

**Abschaltungsmechanismen retroviraler Gensequenzen:
Konstruktion verbesserter Vektoren für die somatische
Gentherapie beim Menschen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Oliver Frank
aus Celle

Hamburg
2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. OSTERTAG

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. O. Abel

Tag der Disputation: 19. Juli 2002

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs. EtOH	reines Ethanol
ADA	Adenosin-Desaminase
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BVDU	Bromvinyl-Desoxyuridin
Ci	Curie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
cpm	„counts per minute“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	„enhanced“ grünes fluoreszierendes Protein
env	Hüllprotein („envelope“)
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMEV	chimäres Virus mit Sequenzen von F-SFFVp und MESV
F-SFFVp	Friend-„Spleen Focus-Forming Virus (polycythemic strain)“
G418	Selektionsmittel Geneticin-Sulfat
gag	Gruppen-spezifisches Antigen
GCV	Ganciclovir
GITC	Guanidin-Isothiocyanat
GPT	Guaninphosphoribosyl-Transferase
GTU	Geneticin Transfereinheit
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit
GvI	Transplantat-gegen-Infektion
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie
GvT	Transplantat-gegen-Tumor
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSV1-Tk	<i>Herpes Simplex</i> Virus 1-Thymidinkinase
IL-1	Interleukin-1
KMT	Knochenmarktransplantation
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LTR	lange terminale Wiederholungen („Long Terminal Repeats“)
MBq	Mega Bequerel
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MESV	murines embryonales Stammzellvirus
Mo3TIN	<u>Mo</u> -MuLV LTR, „Leader <u>3</u> “, HSV1- <u>Tk</u> cDNA, PV <u>IRES</u> , <u>neo</u> ^R
MOI	„multiplicity of infection“

Mo-MuLV	Moloney-Maus Leukämie Virus
MPSV	Myeloproliferatives Sarkomvirus
NCR	negative Kontrollregion
neo ^R	Neomycinresistenzgen
NK	natürliche Killerzellen
PBS	Primer Bindungsstelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PGK	Phosphoglyceratkinase
<i>pol</i>	kodierender Bereich für reverse Transkriptase, Integrase, RNase H
puro ^R	Puromycin-Resistenzgen
RCR	replikationskompetentes Retrovirus
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	„severe combined immunodeficiency disease“
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SU	„surface“
TE	Tris-EDTA
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor Nekrosefaktor
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VSV	vesikuläres Stomatitisvirus
VZV	<i>Varizella zoster</i> Virus

Zusammenfassung

In der somatischen Gentherapie sind Moloney-Mausleukämieviren (Mo-MuLV) abgeleitete Vektorkonstrukte das meistverwendete und bezüglich der Sicherheit und Effizienz am besten charakterisierte System für somatischen Gentransfer. Im Vergleich zu anderen Methoden des Gentransfers bieten Retroviren den Vorteil einer stabilen Expression des Transgens. Allerdings wurden auch bei retroviral eingebrachten Transgenen Verluste der Vektorexpression nachgewiesen.

Suizidgenvektoren werden zur Zeit in der Klinik zur Entfernung solider Tumoren und bei allogener Knochenmarktransplantation im Rahmen der adoptiven Immuntherapie in Immunzellen eingesetzt, um beim Auftreten einer potentiell lebensbedrohlichen Transplantat-gegen-Wirt Krankheit (GvHD) eine gezielte Entfernung alloreaktiver Spenderzellen zu ermöglichen. Im Fall der Inaktivierung der Suizidgenfunktion können die genetisch-modifizierten Zellen jedoch nicht zerstört und die Tumorigenese kontrolliert bzw. die GvHD ursächlich bekämpft werden. Zur weiteren Optimierung der Sicherheit retroviraler Konstrukte wurde in der vorliegenden Arbeit ein klinisch relevanter Suizidgenvektor in T-Zellen auf Verluste der Expression *in vivo* überprüft. Für die Untersuchung hierfür zugrundeliegender Ursachen wurde ein Modell (Maus) entwickelt. Hierbei wurde die Suizidgenfunktion des Vektors zur *in vivo* Entfernung tumorigener T-Zellen und damit Aufhebung der Tumorausbildung benutzt. Im Fall einer nur unvollständigen Entfernung der Vektor-transduzierten Tumorzellen konnten Tumorrezidive innerhalb eines bestimmten Zeitraums nach Selektion nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von Zellklonen innerhalb des hier präsentierten Tumorzell-Transplantationsmodells war es möglich, unterschiedliche Ursachen der Inaktivierung retroviraler Sequenzen zu identifizieren: a) chromosomaler Verlust, b) Exzision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination und c) Löschung der Suizidgenexpression. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal ein *in vivo*-Modell für die Quantifizierung der Frequenzen unterschiedlicher Abschaltungsursachen retroviraler Vektoren vorgestellt. Vorteil des hier etablierten Modells ist, daß aufgrund seiner Sensitivität auch seltene Abschaltungsereignisse nachweisbar sind. Hierdurch konnten die jeweiligen Abschaltungshäufigkeiten zur Bewertung der Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren

quantifiziert werden. Das Modell erlaubt eine Abschätzung der Risiken des Verlusts der Vektorexpression in den beiden derzeitigen klinischen Anwendungsmöglichkeiten. In der Onkologie könnten chromosomale Verluste trotz geringer Mutationsraten aufgrund der häufig festgestellten, genetischen Instabilität von Tumorzellen zu Rezidiven führen. Diese Ursache des Verlusts der Suizidgenexpression sollte bei diploiden T-Zellen, die bei Auftreten einer GvHD entfernt werden sollen, nicht von großer Bedeutung sein. LTR-Rekombination und Löschung wurden in der vorliegenden Arbeit als weitere Ursachen für die Inaktivierung der Vektorfunktion nachgewiesen. Sie traten ebenfalls jeweils mit einer geringen Inzidenz auf. Da bei einer Knochenmarktransplantation häufig nur geringe Mengen von T-Zellen (etwa 1×10^5) kotransplantiert werden, sollte eine selektive *in vivo* T-Zelldepletion ausreichen, um die Anzahl immunogener T-Zellen unter den für die GvHD kritischen Schwellenwert zu reduzieren. Insofern ist die Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren hierbei als hoch einzuschätzen.

Ziel weiterer Untersuchungen war die Charakterisierung von *cis*-aktiven Elementen, die eine dauerhafte Expression retroviraler Vektoren in humanen T-Zellen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die Expression von zwei Vektoren mit unterschiedlichen, intern im Vektorgenom gelegenen, Promotoren (CMV *versus* PGK) *in vitro* miteinander verglichen. Hierbei wies das Vektorkonstrukt mit dem CMV-Promotor eine deutlich stabilere Transgenexpression gegenüber dem Konstrukt mit dem PGK-Promotor auf.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Aufbau der Retroviren	2
1.1.2 Replikationszyklus von Retroviren	3
1.1.3 Retrovirale Vektoren und Verpackungszelllinien	4
1.2 Das hämatopoetische System	5
1.3 Linienspezifische Expression retroviraler Vektoren	6
1.4 Adoptive Immuntherapie	8
1.4.1 Suizidgenstrategien: Wirkungsweise und Anwendung in der Klinik	10
1.5 Somatische Gentherapie mit Retroviren -Erfolge und Rückschläge	12
1.6 Transplantationsmodelle	13
1.7 Aufgabenstellung	15
 2. Material und Methoden	 17
2.1 Material	17
2.1.1 Mikrobiologie	17
2.1.1.1 Bakterienstämme	17
2.1.1.2 Kulturmedien	17
2.1.1.3 Plasmide und retrovirale Vektoren	18
2.1.2 Molekularbiologie	20
2.1.2.1 Enzyme	20
2.1.2.2 Membranen und Röntgenfilme	20
2.1.3 Zellkultur	21
2.1.3.1 Zelllinien	21
2.1.3.2 Zellkulturmedien und Puffer	22
2.1.4 Tierhaltung	23
2.1.4.1 Benutzte Mausstämme	23

2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	23
2.2.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.1.3 DNA-Sequenzierung	25
2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	25
2.2.1.5 Southern Blot-Analyse genomischer DNA nach enzym. Restriktion	26
2.2.1.6 Hybridisierung von Southern Blot-Membranen mit radioaktiv-markierten DNA-Fragmenten	27
2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.1.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	29
2.2.1.9 cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)	30
2.2.2 Zellbiologische Methoden	30
2.2.2.1 Herstellung transientvirusproduzierender Verpackungszelllinien	30
2.2.2.2 Titration retroviraler Überstände	31
2.2.2.3 Stabile Transduktion von T-Zelllinien	32
2.2.2.4 Durchflußzytometrische Analyse eGFP-exprimierender Zellen	33
2.2.2.5 Anreicherung vektortragender Zellen	34
2.2.2.6 Klonierung von Zellen	35
2.2.2.7 [³ H]-Thymidin-Proliferationsanalyse	36
2.2.2.8 Negativ-Selektion HSV1-Tk Gen-transduzierter Zellen <i>in vitro</i>	36
2.2.2.9 Kultivierung reisolierter EL4-Tumorzellen	37
2.2.2.10 Markierung von Zellen durch Antikörperbindung	37
2.2.3 Tierexperimentelle Methoden	38
2.2.3.1 Transplantation von Zellen	38
2.2.3.2 Verabreichung von Ganciclovir	39
3. Ergebnisse	40
3.1 <i>In vitro</i> Analyse des Verlusts der Expression retroviraler Vektoren mit unterschiedlichen internen Promotoren	40
3.1.1 Vektoren mit internen Promotoren	41
3.1.2 Verwendung des eGFP-Reportergens zur Messung der Langzeitexpression	42

3.1.3 Vergleich der Aktivität unterschiedl., interner Promotoren im Vektorgenom	46
3.2 Abschaltungsmechanismen der Expression retroviraler Suizidgenvektoren in T-Zellen im Mausmodell	52
3.2.1 Entwicklung eines Tumorzell-Transplantationsmodells zur Untersuchung der Abschaltung von Suizidgenvektoren	52
3.2.2 Suizidgenvektoren mit HSV1-Thymidinkinasegen, die zur Expressionsanalyse <i>in vivo</i> eingesetzt werden	60
3.2.3 Entwicklung, Charakterisierung und <i>in vitro</i> -Funktionsprüfung Suizidgen-tragender T-Zellen	61
3.2.4 Vorversuche zur Transplantation von Vektor-transduzierten EL4-Tumorzellen für die Suizidgentherapie bei Mäusen	76
3.2.5 Wiederauftreten von Tumorwachstum bei zunächst kompletter Tumorregression nach erfolgter Suizidgentherapie	87
3.2.6 Genetische und epigenetische Mechanismen als Ursachen des Verlusts der Vektorexpression	98
4. Diskussion	103
4.1 Wirkung retroviraler <i>cis</i> -Elemente auf die Abschaltung der Vektorexpression	103
4.2 Meßsystem zur Untersuchung der Ursachen und der Frequenz des Verlusts der retroviralen Suizidgenexpression	104
4.3 Abschaltungsmechanismen retroviraler Vektoren	107
4.4 Schlußfolgerung und Ausblick	111
5. Literaturverzeichnis	113

1. Einleitung

Von Retroviren abgeleitete Vektoren werden für den Gentransfer in Eukaryontenzellen erfolgreich eingesetzt. Die retrovirusvermittelte Genexpression wurde bereits experimentell zur Klärung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen, insbesondere der Analyse von Entwicklungsvorgängen, von Zell-Zell-Interaktionen und der Onkogenese eingesetzt (Soriano und Jaenisch, 1986; Laker *et al.*, 1987; Keller und Snodgrass, 1990; Just *et al.*, 1991; Cepko *et al.*, 1993). In neuen Anwendungsgebieten, wie der somatischen Gentherapie (Überblick in Baum *et al.*, 1996), ist häufig eine hohe und langanhaltende Expression des Transgens *in vivo* wünschenswert. Diese Voraussetzung ist allerdings nicht immer erfüllt. Zelluläre Mechanismen verhindern, in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der Zelle, eine hohe Expression.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung von Mechanismen, die zu einer Inaktivierung der Vektorfunktion führen. Außerdem soll die Quantifizierung dieser, dem retroviralen Expressionsverlust zugrundeliegenden, Mechanismen vorgenommen werden. Um die Funktion und Effizienz der retroviralen Suizidgenvektoren *in vivo* zu testen, wurde ein Onkogenese-Testsystem in der Maus etabliert.

1.1 Retroviren

Retrovirale Vektoren repräsentieren gegenwärtig das meistverwendete und bezüglich der Sicherheit und Effizienz am besten charakterisierte System für somatischen Gentransfer (Baum und Ostertag, 1996). Die klassischen retroviralen Vektorsysteme beruhen auf Maus-Leukämieviren (MuLV) und auf von diesen Viren abgeleiteten Formen. In dieser Arbeit wurden Vektoren auf Basis des lymphotropen Moloney-Mausleukämievirus (Mo-MuLV) verwendet. Im Gegensatz zu den ursprünglichen Mausviren sind die meisten abgeleiteten Vektoren aus Gründen der Sicherheit nicht replikationskompetent. Aufgrund geringer Homologie der Vektoren zu humanen, zellulären DNA-Sequenzen ist das Risiko der Entstehung neuer replikationskompetenter Viren minimal (Baum und Ostertag, 1994; Baum *et al.*, 2002). Onkologische Anwendungen zur Transduktion solider Tumoren mit Suizidgenvektoren nutzen die Tatsache, daß MuLV-Retroviren nur sich teilende Zellen

infizieren. Eine genetische Modifikation von hämatopoetischen Vorläuferzellen und T-Lymphozyten *in vivo* ist schwierig, da sich diese Zellen überwiegend nicht im Zellzyklus befinden. Aus diesem Grund erfolgt hierbei der Gentransfer *ex vivo* nach Stimulation der selektierten und angereicherten Zellen.

1.1.1 Aufbau der Retroviren

Retroviren sind RNA-Viren, die über ein DNA-Intermediat replizieren. Als Träger für die Erbinformation enthalten sie zwei identische RNA-Moleküle mit einer Größe von 7-10 kb, die strukturell, mit einer "Capping"-Struktur am 5'-Ende und Polyadenylierung am 3'-Ende, wie zelluläre "messenger" RNAs (mRNAs) aufgebaut sind (Kung *et al.*, 1975; Bender und Davidson, 1976; Dube *et al.*, 1976; Haseltine *et al.*, 1977; Taylor, 1977; Varmus, 1988). Assoziiert mit Nukleoproteinen und spezifischen tRNA-Molekülen als Primer für die Reverse Transkriptase sind sie gemeinsam mit viruskodierten Replikationsenzymen (Reverse Transkriptase, Protease, Integrase) in ein ikosaedrisches Kapsid eingeschlossen. Matrixproteine, als Produkte des-*gag* Gens, umgeben als innere virale Proteinhülle das Kapsid. Außen befindet sich eine Lipid-Doppelmembran mit inserierten Virus-kodierten (*env*-) Glykoproteinen. Diese bestehen aus einer transmembranen Komponente und dem locker aufgesetzten Oberflächenglykoprotein (Gray und Roth, 1993). Die extrazelluläre Domäne vermittelt die Wirtsspezifität der Retroviren (Kozak *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1993; Baum *et al.*, 2002), indem es an spezifischen Rezeptoren in der Membran der Wirtszelle haftet (Albritton *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1989).

Das RNA-Genom besitzt strukturelle Modifikationen mit einer "Capping"-Struktur am 5'-Ende und Polyadenylierung am 3'-Ende, die für zelluläre mRNAs charakteristisch sind. Das Genom replikationskompetenter Maus-Retroviren ist in der Regel nach folgendem Muster aufgebaut:

5' cap-R-U5-PBS-ψ-----*gag*----*pol*----*env*-----U3-R-poly (A) 3'

Terminal befinden sich redundante (R) Regionen, denen bei der reversen Transkription eine entscheidende Rolle zukommt. Die U5-Region (U="unique") wird durch die

flankierende Sequenz R und die Primer Bindungsstelle (PBS) begrenzt. Funktionell wird sie für die Verpackung, sowie die Initiation der reversen Transkription benötigt. Die PBS besteht aus einer Erkennungssequenz für spezifische tRNA-Moleküle, die als Primer für die Reverse Transkriptase fungieren. Zwischen der PBS und dem Start-Codon für das virale *gag*-Gen befindet sich, in einem als "Leader" bezeichneten Abschnitt, das Verpackungssignal ψ (Alford *et al.*, 1991). Im Fall des Mo-MuLV Genoms erstreckt es sich bis in das *gag* Gen hinein (Bender *et al.*, 1987). Die U3-Region bildet den späteren 5'-Abschnitt der "Long Terminal Repeats" (LTRs; siehe Kap. 1.1.2) und enthält als DNA-Sequenz Elemente zur Kontrolle der Transkription.

Die zwischen den LTRs liegenden Gene kodieren für die viralen Proteine *gag*, *pol* und *env*. Das Gruppen-spezifische Antigen (*gag*) kodiert für Vorläufer der Nukleoproteine, des Kapsids und der Matrix. Das sich anschließende *pol*-Gen beinhaltet die genetische Information zur Bildung der folgenden Replikationsenzyme: Protease, Reverse Transkriptase mit RNase H Aktivität und Integrase (DNA-Endonuklease). Wie bereits erwähnt, kodiert die *env*-Region das glykosylierte Hüllprotein (Gray und Roth, 1993).

1.1.2 Replikationszyklus von Retroviren

Durch die extrazelluläre Domäne (SU-Untereinheit; SU="surface") des Env-Proteins stellen retrovirale Partikel den spezifischen Kontakt zur Zielzelle her. Nach der Fusion viraler und zellulärer Membranen erfolgt anschließend die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Zelle (Hunter und Swanstrom, 1990). Hier findet nun die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA statt (Coffin, 1996). Durch diesen Prozeß wird ein einzelnes virales DNA-Molekül mit zwei vollständigen LTRs generiert. Die LTRs entstehen durch Verdopplung der U3- und U5-Regionen des RNA-Genoms und haben die typische Struktur 5'-U3-R-U5-3' (Ramsey und Panganiban, 1993). Für den Kerntransport der mit Nukleokapsidproteinen als Komplex vorliegenden proviralen DNA ist die Auflösung der Kernmembran während der Mitose notwendig (Miller *et al.*, 1990; Roe *et al.*, 1993). Die Integration der linearen DNA in das zelluläre Genom wird von der Integrase katalysiert. Diese erfolgt im Hinblick auf die Position im Wirtsgenom sequenzunabhängig (Shimotohno und Temin, 1980) und zufällig (Withers-Ward *et al.*, 1994), allerdings mit Präferenz für offene Chromatinbereiche (Rohdewohld *et*

al., 1987; Schulz *et al.*, 1987; Mooslehner *et al.*, 1990; Scherdin *et al.*, 1990). Nach Integration kann das Provirus als äußerst stabil angesehen werden. Die Transkription des integrierten Provirus wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II vermittelt. Die entstehenden mRNA-Moleküle können im folgenden entweder als Matrize für die Translation der retroviralen Proteine genutzt oder als RNA-Genom in neue Viruspartikel verpackt werden. Das Matrixprotein interagiert im letzteren Fall mit der inneren Oberfläche der Zytoplasmamembran und vermittelt schließlich die Knospung des Virus (Kräusslich und Welker, 1996). Bis zur völligen Reifung finden auch nach der Freisetzung zusätzliche Prozesse in den Virionen statt (Einfeld, 1996).

1.1.3 Retrovirale Vektoren und Verpackungszelllinien

Retroviren sind als Vektorsysteme besonders geeignet, da eine strikte räumliche Trennung von *cis*-aktiven Sequenzen für die Virusreplikation und viruskodierten, *trans*-aktiven Sequenzen (*gag*, *pol*, *env*) vorgenommen werden kann, ohne die Fähigkeit zur Verpackung des RNA-Genoms, der Infektion, der reversen Transkription und der proviralen Integration wesentlich zu beeinflussen (Tabin *et al.*, 1982). Durch Insertion von Fremd-DNA an Stelle der entfernten in *trans*-wirkenden Elemente entsteht ein retroviraler Vektor. Für eine effiziente reverse Transkription und Verpackung der Vektoren sind das retrovirale Verpackungssignal und die PBS notwendig. Für die Herstellung infektiöser, replikations-inkompetenter Vektorpartikel müssen die Proteine für die Verpackung in *trans* zur Verfügung gestellt werden. Um sogenannte Verpackungszelllinien zu generieren, werden z.B. Fibroblastenzelllinien mit entsprechenden Expressionsplasmiden für die Verpackungsproteine transfiziert (Miller, 1990). Um die unerwünschte Entstehung replikations-kompetenter Retroviren (RCRs) zu minimieren, enthalten moderne Verpackungszelllinien zumindest zwei Expressionskonstrukte für virale Gene, bei denen das eine für *gag-pol*- und das andere für *env*-Gene kodiert (Miller, 1990). In diesem System sind mindestens drei Rekombinationsereignisse erforderlich, damit ein RCR entstehen kann (Markowitz *et al.*, 1988). Durch Transfektion oder Transduktion wird der retrovirale Vektor in die zelluläre DNA der Verpackungszelllinie eingebracht. Die transkribierte virale RNA wird zu Virionen verpackt. Die freigesetzten, reifen Virionen sind in der Lage, bestimmte Zellen zu infizieren und als Provirus in das Wirtszellgenom zu integrieren.

Aufgrund des Fehlens der retroviralen Genprodukte sind sie jedoch nicht in der Lage, einen erneuten Replikationszyklus zu durchlaufen und die Zelle wieder zu verlassen.

1.2 Das hämatopoetische System

Retrovirale Vektoren sind in der Lage, verschiedene humane Zellen, darunter lymphoide und myeloide, sowie deren Vorläufer, zu infizieren und eine linienspezifische Expression zu vermitteln (siehe Kap. 1.3). Nach der Infektion inseriert das Virus stabil in das zelluläre Genom der Wirtszelle. Aufgrund der genannten Eigenschaften eignen sich retrovirale Vektoren hervorragend für die somatische Gentherapie hämatopoetischer Zellen. Aus Gründen der Sicherheit und Effizienz wird der Gentransfer in diese Zellen *ex vivo* durchgeführt. Durch diese Methode ist die Einstellung definierter Infektionsbedingungen für die Transduktion hämatopoetischer Zellen möglich.

Den zellulären Blutbestandteilen lassen sich verschiedene Funktionen im Bereich der Atmung, des Transportes und der Immunabwehr zuordnen. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer dieser terminal differenzierten Zellen müssen diese kontinuierlich nachgebildet werden. Diese Aufgabe wird von hämatopoetischen Stammzellen übernommen. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sich selbst erneuern und alle anderen Blutzelllinien generieren zu können. Als Hämatopoese wird der Prozeß bezeichnet, bei dem eine Blutzelle durch zellspezifische Genexpression einen spezifischen Phänotyp erwirbt (Shivdasani und Orkin, 1996). Die Entwicklung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle zur reifen ausdifferenzierten Blutzelle erfolgt über multipotente und unipotente Vorläuferstufen und läßt sich als Hierarchie von Zelllinien darstellen (Abb. 1, S. 6). Im Rahmen dieses Prozesses nimmt das Differenzierungspotential und die Proliferationsfähigkeit der Zellen zunehmend ab. Die Unterscheidung der verschiedenen Zelllinien erfolgt aufgrund unterschiedlicher Gesichtspunkte, wie morphologische Eigenschaften, Oberflächen-Antigene, Vorkommen bestimmter Enzyme, sowie dem differentiellen Expressionsmuster der Zellen für spezielle Gene.

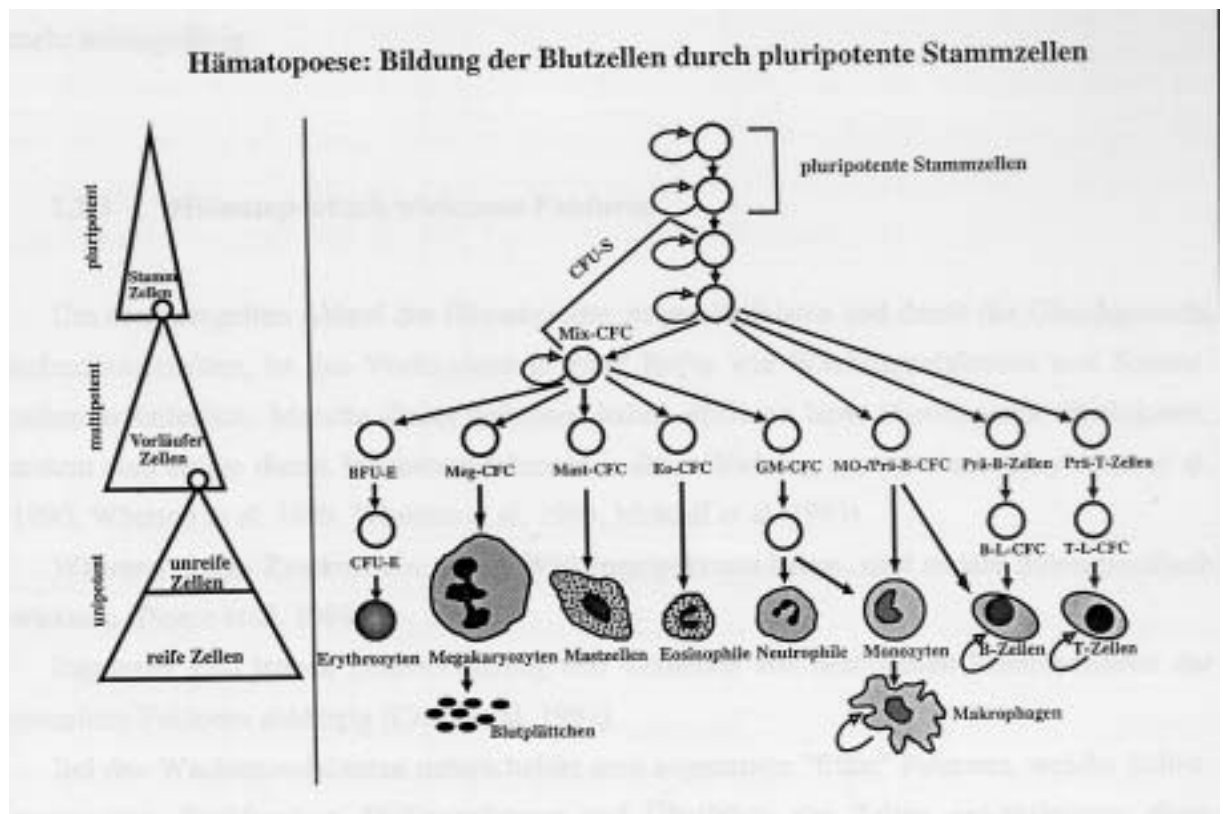


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (nach Stocking und Ostertag, 1990)

1.3 Linienspezifische Expression retroviraler Vektoren

Die linienspezifische Expression retroviraler Vektoren innerhalb der Hämatopoese wird maßgeblich durch die Zusammensetzung der im Vektor befindlichen *cis*-aktiven Elemente determiniert. Von Bedeutung sind die in den retroviralen Enhancern befindlichen Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren, die bei Differenzierungsprozessen in den betreffenden Zielzellpopulationen beteiligt sind. Außerdem spielen Sequenzen der PBS eine Rolle. Sie besitzen Funktionen bei der Replikation und bei der Kontrolle auf Ebene der Transkription.

Für den Mo-MuLV sowie andere murine Retroviren wurde gezeigt, daß ihre Expression in undifferenzierten, embryonalen Zellen und hämatopoetischen Stammzellen unterdrückt wird (Jähner *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1982; Challita und Kohn, 1994; Laker *et al.*, 1998; Übersichtsartikel: Stocking *et al.*, 1993). Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen nicht ausreichend mit Faktoren zur Aktivierung der Transkription ausgestattet

sind oder Repressorproteine für die retroviralen Enhancer exprimieren (Baum *et al.*, 1995). Mutationen können Bindungsstellen für putative Repressormoleküle zerstören bzw. solche für Transkriptionsaktivatoren erst generieren, wie es z.B. bei der Entstehung des Myeloproliferativen Sarkomvirus (MPSV) der Fall war. Konsequenz war eine im Vergleich zum Mo-MuLV verbesserte Expression der MPSV abgeleiteten Vektoren in undifferenzierten hämatopoetischen Zellen (Franz *et al.*, 1986). Durch eine der charakterisierten Punktmutationen im LTR-Bereich wurde eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 erzeugt (Stocking *et al.*, 1985 und 1986; Grez *et al.*, 1991). Dieser Faktor ist ein wichtiger Transkriptionsregulator in hämatopoetischen Zellen (Shivdasani und Orkin, 1996). Weitere Modifikationen in Enhancerregionen und der PBS ermöglichten die Isolierung des murinen embryonalen Stammzellvirus -MESV- (Franz *et al.*, 1986; Hilberg *et al.*, 1987; Grez *et al.*, 1990), das in undifferenzierten, embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Grez *et al.*, 1990; Baum *et al.*, 1995). Durch Kombination von Sequenzen aus "Friend-Spleen Focus-Forming Virus" (F-SFFVp) und MESV war eine Erweiterung des Wirtsspektrums möglich. Vektoren aus dem hieraus resultierenden FMEV (F-SFFVp/MESV) vermittelten zusätzlich eine Transgenexpression in myelo-erythroiden Vorläuferzellen und Lymphozyten (Pawliuk *et al.*, 1997). Dennoch wurde weiterhin das Auftreten transkriptioneller Repression festgestellt (Laker *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 1999).

Neben der negativ regulatorischen Wirkung von in *trans*-wirkenden Faktoren auf die Transkription wurden weitere Mechanismen identifiziert, die an der Repression der viralen Expression beteiligt sind. Festgestellt wurde dabei eine Korrelation zwischen Methylierung und Expressionsverlust des Provirus. Hierbei können jedoch je nach Differenzierungsstadium der Zellen unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen. In undifferenzierten, nicht-permissiven Zellen steht die *de novo* Methylierung im Zusammenhang mit der Abschaltung retroviraler Sequenzen (Stewart *et al.*, 1982; Jähner *et al.*, 1982). Allerdings besitzt sie hierbei vermutlich nur eine unterstützende Funktion, da sie nach erfolgter Löschung zeitlich verzögert eintritt (Niwa *et al.*, 1983; Kempner *et al.*, 1993). Bei bereits differenzierten, für retrovirale Expression permissiven Zellen (Asche *et al.*, 1984; Seliger *et al.*, 1986; Laker *et al.*, 1998) wird angenommen, daß die Methylierung eine der Ursachen für die stillgelegte Expression ist.

Unabhängig von der Zelllinie und dem Differenzierungsstadium kann außerdem die räumliche Struktur, der den Integrationsort flankierenden Genomsequenzen, die virale Expression beeinflussen (Sorge *et al.*, 1984; Taketo *et al.*, 1985; Phi-Van *et al.*, 1990; Hoebe *et al.*, 1991). Zum Schutz vor diesen negativ regulatorischen Einflüssen aus dem zellulären Chromatin wurden erfolgreich sogenannte Insulatorelemente in Retroviren eingebaut (Dang *et al.*, 2000).

1.4 Adoptive Immuntherapie

Adoptive Immuntherapie bezeichnet eine Therapieform, bei der Immunzellen von einem Spender auf einen Patienten transplantiert werden. Aufgrund der potenten Wirkung von Donor T-Zellen auf die vom Immunsystem des Patienten nicht erkannten, verbliebenen Krebszellen kommt diese Therapie mittlerweile routinemäßig bei bestimmten Krebsarten zur Anwendung. Die Reaktivität des Transplantats gegenüber den Leukämie-/Tumorzellen wird als GvL/GvT-Effekt bezeichnet.

Mit Hilfe von Tiermodellen (Maus) wurde gezeigt, daß immunkompetente Zellen Hauptmediatoren dieses Effekts sind (Bortin *et al.*, 1979; Truitt und Atasoylu, 1991; Weiss *et al.*, 1990; Rocha *et al.*, 1997). Im humanen System sind jedoch weder der Mechanismus noch die den Effekt verursachenden Mediatoren und Zielstrukturen geklärt. Wahrscheinlich sind alloreaktive Zellen und schwache Histokompatibilitätskomplex (Nebenlocus)-Antigene beteiligt, da GvHD und GvL korreliert auftreten (Sosman und Sondel, 1993; Soiffer, 1997). In diesem Zusammenhang werden auch NK (natürliche Killer)-Zellen, LAK (Lymphokin-aktivierte Killer)-Zellen (Horowitz *et al.*, 1990; Drobyski *et al.*, 1990; Charak *et al.*, 1992), Monozyten, andere mononukleäre Zellen und Lymphokine (Porter *et al.*, 1994) diskutiert. Indirekte Hinweise geben Rückschluß auf das Vorhandensein des GvL-Effekts. Nach allogener Transplantation hatten Patienten mit einer milden bis moderaten GvHD ein geringeres Rezidivrisiko im Vergleich zu solchen, die keine GvHD aufwiesen (Weiden *et al.*, 1981a und 1981b). Die Rezidivrate bei syngener Transplantation zwischen Zwillingspaaren, die keine GvHD entwickelten, war bedeutend größer als bei allogener Transplantation zwischen nahe verwandeten Spendern (Horowitz *et al.*, 1990; Gale und Champlin, 1984; Porter *et al.*, 1994; Gratwohl *et al.*, 1995; Kolb *et al.*, 1995; Collins *et al.*,

1997). Die Annahme einer Korrelation zwischen Alloreaktivität und GvL-Effekt wird dadurch unterstützt, daß eine *ex vivo* T-Zelldepletion von allogenen Spender Knochenmark zwar zum einen die Inzidenz von sowohl akuter als auch chronischer GvHD herabsetzt, zum anderen aber gleichzeitig die Leukämie-Rückfallrate signifikant ansteigen läßt (Marmont *et al.*, 1991). Der erste *direkte* Beweis für einen im Menschen induzierten GvL-Effekt wurde bei Patienten mit CML (chronisch myeloischer Leukämie)-Rezidiv nachgewiesen (Kolb *et al.*, 1990). Hierbei konnte den allogenen, mononukleären Zellen die eindrucksvolle Potenz zugeordnet werden, CML-Zellen *in vivo* zu identifizieren und zu zerstören.

Die adoptive Immuntherapie wird seit einigen Jahren bei unterschiedlichen Indikationen erfolgreich eingesetzt. Im Rahmen der Rezidivbehandlung, nach allogener Transplantation, kann bei 50-70% der Patienten mit CML eine komplette Remission bewirkt werden (Giralt *et al.*, 1995; Walther *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1997). Weniger effektiv ist diese Behandlungsform bei Patienten mit anderen hämatologischen Erkrankungen (AML=akute myeloische Leukämie, MDS=myelodysplastisches Syndrom; ALL=akute lymphatische Leukämie) und der anschließenden Rezidivbehandlung (Walther *et al.*, 1996). Um nach allogener Transplantation mit T-Zell-depletiertem Knochenmark das Auftreten einer Rezidivkrankung zu verhindern, wird die Infusion von T-Lymphozyten zur Entfernung residueller Tumorzellen zeitversetzt durchgeführt (Sullivan *et al.*, 1989). Die medikamentös induzierte, schwere Immunsuppression transplantierte Patienten begünstigt das Auftreten viraler Infektionen. Von besonderer Bedeutung für die Morbidität und Mortalität bis zum Tag +100 nach Knochenmarktransplantation (KMT) ist die Zytomegalievirus (CMV)-Infektion (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995). Die Gabe spezifischer, gegen CMV-Strukturproteine gerichtete, CD8⁺ Spender T-Zellklone gilt als vielversprechender Ansatz zur Rekonstitution zellulärer Immunität gegen CMV (Reusser *et al.*, 1991; Schuler und Ehninger, 1992; Walter *et al.*, 1995). Auch zur Bekämpfung Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierter Zellen, die mit dem Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen assoziiert sind, wurde der adoptive Transfer von zytotoxischen T-Zellen beschrieben (Papadopoulos *et al.*, 1994; Rooney *et al.*, 1995; Heslop *et al.*, 1996). Sogar zur Behandlung fortgeschrittener, solider Tumore wurden bereits Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und Lymphokin-aktivierte-Killerzellen

(LAK) eingesetzt. Als Reaktion auf diese Therapieform wurden als Parameter allerdings nur eine kurzzeitige Abnahme des Tumorzvolumens und eine Reduktion der Tumormarker gewertet (Rosenberg *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1993; Boasberg, 1996).

Generell soll die Infusion allogener Spender-Lymphozyten im Rahmen der allogenen Knochenmarktransplantation das Anwachsen des Transplantats begünstigen, den Patienten bis zur Rekonstitution des Immunsystems vor Infektionen schützen (GvI-Effekt) und die Zerstörung residueller Leukämie-/Tumorzellen bewirken (GvL/GvT-Effekt). Allerdings ist diese Therapieform mit Risiken verbunden, neben einer ausgeprägten Panzytopenie ist das Auftreten einer schweren GvHD möglich. Zur Minimierung des GvHD-Risikos, unter gleichzeitiger Erhaltung der geschilderten positiven Effekte, werden unterschiedliche Strategien verfolgt: die Verabreichung von Zytokinantagonisten (Anti-TNF, IL-1-Antagonist u. a.; Piguet *et al.*, 1987; Ferrara *et al.*, 1992), Depletion bestimmter T-Zell-Subtypen (Giralt *et al.*, 1995), Infusion einer begrenzten Anzahl T-Lymphozyten (Giralt *et al.*, 1995) und eine zeitlich versetzte Infusion immunkompetenter Zellen nach erzeugter Toleranz in transplantierten Patienten (Walther *et al.*, 1996). Besonders erfolgreich war die Infusion gentechnisch veränderter T-Zellen (Tiberghien *et al.*, 1994; Bordignon *et al.*, 1995; Bonini *et al.*, 1997). Diese sind mit einem sogenannten Suizidgen ausgestattet, das ihre selektive *in vivo*-Depletion im Fall einer GvHD ermöglicht.

1.4.1 Suizidgenstrategien: Wirkungsweise und Anwendung in der Klinik

Expressionsprodukte von Suizidgenen definieren sich durch ihre Fähigkeit, eine nicht-toxische Vorstufe (Prodroge) in eine zytotoxische Substanz umzuwandeln und dadurch die Apoptose der Zelle einzuleiten.

In der Literatur sind eine Reihe solcher Suizidgen/Prodrogen-Systeme beschrieben, wie z.B. Cytosin-Desaminase/5-Fluorcytosin (Mullen *et al.*, 1992), *Varizella zoster* virus (VZV)-Thymidinkinase/Bromvinyl-Desoxyuridin (BVDU, Grignet-Debrus und Calberg-Bacq, 1997), Guaninphosphoribosyl-Transferase (GPT)/6-Thioguanin und HSV-Tk/GCV (Übersichtsartikel: Dilber und Smith, 1997).

Ursprünglich wurde das Konzept des Suizidgentransfers für die Transduktion von Tumorzellen im Rahmen der Krebstherapie entwickelt (Moolten, 1986; Culver *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 1993; Oldfield *et al.*, 1993). Neben der direkten Entfernung transduzierter Zellen und der Induktion einer Immunantwort nutzt diese Strategie zusätzlich den sogenannten "Bystander"-Effekt. Dieser Effekt beruht auf der Zerstörung benachbarter, untransduzierter Zellen nach Aktivierung des Suizidmechanismus in den transduzierten Zellen. Da dieses Phänomen bevorzugt in soliden Zellverbänden auftritt (Elshami *et al.*, 1996; Hamel *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 1996; Dilber und Smith, 1997; Ishii-Morita *et al.*, 1997), wird angenommen, daß das metabolisierte Medikament auch interzellulär über Zell-Zellverbindungen ("gap junctions") oder Phagozytose übertragen wird. Aus diesem Grund ist der "Bystander"-Effekt von großer klinischer Bedeutung für die Therapie solider Tumore, da diese selbst eine sehr geringe Transduktionseffizienz aufweisen. Bei einer Transduktionsrate von 10 % der Tumorzellen, mit z.B. dem HSV1-Tk Gen, kann bereits ein deutlicher "Bystander"-Effekt hervorgerufen und eine Reduktion des Tumolvolumens bewirkt werden (Freeman *et al.*, 1993).

Einer der ersten gentherapeutischen Ansätze in der Onkologie war die Herstellung modifizierter Tumorzellen, die das HSV1-Tk Gen enthielten. Durch Behandlung mit Ganciclovir (GCV) konnten Mäuse komplett von diesen Zellen hervorgerufenen Tumoren geheilt werden (Moolten *et al.*, 1986). GCV gehört zur Gruppe der Nukleosid-Analoga. Die Enzymaktivität der viralen HSV1-Tk setzt eine Kaskade von Phosphorylierungen von GCV in Gang. Das Produkt GCV-Triphosphat inhibiert zum einen direkt die DNA-Polymerase, zum anderen führt sein Einbau anstelle von dGTP zum DNA-Kettenabbruch, der einen Wachstumstillstand der Zelle bewirkt und anschließend die Apoptose einleitet (siehe Kap. 3.2.1: Abb. 10). Da die HSV1-Tk eine bis zu 1000-fach höhere Affinität als entsprechende zelluläre Kinasen zu GCV aufweist, und damit die Wirkstoffkonzentration in den infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten deutlich erhöht ist, kann eine therapeutische Dosis gewählt werden, bei der die toxischen Nebenwirkungen sehr begrenzt sind (Freeman und Gardiner, 1996).

1.5 Somatische Gentherapie mit Retroviren -Erfolge und Rückschläge

Die somatische Gentherapie ist eine der großen medizinischen Herausforderungen unserer Zeit. Ursprünglich entwickelt wurde sie zur Behandlung von Patienten mit monogenen Erbkrankungen. Der Zuwachs an wissenschaftlichen Erkenntnissen in der molekularen Genetik, im besonderen die kürzliche Aufklärung der menschlichen Genomsequenzen, rückt die multifaktoriellen Erkrankungen zunehmend in den Mittelpunkt der gentherapeutischen Anwendungsstrategien (Überblick bei Verma und Somia, 1997). Allerdings benötigt auch die somatische Gentherapie Zeit, sich zu entwickeln, wie dieses auch bei neuen Technologien in anderen Feldern der Medizin ist. Die Hauptprobleme liegen derzeit vor allem in unzureichenden Gentransferraten und der z.T. instabilen Expression der applizierten DNA-Sequenzen. Eine Abschaltung der Vektorexpression könnte in der adoptiven Immuntherapie fatale Folgen nachsichziehen. Bei Auftreten von GvHD wäre eine Depletion Suizidgen-transduzierter, alloreaktiver T-Lymphozyten nach GCV-Gabe nicht mehr möglich. Dieses wurde bereits bei einer klinischen Studie im Fall eines Patienten berichtet (Bonini *et al.*, 1997; Verzeletti *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bewertung der Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren ein Mausmodell etabliert, das die Aufklärung der Ursachen gestattet, die zu einer Inaktivierung der Vektorfunktion führen. Desweiteren ermöglicht dieses Modell die Quantifizierung der Häufigkeiten der zugrundeliegenden Abschaltungsmechanismen.

Retroviren zeichnen sich dadurch aus, daß sie a) stabil in das Wirtsgenom ihrer Zielzellen integrieren und b) eine stabile Expression inserierter Transgene relativ zu anderen DNA-Gentransfermethoden ermöglichen. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften erscheinen sie prädestiniert für die dauerhafte Korrektur erblicher, monogenetischer Erkrankungen. So wurde zur Unterstützung der konventionellen Therapie die erste gentherapeutische Studie 1990 im Rahmen der Behandlung einer durch Adenosin Desaminase (ADA)-Defizienz hervorgerufenen Immundefizienz-Krankheit (SCID= "severe combined immunodeficiency disease") durchgeführt (Blaese und Anderson, 1990; Überblick bei Weinberg und Kohn, 1998). Die Transduktion ADA-Sequenz tragender Vektoren fand hierbei in T-

Lymphozyten *ex vivo* statt und die Infusion Gen-korrigierter T-Zellen mußte von Zeit zu Zeit wiederholt werden. Generell wünschenswert ist allerdings eine dauerhafte Korrektur nach einmaliger Therapie. In darauffolgenden Studien wurde zu diesem Zweck versucht, die ADA-Sequenz als Transgen in hämatopoetische Stammzellen (HSC) einzubringen, welche zum einen die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen und zum anderen in sämtliche Linien des hämatopoetischen Systems differenzieren können. Leider zeigte sich, daß die Gentransferraten zu gering waren, um einen dauerhaften therapeutischen Effekt zu erzielen. Durch Verbesserungen der Kultivierungs- und Transduktionsbedingungen (Murray *et al.*, 1999; Fehse *et al.*, 1998; Cosset *et al.*, 1995; Bayle *et al.*, 1993) konnten höhere Gentransferraten erzielt werden. Die erfolgreiche, retroviral vermittelte Gentherapie einer X-Chromosom gekoppelten Form von SCID (SCID-X1) wurde kürzlich publiziert (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich somit um das Beispiel in der somatischen Gentherapie überhaupt. Diese Form der SCID-Krankheit wird auf eine Mutation im kodierenden Bereich für die γ c-Untereinheit bestimmter Zytokinrezeptoren zurückgeführt. Zusätzlich zu den bereits geschilderten Erfolgen wurden auch Fortschritte in der Behandlung von Hämophilie (Kay *et al.*, 2000; Überblick in Walsh, 2002), Thrombophilie (Chen *et al.*, 1999) und der Angiogenese zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen (Losordo *et al.*, 2002; Isner und Asahara, 1999) gemacht. Bei diesen Therapieansätzen wird die Funktion mutierter Gensequenzen im Patienten durch das Einbringen der korrigierten Transkriptionseinheiten unterstützt bzw. gänzlich wiederhergestellt. Allerdings werden erst Langzeitstudien zeigen, ob die Vektor-induzierte Expression des eingebrachten therapeutischen Gens dauerhaft stabil ist.

1.6 Transplantationsmodelle

Der folgende Abschnitt befaßt sich mit Transplantationsmodellen für die Suizidgentherapie. In der Literatur ist ein Vielzahl von Tiermodellen beschrieben, bei denen im Rahmen einer Krebstherapie verschiedenste Tumorarten mit Hilfe von Suizidgenanwendungen (Moolten, 1986) behandelt wurden. Hierbei kamen sowohl virale als auch nicht-virale Vektorsysteme zum Einsatz (Übersichtsartikel: Liu und Huang, 2002; Lipps und Bode, 2001). Bei der vorliegenden Arbeit sind nur relevante Studien aufgeführt, bei denen retrovirale Vektorsysteme mit dem Suizidgen HSV-Tk genutzt wurden. Die

Transduktion der Tumorzellen fand in den beschriebenen Studien entweder *in vitro* oder *in vivo* statt. In letzterem Fall wurden hierfür Vektor-produzierende Zellen bzw. retrovirale Überstände benutzt (Smiley *et al.*, 1997).

Bei den Studien finden sich u.a. Ansätze zur Behandlung von Brustkrebs (Paquin *et al.*, 2001), Thyroidkarzinomen (Nishihara *et al.*, 1997; Braiden *et al.*, 1998), Nierenzellkarzinomen (Yamamoto *et al.*, 1997; Pulkkanen *et al.*, 2001), Colo-rektalen Tumoren (Howard *et al.*, 1999), Hirntumoren (Takamiya *et al.*, 1993), Colon-Adenokarzinomen, hepatischen Metastasen und malignen Melanomen (Klatzmann, 1996).

Die meisten Modelle mit murinen Suizidgen-tragenden Lymphozyten wurden mit HSV-Tk transgenen Mäusen durchgeführt (Moolten *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1997; Helene *et al.*, 1997; Drobyski *et al.*, 1999; Ritchey und DiPersio, 1999). Ein Vorteil des transgenen Modellsystems ist die einfache Gewinnung der HSV-Tk tragenden T-Zellen, so daß die Transplantationsbedingungen gut getestet werden können. Da die T-Lymphozyten der transgenen Tiere keine *ex vivo* Kultivierungs-, Stimulations-, Selektions- sowie Expansionsphasen durchlaufen, ist es fraglich, ob sie sich vergleichbar zu *ex vivo* retroviral transduzierten T-Lymphozyten verhalten. Im Gegensatz zu den komplexen und aufwendigen Transplantationsmodellen bietet das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell die Möglichkeit, innerhalb eines kurzen Zeitraums relativ einfach unterschiedliche retrovirale Vektoren auszutesten. Bei dem in der Literatur bisher einzigen Mausmodell mit *ex vivo* transduzierten T-Lymphozyten wurde die Verwendbarkeit der Suizidgen-transduzierten Zellen zur Modulation der GvHD getestet (Kornblau *et al.*, 2001). Die in den Tieren zuvor manifestierte GvHD wurde tatsächlich nach GCV-Gabe aufgehoben. Interessanterweise fanden sich im peripheren Blut dennoch Markergen-exprimierende T-Lymphozyten, was nach Meinung der auszuführenden Arbeitsgruppe auf selektive Entfernung aktivierter GvHD-produzierender Zellen zurückzuführen ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Sensitivität bestimmter T-Zellen gegenüber GCV zumindest teilweise verringert hat. Ursachen könnten die Inaktivierung (Emerman und Temin, 1984) oder der Verlust des Suizidgens sein. Um Aussagen über Mechanismen und Inzidenzen von Abschaltungsereignissen retroviraler Suizidgenvektoren in T-Zellen treffen zu können, wurden in den hier vorgestellten Analysen mit tumorigenen T-

Zellklonen mit jeweils einer Vektorkopie gearbeitet. Durch die Verwendung der Klone war es möglich neben Abschaltungsereignissen, die in heteroploiden Zellen häufig auch auf chromosomale Verluste zurückzuführen sind, die Löschung der Vektorexpression zu untersuchen. Dieses ist in der hier vorgestellten Arbeit erstmals geglückt.

1. 7 Aufgabenstellung

Bis zum derzeitigen Zeitpunkt wurden retrovirale Vektoren erst sehr vereinzelt erfolgreich in gentherapeutischen Anwendungen verwendet (siehe Kap. 1.5). Die therapeutischen Effekte in den geschilderten Studien konnten erst durch Erhöhung der Gentransferraten des applizierten Transgens erzielt werden. Entscheidend für eine dauerhafte Heilung ist allerdings auch eine langanhaltende Expression des retroviralen Vektors. Der spontane Verlust der retroviralen Expression stellt allgemein jedoch eine Barriere für die therapeutische Nutzung von Retroviren als Gefahren dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden diejenigen Mechanismen analysiert, welche zum Verlust der Suizidgenfunktion bzw. der Funktion des Vektors führten. Aufgrund der geplanten klinischen Verwendung des Suizidgenvektors (Mo3TIN) im Rahmen der adoptiven Immuntherapie wurde seine Expression in T-Zellen *in vitro* und *in vivo* getestet. Für die *in vivo*-Analyse der Vektorfunktion wurde ein Onkogenese-Testsystem der Maus etabliert, das durch die Verwendung unabhängiger Zellklone mit jeweils einer Vektorintegration die Aufklärung von Ursachen des Verlusts der retroviralen Expression ermöglichen sollte, da Veränderungen im Genotyp eindeutig festgestellt werden können. Aufgrund des bekanntermaßen aggressiven Tumorwachstums der verwendeten EL4-Zellen sollten auch sehr seltene Abschaltungen sichtbar werden. Somit kann eine Quantifizierung des Expressionsverlustes der Transgenexpression vorgenommen werden. Hieraus ergibt sich, ob und in welcher Höhe ein durch Expressionsverlust von Vektoren bedingtes Risiko für gentherapeutische Anwendungen besteht. Ziel der Entwicklung des hier vorgestellten Modells war, eine schnelle, einfache und systematische Funktionsuntersuchung unterschiedlicher retroviraler Suizidgenvektoren für die somatische Gentherapie *in vivo* zu ermöglichen. Aus den hier erzielten Ergebnissen sollten sich somit wichtige Implikationen

für die Anwendung von Vektoren zur Behandlung der GvHD und zur Suizidgentherapie solider Tumoren ergeben.

In einem weiteren Testsystem sollten Vektoren mit ausreichend hoher und vor allem langanhaltender Expression in humanen T-Zellen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression von zwei retroviralen Vektoren mit jeweils unterschiedlichen internen Promotoren (viral *versus* eukaryontisch) in Langzeituntersuchungen *in vitro* miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Biochrom (Berlin), Biomol (Hamburg), Roche (Mannheim), Difco-Laboratories (Hamburg), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), neoLab (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg), Roche (Grenzach-Wyhlen), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. In den Fällen, in denen eine besondere Qualität bezüglich der Reinheit erforderlich war, ist dieses gesondert vermerkt. Ansonsten wurden die handelsüblichen Standardqualitäten eingesetzt. α -[^{32}P]-markierte Radionukleotide wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig), Methyl-[^3H]-Thymidin von der Firma ICN Biochemicals GmbH (Eschwege) bezogen.

2.1.1 Mikrobiologie

2.1.1.1 Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifikation der Plasmide wurden die Bakterienstämme *E.coli* Top10 (Invitrogen, Paisley, U.K.), MAX EFFICIENCY STBL2™ (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) -Derivat des Stammes JM 109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)- und CMK 603 -Derivat des Stammes 600 (Appleyard, 1954)- eingesetzt. Die Lagerung, Anzucht, Expansion und Herstellung von kompetenten Bakterien zur Transformation mit Plasmiden erfolgte nach den allgemein üblichen Protokollen (Ausubel *et al.*, 2001; Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.1.2 Kulturmedien

Zur Anzucht von Bakterien wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Dieses setzt sich aus 1 % (w/v) Bacto™-Trypton (Difco-Laboratories, Hamburg), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Difco-Laboratories, Hamburg) und 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,4 zusammen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem LB-Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 ng/ml zugesetzt.

Zur Herstellung von festen Nährmedien für Petrischalen wurde das LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto™-Agar (Difco-Laboratories, Hamburg) versetzt. Entsprechend wurde bei der Herstellung von Selektionsplatten dem LB-Agarmedium vor dem Ausplattieren 100 ng/ml Ampicillin zugesetzt.

2.1.1.3 Plasmide und retrovirale Vektoren

Nachfolgend sind die für die experimentellen Arbeiten verwendeten DNA-Plasmide aufgeführt. In Klammern ist die laborinterne Nomenklatur dargestellt.

pPNT (#326)	Plasmid beinhaltet die Sequenz für den murinen Phosphoglyzeratkinase-Promotor (überlassen von C. Paszty, Berkeley, CA)
pMo/MP-CGa	Vektorplasmid mit Promotor-Markergen-Cassette (IE94 Promotor des humanen Zytomegalievirus und "N1-enhanced green fluorescent protein"-Sequenz) in gegensinniger Orientierung zur Transkriptionrichtung des retroviralen LTR (Schwieger, 2000)
pMo3TIN (MH 73)	Suizidgenvektor zur Koexpression des HSV1-Tk- und neo ^R -Gens (überlassen von M. Hildinger und C. Baum, HPI, Hamburg)
pMo3N (9451)	Kontrollvektor zu pMo3TIN ohne Suizidgen (Hildinger <i>et al.</i> , 1998; überlassen von C. Baum, HPI, Hamburg)
M4	Expressionsplasmid für das VSV-G Protein (überlassen von M. Donath und J. Kruppa, Institut für Physiologische Chemie, UKE, Hamburg)
M57	Koexpressionsplasmid für <i>gag</i> und <i>pol</i> Proteine (überlassen von M.-D. von Laer, HPI, Hamburg)

K73 (#522) Plasmid mit EF1 α -Promotor/*eco-env*/IRES/puro^R (Morita *et al.*, 2000, überlassen von T. Kitamura, Tokyo, Japan)

Die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren sind in Abb. 2 (S. 20) schematisch dargestellt. Für den Vergleich der eGFP-Langzeitexpression *in vitro* wurden zwei Konstrukte hergestellt, die sich in ihren internen Promotoren (humaner CMV-Promotor bzw. muriner PGK-Promotor) unterscheiden. Grundgerüst ist das Vektorplasmid pMo/MP, aus dem pMo/MP-CGa hervorging.

Zur Generierung des Plasmidvektors pMo/MP-CG wurde die CMV-Promotor/eGFP-Kassette (1582 bp) aus pMo/MP-CGa mit *NotI* herausgeschnitten. Nach Dephosphorylierung der *NotI*-geschnittenen Enden des Vektorgrundgerüsts wurde sie erneut in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingesetzt. Die Ligationsprodukte wurden in Bakterien des Stammes CMK 603 transformiert. Zur Bestimmung der Orientierung wurde die amplifizierte Plasmid-DNA mit *XhoI* gespalten und die Fragmentgrößen auf einem Agarosegel überprüft.

Zur Klonierung des Plasmidvektors pMo/MP-PG wurde die *NotI*-geschnittene CMV-Promotor/eGFP-Kassette mit *NheI* gespalten und das eGFP-Fragment (812 bp) nach Agarosegel-elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel isoliert. Der PGK-Promotor wurde aus dem Ausgangsplasmid pPNT (#326) über PCR-Technik unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase amplifiziert (Bedingungen: 20 Zyklen à 1'/95 °C; 1'/55 °C; 3'/68 °C; Pause 4 °C). Die ausgewählten Primer (PGKP5A: 5'-GCT CGG CGG CCG CTG CAG GTC AAT TC-3'; PGKP3A: 5'-ATA TTG CTA GCA GGT CGA AAG GC-3') generierten am 5'-Ende des Promotors eine *NotI*- und am 3'-Ende eine *NheI*-Schnittstelle. Nach *NotI*-*NheI*-Spaltung wurde das Fragment (528 bp) zusammen mit dem eGFP-Fragment in das *NotI*-geöffnete und dephosphorylierte Vektorgerüst kloniert. Die Orientierung wurde durch *XhoI*-Spaltung amplifizierter Plasmid-DNA bestimmt und die Fragmentgrößen auf einem Agarosegel überprüft.

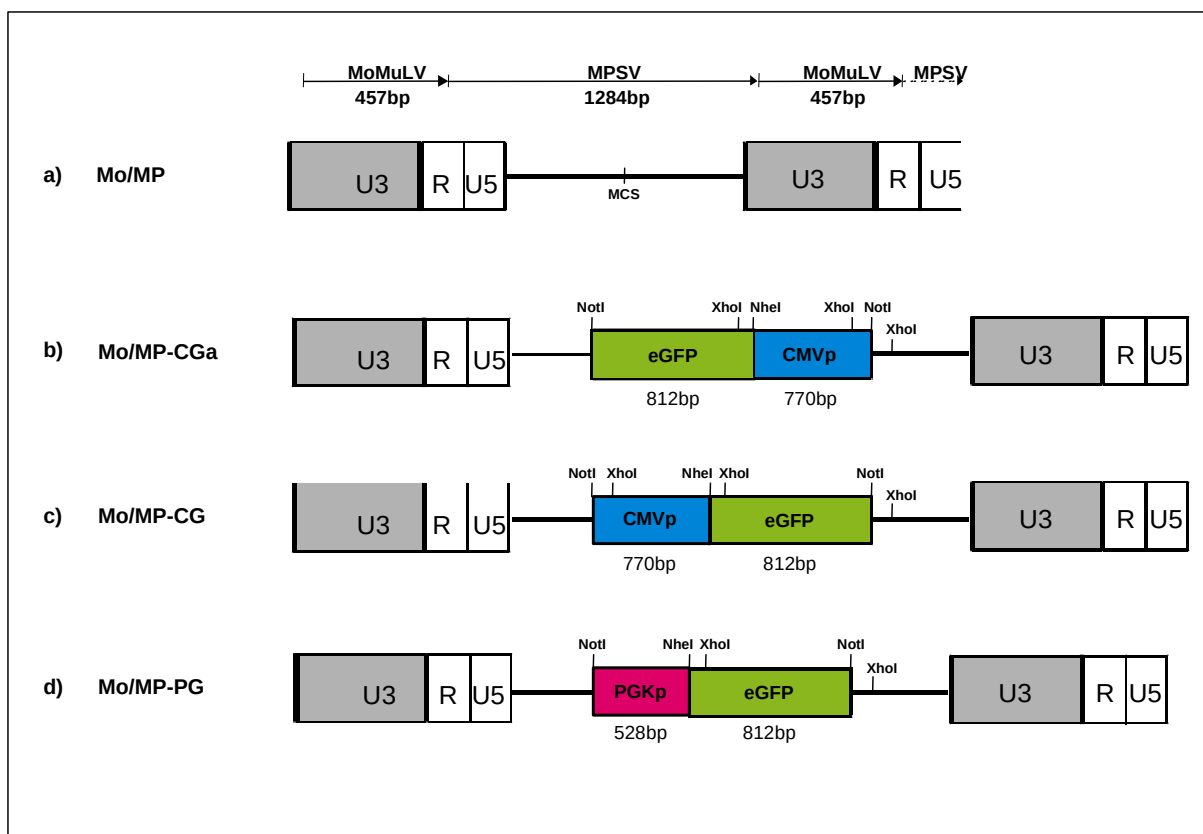


Abbildung 2: Schematische Darstellung proviraler Vektorkonstrukte. a) Ausgangsvektor Mo/MP mit chimären LTRs (Mo-MuLV/MPSV) und multipler Klonierungsstelle (MCS), in die die Promotor-Transgen-Kassetten einkloniert werden, b) Mo/MP-CGa mit in gegensinniger Orientierung klonierter Kasette, c) Mo/MP-CG mit internem CMV-Promotor und d) Mo/MP-PG mit internem PGK-Promotor.

2.1.2 Molekularbiologie

2.1.2.1 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNA- und RNA-modifizierende Enzyme, z.B. Ligasen, Phosphatasen und Polymerasen wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Geneo BioProducts GmbH (Hamburg), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Stratagene (Heidelberg) und Qiagen (Hilden) bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß Herstellerangaben eingestellt.

2.1.2.2 Membranen und Röntgenfilme

Im Rahmen von Southern Blot Analysen wurde zum Transfer von DNA-Fragmenten die Biotransfer B Transfer Membran der Firma Pall Europe Limited (Portsmouth, U.K.)

verwendet. Die hybridisierten Membranen wurden dann auf ^{Super}RX Medical X-Ray Filmen der Firma Fuji Photo Film GmbH (Düsseldorf) exponiert.

2.1.3 Zellkultur

2.1.3.1 Zelllinien

T-Zelllinien:

Jurkat: Aus einer akuten T-Zell-Leukämie humanen Ursprungs etablierte Jurkat-FHCRC-Zellen (K. Smith). Der hier verwendete Klon E6-1 wurde aus diesen Zellen isoliert (ATCC Nr. TIB-152).

EL4: Die T-Zellen stammen von einem Lymphom von C57BL/6N-Mäusen, das durch Behandlung mit 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen induziert wurde (Gorer, 1950; ATCC Nr. TIB-39). Die Lymphoblastenzellen wurden uns von R. Stripecke überlassen (Los Angeles, CA, USA).

Verpackungszelllinien:

Phönix-ampho: Transiente Verpackungszelllinie auf der Basis von 293T-Zellen. Enthält stabil integriertes, für amphotropes Hüllprotein (ampho-env)-kodierendes Plasmid.

Phönix-gp: Transiente Verpackungszelllinie mit stabil integriertem, für *gag-pol*-Sequenzen-kodierendes Plasmid. Etabliert aus 293T-Zellen, die sich sehr erfolgreich über die CaCl₂-Phosphat-Methode transfizieren lassen (Pear *et al.*, 1993).

Indikatorzelllinien:

SC-1: Fibroblastenzelllinie mit größerer Sensivität gegenüber den meisten Maus-tropischen MuLV-Stämmen als andere Mauszelllinien (Hartley und Rowe, 1975; ATCC Nr. CRL-1404).

- HT-1080: Ursprünglich aus menschlichem Fibrosarkom gewonnen und als epithelial-ähnliche Zellen etabliert (Rasheed *et al.*, 1974; ATCC Nr. CCL-121).
- TE671: Von Medullablastom des Menschen abstammend. Sublinie Nr. 2 der ursprünglichen TE671-Zelllinie (McAllister *et al.*, 1977; ATCC CRL-8805).

2.1.3.2 Zellkulturmedien und Puffer

Alle Medien wurden mit fötalem Kälberserum (FCS; Sigma, München) versetzt. Die Inaktivierung der sich im FCS befindlichen Komponenten des Komplementsystems erfolgte durch 30 minütige Erwärmung bei 56 °C.

Kulturmedium für Jurkat und EL4 Zellen:

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI); Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

+FCS	10 %
+Glutamin	2 mM
+Natriumpyruvat	1 mM
+Penicillin/Streptomycin	1 %

Kulturmedium für HT-1080, TE671, Phönix-ampho und Phönix-gp Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

+FCS	10 %
+Glutamin	2 mM
+Natriumpyruvat	1 mM
+NaHCO ₃	5 %
+Penicillin/Streptomycin	1 %

Kulturmedium für SC-1:

Minimal Essential Medium (MEM); Sigma Cell Culture™, München

+FCS	10 %
Glutamin	2 mM
Natriumpyruvat	1 mM
+Penicillin/Streptomycin	1 %

2.1.4 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte gemäß der Betriebsanweisung für gentechnologische Arbeiten in den Tierstallungen des Heinrich-Pette-Instituts.

2.1.4.1 Benutzte Mausstämme

Zur Unterscheidung von Donor- und Rezipientenzellen erfolgte die Transplantation von Lyt5.2-exprimierenden EL4-Zellen in kongene Mäuse (8-10 Wochen alt) des Lyt5.1 exprimierenden Stammes C57BL/6J-Lyt5.1-Pep3b (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA).

2.2 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden gemäß den in den Standardwerken (Ausubel *et al.*, 2001; Sambrook *et al.*, 1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt. In diesem Abschnitt werden nur in dieser Arbeit verwendete Methoden im Detail beschrieben, die über den Standard hinausgehen oder von ihm abweichen.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981). Je nach benötigter DNA-Menge wurde hierbei zwischen Mini- (max. 20 µg DNA-Ausbeute) bzw. Maxi-präparationen (max. 500 µg DNA-Ausbeute) unterschieden.

Zur Herstellung von Kulturen für die Minipräparation wurden je 4 ml LB-Kulturmedium, inklusive Selektionsmittel, mit je einer Kolonie Plasmid-transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei einer Temperatur von 28-37 °C geschüttelt. Nach ausreichender Inkubationszeit erfolgte anschließend die DNA-Extraktion von der in den Standardwerken beschriebenen Weise. Die extrahierte DNA wurde in 50 µl 1x TE-Puffer mit 20 µg/ml DNase-freier RNase A gelöst. Eine genaue Charakterisierung der isolierten DNA wurde anhand von Restriktionskarten und Gelelektrophorese durchgeführt. Positive Klone wurden mittels einer Impföse in 250 ml Bakterienkulturlösung (LB-Medium inklusive Selektionsmittel) für die anstehende Maxipräparation angeimpft.

Bei der Maxipräparation wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien mittels des kommerziell erhältlichen "Maxi Plasmid Purification Kits" (Qiagen, Hilden) extrahiert. Extraktion und Reinigung der DNA erfolgen hierbei über Ionenaustauschersäulen (QIAGEN-tip 500). Nach Elution, Fällung und den Waschschritten wurde die getrocknete DNA je nach Ausbeute in 200-500 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und die Konzentration der gelösten Nukleinsäuren photometrisch bestimmt. Die isolierte DNA wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

2.2.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde mittels präparativer TAE-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden dabei zuvor entweder durch PCR-Amplifikation synthetisiert oder aber durch den Einsatz von Restriktionsenzymen aus Plasmiden gewonnen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA und Ethidiumbromid-Färbung wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator (Ti2, Biometra, Göttingen) gelegt, das richtige DNA-Fragment mit Hilfe eines gereinigten Skalpells aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Auswiegen des Agarosestücks wurde die DNA mit Hilfe kommerziell erhältlicher "Qiaquick"- Säulchen (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte gelelektrophoretisch durch Vergleich mit DNA-Standards (Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Auf diese Weise hergestellte DNA-Fragmente wurden entweder als Sonden für Southern Blot-Analysen oder aber im Rahmen von Ligationen eingesetzt.

2.2.1.3 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der richtigen Sequenzabfolge bei synthetisierten DNA-Plasmiden oder DNA-Fragmenten wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Diese erfolgte nach einem modifizierten Verfahren der Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurde die gereinigte DNA mit dem Sequenzierungsmix (ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt), den Primern (Endkonzentration: 15 pmol/μl) und 2 mM Tris-Puffer (pH 8,0) gemischt und die PCR im Thermoblock (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 96 °C	1'
2. 96 °C	30''
3. 50 °C	15''
4. 60 °C	4'
5. 4 °C	Pause
Zykluswiederholung (4.→ 2.): 25x	

Nach Fällung und Waschschritten wurde die DNA als getrocknetes Präzipitat dem Sequenzierservicelabor des „Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie“, UKE, Hamburg (Leiter Prof. Dr. D. Richter) zur Analyse gegeben.

2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Um die Kopienanzahl und die Unversehrtheit der proviralen Sequenzen zu überprüfen, wurde die genomische DNA aus transduzierten Zellen isoliert. Die Extraktion erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden. Bei der ersten Methode (ohne Verwendung von Phenol) wurde das "DNazol® Genomic DNA Isolation Reagent" (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) gemäß Herstellerangaben zur Aufreinigung verwendet.

Bei der zweiten Methode wurde zunächst eine Zellsuspension hergestellt, diese zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach einem Waschschriff mit 1x PBS wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml Lysepuffer (30 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und SDS (Endkonzentration 1 %) sowie Proteinase K

(Endkonzentration 150 µg/ml) zugegeben. Zur Lyse der Zellen wurde dieser Ansatz bei 37 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Zur Reinigung der gDNA wurden am folgenden Tag je zwei Extraktionsschritte mit gleichen Volumina Phenol und Chloroform durchgeführt. Durch Überschichtung mit 2,5 Vol (v/v) abs. EtOH fällt die gDNA aus der wässrigen Phase aus und wird dann vorsichtig als Faden mit einer Pasteurpipette aufgewickelt. Nach einmaligem Waschen mit 70 % EtOH wurde die aufgespulte gDNA kurz getrocknet und dann über Nacht in 200 µl 1x TE-Puffer gelöst. Um sicherzustellen, daß die DNA vollständig gelöst war, wurde die Konzentration durch dreifache Bestimmung der optischen Dichte im Photometer bei 254 nm ermittelt.

2.2.1.5 Southern Blot-Analyse genomischer DNA nach enzymatischer Restriktion

Im Rahmen der Southern Blot-Analyse (Southern, 1975) wird genomische DNA nach Spaltung mit Restriktionsenzymen gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel auf eine Membran transferiert und fest an diese gebunden.

Pro Ansatz wurden 8-10 µg genomische DNA gespalten. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden über Nacht auf einem 0,8 %-igen (w/v) Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch bei einer Spannung von 1,3 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zunächst 30 Minuten im Denaturierungspuffer (0,4 N NaOH; 0,6 M NaCl) und dann für die selbe Zeit im Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-Cl; pH 7,5) geschwenkt. Nun folgte der Blot-Transfer auf eine Nylonmembran durch Ausnutzung von Kapillarkräften. Hierbei wurde das Gel auf eine zweilagige, befeuchtete Papierbrücke (3 MM Whatman[®] Chromatographie-Papier, Maidstone, U.K.) gelegt, die mit den Seitenenden in eine mit 10x SSC-Puffer gefüllte Wanne hineinragte. Auf dem Gel wurde dann eine passend zurechtgeschnittene Nylonmembran luftblasenfrei gelegt und mit zwei Lagen Chromatographie-Papier zugedeckt. Mehrere Lagen saugfähiger Papierhandtücher wurden oben aufgelegt. Zur Beschwerung diente ein kleineres Gewicht. Durch die Sogwirkung wurde die genomische DNA auf die Membran übertragen. Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese entweder zwei Stunden im Ofen bei 80 °C gebacken oder zweimal mit je 120 mJ im UV-Stratalinker[™] 1800 (Stratagene) vernetzt. Die Blot-Membran wurde bis zur Hybridisierung in Folie aufbewahrt.

2.2.1.6 Hybridisierung von Southern Blot-Membranen mit radioaktiv-markierten DNA-Fragmenten

Herstellung radioaktiv-markierter DNA-Sonden

Zur Hybridisierung von Southern Blot-Membranen wurden DNA-Fragmente als Sonden verwendet, die mittels des "Prime-It[®] II Random Primer Labeling Kit" (Stratagene, Heidelberg) radioaktiv [³²P]-markiert wurden. Zu diesem Zweck wurden 25-75 ng des DNA-Fragmentes gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von 50 µCi (≅1,85 MBq) α-[³²P]-dCTP (spezifische Radioaktivität: 3000 Ci/mmol bzw. 110 TBq/mmol) mit Hilfe der 3' exonukleasedefizienten Mutante des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Radioaktivität wurde über Affinitätschromatographie-Säulchen (MobiSpin, MoBiTec, Göttingen) durch Zentrifugation abgetrennt. Durch Messung eines Aliquots in einem Szintillationsmeßgerät (Beckman) wurde die Aktivität des Gesamtansatzes bestimmt. Dabei wurden Gesamtwerte von 1,5-2x10⁷ cpm erzielt, was einem Einbau von 50-67 % der eingesetzten Radioaktivität entspricht.

Prähybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde eine sogenannte Vorinkubation durchgeführt. Hierbei wurde die Blot-Membran in ein Inkubationsröhrchen (Bachhofer) überführt und luftblasenfrei an der Gefäßwandung mit einer Glaspipette glattgestrichen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden 10 ml des auf 55°C vorgeheizten Prähybridisierungspuffers (47 % deion. Formamid, 5,7x SSC, 0,48 % SDS, 2,35x Denhard-Lösung, 7,5 % Dextransulfat) mit denaturierter Heringssperm-DNA in einer Endkonzentration von 50-100 µg/ml versetzt und die Membran darin für mindestens 30 Minuten in einem rotierenden Hybridisierungssofen inkubiert.

Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten Sonde

Durch die Bindung der radioaktiv-markierten vektorspezifischen Sonde an entsprechende Zielsequenzen der DNA können Aussagen über Kopienanzahl sowie Unversehrtheit proviraler Vektoren im zellulären Genom getroffen werden. Hierfür wurden die Doppelstränge des markierten DNA-Fragments durch Aufkochen für fünf Minuten bei 95

°C denaturiert und dem Hybridisierungsansatz nach Vorinkubation in einer Konzentration von mind. $1,5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 55 °C für 6-24 Stunden. Zur Entfernung ungebundener Radioaktivität wurde die Membran im Anschluß zunächst zweimal mit 20 ml 2x SSC für jeweils fünf Minuten im Hybridisierungsröhrchen bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einer Schale zweimal mit 500 ml 0,1x SSC/0,1 % SDS für jeweils eine Stunde bei 65 °C gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde die Blot-Membran in Folie eingeschweißt, zur Exposition auf einen Röntgenfilm in einer mit Verstärkerfolie (Firma Kostix) versehenen Filmkassette gelegt und bis zum Entwickeln bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine geeignete Methode zur Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wird nur der DNA-Abschnitt angereichert, der sich zwischen zwei Oligonukleotid-Primern befindet, die gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge gebunden sind. Nach der Erstbeschreibung durch Kleppe (Kleppe *et al.*, 1971) wurde diese Methode von K. B. Mullis und Mitarbeitern weiterentwickelt (Saiki *et al.*, 1986). Sie erlaubt, geringe Mengen einer DNA-Sequenz um das Millionenfache zu amplifizieren. Voraussetzungen für den Einsatz der PCR-Methode sind, daß die Nukleotidsequenzen beiderseits des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sind und geeignete Oligonukleotid-Primer zur Verfügung stehen.

In einem Denaturierungsschritt werden zunächst die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 95 °C getrennt, und somit der als Matrize dienende DNA-Abschnitt für speziell synthetisierte Einzelstrang-Oligonukleotide (Primer) zugänglich gemacht. Bei optimaler Hybridisierungstemperatur binden die Primer anschließend spezifisch flankierend an den komplementären Strängen des zu amplifizierenden Bereichs. In der Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase durch Einbau von im Überschuß zugesetzten Didesoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) komplementäre DNA-Stränge. Hierbei heftet das Enzym die freien Nukleotide an das jeweilige 3'-OH-Primer-Ende an. Eine weitere Amplifikationsrunde wird eingeleitet durch einen erneuten Denaturierungsschritt. Die Anzahl der Zyklen beträgt üblicherweise 25-40.

Aufgrund unterschiedlicher "Proofreading"-Aktivitäten der einzelnen Reaktionsenzyme wurden für verschiedene Anwendungen diverse hitzestabile DNA-Polymerasen für die PCR eingesetzt. Bei kürzeren zu amplifizierenden DNA-Fragmenten wurde die *Taq*-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, benutzt. Bei längeren Fragmenten wurden dagegen *Pfu*- bzw. *Pfx*-Polymerasen verwendet. Des öfteren wurde zur Veränderung der Schmelzeigenschaften der DNA "Yellow Sub" hinzugefügt (überlassen durch Geneo BioProducts GmbH, Hamburg). Detaillierte Angaben zu den einzelnen Produkten sowie zu deren Gebrauch finden sich in den Herstellerprotokollen.

Während der "Mastercycler gradient" (Firma Eppendorf, Hamburg) zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur zum Einsatz kam, wurde für die meisten Anwendungen der "T3 Thermocycler" (Biometra, Göttingen) benutzt.

2.2.1.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen (Jurkat) erfolgte anhand des "RNeasy[®] Mini-Kits" (Qiagen, Hilden). Zur Entfernung eventueller genomischer Verunreinigungen wurde zusätzlich das „Qiashtredder Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Beide Prozeduren wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden bis max. 1×10^7 Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Im nächsten Schritt wurden das Zellsediment in einem Volumen von 600 µl GITC-enthaltenden Lysepuffer resuspendiert. Das Lysat wurde direkt auf ein „Qiashtredder“-Säulchen pipettiert und für zwei Minuten bei einer Geschwindigkeit von 15000 g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Im Anschluß wurde 70 % Ethanol dem homogenisierten Lysat im gleichem Volumen zugegeben und durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (≥ 8000 g) auf die „RNeasy“-Mini-Säule geladen. Nach zwei Waschschritten und der Entfernung des restlichen Ethanols von der Säule erfolgte die Elution der RNA in RNase-freiem DEPC-behandeltem H₂O mit einem Volumen von 50 µl. Nach der Isolierung wurde die Qualität der RNA durch Vergleich mit einer Referenz-RNA durch gelelektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft und bis zum weiteren Gebrauch bei -70 °C eingefroren.

2.2.1.9 cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)

Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden „Random“-Hexamere (Roche, Mannheim) und die Mo-MuLV-Reverse Transkriptase (Geneo BioProducts GmbH, Hamburg) eingesetzt. Für die Durchführung wurde das entsprechende Protokoll des Herstellers verwendet. In einem Volumen von 20 µl wurden pro Ansatz je 50 ng/µl zelluläre Gesamt-RNA, 40 µM Random Hexamere, 1x Mo-MuLV-Reaktionspuffer, 0,25 mM dNTP-Mix (Geneo BioProducts GmbH, Hamburg), 5 mM DTT sowie 1,25 U/µl Mo-MuLV-RT für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Mo-MuLV-RT erfolgte bei 95 °C für fünf Minuten. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend durch PCR-Analyse untersucht.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37 °C, mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % Luftfeuchtigkeit unter Verwendung von Medium mit hitzeinaktiviertem FCS.

2.2.2.1 Herstellung transient virusproduzierender Verpackungszelllinien

Für die Infektion von Zellen des Menschen (Jurkat) sowie der Maus (EL4) wurden die Verpackungszelllinien Phönix-ampho bzw. Phönix-gp verwendet. Unter Benutzung dieser Verpackungszellen konnten mit VSV-G Protein pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt werden. Der Vorteil der transienten Virenexpression liegt in der einfachen und schnellen Handhabung, sowie der Herstellung von zumeist hochtitrigen Überständen. Aufgrund der fusogenen Eigenschaft (Synzythienbildung) ist das VSV-G Protein zelltoxisch. Die Virusernte ist deswegen nur für 3-4 Tage möglich, da dann die Zellen absterben.

Verpackungszellen wurden mit Expressionsplasmiden für VSV-G (M4) bzw. *eco-env* (K73) (eingesetzte Mengen: 2-3 µg) zusammen mit dem jeweiligen retroviralen Vektorplasmid (3-5 µg) über die Kalziumphosphat-Methode transformiert. Um den Titer zu erhöhen, wurde in bestimmten Fällen zusätzlich das *gag-pol*-Plasmid M57 (2 µg) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden pro Vektorkonstrukt $5\text{-}7 \times 10^6$ amphotrope Phönixzellen (bzw. Phönix-gp) auf einer Gewebekultur-Petrischale (100 mm) ausplattiert. Die Kalziumphosphat-Transfektion wurde mit dem "Calcium Phosphate Transfection Kit", Fa. 5-3 prime (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers am

folgenden Tag durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurde zur Steigerung der Effizienz direkt vor der Transfektion Chloroquin in einer Endkonzentration von 25 μM zum Medium zugegeben. Ein Mediumwechsel fand 6-8 Stunden später statt, diesmal ohne Zusatz von Chloroquin, ehe nach 24 Stunden mit der Virusernte begonnen wurde. Im folgenden wurden zweimal täglich alle 12 Stunden Überstände gesammelt, steril filtriert (Millipore-Filter), auf Eis gekühlt und dann bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte im Anschluß auf verschiedenen Indikatorzelllinien.

2.2.2.2 Titration retroviraler Überstände

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthalten als Marker entweder eGFP oder das Neomycinresistenzgen (neo^{R}). Die Bestimmung der Infektiösität erfolgte im ersten Fall mittels durchflußzytometrischer Messung und im zweiten Fall mittels eines sogenannten GTU (Geneticin-Transfereinheiten)-Experiments.

a) Titration von eGFP-Vektoren:

Je 1×10^5 SC-1 Zellen wurden pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausplattiert. Die virushaltigen Überstände wurden in seriellen Verdünnungen (2-, 10-, 40-fach) zupipettiert. Pro Verdünnungsstufe wurden Dreifach-Ansätze hergestellt. Um die Virusaufnahme zu verbessern, wurde Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ dem Medium zugegeben. Um die Transduktionseffizienz zusätzlich zu erhöhen, wurde der Ansatz bei 200 g für eine Stunde bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Microplus Carrier; CL-GPKR Zentrifuge, Beckman). Nach weiteren 1-3 Stunden Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Bestimmung der Titer erfolgte durch durchflußzytometrische Analyse der eGFP-Expression am dritten Tag nach Infektion. Uninfizierte Zellen wurden hierbei als Negativ-Kontrolle verwendet. Bei Messung des Titers wurde zur reproduzierbaren Unterscheidung zwischen eGFP-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen eine definierte Grenze festgelegt. Dabei wurden 1 % der Zellen aus der Negativ-Kontrolle als falsch positiv gewertet. Aus dem Vergleich mit dem Histogramm der Negativ-Kontrolle wurde der Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen in einer Kultur ermittelt. Aus dem Prozentsatz der eGFP-positiven Zielzellen, der Verdünnung und dem Volumen des eingesetzten Virusüberstands wurde berechnet, wieviel

infizierende Viren in 1 ml Überstand vorhanden waren (Titer). Die Reproduzierbarkeit der auf SC-1 Zellen ermittelten Titer wurde zusätzlich durch Titration auf zwei weiteren Indikatorzelllinien (TE671 und HT-1080) überprüft. Die Titer für Mo/MP-CG lagen im Mittel bei $1,9(+/-0,3) \times 10^5/\text{ml}$, für Mo/MP-PG bei $3,5(+/-1,5) \times 10^5/\text{ml}$ (Abweichungen der Werte zwischen den benutzten Zelllinien in Klammern; je Zelllinie n=9).

b) Titration von neo^R-Vektoren:

Zur Titerbestimmung bei Neomycinresistenz-vermittelnden Vektorpartikeln wurden GTU-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden $0,5-1 \times 10^4$ HT-1080-Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte in einem Volumen von 0,5 ml ausplattiert und sieben Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und gegen frisches Medium ausgetauscht. Serielle Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1×10^{-2} , 2×10^{-3} , 4×10^{-4} , 8×10^{-5} , $1,6 \times 10^{-5}$, $3,2 \times 10^{-6}$, $6,4 \times 10^{-7}$) der Überstände wurden als Triplets in einem Gesamtvolumen von je 1 ml ausplattiert. Um die Virusaufnahme zu verbessern, wurde Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml dem Medium zugegeben. Anschließend erfolgte die Infektion durch Zentrifugation (200 g für eine Stunde bei 30 °C). Nach weiteren 1-3 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Bei erfolgter Transduktion (dritter Tag nach Infektion) wurde mit der Geneticinselektion (G418) begonnen. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium abgenommen und gegen Selektionsmedium (G418: c=0,9mg/ml) ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage gegen frisches ausgetauscht. Die G418-Selektion wurde bis zum vollständigen Absterben der uninfizierten Zellen der Negativ-Kontrolle am Tag 11 weitergeführt. Aus der Anzahl der gewachsenen Klone konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Virustiter ermittelt werden (durchschnittliche Anzahl an Klonen/Dreifachansatz*Verdünnungsfaktor *2).

2.2.2.3 Stabile Transduktion von T-Zelllinien

Zunächst wurden 2×10^5 Suspensionszellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte vorgelegt und Virusüberstand mit definiertem Titer ("multiplicity of infection" ≤ 1) in einem Gesamtvolumen von 1 ml zugegeben. Der Zusatz von Protaminsulfat (Endkonzentration: 4 µg/ml) führte zur Verbesserung der Transduktionseffizienz. Im Anschluß wurde bei 200 g für eine Stunde bei 30 °C zentrifugiert. Nach Inkubation für 1-3 Stunden im Brutschrank

wurde der Virusüberstand abgenommen und je Vertiefung 1,5 ml frisches Medium zugesetzt.

2.2.2.4 Durchflußzytometrische Analyse eGFP-exprimierender Zellen

Beim durchflußzytometrischen Meßverfahren macht man sich die Eigenschaft zunutze, daß verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften einzelner Zellen -wie relative Größe, Granularität sowie verschiedene Fluoreszenzintensitäten- simultan gemessen werden können. Dabei werden die Zellen als Suspension durch Überdruck in die Meßküvette gepreßt und dort hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet, so daß sie einzeln vom Laserstrahl erfaßt und physikalisch gemessen werden können. In dieser Arbeit fand das *FACSCalibur* (Becton-Dickinson, Heidelberg) Verwendung. Dieses Gerät bietet die Möglichkeit, vitale Zellen in einer Probe zu identifizieren und gleichzeitig die Stärke der eGFP-Expression in diesen Zellen zu quantifizieren.

In Abhängigkeit der Intensität der Fluoreszenz erfolgt die Einteilung der Zellen in Expressionsklassen. Die Verteilung der Zellen wird in Form eines Häufigkeitsdiagramms dargestellt. Eine Abschwächung oder gar ein Verlust der eGFP-Expression in einer Zellkultur bewirkt eine Änderung der Verteilung im Häufigkeitsdiagramm. Durch den Vergleich der Histogramme im Laufe einer Kultivierung können Veränderungen der Expression in den Zellen verfolgt werden.

Bei Langzeitkulturen wurde wöchentlich die eGFP-Expression der Zellen gemessen. Aliquots von Zellen wurden aus den Kulturen entnommen, mit 1x PBS-Puffer gewaschen und direkt im Durchflußzytometer analysiert. Als Negativ-Kontrolle diente eine parallel kultivierte, untransduzierte Kultur der betreffenden Zelllinie. Durch Vergleich mit dem Histogramm der Negativ-Kontrolle konnte der Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen in einer Kultur ermittelt werden.

Die Analysen zur Ermittlung des Verlusts der Vektorexpression in Jurkatzellen wurden mit transduzierten Massenkulturzellen und daraus isolierten Zellklonen durchgeführt. Bei Massenkulturen waren selbst nach Sortierung mit einem Zellsortierer (MoFlo[®] Cytomation, Inc., Ft. Collins, CO, USA) untransduzierte Zellen in den Kulturen vorhanden.

Die Werte für eGFP-exprimierende Zellen lagen direkt nach der Sortierung bei 71 % (Mo/MP-PG) bzw. 79 % (Mo/MP-CG). Während der weiteren Untersuchungen wurde für die Berechnung des Anteils an abgeschalteten Zellen berücksichtigt, daß sich nicht transduzierte Zellen in den Massenkulturen befinden. Diese wurden von dem Anteil an nicht exprimierenden Zellen abgezogen. Die Kulturen aus Zellklonen hatten jeweils eine Vektorkopie und exprimierten anfangs etwa 100 % eGFP.

2.2.2.5 Anreicherung vektortragender Zellen

Sortierung von Zellen

Die eGFP-exprimierenden Suspensionszellen wurden in Sortierungsröhrchen gegeben und bei 200 g für fünf Minuten bei einer Temperatur von 37 °C abzentrifugiert. Zum Waschen wurden die Zellen in 1x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1x PBS aufgenommen (Zelldichte: 5×10^5 /ml). Zur Abtrennung von Zellklumpen wurden die Zellen dann in sterile Prä-Separationsfilter aus Nylon mit einem Durchlaß von 30 µm (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pipettiert und in einem sterilen Sortierungsröhrchen aufgefangen. Die Zellen wurden bis zum Sortieren auf Eis gelagert. Die Sortierung eGFP-exprimierender Zellen erfolgte mit einem Zellsortierer der Firma MoFlo[®] Cytomation, Inc. (Ft. Collins, CO, USA). Aus der Kultur wurden bis zu $2\text{-}3 \times 10^4$ Zellen in sterile Sortierungsröhrchen abgelegt. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen in Medium resuspendiert und auf Kulturschalen eingesät.

Zur Ermittlung der Sortierungseffizienz wurde der Anteil eGFP-positiver Zellen in der Kultur direkt vor sowie nach der Sortierung miteinander verglichen. Hierfür wurden jeweils Aliquots der Zellen vor und nach der Sortierung aus den Kulturen entfernt und ihr Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen zytometrisch bestimmt (vergl. Kap. 2.2.2.4).

Anreicherung transduzierter Zellen *in vitro*

Zur Anreicherung von EL4-Zellen, die mit einem Neomycinresistenz-Vektor infiziert wurden, wurde eine Kultivierung unter Selektion mit Geneticin (G418-Sulfat, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, U.K.) durchgeführt. Gestartet wurde diese Selektion bei

Massenkulturen ($c=0,6$ bzw. $1,2$ mg/ml) am Tag 3 und bei Endpunkt-verdünnten Klonen ($c=1,2$ mg/ml) am Tag 1 nach Transduktion. Ab diesem Zeitpunkt wurde mikroskopisch regelmäßig auf klonales Zellwachstum hin untersucht. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 11 Tagen.

2.2.2.6 Klonierung von Zellen

Klonierung durch Einzelzellablage (EZA)

Zur Herstellung von Klonen aus Jurkatzellen durch Einzelzellablage wurden zunächst geeignete Bedingungen zur Verwendung des Zellsortierers (MoFlo[®] Cytomation, Inc., Ft. Collins, CO, USA) ausgetestet. Die hierbei gefundenen Werte sind nachfolgend aufgeführt:

- eingestellte Zellkonzentration: $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml,
- ausgesäte Zellzahl: drei Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte,
- Druck im System des Zellsortierers: 3,6 psi.

Zur Etablierung unabhängiger Klone wurden aus Massenkulturen transduzierter Jurkat-Zellen (Mo/MP-CG bzw. Mo/MP-PG) eGFP-positive Zellen abgelegt. Nach 10 Tagen Kultivierung der Zellen wurde die Platte auf klonales Wachstum untersucht.

Klonierung durch Endpunktverdünnung (EPD)

Zur Herstellung unabhängiger Klone wurden aus Massenkulturen transduzierter EL4-Zellen (Mo3TIN bzw. Mo3N) Endpunktverdünnungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden am Tag der Infektion serielle Verdünnungen der transduzierten Zellen hergestellt und unterschiedliche Zellzahlen (0,3/1/3/10/30/100/300) pro Vertiefung in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert. Pro Zellzahl wurden 24 bzw. 48 Vertiefungen verwendet. Um transduzierte Klone zu erhalten, wurden die Zellen in Medium mit Zusatz von G418 ($c=1,2$ mg/ml) kultiviert. Um die Funktionalität der Vektoren zu prüfen, wurden Zellen in Medium ohne Selektionsmittel sowie mit einer Kombination aus G418 (Geneticin; $c=1,2$ mg/ml) und GCV ($10 \mu\text{M}$) gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wurde die Auswertung durch Auszählen des Zellwachstums vorgenommen und die etablierten Klone für weitere Experimente expandiert.

2.2.2.7 [³H]-Thymidin-Proliferationsanalyse

Der Suizidmechanismus in Zellen mit HSV1-Tk wird durch Zugabe von Ganciclovir in das Kulturmedium aktiviert. Für die Negativ-Selektion Suizidgen-tragender EL4-Zellen *in vitro* (GCV-Selektionsexperimente, siehe Kap. 2.2.2.8) mußte eine Ganciclovir-Konzentration ermittelt werden, die für eine selektive Entfernung transduzierter Zellen geeignet war (Beck *et al.*, 1995). Zu diesem Zweck wurden [³H]-Thymidin-Proliferationsanalysen von EL4-Zellen bei unterschiedlichen GCV-Konzentrationen durchgeführt. Im Rahmen dieser Methode gilt die [³H]-Thymidin-Aufnahme in die zelluläre DNA als Maß für die Proliferationsrate der Zellen.

Zur Durchführung der Proliferationsanalyse wurden EL4-Zellen einer log-Phasen Kultur entnommen, mit 1x PBS gewaschen und in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/ml in frischem RPMI-Medium aufgenommen. Aliquots der Zellsuspension à 100 µl (3×10^3 Zellen) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausplattiert. Vom Selektionsmittel Ganciclovir wurden serielle Verdünnungen in einem Volumen von 100 µl zugegeben (Endkonzentrationen: 0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 500 µM). Der Test wurde als 3-fach Bestimmung durchgeführt. Nach drei Tagen Kultivierung der Zellen im Brutschrank wurden anschließend 500 µCi [³H]-Thymidin (spez. Akt.: 50 Ci/mmol $\cong$ 1,85 TBq/mmol) pro Ansatz in einem Volumen von 50 µl RPMI-Medium zugegeben. Nach weiteren 6,5 Stunden Inkubation wurden die Zellen im Zellerntegerät (Skatron 7025, Lier, Norwegen) direkt auf Szintillator-Filtermatten (Skatron, Suffolk, U.K.) geerntet und die Aktivität im Szintillationszähler (LS 1701, Beckman) ermittelt. Bei einer GCV-Konzentration von 100 µM war ein zytotoxischer Effekt bei untransduzierten Zellen nachweisbar. Dieser Effekt tritt bei 10-30 µM GCV nicht auf. Aus diesem Grunde wurden die nachfolgenden *in vitro* Experimente unter Verwendung der Konzentrationen von 10 und 30 µM GCV durchgeführt.

2.2.2.8 Negativ-Selektion HSV1-Tk Gen-transduzierter Zellen *in vitro*

Zur Negativ-Selektion HSV1-Tk Gen-transduzierter EL4-Zellen wurden GCV-Selektionsexperimente *in vitro* durchgeführt (modifiziert nach Munshi *et al.*, 1997; Drobyski *et al.*, 2001). 1×10^4 bzw. 1×10^5 EL4-Zellen wurden pro Vertiefung einer 24-Lochplatte eingesät und mit unterschiedlichen GCV-Konzentrationen ($c=10/30$ µM GCV)

4-5 Tage selektioniert. Als Wachstumskontrolle wurden EL4-Zellen ohne Negativ-Selektion parallel kultiviert. Jede Konzentration wurde als Dreifachansatz getestet. Im Anschluß wurden die Vertiefungen auf überlebende Zellen untersucht. Anhand der ermittelten Zellzahlen konnte die Effizienz der Negativ-Selektion bestimmt werden.

2.2.2.9 Kultivierung reisolierter EL4-Tumorzellen

Tumore mit einem Gewicht zwischen 0,4 und 1,7 g wurden aus transplantierten C57BL/6-Mäusen (Lyt5.1-Stamm) steril entfernt. Die Zellen des Tumorverbands wurden in RPMI-Medium durch Zerteilen mit einem Skalpell und anschließendem Quetschen mit dem Stempel einer Spritze mechanisch vereinzelt. Größere Gewebetrümmer wurden durch Sedimentation abgetrennt. Die Zellsuspensionen wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit einer Spritze weitgehend homogenisiert. Anschließend wurden diese Zellsuspensionen in verschiedenen Konzentrationen in Vertiefungen von 6-Lochplatten ausgesät. Nach einem Tag Kultivierung im Brutschrank wurden die restlichen, sedimentierten Gewebestandteile und Zelltrümmer entfernt, und die EL4-Zellen nach einem Waschschrift in frischem Medium erneut ausplattiert. Die Prozedur wurde gegebenenfalls wiederholt. Auf diese Weise wurden homogene Kulturen von reisolierten EL4-Tumorzellen erhalten, die in weiteren Untersuchungen Verwendung fanden.

2.2.2.10 Markierung von Zellen durch Antikörperbindung

Um im Rahmen der Transplantationsexperimente bezüglich Spender- bzw. Wirtszugehörigkeit unterscheiden zu können (vergl. Kap. 2.2.3.1), wurden Antikörper zur Erkennung der Oberflächenmoleküle CD45.1/2 eingesetzt (Lyt5.1 mit PE, Lyt5.2 mit FITC gekoppelt, BD Pharmingen,).

Pro Ansatz wurden jeweils 5×10^5 der anzufärbenden Zellen eingesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (200 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen einmal mit PBS/2 % FCS gewaschen und die verdünnte Antikörperlösung (0,3 µg pro Färbeansatz) in einem Volumen von 20 µl auf das Zellsediment pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4 °C für 30 Minuten in Dunkelheit. Nach dreimaligem Waschen wurden die Antikörper-markierten Zellen in einem Volumen von 0,5 ml 1x PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert.

2.2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.2.3.1 Transplantation von Zellen

Die tumorigene EL4-Zelllinie wurde aus C57BL/6-Mäusen etabliert. Zur Unterscheidung von Donor- und Wirtszellen wurde im Rahmen des Transplantationsmodells das Lyt5.1/Lyt5.2-System verwendet. Hierbei handelt es sich um Varianten eines exprimierten Oberflächenmoleküls (Lyt5), welches zur Unterscheidung von syngenischen Tieren eingesetzt werden kann. Die hierin unterschiedlichen Zellen werden als kongen bezeichnet. Da EL4-Zellen Lyt5.2 exprimieren, wurde ein Lyt5.1 exprimierender C57BL/6-Stamm (C57BL/6J-Lyt5.1-Pep3b, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) für die Transplantationsexperimente verwendet. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung von Donor- und Wirtszellen möglich. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden parallel unterschiedliche Injektionsrouten sowie verschiedene Zelldosen getestet.

Intravenöse Transplantation von Zellen

Bei intravenöser Applikation wurden 5×10^4 bzw. 5×10^5 EL4-Zellen in 200 μ l RPMI-Medium resuspendiert und in die Schwanzvene einer etwa acht Wochen alten Maus (w) gespritzt. Die Mäuse wurden 2-3mal wöchentlich untersucht. Hierbei wurde durch Vergleich der Mäuse mit den Tieren der Negativ-Kontrollgruppe zunächst das Auftreten auffälliger Verhaltensweisen untersucht. Anschließend folgte eine palpatorische Untersuchung der Tiere. Bei offensichtlichen und stark ausgeprägten Krankheitssymptomen wurden den Tieren Organe entnommen (Milz, Leber, Thymus, Nieren) und deren Gewicht bestimmt sowie auf pathologische Auffälligkeiten untersucht.

Subkutane Transplantation von Zellen

Vor Versuchsbeginn wurden jeweils beide Beine der Mäuse mit einer Schieblehre vermessen. Bei subkutaner Injektion wurden die EL4-Zellen in die Flanke des rechten Hinterbeins der Mäuse (m/w) in verschiedenen Zelldosen (1×10^4 - 1×10^6 Zellen) in einem Volumen von 100 μ l verabreicht. Die Zellen waren zuvor in 1x PBS gewaschen worden. Die Mäuse wurden 2-3mal pro Woche auf Tumorwachstum untersucht und jeweils das rechte Bein zur Bestimmung auf Veränderungen in der Größe mit einer Schieblehre

vermessen. Um Wachstumsveränderungen der Tiere auszuschließen, wurde solch eine Messung als Referenz auch mit dem jeweils linken Bein durchgeführt.

2.2.3.2 Verabreichung von Ganciclovir

Die Prodroge Ganciclovir (Cymeven[®], Roche, Grenzach-Wyhlen) wurde C57BL/6-Lyt5.1-Mäusen zur gezielten Entfernung tumorigener, Suizidgen-tragender EL4-Zellen verabreicht. Dieses erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen:

In einem präventiven Ansatz begann die Behandlung der Tiere einen Tag nach Zellapplikation. Es wurde sieben Tage lang eine tägliche GCV-Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Das Injektionsvolumen des in 1x PBS gelösten und sterilfiltrierten GCV betrug 20 µl/g Körpergewicht.

In einem kurativen Ansatz begann die Behandlung der Tiere beim Auftreten von messbaren Tumoren. Tumore wurden frühestens am Tag 10 nach Zellapplikation sichtbar. GCV-Injektionen wurden zweimal am Tag mit einer Dosis von jeweils 50 mg/kg Körpergewicht vorgenommen. Morgens wurde GCV mit einem Injektionsvolumen von 5 µl/g Körpergewicht direkt in den lokal entstandenen Tumor gespritzt (intra-tumoral). Am Abend erfolgte die Injektion intraperitoneal. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von molekularen Mechanismen, die zu einer Inaktivierung der Vektorexpression führen können. Die Kenntnis solcher Mechanismen ermöglicht eine verbesserte Vektorentwicklung. Die Häufigkeit sollte bestimmt werden, mit der retrovirale Suizidgenvektoren *in vitro* und *in vivo* durch genetische oder epigenetische Prozesse inaktiviert werden. Dieses ist wichtig, um die Sicherheit der Vektoren bei der therapeutischen Verwendung am Menschen einschätzen zu können. Zur Zeit werden Suizidgenvektoren sowohl bei der adoptiven Immuntherapie im Rahmen von Knochenmarktransplantationen zur Bekämpfung der Transplantat-gegen-Wirt Krankheit (GvHD) als auch in der Onkologie für die Entfernung solider Tumoren angewendet.

3.1 *In vitro* Analyse des Verlusts der retroviralen Expression bei Vektoren mit unterschiedlichen internen Promotoren

Interne Promotoren wurden zur Steuerung der Transgenexpression in retroviralen Vektoren bereits erfolgreich benutzt (z.B. Wagner *et al.*, 1985). Sie zeigten dabei besonders hinsichtlich ihrer Expressionstärke deutliche Unterschiede (Hock *et al.*, 1989). Für gentherapeutische Anwendungen ist neben einer *ausreichend hohen* zusätzlich auch eine *dauerhaft stabile* Vektorexpression wünschenswert.

Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit zwei Promotorelemente getestet, ob sie eine stabile Transgenexpression vermitteln. Bei diesen Elementen handelt es sich um den Promotor des humanen Zytomegalievirus (CMV; Lupton *et al.*, 1991) sowie den Promotor des murinen Phosphoglyzeratkinase (PGK; Tybulewicz *et al.*, 1991)-Gens. Zur Analyse der Langzeitexpression *in vitro* wurde ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Meßsystem verwendet (Schwieger, 2000). Es basiert auf dem zytometrischen Nachweis des "enhanced green fluorescent protein" (eGFP). Die eGFP-Expression der retroviralen Vektoren wurde in Zellkulturexperimenten über einen Zeitraum von bis zu vier Monaten quantifiziert. Für die *in vitro*-Expressionsanalysen wurden T-Zellen humanen Ursprungs benutzt, da die therapeutische Verwendung von T-Zellen thematisch im Vordergrund stand. In die

Untersuchungen wurden neben Massenkulturen auch Zellklone einbezogen. Zellklone sind dadurch charakterisiert, daß alle Zellen von derselben Ursprungszelle abstammen. Das Provirus befindet sich daher bei Zellen eines Klon an der gleichen Stelle im Genom. Die Verwendung von Klonen mit jeweils einer Vektorkopie ermöglicht die molekulare Analyse von Mechanismen, die zu einem Verlust der Vektorexpression führen können.

3.1.1 Vektoren mit internen Promotoren

Mit dem eGFP-Meßsystem wurde der Einfluß unterschiedlicher interner Promotoren auf die Stabilität der Expression des eGFP-Gens im retroviralen Vektor untersucht. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Arbeit fanden einfache Retroviren in der somatischen Gentherapie Verwendung (Mulligan, 1993). Sie sind auch bei Transfer in lymphoide Zellen vorteilhaft, weil Moloney-Mausleukämievirus (Moloney, 1960) und davon abgeleitete Konstrukte eine bessere Expression in T-Zellen als z.B. SFFV-Vektoren erlauben. In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Expressionsstabilität des Promotors des humanen Zytomegalievirus (IE94 hCMV) und des murinen Phosphoglyzeratkinase-Gens (mPGK) im retroviralen Vektorkontext verglichen. Die intern im Vektor integrierten Promotoren sollen eine vom viruseigenen Promotor/Enhancerbereich unabhängige Expression vermitteln. Es wurde bereits gezeigt, daß flankierende LTRs, die selbst vom Löschen betroffen sein können (Gautsch und Wilson, 1983; Niwa *et al.*, 1983), einen internen Promotor schützen können (Wagner *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 1996). Da die Höhe der Expressionsstärke und der Expressionsstabilität der Vektoren vom Differenzierungszustand der Zelle abhängt, ist die Wahl und Analyse eines geeigneten Promotors im jeweiligen Zellsystem unerlässlich. So zeigte der virale CMV-Promotor im Vergleich zu diversen anderen internen Promotoren *hohe Expressionspiegel* in kultivierten hämatopoetischen Zellen (Hock *et al.*, 1989). Allerdings wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits die Abschaltung des CMV-Promotors in einem retroviralen Vektor festgestellt (Bergemann *et al.*, 1995; Schwieger, 2000). Da virale Promotoren möglicherweise Erkennungssequenzen zur Abschaltung im eukaryontischen System in sich tragen, wurde zum Vergleich ein Vektor mit einem eukaryontischen Promotor verwendet. Der eukaryontische PGK-Promotor wurde ausgewählt, da durch ihn auch in der *in vivo* Situation eine *hohe Stabilität der Expression* vermittelt werden kann (Lim *et al.*, 1987 und 1989; Correll *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 2000).

Die hier verwendeten Vektoren enthalten neben Mo-MuLV-Sequenzen Anteile aus anderen murinen Retroviren sowie nicht-virale Sequenzen. Die U5-„Leader“-Region stammt vom endogenen Retrovirus dl587rev und ermöglicht die Expression von MESV (Maus embryonalen Stammzellvirus) in embryonalen Stammzelllinien (Grez *et al.*, 1990). Die selbe Sequenz wurde für eine gute Expression in hämatopoetischen Zellen unter Verwendung von FMEV-Vektoren benutzt (Baum *et al.*, 1996).

Die Vektoren mit internem Promotor und ihre Ausgangskonstrukte sind in Abb. 2 (siehe S. 20) dargestellt. Ausgangsplasmid für die zwei neu generierten Konstrukte war pMo/MP-CGa. Dieses Vektorplasmid enthält die Promotor-Markergen-Kassette in gegensinniger Orientierung zur Transkriptionsrichtung der LTR. Da mit diesem Konstrukt nur geringe Titer erzielt wurden (Schwieger, 2000), wurden in der vorliegenden Arbeit Vektoren mit gleichsinniger Orientierung der Expressionskassette hergestellt: Mo/MP-CG und Mo/MP-PG. Sie enthalten von Mo-MuLV abgeleitete LTR-Sequenzen und den 5'-untranslatierten Bereich des MPSV. Die intern inserierten Promotoren von CMV bzw. PGK vermitteln die Expression der eGFP-Sequenz.

3.1.2 Verwendung des eGFP-Reportergens zur Messung der Langzeit-expression

Die durchflußzytometrische Messung der Fluoreszenz des zytoplasmatischen eGFP-Proteins bietet die Möglichkeit, mit geringem Zeitaufwand Expressionstudien durchzuführen, da weitere Färbeschritte entfallen. Weiterhin lassen sich zusätzlich physikalische Parameter wie Zellgröße und Granularität der Zellen bestimmen.

Eine Quantifizierung der Abschaltung ist nur möglich, wenn möglichst viele Zellen einer Kultur zu Beginn der Untersuchung Expression zeigen. Allerdings ist eine Transduktionsrate von mehr als 30-40 % nicht erwünscht, da bei höheren Infektionsraten die Wahrscheinlichkeit steigt, daß die Vektoren in vielfachen Kopien in den Zellen integrieren. Bei Mehrfachintegrationen ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß eine Vektorkopie angeschaltet bleibt und Abschaltungsereignisse nicht nachgewiesen werden können. Eine zuverlässige Quantifizierung der Abschaltung der Expression ist dann nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde bei den Infektionen eine geringe MOI von <1

ausgewählt, um Mehrfachintegrationen auszuschließen. Um den Anteil an eGFP-positiven Zellen zu erhöhen, wurden Zellen von Massenkulturen sieben Tage nach Transduktion mit einem Zellsortierer sortiert. Der Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen wurde hiermit auf 71-79 % erhöht.

Analyse der Vektoren mit internem Promotor in transduzierten Jurkatzellen

Humane Jurkat T-Zellen wurden mit den Vektoren mit einer "multiplicity of infection" (MOI) von 0,2 transduziert. Der Infektionserfolg wurde mittels FACS-Analyse am dritten Tag nach Infektion überprüft. Es ergaben sich Transduktionsraten von 11,3 $\pm$ 0,5 % (n=2) für das CMV-Promotor-Konstrukt und von 19,7 $\pm$ 0,5 % (n=2) für das PGK-Promotor-Konstrukt. Bei der hier verwendeten MOI von <0,5 und einer Transduktionsrate von 10-20 %, ist es wahrscheinlich, daß die Mehrheit der Zellen nur eine einzige Vektorkopie enthält (Wahlers *et al.*, 2001). Zur Erhöhung des Anteils positiver Zellen wurde am Tag 7 nach Transduktion, wie oben beschrieben, eine Sortierung der Massenkulturen vorgenommen. Der anschließend mittels FACS-Analyse bestimmte Anteil positiver Zellen war nach der Sortierung deutlich höher: 79 % für Mo/MP-CG-transduzierte Zellen und 71 % für Mo/MP-PG-transduzierte Zellen. Die mit Massenkulturen erzielten Ergebnisse dienen als vorläufige Daten, da nicht infizierte Zellen bei der Interpretation der Resultate stören. Um uninfectierte Zellen auszuschließen, wurden im folgenden Zellklone mit jeweils einer Vektorkopie etabliert. Bei den hiermit erzielten Ergebnissen handelt es sich um die richtigen Daten.

Zur Gewinnung unabhängiger Klone wurden im Rahmen der Sortierung (FACS) Einzelzellen aus der eGFP-exprimierenden Zellfraktion in 96-Lochplatten abgelegt. Insgesamt wurden 23 Klone mit dem CMV-Promotor-Konstrukt sowie 22 Klone mit dem PGK-Promotor-Konstrukt isoliert. Die Klonierungseffizienz nach Einzelzellablage war etwa 9 % und ist damit um den Faktor sechs geringer als nach Endpunktverdünnung. Nach durchflußzytometrischer Analyse wurden jeweils 12 eGFP-positive Klone mit nur einer einzigen Vektorkopie für weitere Studien ausgewählt (Tab. 1, S. 45). Alle zeigten nahe 100 % eGFP-positive Zellen (92-100 % bei Mo/MP-CG-transduzierten und 97,5-100 % bei Mo/MP-PG-transduzierten Klonen). Zwischen verschiedenen Klonen wurden unterschied-

liche mittlere Fluoreszenzen ermittelt. Diese entsprechen unterschiedlichen eGFP-Expressionspegeln.

a)

Nr.:	Klone mit CMV-Promotor-Vektoren	eGFP-Expression (%)	Mittlere Fluoreszenz	Kopienzahl
1	#A1	99,98	164	n.u.
2	#B3	96,97	78	1
3	#B4	99,80	393	1
4	#C5	99,44	107	1
5	#E6	99,83	95	1
6	#E8	99,95	189	1
7	#F1	92,05	86	1
8	#F10	99,18	88	1
9	#G2	95,76	286	1
10	#H7	95,31	55	1
11	#H8	99,95	214	1
12	#H10	100	90	1

b)

Nr.:	Klone mit PGK-Promotor-Vektoren	eGFP-Expression (%)	Mittlere Fluoreszenz	Kopienzahl
1	#A7	99,96	407	1
2	#A10	99,83	262	1
3	#B2	97,48	99	1
4	#B9	99,81	514	n.u.
5	#B10	97,61	32	1
6	#C8	99,92	100	1
7	#E5	99,86	287	1
8	#F10	99,81	41	1
9	#F12	99,99	208	n.u.
10	#G11	99,76	95	n.u.
11	#G12	98,64	21	n.u.
12	#H9	99,71	52	n.u.

Tabelle 1: Die isolierten Klone der Jurkatzellen tragen nach Transduktion jeweils eine Vektorkopie. Dargestellt ist die eGFP-Expression (in %) in Jurkat-Zellklonen (a: Mo/MP-CG-transduziert, b: Mo/MP-PG-transduziert) sowie die Mittlere Fluoreszenz (MF) jeweils zu Beginn der Analysen. Die Anzahl der Vektorkopien pro Zellklon blieben im Lauf der Untersuchungen konstant. N.u.=nicht untersucht.

Anschließend wurden Langzeitexpressionsprofile sowohl der Massenkulturen als auch der unabhängigen Klone durch wöchentliche Messung der eGFP-Expression über einen Zeitraum von etwa vier Monaten erstellt. Die Massenkulturen wurden zu diesem Zweck 14 Tage nach Sortierung in drei Ansätze gesplittet. Die im Rahmen dieser Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.3 aufgeführt.

3.1.3 Vergleich der Aktivität unterschiedlicher interner Promotoren im Vektorgenom

Expressionsvergleich in Massenkulturen und Einzelklonen

Die eGFP-Expression wurde über einen Zeitraum von vier Monaten gemessen (Abb. 3, S. 47). In Jurkatzellen ist das Vektorkonstrukt mit dem CMV-Promotor sowohl in Massenkulturen als auch in Klonen dem Konstrukt mit dem PGK-Promotor in Bezug auf Expressionsstabilität überlegen. Bei Massenkulturzellen, die mit dem Vektor Mo/MP-CG transduziert waren, wurde ein Expressionsverlust von 33 % innerhalb des Untersuchungszeitraums nachgewiesen. Für Mo/MP-PG-transduzierte Massenkulturzellen wurde im gleichen Zeitraum sogar ein Verlust der Expression von 41 % gemessen. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den jeweiligen Klonen (Mo/MP-CG: 28 %; Mo/MP-PG: 37 %).

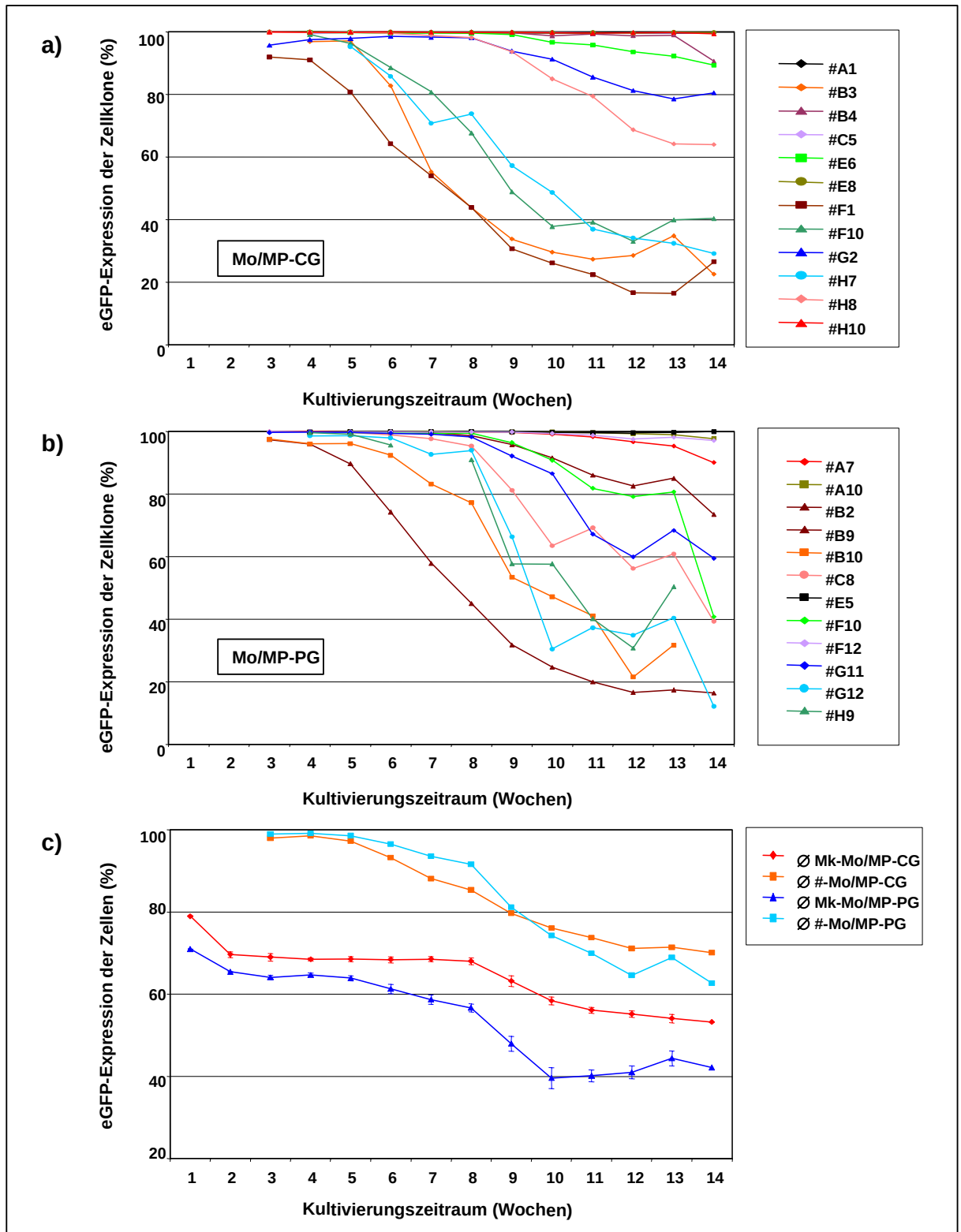


Abbildung 3: Der CMV-Promotor vermittelt in humanen Jurkat T-Zellen eine stabilere Transgenexpression als der PGK-Promotor. a) Mo/MP-CG transduzierte Klone, b) Mo/MP-PG transduzierte Klone und c) Vergleich von Massenkulturen (Mk, n=3) und klonierten Zellen (n=12).

Vektorverlust ist nicht Ursache für die Inaktivierung der eGFP-Expression in Klonen

Im Fall von jeweils einer Vektorkopie pro Zelle können Veränderungen im Genotyp leicht festgestellt werden. Im Fall von zwei oder mehr Integrationen pro Zelle kann die Abschaltung einer einzelnen Kopie aufgrund der Expression anderer Kopien nicht quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurden zu Versuchsbeginn Southern Blot-Analysen durchgeführt und Klone mit jeweils einer Vektorkopie ausgewählt. Um zu prüfen, ob der festgestellte Expressionsverlust auf genetische Ursachen zurückzuführen ist, wurde genomische DNA aus den Klonen auch zu Versuchsende anhand von Southern Blot-Analysen untersucht (Abb. 4; vergl. Kap. 2.2.1.5).

Bei Hybridisierung der DNA mit der als Sonde eingesetzten Promotor-eGFP-Kassette (Abb. 4c) waren pro Spur eine eGFP-Bande (809 bp) und pro Vektorintegration jeweils zusätzlich eine Bande unterschiedlicher Größe nachweisbar. Bei allen im Rahmen der Langzeituntersuchungen ausgewählten Klonen waren zwei Banden sichtbar (Abb. 4a: Spuren 1-9, 11, 12, 14 und Abb. 4b: Spuren 18-20, 22, 24-25). Daraus ergibt sich, daß alle Klone weiterhin den proviralen Vektor tragen und somit Vektorverluste in den Klonen nicht Ursache für die Inaktivierung der eGFP-Expression ist. Vermutlich ist der Expressionsverlust in diesen Fällen auf Löschung der Vektorexpression zurückzuführen.

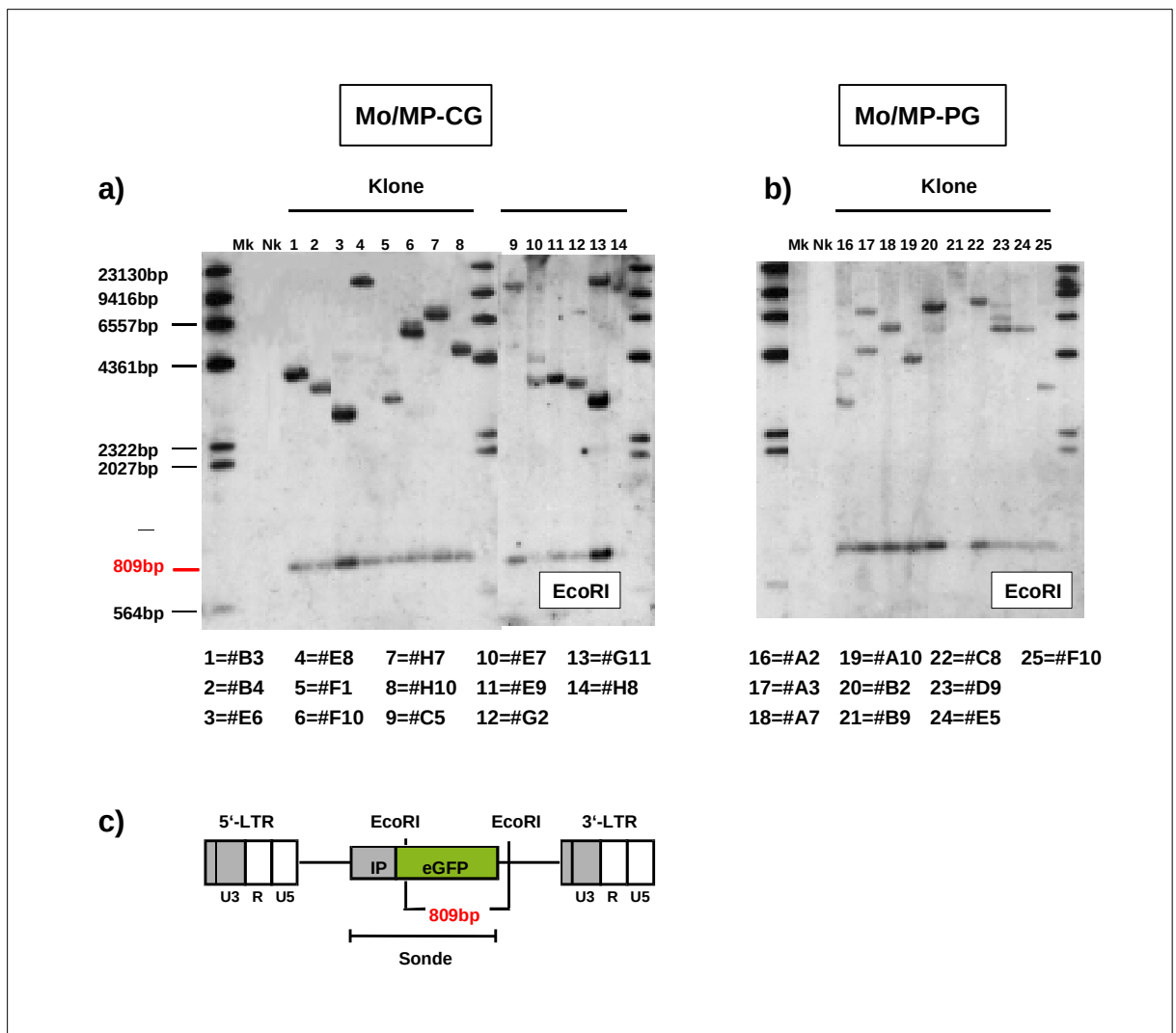


Abbildung 4: Die Inaktivierung der eGFP-Expression ist nicht auf genetischen Verlust des proviralen Vektors zurückzuführen, da die Anzahl der Vektorkopien unverändert bleibt. Genomische DNA aus Juratzellklonen (transduziert mit a) Mo/MP-CG, b) Mo/MP-PG) wurde mit *EcoRI* gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine Blot-Membran mit der in c) dargestellten Sonde hybridisiert. Die Analyse genomischer DNA fand zu Versuchsbeginn und auch zu Versuchsende statt. Die Resultate hierfür waren identisch. Repräsentativ sind hier die Ergebnisse zu Versuchsende abgebildet. Mk=gDNA aus Vektor-transduzierten Massenkulturen, Nk=gDNA aus untransduzierten Jurkatzellen, IP=interner Promotor (in a:CMV-Promotor, in b: PGK-Promotor). Die Klone in den Spuren 10, 13, 16, 17 und 23 wurden aufgrund von Mehrfachintegrationen nicht für die Langzeitexpressionsanalysen ausgewählt.

Die Abschaltung der Transgenexpression ist stabil

Zur Klärung, ob die Abschaltung der eGFP-Expression in den Zellen stabil ist oder die Expression durch dynamische Aktivierung und Inaktivierung der Transkriptionseinheit oszilliert (Ostertag *et al.*, 1974; Feng *et al.*, 1999), wurden bestimmte Klone zur Subklonierung ausgewählt. Es wurden Kulturen ausgewählt, bei denen nach vier Monaten Kultivierung gleichzeitig jeweils eine eGFP-positive und eine eGFP-negative Zellfraktion

deutlich voneinander zu unterscheiden waren. Von diesen Fraktionen wurden über Zellsortierung jeweils Einzelzellen abgelegt und nach deren Expansion die Expression bis zu 14 Wochen nach Sortierung wöchentlich mittels FACS analysiert. Ursprünglich aus der eGFP-negativen Fraktion stammende Zellen blieben im Beobachtungszeitraum eGFP-negativ, während Zellen aus der eGFP-positiven Fraktion eGFP-positiv blieben. Daraus ergibt sich, daß die Inaktivierung der Vektorexpression in der eGFP-negativen Zellfraktion stabil ist. Im Laufe der Kultivierung kam es bei letzteren allerdings zu dem bereits beschriebenen Expressionsverlust (vergl. Abb. 3, sowie nicht gezeigte Daten).

Da trotz Heteroploidie chromosomaler Verlust in den Jurkatklonen nicht Ursache des Expressionsverlusts war, wurde geprüft, ob die Inaktivierung in den eGFP-negativen Subklonen auf Ebene der Transkription stattgefunden hat. Zu diesem Zweck wurde RNA präpariert und anschließend in einer Transkriptionsanalyse untersucht. Die in Abb. 5 dargestellten Ergebnisse zeigen keine vektorspezifischen Transkripte für die eGFP-negativen Subklone. Damit ist gezeigt, daß die Transgenexpression auf Ebene der Transkription blockiert ist und die Abschaltung über die Zellteilung hinweg stabil auf die Tochterzellen (Subklone) vererbt wird.

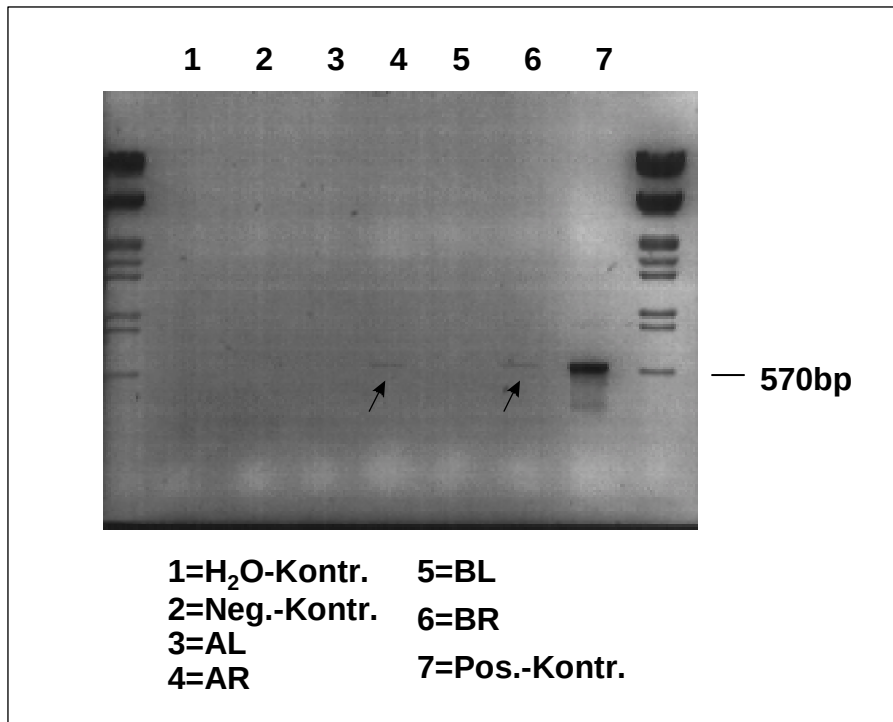


Abbildung 5: Die Abschaltung der Transgenexpression findet in Jurkatklonen auf Ebene der Transkription statt. Die Analyse wurde repräsentativ mit Mo/MP-PG transduzierten Subklonen durchgeführt (verwendete Primer: R326MCS5: 5'-ATC CAG CCC TCA CTC CTT C-3'; PGKP3A: 5'-ATA TTG CTA GCA GGT CGA AAG GC-3'). Neg.-Kontr.=RNA aus untransduzierten Zellen, AL=RNA von #A7-1 (aus urspr. EGFP-neg. Zellfraktion sortiert), AR=RNA von #A7-6 (aus urspr. EGFP-pos. Zellfraktion sortiert), BL= RNA von #B9-5 (aus urspr. EGFP-neg. Zellfraktion sortiert), BR= RNA von #B9-1 (aus urspr. EGFP-pos. Zellfraktion sortiert), Pos.-Kontr.=Plasmidvektor pMo/MP-PG.

3.2 Abschaltungsmechanismen der Expression retroviraler Suizidgenvektoren in T-Zellen im Mausmodell

Im Rahmen zelltherapeutischer Anwendungen (Übersichtsartikel: Baum *et al.*, 2002) wurden Suizidgene zur Entfernung transduzierter Tumor- bzw. T-Zellen bereits erfolgreich in klinischen Phase I/II-Prüfungen benutzt (Tiberghien *et al.*, 2001; Packer *et al.*, 2000; Marini *et al.*, 1999; Anonym, 1997; Klatzmann *et al.*, 1998; Bonini *et al.*, 1997; Tiberghien *et al.*, 1996). Zur schnellen präklinischen Prüfung der Expression von Suizidgenvektoren für die adoptive Immuntherapie fehlten bisher geeignete *in vivo* Modelle (vergl. Kap. 1.6). Das Hauptziel der Arbeit war daher die Entwicklung eines solchen Modells (Maus) zur präklinischen Testung der Expression von Suizidgenvektoren. Es sollten diejenigen Mechanismen identifiziert werden, die zum Verlust der Suizidfunktion führen.

In einem ersten Schritt wurden zu diesem Zweck schnellwachsende Tumorzellen mit einem Suizidgenvektor transduziert. In einem zweiten Schritt wurden sie lokal begrenzt in das rechte Hinterbein der Mäuse subkutan transplantiert. Bei Tumorentstehung wurde ein Medikament verabreicht, das zur selektiven Zerstörung der transduzierten Zellen führen sollte. Ausnahmen sind Tumorzellen, die resistent gegenüber dem Medikament sind. Solche Tumorzellen wurden nach der Behandlung reisoliert und auf Mechanismen untersucht, die zum Verlust der Expression des Transgens geführt haben.

3.2.1 Entwicklung eines Tumorzell-Transplantationsmodells (Maus) zur Untersuchung der Abschaltung von Suizidgenvektoren

Bevor die EL4-Zellen in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten eingesetzt wurden, erfolgte ihre Charakterisierung mit zellbiologischen Methoden. Zunächst wurde die *in vitro*-Verdopplungszeit (38,4 Stunden) sowie die Klonierungseffizienz (90 %) der Zellen ermittelt. Anschließend wurden die EL4-Zellen mittels immunologischer Färbeverfahren und anschließender FACS-Analyse auf Expression der Oberflächenmoleküle Lyt5.1/Lyt5.2 (siehe Abb. 24; vergl. Kap. 2.2.3.1), CD90.2 (=Thy1.2), CD3, CD4 und CD8 (nicht gezeigte Daten) überprüft.

Bestimmung des geeigneten Applikationsorts

Für die Entwicklung des bereits geschilderten Tumorzell-Transplantationsmodells ist es wichtig, einen Applikationsort in Mäusen zu bestimmen, bei dem die tumorigenen EL4-Zellen ein reproduzierbares und einfach zu bestimmendes Krankheitsbild hervorrufen. Da EL4-Zellen in syngen Mäusen je nach Applikationsroute verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen können (Mann *et al.*, 1986), wurden Mäusen in Vorversuchen die Zellen intravenös oder subkutan injiziert. Intravenös transplantierte EL4-Zellen verursachen kein einheitliches Krankheitsbild (Tab. 2). Neben z.T. auftretenden Lähmungserscheinungen der hinteren Extremitäten zeigte die anatomische Analyse der Mäuse pathologische Veränderungen verschiedener Organe (Vergrößerungen, Nekrosen, Zysten, Tumore) sowie zusätzlich die Bildung von Lymphomen diversen Ursprungs. Im Fall der subkutanen Transplantationsmethode entsteht ein lokal begrenzter Tumor. Seine Größe kann durch Messung mit einer Schieblehre einfach und schnell bestimmt werden. Aus diesem Grund eignet sich die subkutane Transplantationsmethode gut als Applikationsroute der EL4-Zellen und wurde für die weitere Entwicklung des Tumorzell-Transplantationsmodells beibehalten.

Gruppe (Anzahl Mäuse)	Leukozyten- zahl im Blut ($\times 10^6/\text{ml}$)	Thymus (mg)	Milz (mg)	Lymphknoten- vergrößerung	Lymphome/ Tumoren
Neg.-Kontr. (n=4)	12.8	80	105	nein	keine
5×10^4 EL4 (n=12)					
Woche 1 (n=3)	8.5	80	stark vergr. nekrotisch	nein	keine
Woche 3 (n=4)	9.5	65	stark vergr. nekrotisch	lumbal: sehr stark inguinal: stark	•Mesenterial- und Ischias-Lymphkn. •Nierentumor
Woche 4 (n=5)	9.5	50	stark vergr. nekrotisch	lumbal: sehr stark inguinal: stark	•Renal-Lymphkn. •Leber- u. Nieren- zysten •Hinterbeintumor
5×10^5 EL4 (n=12)					
Woche 1 (n=3)	11.5	60	nekrotisch	nein	keine
Woche 2 (n=3)	13.1	55	stark vergr.	lumbal: stark	•Renal-Lymphkn. (Nierentumor)
Woche 3 (n=6)	11.3	30	stark vergr. nekrotisch	lumbal: sehr stark inguinal: stark	•Mesenterial- Lymphkn. •Nierentumoren •Leberzysten/ -tumoren

Tabelle 2: Die intravenöse Applikation tumorigener EL4-Zellen verursacht in C57BL/6-Mäusen kein einheitliches Krankheitsbild und ist deshalb ungeeignet für die Entwicklung des Mausmodells. Verschiedene Zelldosen (5×10^4 , 5×10^5) wurden 8 Wochen alten Tieren (n=12) intravenös über die zentrale Schwanzvene (in 1x PBS resuspendiert) verabreicht. Zur Ermittlung pathologischer Veränderungen nach Zellgabe (Untersuchungszeitpunkte: Woche 1-4) wurden verschiedene Meßparameter untersucht. Neg.-Kontr.=untransplantierte Mäuse (n=4); vergr.=vergrößert.

Titration von EL4-Zellen zur Bestimmung der geeigneten Zelldosis

Ziel ist es, in den Mäusen Tumorwachstum innerhalb einer definierten, möglichst kurzen Zeit, reproduzierbar hervorzurufen. Das Zeitintervall zwischen Transplantation und Tumorentstehung mußte durch Auswahl einer geeigneten Zelldosis so eingestellt werden, daß die Suizidgentherapie sich noch ausreichend gegen die aggressiven Tumorzellen durchsetzen kann. Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen Titrationsanalysen der EL4-Zellen in C57BL/6-Mäusen durchgeführt (Abb. 7). Zellzahlen zwischen 1×10^4 - 1×10^6 EL4-Zellen wurden pro Maus subkutan infundiert. Bei Inokulation einer Dosis von 1×10^5 EL4-Zellen in das rechte Hinterbein der Tiere entstand bereits nach 10 Tagen ein Tumor von $6,6 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ Durchmesser. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit wurden diese Bedingungen für alle nachfolgenden Transplantationsexperimente verwendet.

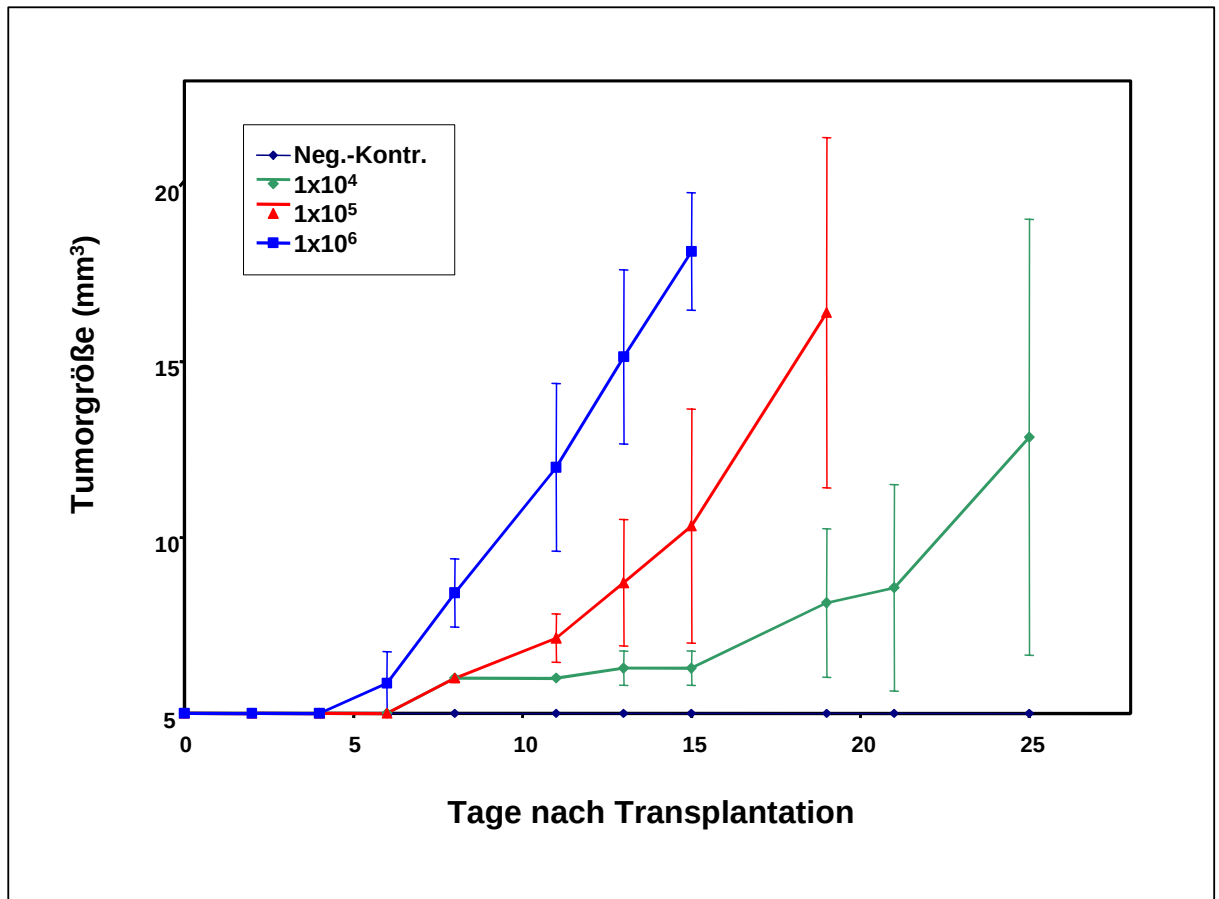


Abbildung 7: Titration tumoriger EL4 T-Zellen in C57BL/6-Mäusen. Verschiedene Zelldosen (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6) wurden den Tieren subkutan in das jeweils rechte Hinterbein gespritzt und das entstehende Tumorwachstum gemessen ($n=7$). Neg.-Kontr.=untransplantierte Mäuse ($n=7$).

Durch die Methode von Skipper wurden die Daten der Titrationsexperimente zur Berechnung der Verdopplungszeit der EL4-Zellen *in vivo* (etwa 38 Stunden, Abb. 8) benutzt (Golumbek *et al.*, 1992). Dieses entspricht der *in vitro* Verdopplungszeit.

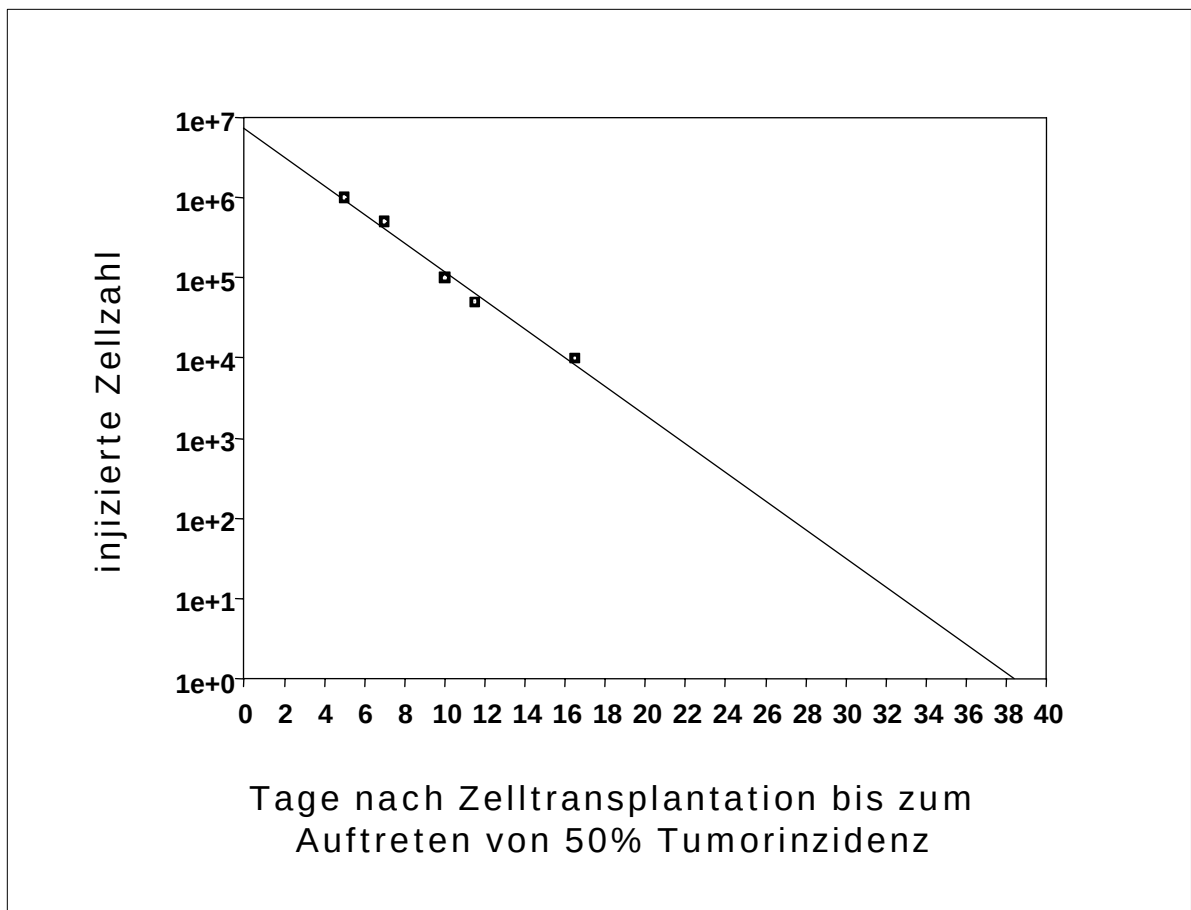


Abbildung 8: Analyse nach Skipper zur Ermittlung der Verdopplungszeit von EL4-Zellen in C57BL/6-Mäusen. Die Bestimmung erfolgte durch Extrapolation der Regressionsgeraden (1×10^4 Zellen: $n=7$; 1×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen: je $n=12$; bei 5×10^4 bzw. 5×10^5 Zellen: je $n=5$).

Das Prinzip des Modells zur *in vivo* Analyse der Suizidgenvektoren

Um Ursachen für den Verlust retroviraler Suizidgenvektoren *in vivo* zu analysieren, wurde ein Tumorzell-Transplantationsmodell (Maus) etabliert (Abb. 9, S. 58). Zur Testung retroviraler Suizidgenvektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit Studien mit T-Zelllinien durchgeführt. Die hier eingesetzte EL4-Zelllinie ist in C57BL/6-Mäusen tumorigen. Aufgrund des heteroploiden Zellhintergrunds war neben genetischen Verlusten des Provirus besonders die Löschung als Ursache des Verlusts der Vektorexpression interessant.

EL4-Zellen werden zunächst mit Überständen eines retroviralen Suizidgenvektors transduziert. Durch Selektion auf Expression eines koexprimierten Transgens (Neomycinphosphotransferase, neo^R) werden die vektortragenden Zellen angereichert. Da

bei Massenkulturen nicht ausgeschlossen werden kann, daß untransduzierte Zellen vorhanden bleiben, wurden aus der Massenkultur anschließend unabhängige Einzelklone durch Endpunktverdünnung (EPD) etabliert. Nach molekulargenetischer Analyse sowie funktioneller Prüfung in *in vitro* Vorversuchen (Ganciclovir-Selektion, siehe Kap. 3.2.3.: Abb. 15) werden die transduzierten EL4-Zellklone kongenen Mäusen subkutan in das rechte Hinterbein inokuliert. Bei Beginn der Tumorentstehung wird durch medikamentöse Behandlung (Ganciclovir) der Suizidmechanismus aktiviert und eine Negativ-Selektion der infundierten Zellen durchgeführt. Im Fall einer erfolgreichen Therapie findet idealerweise eine komplette Tumorregression in den Mäusen ohne erneutes Rezidiv statt außer bei Expressionsverlust des Suizidgens. Da bei Massenkulturen, wie bereits erwähnt, auch untransduzierte Zellen vorhanden sein können, ist eine schlechtere Regressionsrate als in Klonen zu erwarten. Die resistenten Tumorzellen sollten im folgenden erneut Tumorwachstum hervorrufen. Die Verwendung von Klonen erlaubt, die Ursache der Resistenz zu untersuchen. Die tumorigene Wirkung von transduzierten EL4-Zellen in Gegenwart von GCV ist somit Indikator für eine zu schwache Expression bzw. einen Verlust der Expression. Nach Reisolierung der GCV-resistenten Zellen können durch immunologisch-zellbiologische sowie molekularbiologische Analysen diejenigen Mechanismen identifiziert werden, die zu einem Verlust der Expression geführt haben.

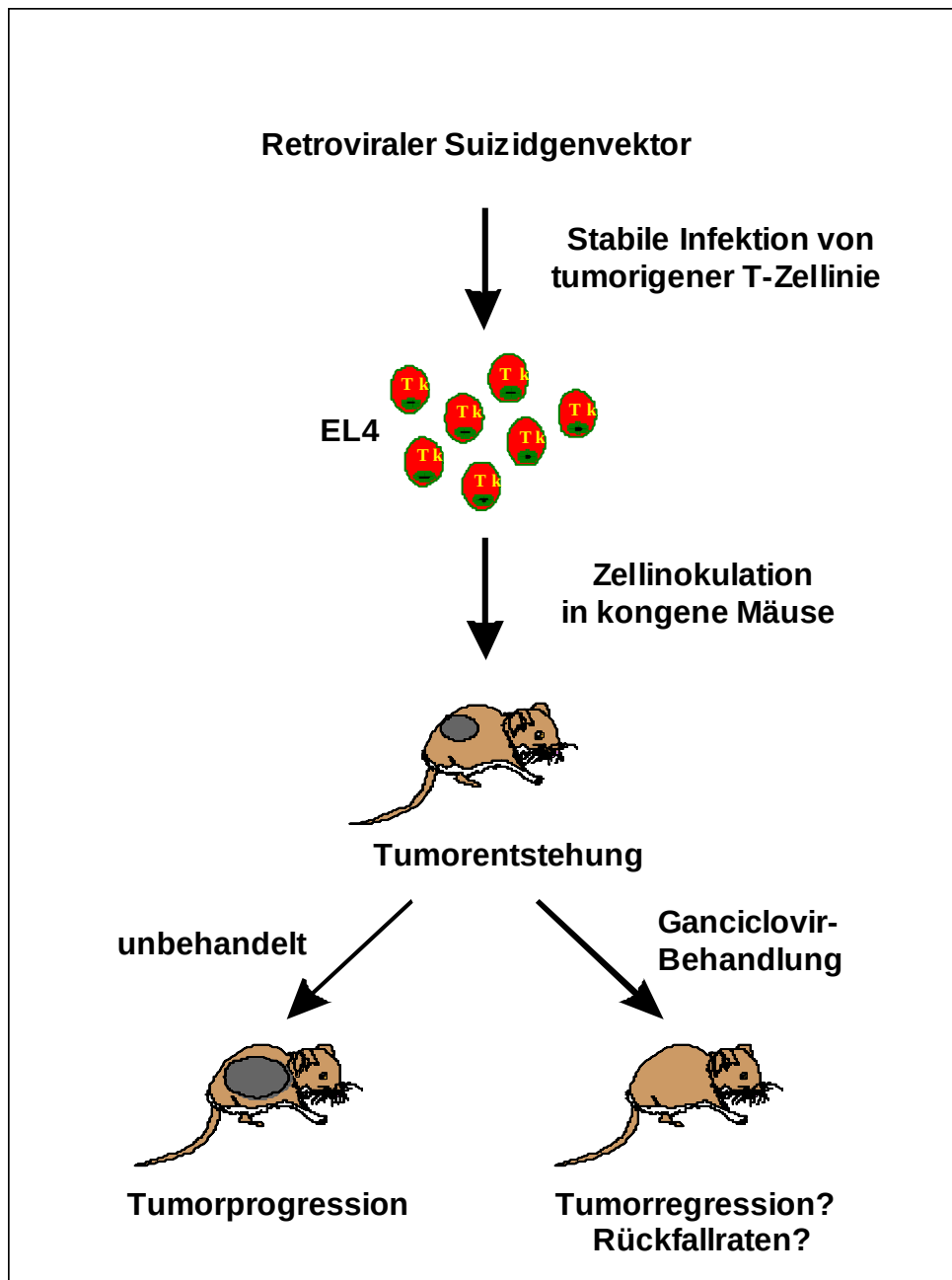


Abbildung 9: Darstellung der Entwicklung des Tumorzell-Transplantationsmodells für die Testung retroviraler Suizidgenvektoren.

Das Herpes Simplex Virus Thymidinkinase/Ganciclovir-System (HSV-Tk/GCV)

Expressionsprodukte von Suizidgenen werden definiert durch ihre Funktion, eine nicht-toxische Vorstufe (Prodroge) in eine zytotoxische Substanz umzuwandeln. Diese Medikamente können z.B. Basenpaaranaloga sein.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Suizidgen handelt es sich um die Thymidinkinase aus *Herpes Simplex Virus-1* (HSV1-Tk). Da die HSV1-Tk eine um etwa drei Größenordnungen höhere Affinität zum künstlich hergestellten Guanosinanalogue Ganciclovir (GCV) als zelluläre Thymidinasen besitzt, wird dieses Medikament selektiv in HSV1-Tk exprimierenden Zellen phosphoryliert. Die monophosphorylierte Form des GCV wird im weiteren Verlauf durch zelluläre Kinasen di- und triphosphoryliert (Miller und Miller, 1980; Boehme, 1984; Übersichtsartikel: Matthews und Boehme, 1988; Akyürek *et al.*, 2001). Das resultierende Produkt konkurriert mit dem Substrat dGTP bei der DNA-Synthese der Zelle. GCV-Triphosphat fehlt die 3'-Hydroxylgruppe am Desoxyriboseerest sowie die Bindung zwischen dem 2' und 3' Kohlenstoffatom, die zur DNA-Kettenverlängerung notwendig ist. Als Resultat ruft der GCV-Triphosphateinbau einen vorzeitigen Abbruch der DNA-Synthese hervor. Dieses führt zum Tod der Zelle (Abb. 10).

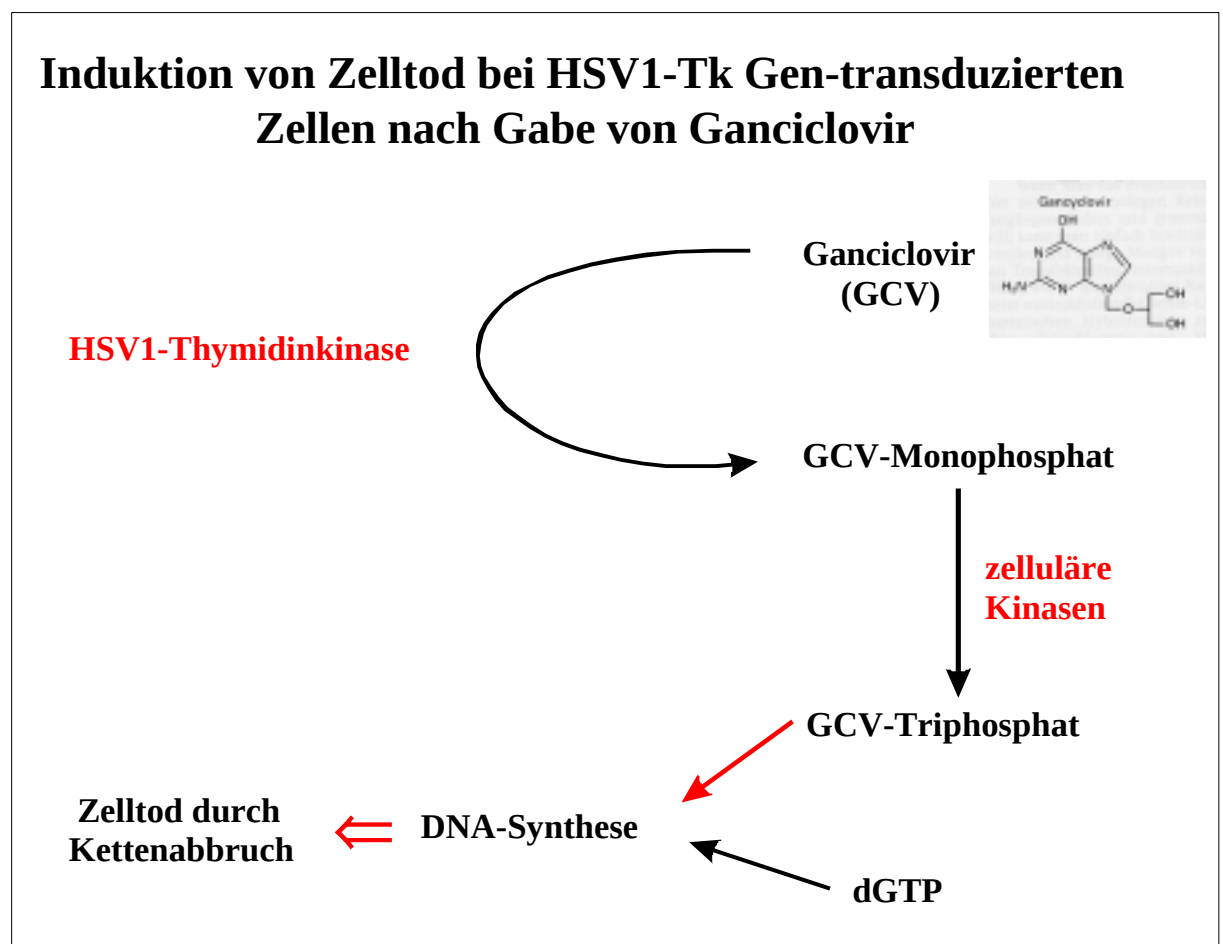


Abbildung 10: Suizidmechanismus der HSV1-Thymidinkinase (HSV1-Tk) in transduzierten Zellen nach Ganciclovirgabe.

Die im Kapitel 3.2.6 dargestellten Ergebnisse zeigen die Vorteile des neuentwickelten Mausmodells: Zum einen können retrovirale Suizidgenvektoren einer schnellen präklinischen Funktionsprüfung unterzogen und somit untereinander verglichen werden. Desweiteren ist im Rahmen dieser Analysen die Identifikation genetischer und epigenetischer Mechanismen möglich, die einer Inaktivierung der Vektorexpression zugrundeliegen. Durch die hohe Sensitivität des Tumorzell-Transplantationsmodells werden hierbei selbst seltene Ereignisse nachweisbar. Abschließend kann durch die Ermittlung der Abschaltungshäufigkeiten eine Bewertung der Sicherheit retroviraler Suizidgenvektoren vorgenommen werden.

3.2.2 Suizidgenvektoren mit HSV1-Thymidinkinasegen, die zur Expressionsanalyse *in vivo* eingesetzt werden

Vektoren zur Analyse der Suizidgenfunktion

Zur Funktionsprüfung des "EL4-Modells" wurde der in unserer Abteilung klonierte Vektor Mo3TIN verwendet, welcher für die Selektionsmarker HSV1-Tk und neo^R kodiert. Als Kontrollvektor ohne Suizidgen wurde der Vektor Mo3N verwendet. Im folgenden wird der genomische Aufbau der Vektoren erläutert (Abb. 11). Die Expression der zwei Fremdgene, HSV1-Tk und Neomycinphosphotransferase, wird über die virale Mo-MuLV LTR gesteuert, in der sich u.a. Promotor/Enhancerelemente befinden. Die als "Leader" bezeichnete untranslatierte Region vor dem HSV1-Tk Gen beinhaltet die Primerbindungsstelle von Mo-MuSV (Moloney-Maussarkomvirus) und enthält zusätzlich für die retrovirale Verpackung wichtige Sequenzen. Vektoren mit den beschriebenen Sequenzelementen vermitteln besonders in reifen T-Lymphozyten eine starke Transgenexpression (Plavec *et al.*, 1996). Die HSV1-Tk Expressionseinheit im Vektor Mo3TIN ist Teil der Suizidgenstrategie. Zur Koexpression des zweiten Selektionsmarkers (neo^R) wird die interne ribosomale Eintrittsstelle des Polio Virus (PV-IRES-Sequenz) verwendet.

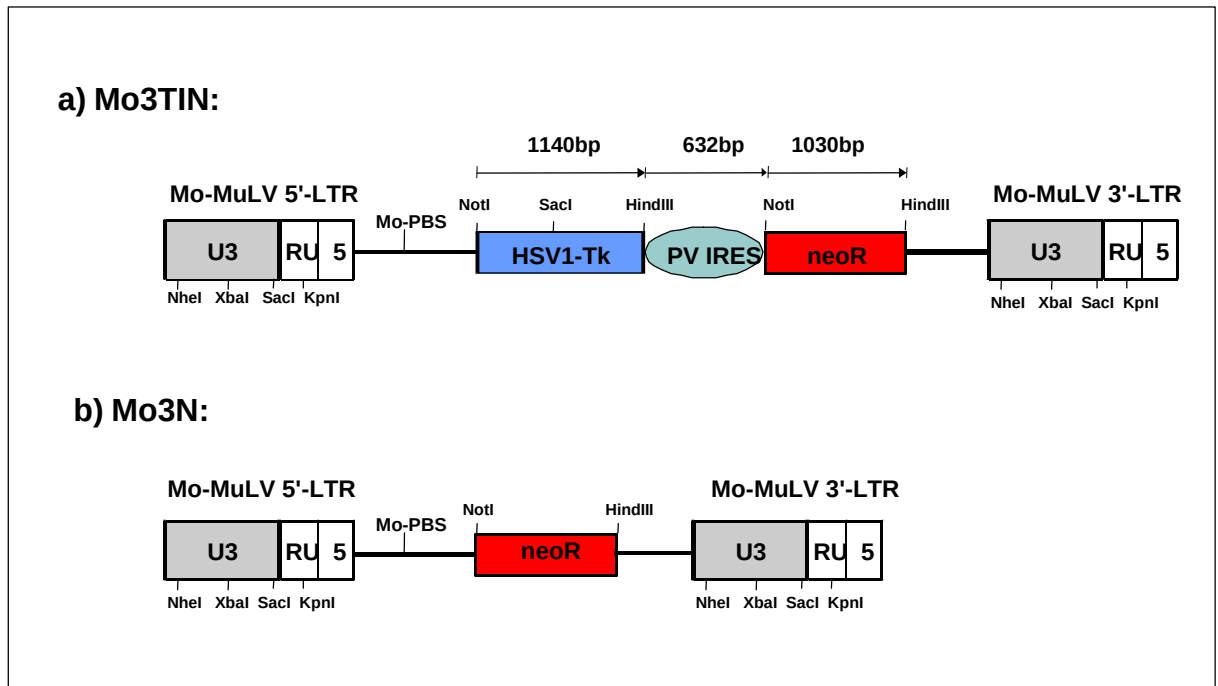


Abbildung 11: Verwendete Vektoren für die Prüfung der Suizidfunktion im etablierten Mausmodell. a) Suizidgenvektor Mo3TIN mit HSV1-Tk cDNA und Neomycinphosphotransferase (neo^R) cDNA, b) Referenzvektor Mo3N. Mo-PBS=Mo-MuSV Primer-Bindungsstelle, PV IRES=interne ribosomale Eintrittsstelle von Polio Virus.

3.2.3 Entwicklung, Charakterisierung und *in vitro*-Funktionsprüfung Suizidgen-tragender T-Zellen

Herstellung transduzierter Massenkulturen und Klone

Für die Herstellung Suizidgen-tragender EL4-Zellen wurden Transduktionen mit dem Mo3TIN-Vektor durchgeführt. Die für die Infektion verwendeten transient hergestellten Überstände enthielten VSV-G/ampho-*env* pseudotypisierte Viruspartikel (Titer: $1\text{-}3 \times 10^5$ Partikel/ml). Für die Infektion wurde eine MOI von ≤ 1 gewählt, um zu gewährleisten, daß die überwiegende Zahl transduzierter Zellen genau eine Vektorkopie trägt. Dieses ist Voraussetzung für die Identifizierung von Abschaltungsmechanismen der retroviralen Vektorexpression. Zur Herstellung unabhängiger Klone wurden nach der Infektion Endpunktverdünnungen der Massenkulturzellen durchgeführt (Abb. 12). Die Verwendung von Klonen vereinfacht die molekulare Analyse transduzierter Zellen.

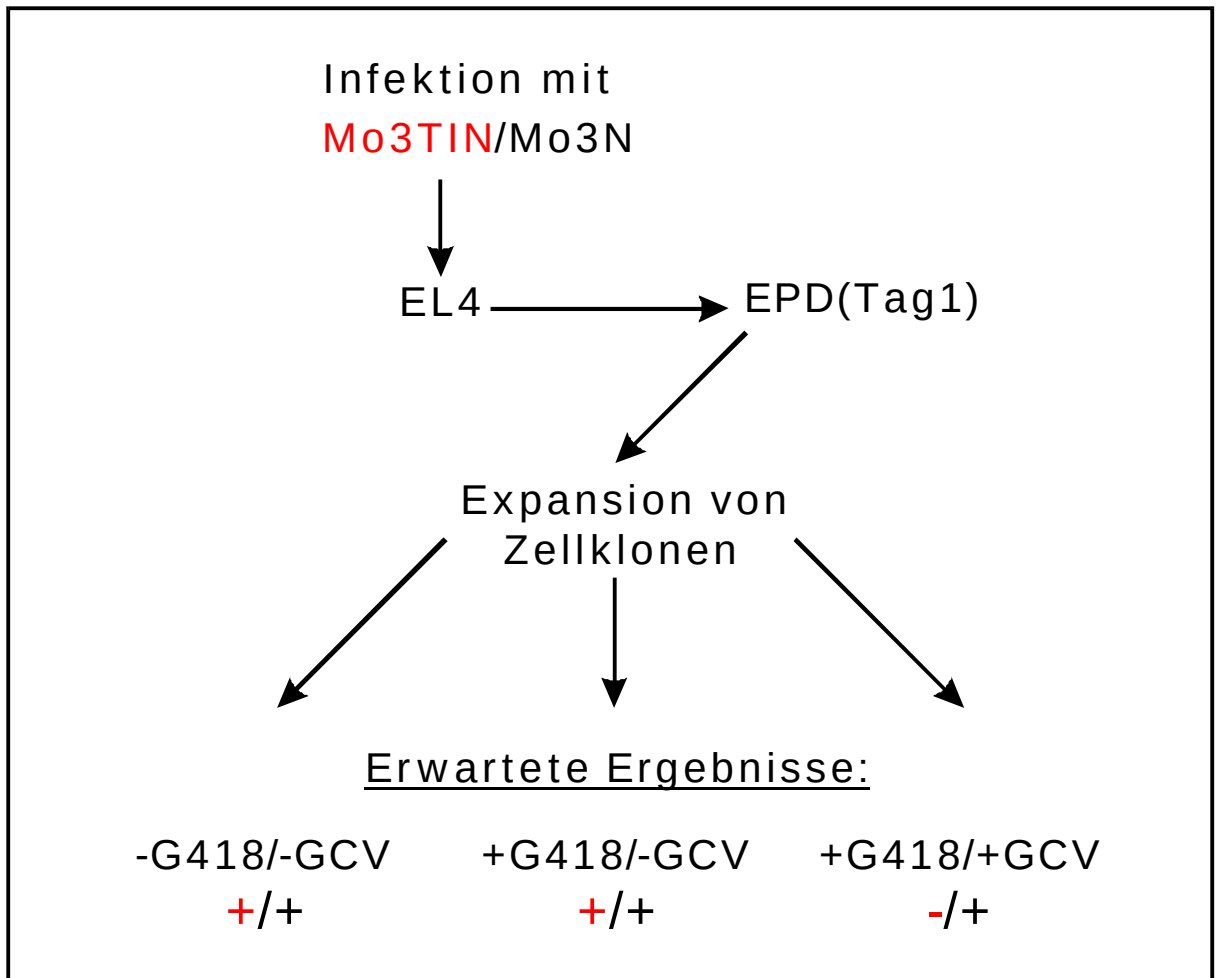


Abbildung 12: Versuchsablauf zur Klonierung transduzierter, selektierbarer EL4 T-Zellen durch Endpunktverdünnung (EPD). Im unteren Teil sind die erwarteten Ergebnisse (+=Wachstum; -=kein Wachstum) bei Kultivierung unter jeweils verschiedenen Kulturbedingungen (-G418/-GCV; +G418/-GCV; +G418/+GCV) der EL4-Zellen abgebildet. EPD=Endpunktverdünnung.

Einen Tag nach Transduktion wurde die G418-Selektion (c=1,2 mg/ml) gestartet. Die Zellen wurden mikroskopisch auf Wachstum im Verband überprüft. Dieses wurde als Hinweis für Klonalität gewertet. 14 Tage nach Aussaat der Zellen wurde die Klonierungseffizienz bestimmt. Parallel wurden Untersuchungen mit dem Kontrollvektor Mo3N unter Verwendung verschiedener Selektionsbedingungen durchgeführt. Diesem Vektor fehlt im Unterschied zum Vektor Mo3TIN das HSV1-Tk Gen.

Erwartungsgemäß konnte bei G418-Selektion (+G418/-GCV) Wachstum von Mo3TIN-transduzierten EL4-Zellen nachgewiesen werden (Tab. 3). Dieses Ergebnis zeigt, daß der Selektionsmarker neo^R in ausreichender Menge exprimiert wird. Aufgrund

der für die Infektion ausgewählten niedrigen MOI (≤ 1) ist die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachintegrationen in den gewachsenen Klonen gering. Insgesamt 14 Klone wurden isoliert (Experimente rot markiert in Tab. 3), von denen anschließend neun für weitere molekularbiologische Analysen ausgewählt wurden. Bei Doppelselektion mit G418 und GCV (+G418/+GCV) ist kein Zellwachstum bei Mo3TIN-transduzierten Zellen nachweisbar. Hiermit ist gezeigt, daß im Fall des Suizidgenvektors Mo3TIN beide Selektionsmarker, HSV1-Tk und neo^R, funktionell exprimiert werden.

Unabhängig vom verwendeten Vektor (Mo3TIN bzw. Mo3N) ergeben sich ohne Selektion (-G418/-GCV) erwartungsgemäß gleiche Klonierungseffizienzen (77,9 %). Unter G418-Selektion (+G418/-GCV) ist dieses unterschiedlich: Beide Vektoren vermitteln eine G418-Resistenz, aber es wachsen mehr Klone bei den mit dem Kontrollvektor Mo3N-transduzierten Zellen als bei den mit dem Suizidgenvektor Mo3TIN-transduzierten Zellen. Vermutlich wirkt sich im letzteren Fall die Positionierung des neo^R-Gens an zweiter Stelle im Vektorgenom nachteilig auf die Expressionsstärke und somit die Klonierungseffizienz aus. Wie erwartet wachsen bei Mo3N-transduzierten Zellen Klone bei gleichzeitiger G418- und GCV-Selektion aus. Allerdings ist die Klonierungseffizienz 10-fach geringer als bei alleiniger G418-Selektion. Ursache hierfür könnte unspezifische GCV-Toxizität sein.

ausgesäte Zellzahl pro Vertiefung	-G418/-GCV		+G418/-GCV		+G418/+GCV	
	Mo3N	Mo3TIN	Mo3N	Mo3TIN	Mo3N	Mo3TIN
0,3	20,80%	20,80%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	25%	29,20%	4,20%	0%	0%	0%
3	75%	45,80%	10,40%	2,10%	n.d.	n.d.
10	100%	95,80%	22,90%	4,20%	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	66,70%	8,30%	62,50%	0%
100	n.d.	n.d.	100%	37,50%	100%	0%
300	n.d.	n.d.	100%	87,50%	100%	0%

Tabelle 3: Isolierung von EL4-Zellklonen mit jeweils einer Kopie des Suizidgenvektors (Mo3TIN) nach G418-Selektion. Zusammenstellung der Resultate der Klonierung transduzierter (Mo3TIN bzw. Mo3N) EL4-Zellen nach Kultivierung unter verschiedenen Selektionsbedingungen (eingesetzte Konzentrationen: für G418=1,2 mg/ml; für GCV=10 μ M). Die Werte in % geben den (prozentualen) Anteil der Anzahl von Vertiefungen mit Zellwachstum in bezug auf die Gesamtanzahl analysierter Vertiefungen an (Beispiel: 2 Vertiefungen mit Zellwachstum auf insgesamt 48 Vertiefungen $\cong$ 4,20 %).

Molekulare Analyse etablierter Zellklone zeigt Unversehrtheit des Suizidgenvektors

Entscheidend für den Nachweis der Abschaltung in EL4-Zellklonen war, daß diese genau jeweils eine Vektorkopie enthalten. Für diesen Nachweis wurde genomische DNA (gDNA)

aus den etablierten Klonen isoliert und in Southern Blot-Analysen untersucht. Bei Hybridisierung der *HindIII* geschnittenen gDNA aus den EL4-Zellklonen mit der HSV1-Tk Sonde (Abb. 13c) ergibt sich pro Vektorintegration eine Bande (Abb. 13a). Ihre Größe definiert sich durch den Abstand der internen *HindIII*-Erkennungsstelle in der proviralen DNA (Position 2705) zur nächsten *HindIII*-Erkennungssequenz in der flankierenden zellulären DNA. Die Ergebnisse zeigen, daß die Mehrheit der untersuchten Zellklone (8/9) jeweils einzelne Vektorkopien enthalten. Um sicherzustellen, daß die integrierten Proviren intakt sind und nicht durch z.B. Rekombination zerstört wurden, wurden Southern Blot-Analysen mit *SacI* geschnittener gDNA aus den EL4-Zellklonen durchgeführt. Bei Hybridisierung mit der bereits erwähnten Sonde (Abb. 13c) ergeben sich erwartungsgemäß jeweils zwei Banden mit einer Größe von 1520 bzw. 2873 bp (Abb. 13b). Hiermit ist gezeigt, daß die Vektoren nach der Integration in das zelluläre Genom noch die richtige Größe haben. Größere genetische Veränderungen wurden damit ausgeschlossen.

Insgesamt wurden acht EL4-Zellklone identifiziert, die jeweils einzelne Vektorkopien richtiger Größe in ihrem Genom trugen (Abb. 13). Sechs der EL4-Klone wurden für die funktionellen *in vivo*-Studien zur Prüfung der Suizidgenvektoren ausgewählt (siehe Kap. 3.2.5, Tab. 4 und Abb. 23).

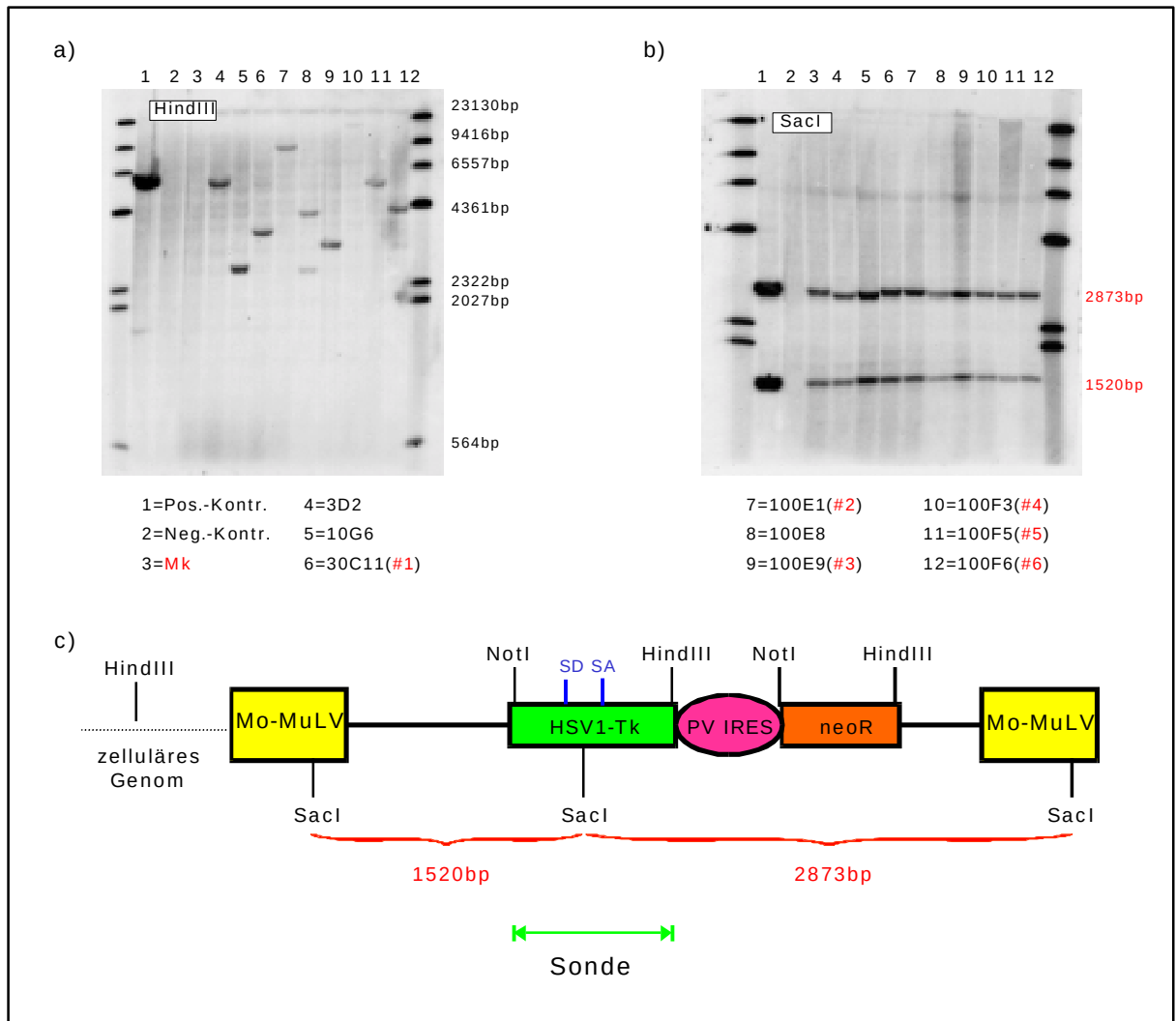


Abbildung 13: Die proviralen Sequenzen des Suizidgenvektors in den EL4-Zellklonen haben die richtige Größe. Southern Blot-Analysen genomischer DNA gespalten mit a) *HindIII*, b) *SacI*. Die Hybridisierung der gespaltenen DNA erfolgte mit der in c) dargestellten HSV1-Tk Sonde. Die *HindIII*-Schnittstelle zwischen HSV1-Tk cDNA und PV IRES befindet sich an Position 2705 des Vektors. Neg.-Kontr.=gDNA aus untransduzierten EL4-Zellen, Pos.-Kontr.=Plasmidvektor pMo3TIN, Mk=gDNA aus Suizidgenvektor-transduzierten Massenkulturzellen.

Vorversuche zur Testung der Suizidgenfunktion in den etablierten Zellklonen

Im vorherigen Experiment wurde nachgewiesen, daß keine großen, genetischen Veränderungen im Suizidgenvektor in den jeweiligen Zellklonen vorhanden sind. Inaktivierende Punktmutationen bzw. epigenetische Abschaltungsereignisse konnten mit dieser Analyse nicht untersucht werden. Aus diesem Grund wurde vor den *in vivo*-Studien geprüft, ob der Vektor funktionell exprimiert wird. Zur Bestätigung der Funktionalität des Suizidgenvektors in den sechs ausgewählten EL4-Zellklonen, wurden vor den *in vivo*-Studien vorab GCV-Selektionsanalysen *in vitro* durchgeführt.

Hierfür mußte in einem Vorversuch allerdings zunächst die GCV-Toxizitätsgrenze untransduzierter EL4-Zellen *in vitro* anhand von [^3H]-Thymidin-Proliferationsanalysen (Kap. 2.2.2.7) ermittelt werden (Abb. 14). Diese Grenze lag bei 10-30 μM GCV ($10\ \mu\text{M} \cong 2,7722\ \mu\text{g/ml}$).

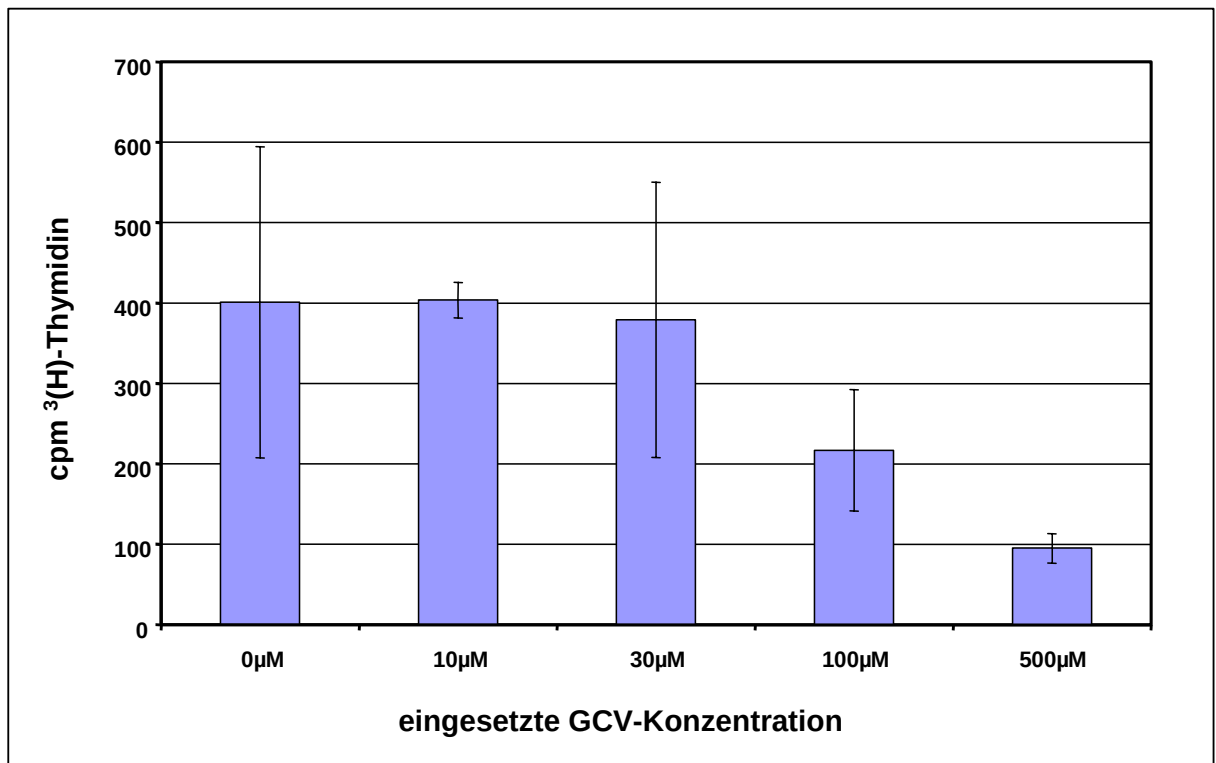


Abbildung 14: *In vitro*-Toxizität von Ganciclovir bei untransduzierten EL4-Zellen. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde die Inkorporation von [^3H]-Thymidin in Zellen (in cpm=„counts per minute“) nach dreitägiger Kultivierung mit dem Selektionsmittel GCV unter Verwendung jeweils verschiedener GCV-Konzentrationen gemessen (jeweils $n=3$).

Anschließend wurde die Funktion der Suizidgenvektoren *in vitro* überprüft. Diese funktionellen Tests wurden als GCV-Selektionsexperimente (Kap. 2.2.2.8) durchgeführt. Alle sechs Klone (siehe Abb. 13) sowie Zellen von Massenkulturen wurden auf Suizidgenexpression getestet (Abb. 15). Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen (10, 30 μM) GCV kultiviert, die innerhalb klinisch erreichbarer GCV Serumkonzentrationen liegen (Faulds und Heel, 1990; Munshi *et al.*, 1997). Die Ergebnisse bestätigen sowohl für die sechs untersuchten Klone als auch für die getesteten Massenkulturzellen die funktionelle Expression des Suizidgens vor Beginn der *in vivo*

Versuche. Damit konnten diese Zellen für die anstehenden Mausversuche (siehe Kap. 3.2.5, Tab. 4 und Abb. 23) eingesetzt werden.

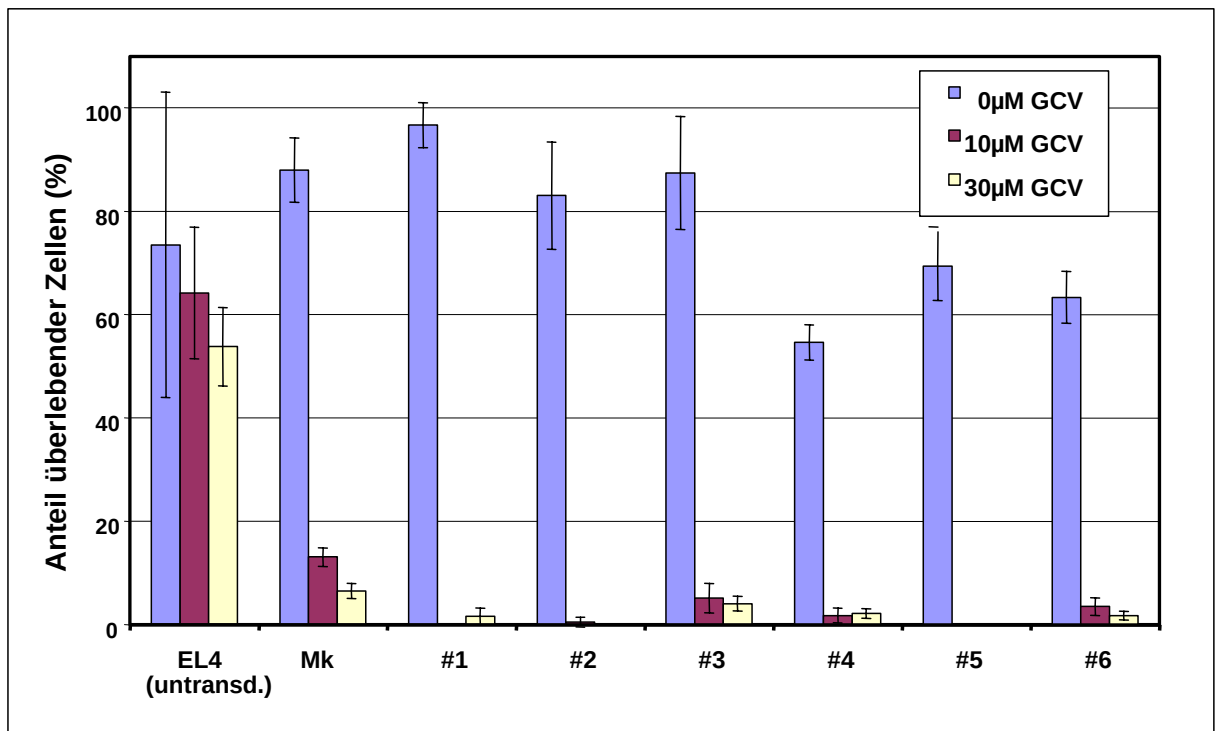


Abbildung 15: Prüfung der Funktion der Vektoren in etablierten EL4-Zellklonen vor Transplantation in C57BL/6-Mäuse. Die Funktion der Vektoren wurde durch *in vitro*-Selektion überprüft. Pro Ansatz (n=3) wurden jeweils 1×10^4 Zellen ausplattiert und nach Kultivierung im Selektionsmedium bei jeweils verschiedenen GCV-Konzentrationen (10/30 μ M) am fünften Tag ausgezählt. Grund für den geringen Anteil überlebender Zellen bei Klonen nach GCV-Selektion ist vermutlich, daß die Selektion nicht ausreichend lange durchgeführt wurde. Mk=Mo3TIN-transduzierte Massenkulturzellen.

3.2.4 Vorversuche mit Vektor-transduzierten EL4-Tumorzellen für die Suizid-gentherapie von transplantierten Mäusen

Untersuchungen zur Tumorigenität von EL4-Zellen in Mäusen wurden in oben beschriebenen Experimenten bisher nur mit untransduzierten Massenkulturzellen im Rahmen von Titrationsexperimenten durchgeführt (vergl. Kap. 3.2.1). In dem nachfolgend beschriebenen Kontrollexperiment wurde die unveränderte Tumorigenität der Vektor-transduzierten EL4-Zellen in Mäusen bestätigt. Dieses war wichtig, um die transduzierten, *in vitro* getesteten EL4-Zellklone im Rahmen von späteren Suizidgenexperimenten verwenden zu können.

Tumorigenität von transduzierten EL4-Zellen

Zunächst wurden je 1×10^5 transduzierte Zellen lokal in das rechte Hinterbein von C57BL/6-Mäusen (Lyt5.1-Stamm) subkutan verabreicht. Durch Kennzeichnung der Mäuse war es möglich, das Tumorwachstum in individuellen Tieren zu ermitteln. In der Folgezeit wurden die Hinterbeine der Mäuse 2-3mal pro Woche mit einer Schieblehre auf Tumorwachstum untersucht. Am zehnten Tag nach Zellinokulation wurde der Beginn von Tumorwachstum festgestellt. Ohne weitere Behandlung wuchsen diese Tumoren bis zu einer Größe von 20 mm^3 heran, bei der die Tiere spätestens abgetötet wurden. Das Tumorwachstum in diesen Kontrolltieren ist in Abb. 16 als Diagramm dargestellt. Bei Transplantation von transduzierten Massenkulturen entwickelten alle Tiere innerhalb von etwa zwei Wochen massives Tumorwachstum. Dieses Ergebnis ist ebenfalls bei Klonen feststellbar. Daraus ergibt sich, daß die aus den Massenkulturen hervorgegangenen Zellklone ein vergleichbares tumorigenes Potential besitzen. Dieses ermöglicht die Anwendung von gleichen Behandlungsprotokollen zwischen Massenkulturen und Klonen im Rahmen von späteren Suizidgentherapie-Experimenten. Obwohl GCV auch bei Massenkulturzellen wirkt, sind sie im Gegensatz zu den Klonen nicht für die Quantifizierung von Verlusten der Suizidgenexpression geeignet.

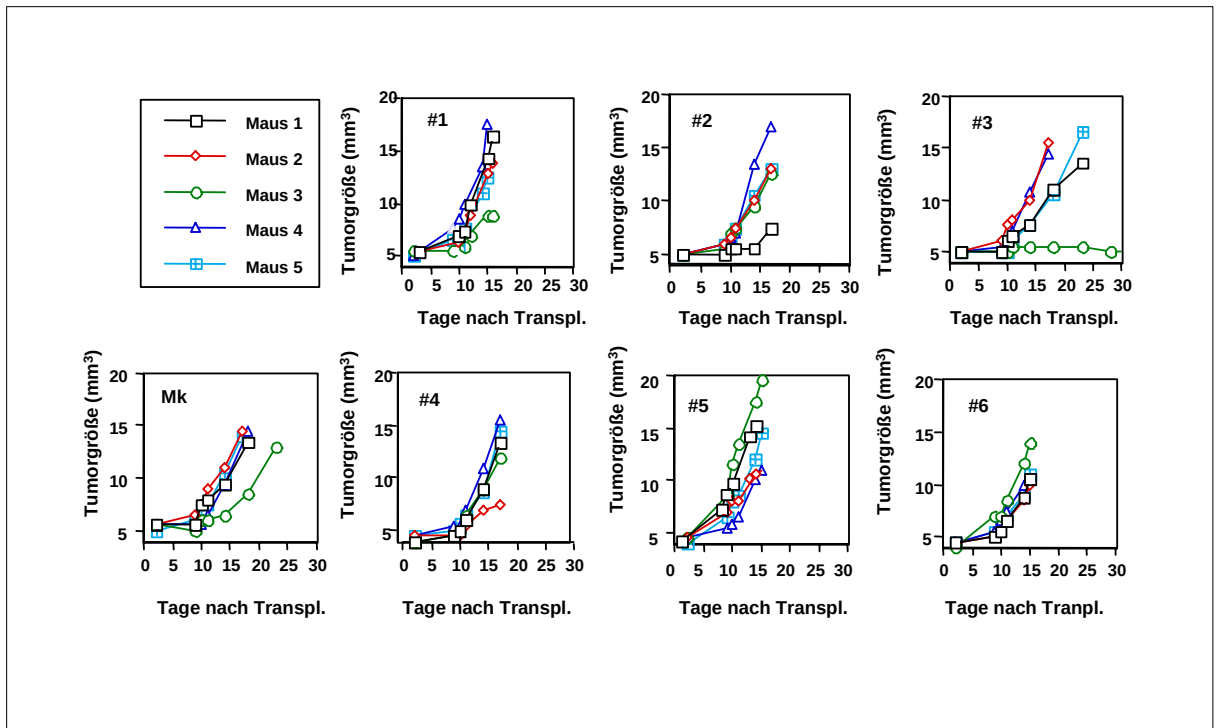


Abbildung 16: Tumorigenität von transduzierten EL4-Zellen. Bei den mit EL4-Zellen transplantierten C57BL/6-Mäusen erfolgte keine GCV-Behandlung. Vektor-transduzierte Massenkulturen (Mk) und Zellklone (#1-6) besitzen ein etwa gleiches tumorigenes Potential. Maus Nr. 3 von #3 blieb im Beobachtungszeitraum ohne Anzeichen von Tumorwachstum.

Die GCV-Konzentration ist für untransduzierte EL4-Zellen nicht toxisch

Zur Behandlung der Tiere nach Tumorbildung wurde eine GCV-Konzentration von 50 mg/kg pro Tag eingesetzt. Um ausschließen zu können, daß GCV in dieser Konzentration auch für EL4-Zellen ohne Suizidgenvektor toxisch ist, wurden *in vivo* Kontrollexperimente durchgeführt. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse mit untransduzierten EL4-Zellen transplantiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Einteilung der Tiere in zwei Gruppen (n=6). Für die folgenden sieben Tage wurden die Tiere der ersten Gruppe mit 1x PBS und die der zweiten Gruppe mit Ganciclovir (50 mg/kg pro Tag), gelöst in 1x PBS, behandelt. Es wurden bei Mäusen, die mit bzw. ohne GCV behandelt wurden, keine Unterschiede im Tumorwachstum von untransduzierten EL4-Zellen festgestellt. Somit ist im Rahmen dieser Untersuchungen kein toxischer Effekt mit der verwendeten GCV-Menge (50 mg/kg pro Tag) bei untransduzierten Zellen *in vivo* feststellbar (Abb. 17). Diese GCV-Konzentration wurde deshalb für die nachfolgenden Studien zur Suizidgentherapie verwendet. In einer früheren Studie wurde diese Konzentration bereits erfolgreich zur Entfernung Suizidgen-tragender T-Zellen in C57BL/6-Mäusen benutzt (Cohen *et al.*, 1997).

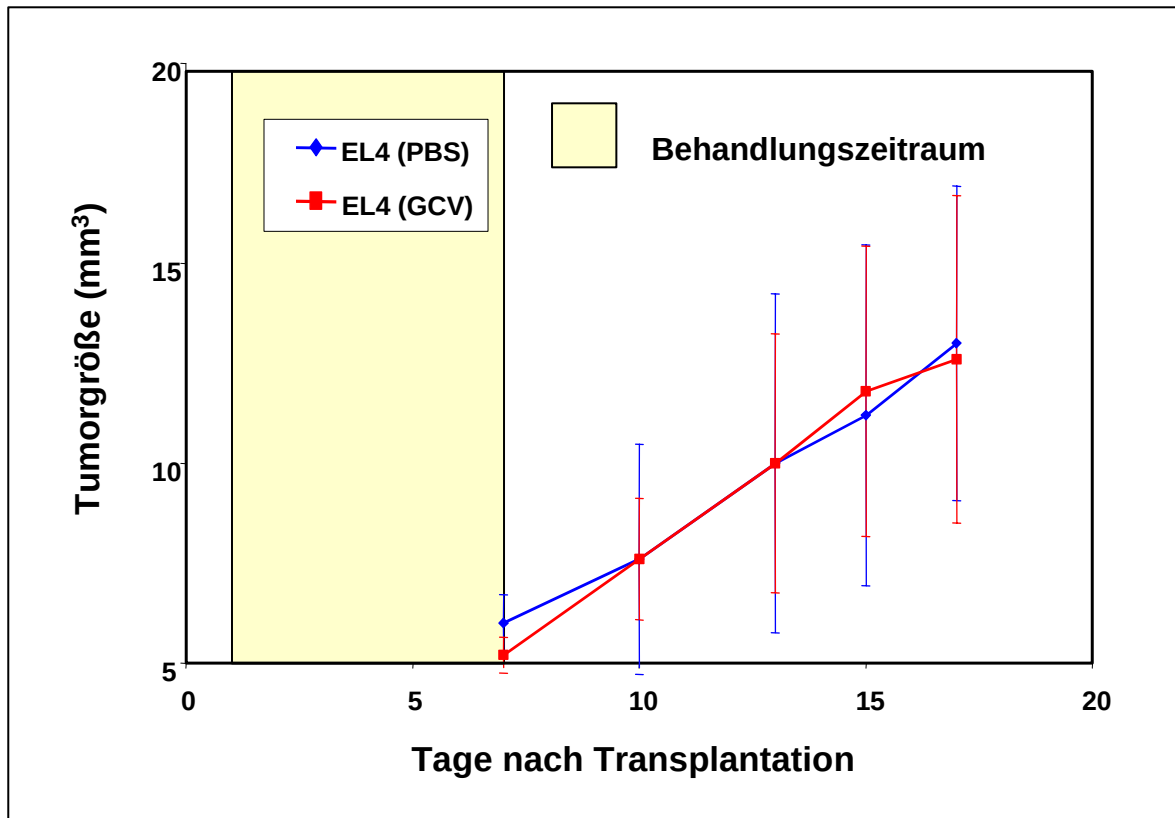


Abbildung 17: Bei der verwendeten GCV-Konzentration (50 mg/kg proTag) war kein toxischer Effekt bei transplantierten, untransduzierten EL4-Zellen nachweisbar. C57BL/6-Mäuse wurden mit EL4-Zellen ohne Suizidgenvektor transplantiert und mit (GCV) bzw. ohne GCV (PBS) behandelt (n=6). Die Messungen des Tumorwachstums in dem rechten Hinterbein der Tiere erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen.

Verschiedene Behandlungsprotokolle wurden getestet, um Tumorentstehung entweder zu verhindern oder vorhandene Tumoren zu entfernen (vergl. Kap. 2.2.3.2). Nach dem ersten Protokoll wurden die Tiere am ersten Tag nach Zellapplikation mit GCV behandelt (prophylaktischer Ansatz). Nach dem zweiten Protokoll erfolgte die GCV-Gabe erst bei Beginn der Tumorentstehung (kurativer Ansatz).

Vergleich unterschiedlicher Behandlungsprotokolle für die Suizidgentherapie

Im Rahmen des prophylaktischen Behandlungsansatzes wurde den mit Massenkulturzellen transplantierten Tieren (n=5) früh nach der Transplantation GCV injiziert (vergl. Kap. 2.2.3.2). Der Beginn der Behandlung erfolgte am ersten Tag nach der subkutanen Inokulation der EL4-Zellen. Die Suizidgentherapie wurde insgesamt über einen Zeitraum von sieben Tagen mit einer täglichen, intraperitonealen Verabreichung von 50 mg GCV/kg (Injektionsvolumen: 20 µl/g) pro Tier durchgeführt. Innerhalb des Behandlungszeitraums

mit GCV (Tag 1-7) wurde kein Tumorwachstum bei Tieren festgestellt, denen Mo3TIN-transduzierte EL4-Zellen transplantiert wurden (Abb. 18). Zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 14) wurde bei 4/5 Mäusen Tumorentstehung nachgewiesen. Maus Nr. 4 blieb innerhalb des Beobachtungszeitraums von sechs Monaten vollständig tumorfrei.

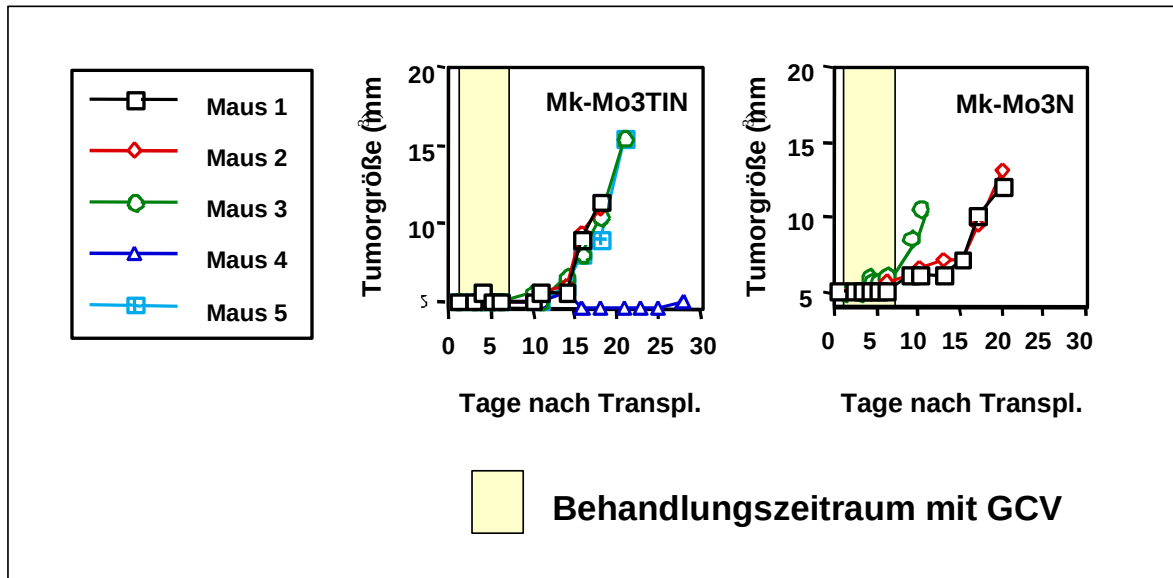


Abbildung 18: Eine präventive GCV-Behandlung kann den Verlust der Vektorexpression als Ursache des verzögerten Tumorwachstums nicht verhindern. Die GCV-Behandlung der Tiere erfolgte früh (einen Tag) nach Zellgabe (vergl. Kap. 2.2.3.2). Wachstumskontrollen für Tumoren waren mit dem Vektor Mo3N-transduzierte Massenkulturzellen (Mk-Mo3N).

Im Rahmen der kurativen Behandlung wurde den Tieren erst bei Tumorentstehung (Tag 10 nach Zelltransplantation) GCV gespritzt (vergl. Kap. 2.2.3.2). Behandelt wurde sechs Tage lang zweimal täglich mit jeweils 50 mg GCV/kg Körpergewicht (Gesamt-Tagesmenge 100 mg GCV/kg Körpergewicht). Die Verwendung von 100 mg GCV/kg pro Tag zeigte keinen negativen Einfluß auf die Differenzierung der Blutleukozyten von C57BL/6-Mäusen (Claudia Lange, KMT UKE, persönliche Mitteilung). Durch die Verdopplung der Gesamt-Tagesmenge von GCV sollte sichergestellt werden, daß die Suizidgentherapie erfolgreich die aggressiven Tumorzellen der bereits sichtbaren Tumoren zerstört.

Am Morgen wurde GCV direkt in den Tumor des rechten Hinterbeins injiziert. Abends erfolgte die Injektion intraperitoneal.

Bei Verwendung von Suizidgen-transduzierten EL4-Zellen (Mk-Mo3TIN, Abb. 19) war in transplantierten Mäusen während der GCV-Behandlung zwischenzeitlich eine Tumorregression nachweisbar. Allerdings traten im weiteren Verlauf der Untersuchung in allen (5/5) Mäusen Tumorrezidive auf.

Beide hier getesteten Therapieansätze (präventiv und kurativ) eignen sich grundsätzlich für die Analyse von Mechanismen, die zum Verlust der Vektorexpression führen. Da vorwiegend kurative Therapieansätze in der Klinik Anwendung finden, wurde bei den folgenden Experimenten ein solcher Ansatz gewählt.

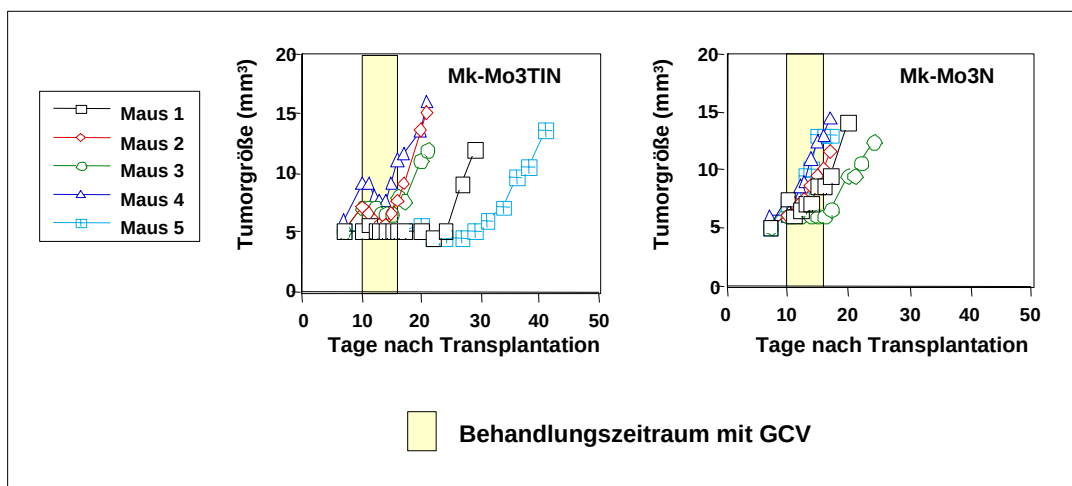


Abbildung 19: GCV-resistente Zellen verursachen Tumorwachstum in Mäusen trotz kurativer GCV-Behandlungsstrategie. Die GCV-Behandlung der Tiere erfolgte am 10. Tag nach Zellgabe (vergl. Kap. 2.2.3.2). Wachstumskontrollen für Tumoren waren mit dem Vektor Mo3N-transduzierte Massenkulturzellen (Mk-Mo3N).

Eine kontinuierliche G418-Selektion vor der Transplantation führt zur Auslese von Zellen mit stabiler retroviraler Transkription

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Ursachen, die zu einem Verlust der Expression retroviraler Suizidgenvektoren führen. Eine Möglichkeit von Verlusten der Expression ist die Löschung der retroviralen Transkription. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob kontinuierliche G418-Selektion zu einer Auslese von Zellen mit dauerhaft aktivem neo^R-Gens führt.

Nach Anreicherung Mo3TIN-transduzierter EL4-Massenkulturzellen durch 11-tägige G418-Selektion (0,6 mg/ml) wurden die Zellen bis zur Transplantation in Mäuse entweder mit oder ohne Selektionsdruck für 2,5 Wochen kultiviert. Zu erwarten ist, daß bei Kultivierung ohne Selektionsdruck Expressionsverluste häufiger auftreten.

Die Experimente wurden nach zwei unterschiedlichen Behandlungsprotokollen durchgeführt: Nach Transplantation der tumorigenen EL4-Zellen wurde die GCV-Behandlung der Mäuse entweder am Tag 1 (prophylaktische Behandlung) oder erst bei der Entstehung von deutlichem Tumorwachstum am Tag 14 (kurative Behandlung) nach Zellgabe begonnen. Die Behandlungsdauer betrug sieben Tage. In dieser Zeit bekamen die Tiere einmal täglich eine Injektion von 50 mg GCV/kg Körpergewicht (Injektionsvolumen 20 µl/g) intraperitoneal verabreicht. Die Tiere wurden in der Folgezeit regelmäßig auf Tumorwachstum untersucht.

Im Rahmen der prophylaktischen GCV-Behandlung wurde eine um etwa eine Woche verzögerte Tumorentstehung im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt (Abb. 20a: vergleiche Tag 13 bei untransduzierten EL4-Zellen mit Tag 19/20 bei Mo3TIN-transduzierten EL4-Zellen). Das Tumorwachstum war hierbei bei Tieren nach Transplantation von EL4-Zellen *mit* kontinuierlicher G418-Selektion *in vitro* vergleichbar mit der Tumorentstehung bei Tieren nach Transplantation von EL4-Zellen *ohne* kontinuierliche G418-Selektion *in vitro*. Der Anteil an Zellen, der die prophylaktische GCV-Behandlung überlebt hat, kann anhand der Ergebnisse der Zelltitrationsexperimente (siehe Kap. 3.2.1, Abb. 7) durch Extrapolation bestimmt werden. Bei einer um etwa eine Woche verzögerten Tumorentstehung ergibt sich ein Anteil von etwa 90 % die Negativ-Selektion überlebenden Zellen (Kap. 3.2.1, Abb. 7, vergleiche Wert von Tag 13 bei ursprünglich 1×10^5 transplantierten Zellen mit dem Wert von Tag 20 bei ursprünglich 1×10^4 transplantierten Zellen).

Wurde GCV erst nach der Entstehung von Tumoren verabreicht (kurativ), gingen die Tumoren während der Behandlung in den beiden zu vergleichenden Gruppen von Mäusen (mit bzw. ohne kontinuierliche G418-Selektion der EL4-Zellen vor der Transplantation) deutlich zurück bzw. es kam zu einer kompletten Tumorregression (Abb. 20b:

Behandlungszeitraum von Tag 14 bis Tag 20). Bereits eine Woche nach Abschluß der Behandlung wurde der Vorteil einer kontinuierlichen G418-Selektion bis zur Transplantation deutlich. Innerhalb dieser Zeit wuchsen in nur 2/6 Tieren mit einer kontinuierlichen G418-Selektion der EL4-Zellen vor der Transplantation erneut Tumoren aus. Bei Tieren ohne eine kontinuierliche G418-Selektion der EL4-Zellen vor Transplantation war allerdings in sogar 5/6 Mäusen Tumorwachstum nachweisbar (Daten als Mittelwerte in Abb. 20b dargestellt). Daraus ergibt sich, daß eine kontinuierliche G418-Selektion der Zellen vor der Transplantation zur Auslese von Zellen mit einer stabilen retroviralen Transkription führt.

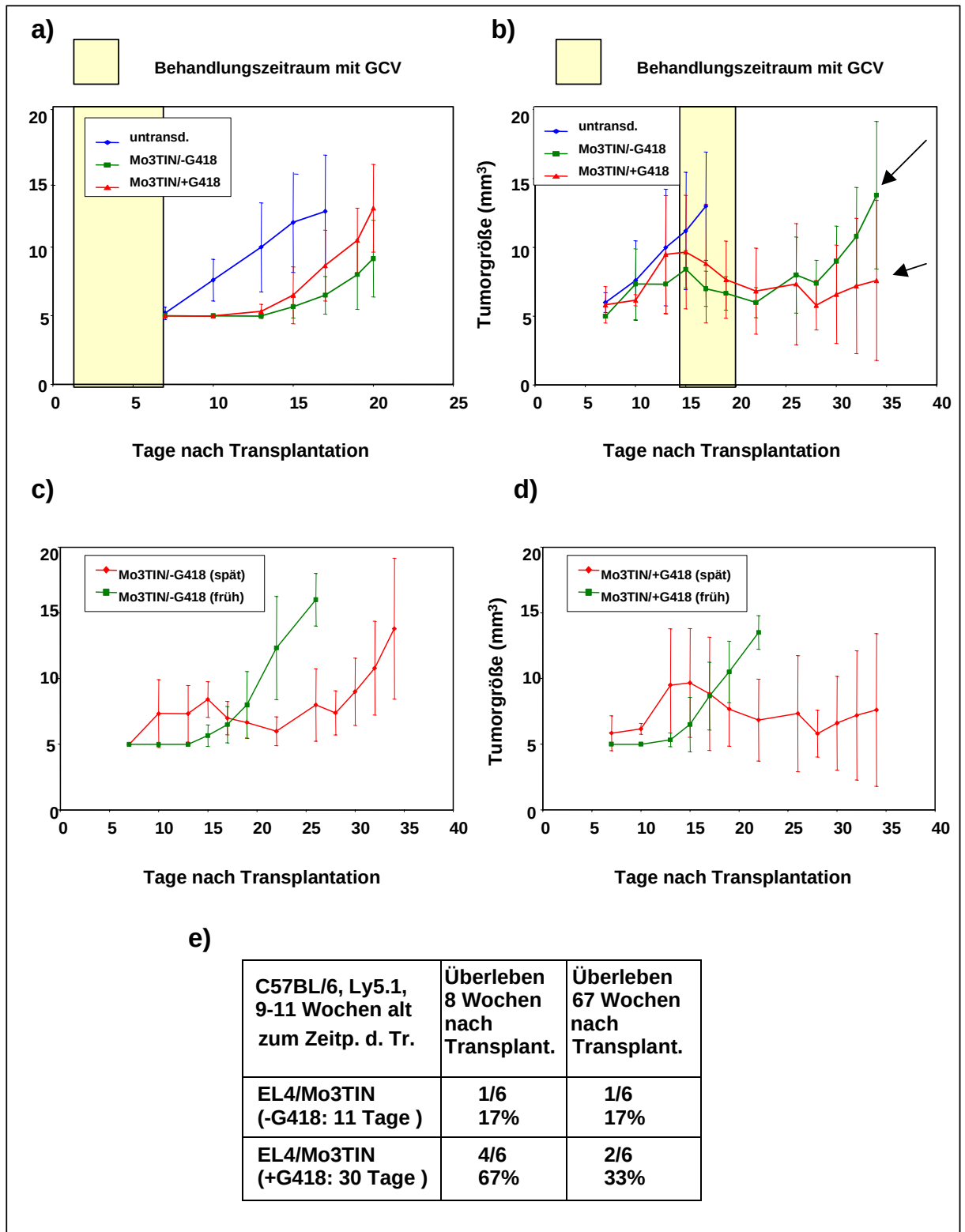


Abbildung 20: Eine kontinuierliche G418-Selektion vor der Transplantation bewirkt eine Auslese von Zellen mit einer stabilen retroviralen Expression. C57BL/6-Mäuse wurden mit Vektor-tragenden EL4-Zellen transplantiert, die ohne (Mo3TIN/-G418) bzw. mit (Mo3TIN/+G418) kontinuierlichem G418-Selektionsdruck kultiviert wurden (n=6). A) Frühe GCV-Behandlung (prophylaktisches Protokoll), b) GCV-Behandlung nach Entstehung von Tumoren (kurativ), c) + d) Vergleich frühe/späte GCV-Behandlung bei EL4-Zellen ohne vorheriger G418-Selektion (c) bzw. mit vorheriger G418-Selektion (d). e) Überleben von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation (tabellarische Übersicht).

Aus Tumoren reisolierte EL4-Zellen wurden als Zellsuspensionen *in vitro* durch GCV-Selektion auf Suizidgenexpression getestet (Abb. 21). Damit sollte geprüft werden, ob Zellen im Tumorverband nicht von GCV erreicht werden und dieses Ursache für die Tumorrezidive ist. Die Ergebnisse sprechen gegen diese Hypothese, da die reisolierten Zellen auch als Zellsuspensionen GCV resistent waren (Abb. 21d).

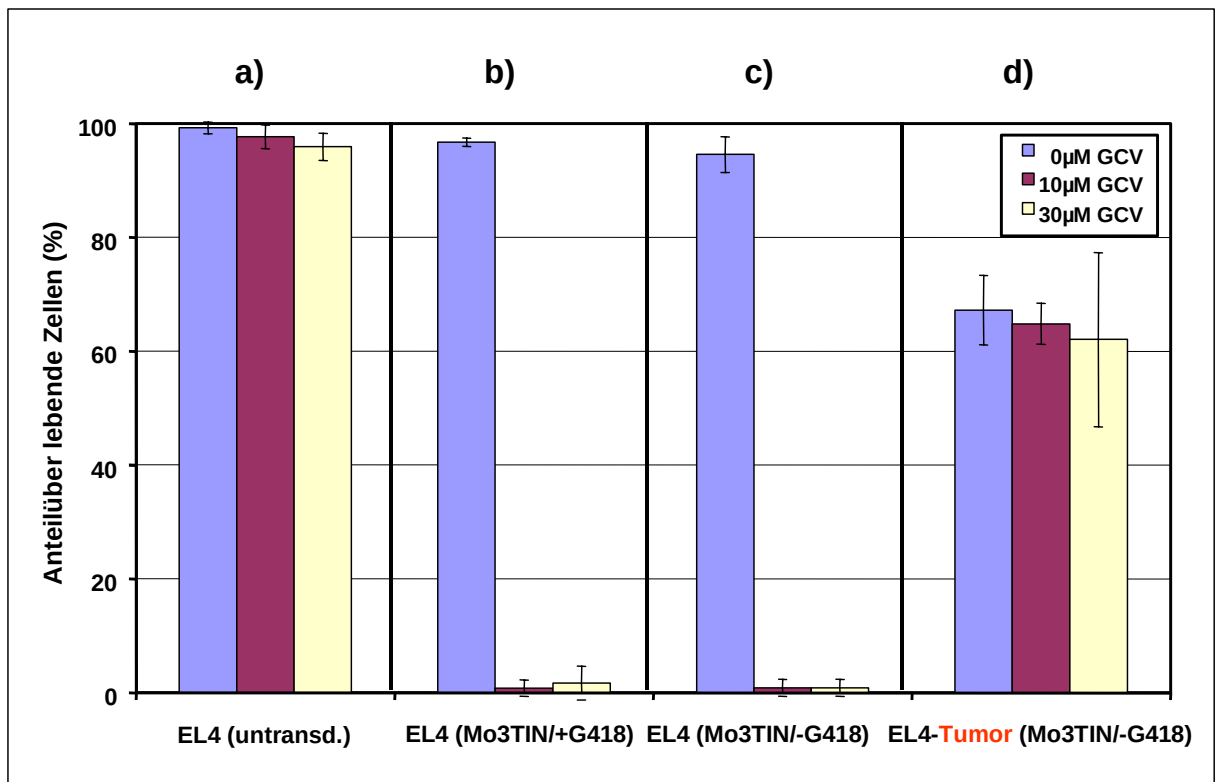


Abbildung 21: Reisolierte EL4-Tumorzellen sind auch als Zellsuspensionen resistent gegenüber GCV-Selektion. Im Rahmen dieser Experimente mit resuspendierten Zellen (Triplika-Ansätze; eingesetzte Zellzahl: je 1×10^4 ; fünf Tage Kultivierung mit 0/10/30 μM GCV) wurde untersucht, ob Zellen im Tumorverband nicht von Ganciclovir erreicht wurden und dieses Ursache für das Wiederauftreten von Tumoren ist. A) Untransduzierte EL4-Zellen, b) + c) Vektor-tragende EL4-Zellen (+/-G418=Zellen vor Transplantation mit/ohne G418 kultiviert) und d) aus Tumormaterial reisolierte EL4-Zellen.

In weiteren Studien sollte die Ursache der GCV-Resistenz in den reisolierten Tumorzellen ermittelt werden. Durch Nachweis des EL4-spezifischen Oberflächenantigens Lyt5.2 (vergl. Kap. 2.2.2.10) wurde ausgeschlossen, daß es sich um spontan auftretende, "wirtseigene" Tumore handelte (siehe Abb. 24, S. 91). Da keine funktionelle Suizidgenexpression der EL4-Zellen nachgewiesen werden konnte (vergl. Abb. 21d), wurde die Ursache der GCV-Resistenz untersucht. Zur Prüfung auf genetische Abschaltungsereignisse (z.B. chromosomaler Verlust) wurde die Unversehrtheit des

proviralen Suizidgenvektors untersucht. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA aus dem Tumormaterial (u.a. aus Lymphknoten) isoliert und mit Hilfe der Southern Blot-Methode molekularbiologisch analysiert (Abb. 22). Für die Tumorzellen waren keine Vektorsequenzen nachweisbar (Abbildung 22: Spuren 4, 8 und 9). Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Chromosomale Verluste (vergl. Kap. 3.2.6: Abb. 27 und 28; Tab. 8) könnten zur Resistenz gegenüber GCV führen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die isolierte Tumor-DNA von untransduzierten EL4-Zellen stammt, die den nachfolgenden G418-Selektionsschritt überlebt haben. Da das Selektionsmittel G418 nur sich teilende Zellen entfernt, ist eine Voraussetzung für das Überleben untransduzierter Zellen eine verminderte Sensitivität gegenüber G418 zum Selektionszeitpunkt aufgrund eines Zellzyklusarrests. Aufgrund der Länge der Selektionsdauer ist diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen. Um dennoch die zweite Möglichkeit zu überprüfen, wurden Mo3TIN-transduzierte Zellen in Gegenwart von G418 in Endpunktverdünnungen analysiert (vergl. Kap. 3.2.3, Abb. 12, Tab. 3). Bei den unter der erhöhten G418-Konzentration ($c=1,2$ mg/ml Medium) klonierenden Zellen muß es sich um transduzierte Zellen handeln, die das im Suizidgenvektor integrierte neo^R -Gen funktionell exprimieren. Die isolierten Zellen wurden anschließend auf GCV-Sensitivität überprüft und die Anzahl der Vektorkopien bestimmt (siehe Kap. 3.2.3, Tab. 3, Abb. 13 und 15). Klone mit Einzelintegrationen der Suizidgenvektoren wurden für die Funktionsprüfung im Rahmen des Tumorzell-Transplantationsmodells eingesetzt (siehe Kap. 3.2.5, Tab. 4).

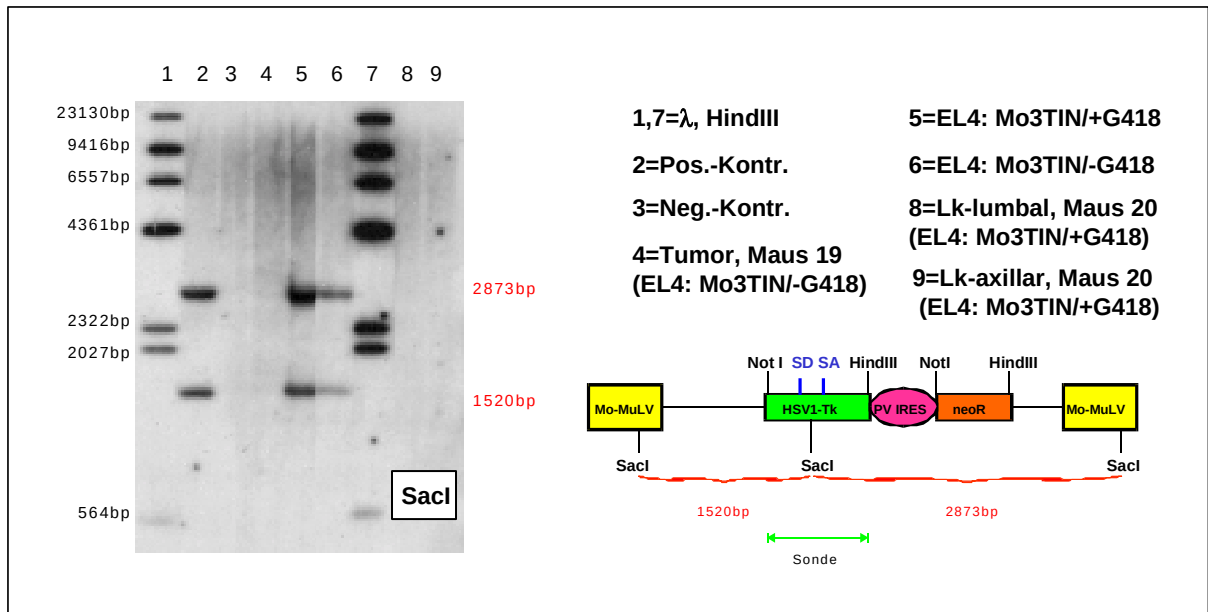


Abbildung 22: Verlust der Suizidgen-Sequenz ist Ursache für die GCV-Resistenz der reisolierten EL4-Tumorzellen. Genomische Tumor-DNA (+/-Zellen vor Transplantation mit/ohne G418 kultiviert; Lk=Lymphknoten) wurde isoliert, mit *SacI* gespalten und nach Transfer auf eine Membran mit der dargestellten Sonde hybridisiert. Neg.-Kontr.=gDNA aus untransduzierten EL4-Zellen, Pos.-Kontr.=Plasmidvektor pMo3TIN.

3.2.5 Wiederauftreten von Tumorwachstum bei zunächst kompletter Tumoregression nach erfolgter Suizidgentherapie

In den oben gezeigten Vorversuchen (siehe Kap. 3.2.4, Abb. 18-22) wurden die geeigneten Bedingungen für die Suizidgentherapie im Mausmodell unter Verwendung von Massenkulturen etabliert.

In den folgenden Studien zur Suizidgentherapie wurden zusätzlich Klone in die Untersuchungen einbezogen (Übersicht der Gruppeneinteilung der Mäuse: Tab. 4). Klone haben im Vergleich zu Massenkulturen den Vorteil, daß Veränderungen im Genotyp (z.B. Vektorverlust) eindeutig festgestellt werden können. Die GCV-Behandlung der transplantierten Tiere begann bei Tumorentstehung (Tag 10 nach Transplantation) und wurde für eine Woche täglich fortgeführt (vergl. Kap. 2.2.3.2).

Transplantation von 1*10⁵EL4-Zellen pro Maus (1. Kohorte)	Anzahl Mäuse (C57BL/6, Ly5.1, ~8 Wochen alt)
Nicht-transduzierte EL4	n=5
Mo3N-transduzierte EL4	n=5
Mo3TIN-transduzierte EL4-Massenkulturzellen	n=5
Mo3TIN-transduzierte EL4-Klone (n=6)	à n=5

Tabelle 4: Übersicht über die Gruppeneinteilung der Tiere im Rahmen der Transplantations-experimente (1. Kohorte).

Bereits einen Tag nach Beginn der GCV-Gabe (Tag 11 nach Transplantation) wurde das Tumorwachstum gestoppt und die Tumoren gingen im Fall der Mausgruppen mit transplantierten Zellklonen innerhalb des Behandlungszeitraums von sieben Tagen vollständig zurück (Abb. 23). Beim ersten Experiment unter Verwendung von Zellklonen (1. Mauskohorte) wurde am Tag 17 eine komplette Tumorregression in allen Tieren (30/30) festgestellt. Nachdem zunächst Tumorregressionen in allen transplantierten Tieren nachgewiesen wurden (Abb. 23), sollte ermittelt werden, ob die Tiere dauerhaft von den Tumoren geheilt waren. Im weiteren Verlauf des Experiments (sechs Monate) waren nach z.T. längeren Beobachtungszeiträumen Tumorrezidive nachweisbar (siehe Abb. 23: bis Tag 50 nach Zelltransplantation).

Bei Tieren, denen Massenkulturzellen transplantiert wurden, ging das Tumorwachstum unter der Behandlung zurück (2/5) bzw. verlangsamte sich (3/5). Spätestens innerhalb von 2,5 Wochen nach Behandlungsende wuchsen erneut Tumoren aus.

Bei Mäusen mit transplantierten EL4-Zellklonen blieben 3/5 Tiere bei Klon #1 (60 %), 0/5 Tiere bei Klon #2 (0 %), 2/5 Tiere bei Klon #3 (40 %), 1/5 Tiere bei Klon #4 (20 %), 4/5 Tiere bei Klon #5 (80 %) und 3/5 Tiere bei Klon #6 (60 %) dauerhaft tumorfrei (Abb. 22). Insgesamt überlebten 13/30 Tiere (43,3 %), die klonierte Zellen bekommen hatten. Die übrigen Tiere (56,7 %) hatten spätestens innerhalb von 3,5 Wochen nach Behandlungsende mit GCV ein Tumorrezidiv.

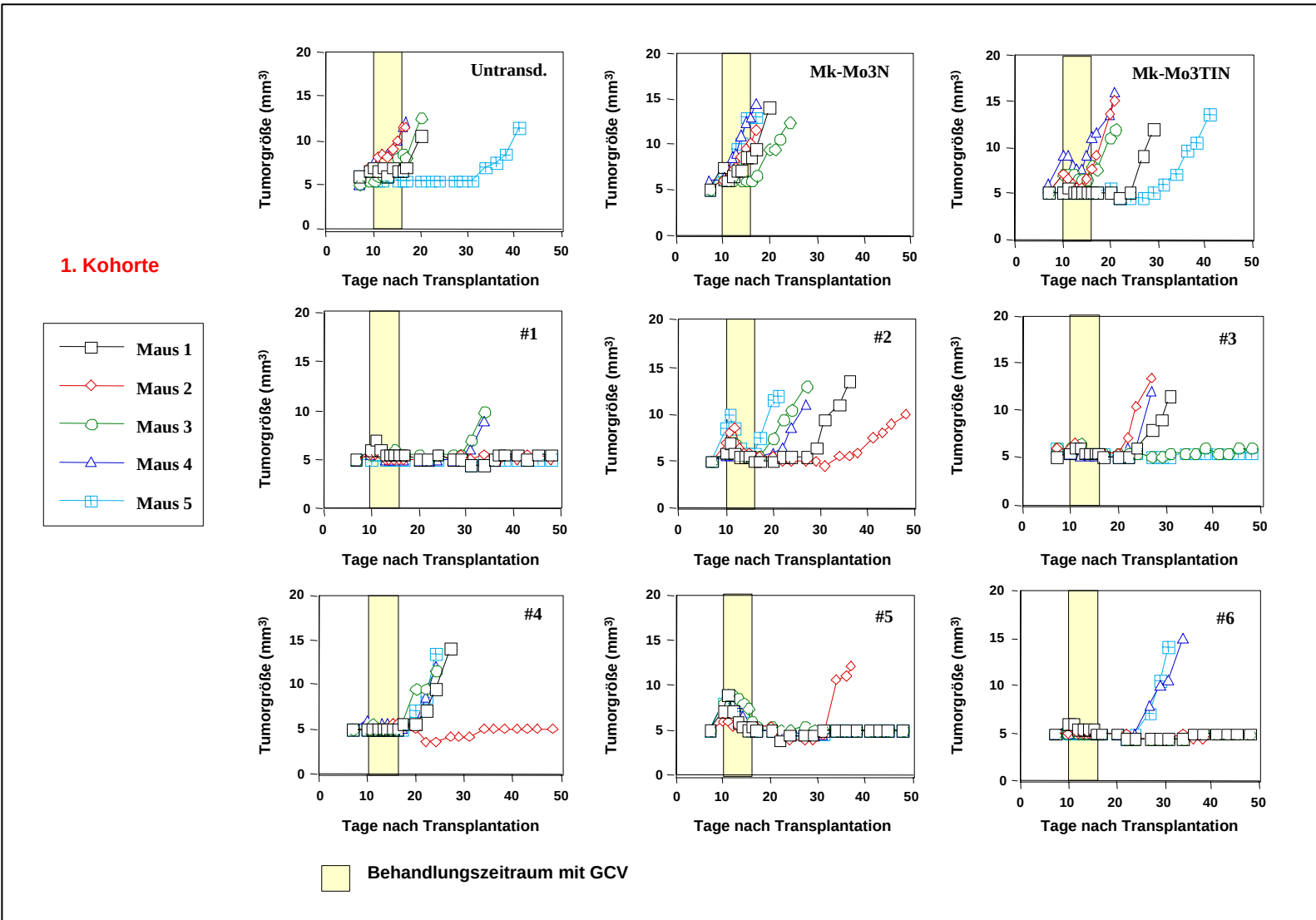


Abbildung 23: Trotz Tumorerregression nach Suizidgentherapie sind Tumorzidive in allen Mausgruppen der ersten Kohorte nachweisbar. Die Suizidgentherapie erfolgte bei den Tieren nach dem kurativen Behandlungsprotokoll (vergl. Kap. 2.2.3.2). Als Positivkontrollen für Tumorzidivum wurden im Vergleich untransduzierte und Mo3N-transduzierte Zellen benutzt.

EL4-Zellen sind Ursache der Tumorrezidive

Um zu prüfen, ob für das erneute Tumorwachstum GCV-resistente EL4-Zellen oder spontan auftretende Tumoren verantwortlich sind, wurden die aus isolierten Tumor-Zellen etablierten Linien hinsichtlich der Expression der EL4-spezifischen Variante des Lyt5-Oberflächenmoleküls geprüft. EL4-Zellen und Rezipientenzellen können mit Hilfe des Lyt5.1/Lyt5.2-Systems unterschieden werden (vergl. Kap. 2.2.3.1). EL4-Zellen exprimieren Lyt5.2, wirtszugehörige Zellen Lyt5.1.

Nach Färbung der Zellen durch Antikörperbindung wurde anhand durchflußzytometrischer Analysen nachgewiesen, daß das Tumormaterial vollständig aus EL4-Zellen bestand (Abb. 24).

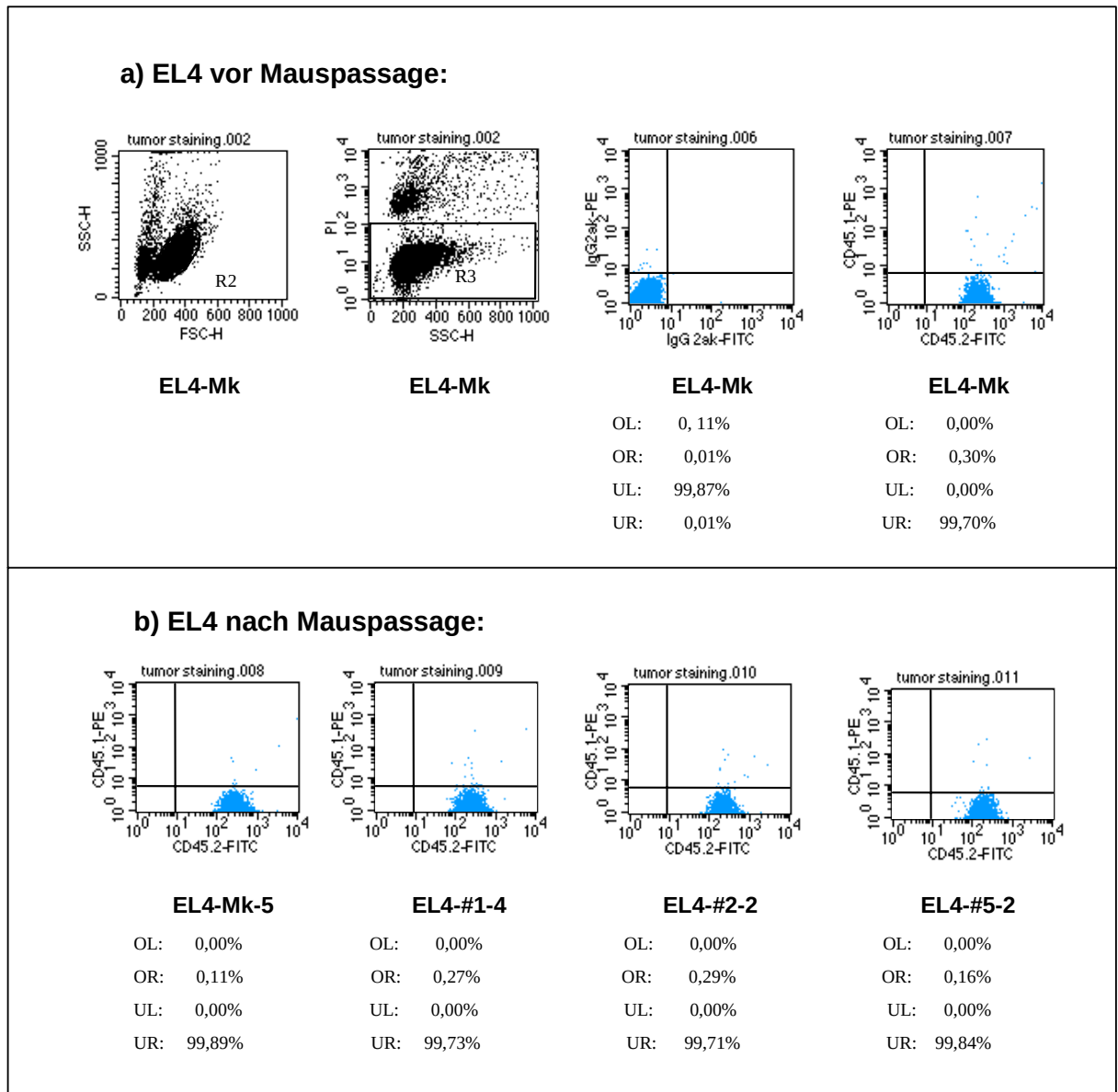


Abbildung 24: GCV-resistente EL4-Zellen sind verantwortlich für das erneute Auswachsen von Tumoren. Die Unterscheidung zwischen EL4- und Rezipientenzellen erfolgte anhand des Lyt5.1/Lyt5.2-Systems (vergl. Kap. 2.2.3.1) nach Markierung der Zellen durch Antikörperbindung: a) Vor Transplantation, b) nach Reisolierung der Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Mk=Vektor-transduzierte Massenkulturzellen, Quadranten im Histogramm: OL=oben links, OR=oben rechts, UL=unten links und UR=unten rechts.

Untersuchungen zur Zugänglichkeit von Ganciclovir bei Tumorzellen

Wenn Vektor-tragende Zellen im Tumorverband nicht von GCV erreicht werden, können diese theoretisch erneut zum Auswachsen von Tumoren führen.

Mehrere Beobachtungen sprechen gegen diese Möglichkeit: Erstens wurde in den Mäusen zwischenzeitlich eine komplette Tumorregression festgestellt. Somit konnte die Wirkung

von GCV bestätigt werden. Zweitens wurden reisolierte EL4-Tumorzellen in GCV-Selektionsexperimenten als Zellsuspensionen getestet (Abb. 25). Im Rahmen dieses *in vitro* Experiments wurden die Zellen vereinzelt und somit erreichbar für GCV. Trotzdem wurden die Zellen nicht durch die GCV-Behandlung entfernt. Um die Ursachen für die GCV-Resistenz zu ermitteln, wurden die Zellen im Anschluß auf molekularer Ebene analysiert (vergl. Kap. 3.2.6).

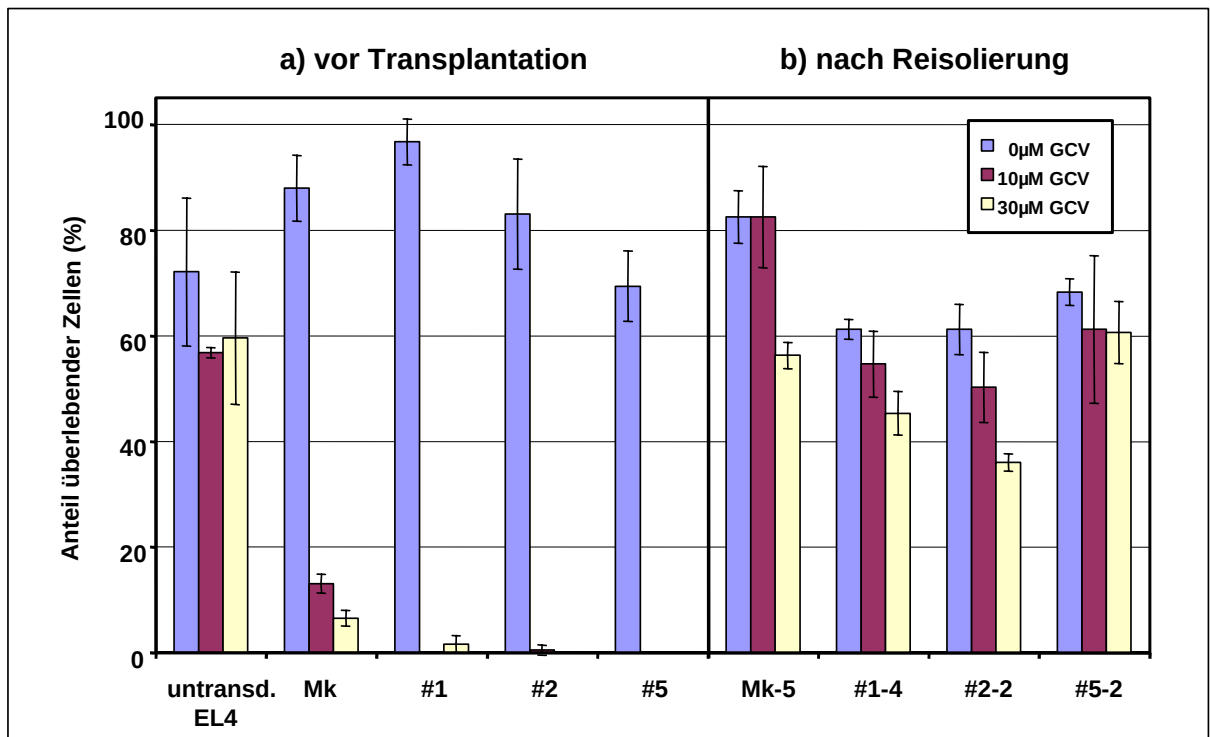


Abbildung 25: Die EL4-Zellen können auch als Zellsuspensionen nicht durch GCV-Selektion abgetötet werden. Um auszuschließen, daß GCV die Tumoren nicht ausreichend penetriert und damit die Entstehung von Tumorrezidiven ermöglicht wird, wurden EL4-Tumorzellen als Suspension in GCV-Selektionsexperimenten *in vitro* getestet (vergl. Kap. 2.2.2.8): a) vor Transplantation, b) nach Reisolierung aus C57BL/6-Mäusen. Mk=Vektor-transduzierte Massenkulturen.

Die Ergebnisse der ersten Mauskohorte sind reproduzierbar

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ersten Mauskohorte wurde das Experiment mit den Klonen #1, #3, #4 und #5 wiederholt (2. Kohorte, siehe Abb. 26). Auch bei den im zweiten Experiment verwendeten Tieren wurde jeweils am Tag 17 nach Transplantation (=Ende der GCV-Behandlung) eine komplette Tumorregression festgestellt (20/20). Trotzdem waren, wie schon bei Mäusen der ersten Kohorte, Tumorrezidive nachweisbar. Diese traten oftmals erst nach einem längerem Beobachtungszeitraum auf.

Bei den Mäusen der zweiten Kohorte blieben 5/5 Tiere bei Klon #1 (100 %), 2/5 Tiere bei Klon #3 (40 %) und 5/5 Tiere bei Klon #5 (100 %) auch nach etwa drei Monaten tumorfrei (Abb. 26). Die übrigen Tiere entwickelten spätestens innerhalb von 1,5 Wochen nach Abschluß der GCV-Behandlung ein Tumorrezidiv.

Im Fall der Tiere von Klon #4 hatten 5/5 Mäuse drei Wochen nach Zellinokulation ein Tumorrezidiv. Um zu testen, ob die wiederausgewachsenen Zellen GCV-resistent waren, wurde ein Teil der Tiere (3/5) einer erneuten Behandlung mit Ganciclovir unterworfen (Abb. 26). Diesmal wurde keine erneute Tumorregression festgestellt. Bei den übrigen Mäusen (2/5) wurden Zellen aus den Tumoren isoliert und zur Prüfung der Suizidgenfunktion *in vitro* mit GCV selektiert (vergl. Tab. 7b: #4-6, #4-9). Auch in diesen Fällen waren die EL4-Zellen GCV-resistent und zeigten zusätzlich eine erhöhte G418-Sensitivität. Dieses Ergebnis spricht vermutlich für eine Abschaltung der gesamten Vektorexpression.

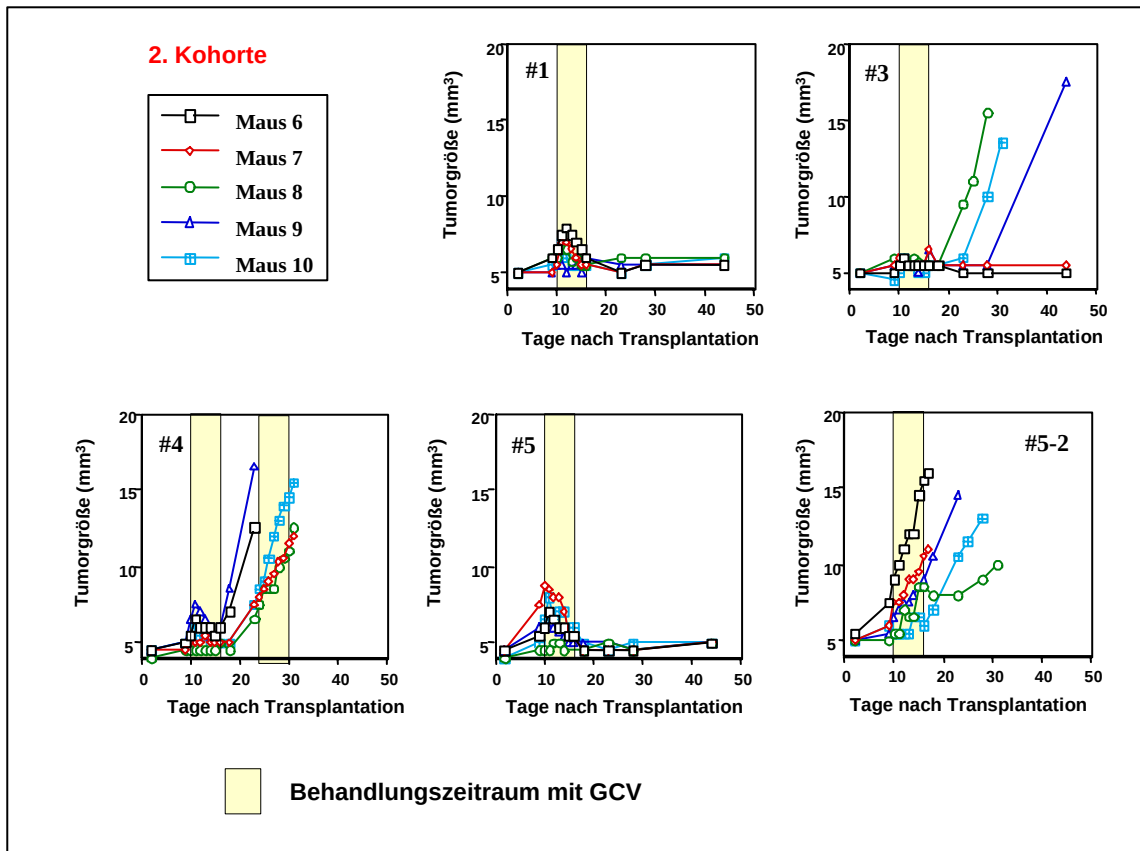


Abbildung 26: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ersten Mauskohorte nach Transplantation der etablierten EL4-Zellklone in die Mäuse der zweiten Kohorte. Die Suizidgentherapie erfolgte bei den Tieren nach dem kurativen Behandlungsprotokoll (vergl. Kap. 2.2.3.2). Zur Prüfung auf GCV-Resistenz wurden zum einen Tumorzellen aus dem Rezidiv der Maus 2 von #5 (1. Kohorte) anderen Mäusen seriell transplantiert (#5-2 Gruppe der 2. Kohorte). Zum anderen wurden #4 transplantierte Mäuse (2. Kohorte) bei erneutem Auswachsen von Tumoren wiederholt mit GCV behandelt (2. Behandlungszeitraum mit GCV: Tag 24-30 nach Transplantation).

Zur Berechnung der Mutationsraten für die GCV-Resistenz in den jeweiligen Mäusen mit Tumorrezidiven ist der Zeitraum zwischen Behandlungsbeginn mit Ganciclovir (Tag 10 nach Transplantation) und Wiederauftreten des Tumorwachstums entscheidend. Aus diesem Grund wurde zunächst die Zellzahl im Tumor der jeweiligen Tiere zu Behandlungsbeginn anhand der ermittelten Verdopplungszeit der EL4-Zellen *in vivo* (38 Stunden, siehe Kap. 3.2.1: Abb. 8) und der durchschnittlichen Tumorgroße (6,6 mm³) bestimmt. Tumorrezidive wurden als solche gewertet bei einer Tumorgroße von 10 mm³. Bei dieser Größe beträgt die Zellzahl im Tumor $5,12 \times 10^7$ Zellen. Durch Bestimmung der Anzahl der Tage zwischen Tag 10 und dem Zeitpunkt eines Rezidivs wurde anhand der Verdopplungszeit die Zellzahl der GCV-resistenten EL4-Zellen berechnet. Die

Mutationsraten ergibt sich, wenn die Anzahl dieser Zellen ins Verhältnis zu der Zellzahl im Tumorrezidiv gesetzt wird.

Mäuse mit transplant. Zelllinie	Tumorgroße bei Beginn der GCV-Behandlung (Tag 10 nach Transpl.)	Anzahl Zellen in Tumoren am Tag 10 ($\times 10^6$)	Auftreten von Tumorrezidiven mit Größe von 10mm^3 (Tage nach GCV-Behandlungsbeginn)	Anzahl Verdopplungen zwischen Tag 10 und Auftreten von Tumorrezid.	Anzahl GCV-resist. Zellen (Tag 10)	Mutationsfrequenz ($\times 10^{-6}$)
#1-3	5,5	3,2	24	14,4	3	1
#1-4	5,5	3,2	25	15	3	1
#2-1	6	5,8	22	13,2	4	0,7
#2-2	7	6,8	37	22,2	2	0,3
#2-3	6	5,8	13	7,8	10	1,7
#2-4	5,5	3,2	16	9,6	6	2
#2-5	8,5	25	9	5,4	27	1
#3-1	5,5	3,2	20	12	4	1,4
#3-2	6	5,8	14	8,4	8	1,4
#3-4	5,5	3,2	16	9,6	6	2
#3-8	5,5	3,2	14	8,4	8	2,6
#3-9	5,5	3,2	24	14,4	3	1
#3-10	5	2,9	18	10,8	5	1,8
#4-1	5	2,9	14	8,4	8	2,9
#4-3	5	2,9	13	7,8	10	3,4
#4-4	6	5,8	13	7,8	10	1,7
#4-5	5	2,9	13	7,8	10	3,4
#4-6	5,5	3,2	11	6,6	15	4,6
#4-7	5	2,9	18	10,8	5	1,8
#4-8	4,5	2,6	18	10,8	5	2
#4-9	6,5	6,4	9	5,4	27	4,2
#4-10	5,5	3,2	16	9,6	6	2
#5-2	6	5,8	24	14,4	3	0,6
#6-4	5	2,9	19	11,4	5	1,6
#6-5	5	2,9	19	11,4	5	1,6
Mk-1	5	2,9	18	10,8	5	1,8
Mk-2	7	6,8	8	4,8	40	5,9
Mk-3	7	6,8	9	5,4	27	3,9
Mk-4	9	26	5,5	3,3	217	8,3
Mk-5	5	2,9	27	16,2	3	1

Tabelle 5: Berechnung der Mutationsraten für die GCV-Resistenz Suizidgenvektor-transduzierter EL4-Zellen *in vivo*. a) Für die Berechnung der Mutationsraten der für die GCV-Resistenz zugrundeliegenden Mechanismen wurde anhand der durchschnittlichen Tumorgroße von $6,6\text{ mm}^3$ bei Beginn der GCV-Behandlung (Tag 10 nach Transplantation) die durchschnittliche Anzahl der im Tumor befindlichen Zellen bestimmt ($6,4 \times 10^6$). Hierfür mußten bei ursprünglich 1×10^5 transplantierten EL4-Zellen und der ermittelten *in vivo* Verdopplungszeit von 38,4 Stunden sechs Verdopplungen stattgefunden haben. Je nach gemessener Tumorgroße (Spalte 2) wurde die Anzahl der Zellen im jeweiligen Tumor bei Beginn der GCV-Behandlung berechnet (Spalte 3). Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der Verdopplungen bestimmt (Spalte 5), bei denen Tumorrezidive mit einer Größe von 10 mm^3 ($\approx 5,12 \times 10^7$ Zellen) entstanden sind (Spalte 4). Hieraus wurde die Anzahl an GCV-resistenten Zellen zum Zeitpunkt des Beginns der GCV-Behandlung berechnet (Spalte 6). Die Mutationsfrequenzen (Spalte 7) ergaben sich aus der Relation der GCV-resistenten Zellen zur Gesamtzellzahl (jeweils Tag 10). b) Mechanismen in transduzierten EL4-Zellklonen, die einer Inaktivierung der Suizidgenfunktion zugrundeliegen.

Für die mit unterschiedlichen EL4-Zellen transplantierten Mausgruppen wurde die mittlere Überlebensrate der Tiere bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die durchschnittliche Anzahl

der Tage bei Auftreten von Tumorrezidiven innerhalb der jeweiligen Mausgruppe berechnet (Tab. 6).

C57BL/6, Ly5.1 ~8 Wochen alt zum Zeitpunkt der Transplantation	Anzahl Mäuse mit kompletter Tumorregression unter GCV- Behandlung	Anzahl Mäuse ohne Tumor- rezidiv ~24 (12) Wochen nach GCV-Behandlung	Mittlere Überlebensrate (in Tagen) von Mäusen mit Tumorrezidiv
nicht-transduz. EL4	1/5	0/5	18.5
Mo3N-transduz. Mk	0/5	0/5	19.0
Mo3TIN-transduz. Mk	2/5	0/5	26.6
#1	5/5 (5/5)	3/5 (5/5)	34.0 (-)
#2	4/5	0/5	34.6
#3	5/5 (5/5)	2/5 (2/5)	28.3 (34.3)
#4	5/5 (5/5)	1/5 (0/5)	24.8 (27.8)
#5	5/5 (5/5)	4/5 (5/5)	37.0 (-)
#6	5/5	3/5	32.5
#5-2	(0/5)	(0/5)	(23.2)

Tabelle 6: Die verschiedenen, transplantierten EL4-Zellklone unterscheiden sich in der Inzidenz der Tumorrezidive. In der Tabelle sind die Daten der ersten und zweiten Mauskohorte gegenübergestellt. Die Ergebnisse der beiden Maushohorten sind bei Verwendung der selben Zellklone reproduzierbar. Dieses gilt sowohl für die Inzidenzen als auch die Latenzzeiten der Tumorrezidive.

Um zu prüfen, ob Ereignisse, die zu einer GCV-Resistenz *in vivo* führen, auch *in vitro* auftreten, wurden mit Zellen der Ausgangskulturen *in vitro* GCV-Selektionsexperimente durchgeführt. Der Behandlungszeitraum mit GCV entsprach dem bei den *in vivo*-Experimenten gewählten Behandlungszeitraum (sieben Tage). Nach GCV-Selektion überlebten vereinzelt Zellen. Diese wurden expandiert und für EPD-Analysen verwendet (Tab. 7c). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die wiederausgewachsenen Zellen (#1, #2 und #5) resistent gegenüber einer weiteren GCV-Behandlung waren (farblich gekennzeichnet). Hieraus kann geschlossen werden, daß die Inaktivierung der Suizidgenvektoren auch *in vitro* stattfindet.

a)	vor Transplantation	RPMI-Medium	G418	GCV
	Zellen/Vertiefung	#4	#4	#4
	0,3	34/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	80/96	00/96
	3	93/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	96/96	01/96

b)	nach Reisolierung	RPMI-Medium	G418	GCV
	Zellen/Vertiefung	#4-K4	#4-K4	#4-K4
	0,3	56/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	95/96	03/96
	3	95/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	96/96	16/96
	Zellen/Vertiefung	#4-6	#4-6	#4-6
	0,3	42/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	06/96	88/96
	3	96/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	35/96	96/96
	Zellen/Vertiefung	#4-9	#4-9	#4-9
	0,3	40/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	10/96	63/96
	3	96/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	41/96	96/96
	Zellen/Vertiefung	#5-2 (+G418)	#5-2 (+G418)	#5-2 (+G418)
	0,3	20/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	51/96	00/96
	3	72/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	96/96	00/96

c)	nach <i>in vitro</i> GCV	RPMI-Medium	G418	GCV
	Zellen/Vertiefung	Massenkultur	Massenkultur	Massenkultur
	0,3	46/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	57/96	66/96
	3	94/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	96/96	96/96
	Zellen/Vertiefung	#1	#1	#1
	0,3	20/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	00/96	42/96
	3	89/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	00/96	95/96
	Zellen/Vertiefung	#2	#2	#2
	0,3	33/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	00/96	78/96
	3	86/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	00/96	96/96
	Zellen/Vertiefung	#5	#5	#5
	0,3	22/96	n.u.	n.u.
	1	n.u.	00/96	61/96
	3	85/96	n.u.	n.u.
	10	n.u.	05/96	96/96

Tabelle 7: Die Inaktivierung der Suizidgenvektoren findet in EL4-Zellen auch *in vitro* statt. Zellklonierungen durch Endpunktverdünnung (EPD) wurden von wiederausgewachsenen EL4-Zellen nach GCV-Selektionsexperimenten unter verschiedenen Kulturbedingungen (Medium; G418, c=1,2 mg/ml; GCV, c=10µM) durchgeführt. a) Testung des Ausgangsklons vor Transplantation (#4), b) Testung von aus Mäusen reisolierten Zellen (#4-K4: Zellen aus einem GCV-unbehandeltem Tier; #4-6 und #4-9: siehe Abb. 26, #4, Mäuse Nr. 6 und Nr. 9; #5-2: aus Maus Nr. 2 von #5 isoliert, nach erneuter *in vitro* Selektion mit G418 schließlich in den hier beschriebenen EPD-Experimenten auf Suizidgenfunktion getestet, c) Testung von Zellen, die trotz *in vitro* GCV-Selektion erneut ausgewachsen sind (Massenkulturen, #1, #2 und #5).

Anhand der nachfolgenden Experimente sollten die molekularen Ursachen für die entstandenen Tumorrezidive ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde aus den Tumorzellen genomische DNA für Southern Blot- und PCR-Analysen extrahiert (vergl. Kap. 2.2.1.4).

3.2.6 Genetische und epigenetische Mechanismen als Ursachen des Verlusts der Vektorexpression

Sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen können Ursache für die GCV-Resistenz der aus Tumorrezidiven reisolierten EL4-Tumorzellen sein. Zur Untersuchung auf chromosomalen Verlust, Exzision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination und Löschung der Vektorexpression wurden molekularbiologische Analysen durchgeführt. Im Rahmen dieser Studien wurde die isolierte gDNA zunächst in Southern Blot-Analysen auf Unversehrtheit des proviralen Vektors überprüft.

Nachweis der Löschung als Ursache für den Verlust der retroviralen Vektorexpression

Bei genomischer DNA aus Tumoren folgender Klone waren keine Vektorsequenzen mittels der HSV1-Tk Sonde nachweisbar (Abb. 27): Klon #1 (Blot a, d und f: Spuren 11+12), Klon #2 (Blot b, d und f: Spuren 14-18), Klon #3 (Blot b und f: Spuren 20+21), Klon #5 (Blot c, d und f: Spur 29) und Klon #6 (Blot c und f: Spuren 31+32). Dieser Nachweis war bei genomischer DNA aus Maus Nr. 2 von Klon #5 erst nach G418-Selektion möglich (Blot d: Spur 33). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß der Suizidgenvektor nur in einem geringen Teil der reisolierten Zellen vorhanden war. Ausnahmen waren die gDNAs aus Mäusen von Klon #4, da in ihnen jeweils intakte provirale Vektoren nachgewiesen wurden (Blot c, d und f: 24-27, Blot e: 35-39). Die Möglichkeit, daß eine Punktmutation zu einem nicht funktionierenden Suizidgen führt, ist wenig wahrscheinlich. In solch einem Fall hätten alle mit Zellklon #4 transplantierten Mäuse trotz GCV-Behandlung ein Tumorrezidiv entwickeln müssen. Eine Maus (1/10) blieb aber tumorfrei (siehe Abb. 23: Klon #4, Maus Nr. 2). Daraus ergibt sich, daß im Fall dieses Klons die Löschung der Vektorexpression Ursache für die GCV-Resistenz ist.

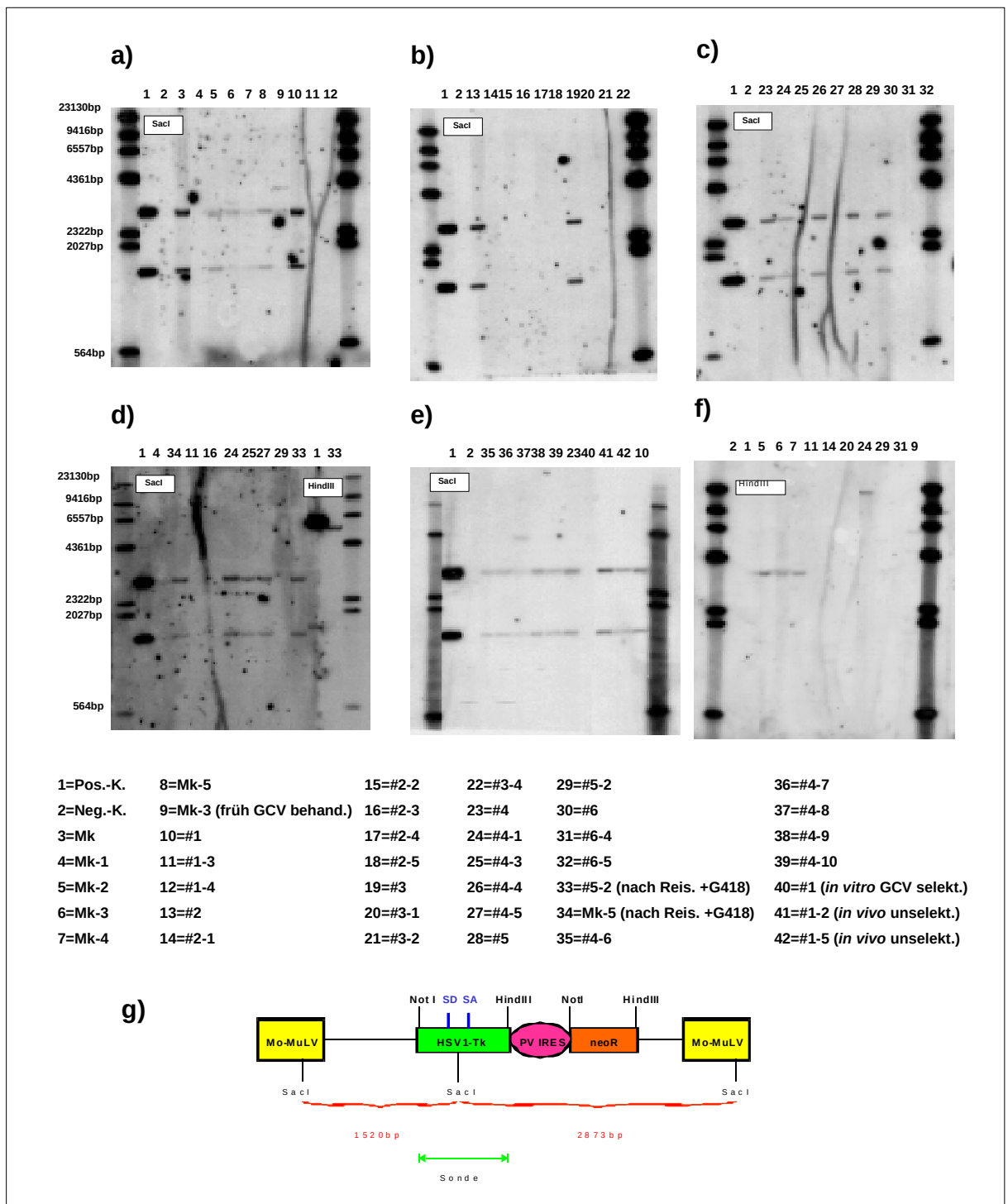


Abbildung 27: Beides, genetische und epigenetische Mechanismen, führt zur Inaktivierung der Suizidgenvektoren: Dieses ist Ursache für die GCV-Resistenz in den verschiedenen EL4-Zellklonen. Untersuchung genomischer DNA aus reisolierten Tumorzellen auf Unversehrtheit des Suizidgens. Einzige Ausnahme mit intaktem Suizidgen war Zellklon #4. Analysiert wurde gDNA aus Klonen bzw. Massenkulturen (Mk). In Massenkulturen wurde nach GCV-Selektion der gleiche Klon mit offenbar intakter Vektorkopie in mehreren Tieren angereichert (Spuren 4-8). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung *SacI* bzw. *HindIII* gespaltenen DNA wurde diese auf Membranen transferiert und mit der dargestellten Sonde (g) hybridisiert. Pos.-Kontr.=Plasmidvektor pMo3TIN, Neg.-Kontr.=gDNA aus untransduzierten EL4-Zellen.

Nachweis von LTR-Rekombination des proviralen Vektors und chromosomalen Verlusten in bestimmten Zellklonen

Um bei den übrigen Klonen (#1, #2, #3, #5, #6) die Veränderungen im Vektorgenom zu charakterisieren, wurde durch PCR eine bestimmte Region der retroviralen LTR amplifiziert. Die Amplifikation war nur bei gDNA aus Mäusen bestimmter Zellklone möglich (Abb. 28), nämlich bei #2 in 2 Fällen (a: Spuren 9 und 13), bei #3 in einem Fall (a: Spur 17), bei #5 in einem Fall (a: Spur 24) und bei #4 erwartungsgemäß in allen 9 Fällen (a: Spuren 19-22 und 37-41). Hiermit wurde beim letztgenannten Zellklon das Ergebnis aus der Southern Blot-Analyse bestätigt, daß jeweils ein intakter Vektor vorhanden ist (siehe Abb. 27).

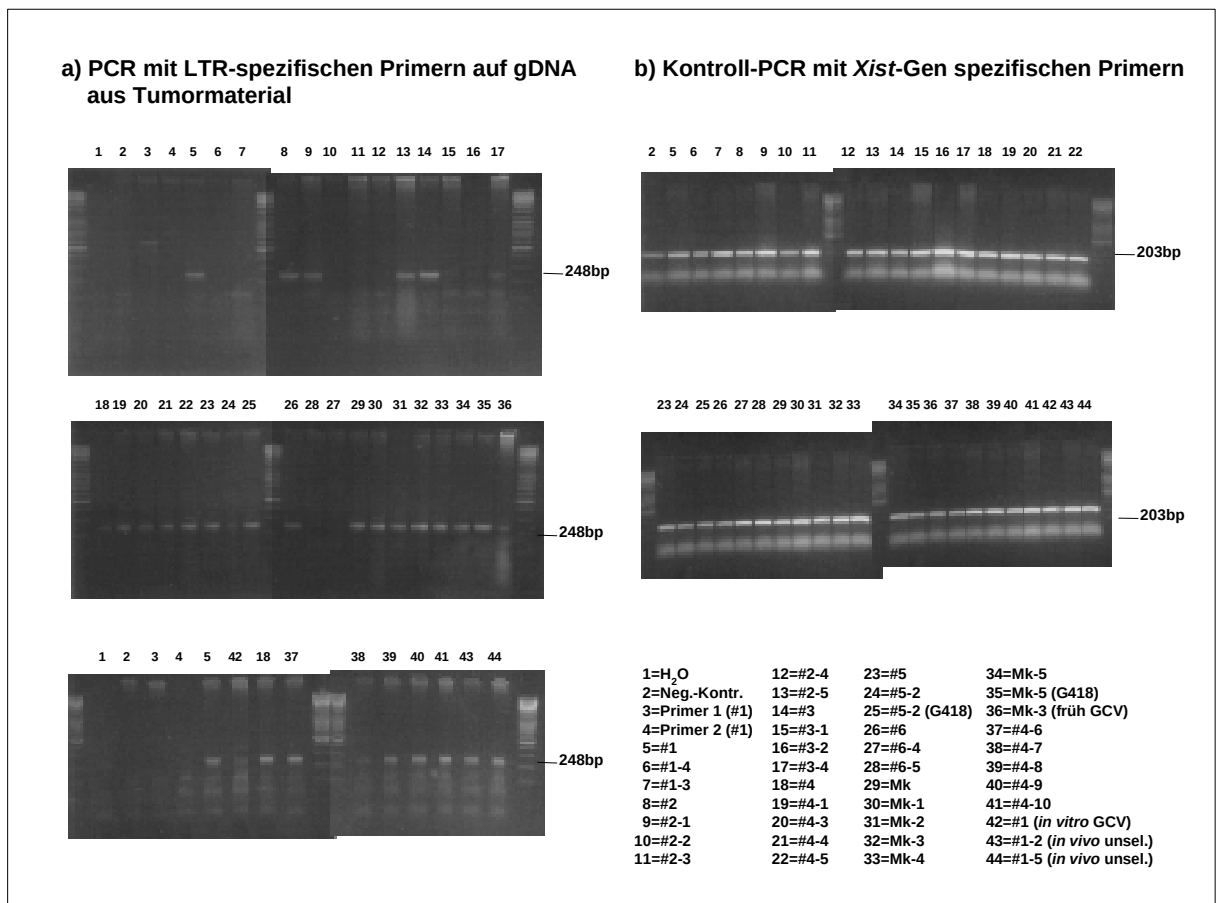


Abbildung 28: Nachweis des kompletten Verlusts der proviralen DNA in bestimmten Zellklonen. Vektorsequenzen aus dem LTR-Bereich wurden über PCR-Analyse von gDNA aus isolierten EL4-Zellen nachgewiesen. Die ausgewählten Primer (LTR1: 5'-TGT TTC CAG GGT GCC CCA AGG-3'; LTR2: 5'-CAC TCA GAG GAG ACC CTC CC-3') wurden in einer früheren Studie zum Nachweis von Mo-MuLV-Sequenzen in menschlichen Zellen benutzt (Morgan *et al.*, 1990) (a). Als Positivkontrolle für die PCR wurden in einem zweiten Ansatz *Xist*-Gen-spezifische Primer (X2-R: 5'-GAA GTG AAT TGA AGT TTT GGT CTA G-3'; X2-L: 5'-GGG ACC TAA CTG TTG GCT TTA TCA G-3', freundlich überlassen von Gerald Schumann, HPI) verwendet (b). H₂O=Wasser Kontrolle, Neg.-Kontr.=gDNA aus untransduzierten EL4-Zellen, Primer 1/Primer 2=PCR-Kontrollen mit jeweils nur einem Primer auf Vektor-tragende gDNA, Mk=gDNA aus Massenkulturzellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit Hilfe des vorgestellten Mausmodells verschiedene Ursachen für den Verlust der Vektorexpression und der damit einhergehenden GCV-Resistenz der EL4-Tumorzellen identifiziert werden konnten (Tab. 8): chromosomaler Verlust (Inzidenz= $1,3 \pm 0,5 \times 10^{-6}$, Latenzzeit= $20,8 \pm 7,3$ Tage), Exzision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination (Inzidenz= $1,1 \pm 0,6 \times 10^{-6}$; Latenzzeit= $17,8 \pm 6,8$ Tage) und Löschung der Expression des Suizidgenvektors (Inzidenz= $2,9 \pm 1,1 \times 10^{-6}$; Latenzzeit= $13,9 \pm 3,0$ Tage).

Klone	LTR-Rekomb.	Chrom. Verluste	Löschung
#1	0	2 (1,0+/-0,0x10 ⁻⁶)	0
#2	2 (0,9+/-0,2x10 ⁻⁶)	3 (1,3+/-0,9x10 ⁻⁶)	0
#3	1 (2,0+/-0,0x10 ⁻⁶)	2 (1,4+/-0,0x10 ⁻⁶)	0
#4	0	0	9 (2,9+/-1,1x10 ⁻⁶)
#5	1 (0,6+/-0,0x10 ⁻⁶)	0	0
#6	0	2 (1,6+/-0,0x10 ⁻⁶)	0

Tabelle 8: Verschiedene Ursachen können einem Verlust der Suizidgenexpression zugrundeliegen: LTR-Rekombination, chromosomale Verluste und Löschung der Vektorexpression. Die Werte in den Klammern sind die Mutationsraten der unterschiedliche Ursachen der GCV-Resistenz in den jeweiligen EL4-Zellklonen.

4. Diskussion

Zweck der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines sensitiven Modells, anhand dessen die Ursachen, die einem Verlust der retroviralen Vektorexpression in T-Zellen *in vivo* zugrundeliegen, untersucht und quantifiziert werden können. Zur Einschätzung der Sicherheit von Suizidgenvektoren bei Anwendungen, wie der adoptiven Immuntherapie und der Entfernung solider Tumoren, wurden im Rahmen der Arbeit T-Zellen verwendet.

4.1 Wirkung retroviraler cis-Elemente auf die Abschaltung der Vektorexpression

Zur Entwicklung von Vektoren für die adoptive Immuntherapie sollten im ersten Teil der Arbeit Promotoren identifiziert werden, die eine stabile Transgenexpression in humanen T-Zellen (Jurkat) vermitteln. Da bestehende Vektoren mit LTR-getriebener Expression im weiteren Verlauf (vergl. Kap. 3.2) auf jeden Fall benutzt werden sollten, wurden in den hier zusammengefaßten Vorversuchen zusätzlich Konstrukte mit verschiedenen, intern im Vektorgenom gelegenen, Promotoren geprüft. Da die Vektorzusammensetzung von großer Bedeutung für die Stabilität der Expression ist, wurden solche Promotoren verglichen (CMV *versus* PGK), für die eine hohe bzw. stabile Vermittlung der Expression in hämatopoetischen Zellen bekannt war (Hock *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 1987 und 1989). Die Expressionsanalysen wurden parallel sowohl mit transduzierten Massenkulturen als auch mit Zellklonen durchgeführt. Von den ursprünglich isolierten Zellklonen mit CMV-Promotor-Konstrukt (23) bzw. PGK-Promotor-Konstrukt (22) wurden solche mit jeweils einer Kopie und 100 %-iger Transgen-Expression (eGFP) zu Versuchsbeginn der Studien ausgewählt (vergl. Kap. 3.1: Tab. 1, Abb. 3 und 4). Vorteil der Verwendung dieser Klone gegenüber Massenkulturen ist, daß Veränderungen im Genotyp eindeutig nachgewiesen werden können. Der Verlust der Expression war in den getesteten Zellklonen nicht auf genetischen Verlust des Vektors zurückzuführen (Abb. 4). Ursache ist vermutlich eine stabile Löschung der Vektorexpression auf Ebene der Transkription (Abb. 5). Entgegen der ursprünglichen Annahme (siehe Kap. 3.1.1) zeigen die Ergebnisse weiterhin, daß das Vektorkonstrukt mit dem CMV-Promotor weniger häufig gelöscht wird als das Konstrukt

mit dem PGK-Promotor. Dieses ist deutlich an Zellklonen aber auch an Massenkulturzellen nachvollziehbar (Abb. 3). Vermutlich ist die in der Literatur beschriebene Schutzwirkung der in der LTR gelegenen Enhancerregion (Wagner *et al.*, 1985) bei dem CMV-Promotor größer als bei dem PGK-Promotor. Die Expression von Transkriptionsfaktoren kann in diesem Zusammenhang eine entscheidende Funktion haben. Nach dem Schleifenmodell wird Genaktivierung durch direkte Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren gesteuert, die einerseits an Enhancerstrukturen und andererseits zugleich an Promotorelemente binden. Dazwischenliegende DNA-Bereiche formieren sich hierbei schleifenartig (Bulger und Groudine, 1999). Daraus resultiert, daß die Stabilität der Expression retroviraler Vektoren durch die Wechselwirkungen zwischen Enhancerelementen in der LTR und internem Promotor definiert wird (Gorman *et al.*, 1985; Soriano *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1996). Da die Schutzwirkung zellspezifisch ist (Schwieger, 2000), könnten zur Prüfung der Gültigkeit der erzielten Ergebnisse in zukünftigen Experimenten Analysen zusätzlich mit den im zweiten Teil der Arbeit verwendeten EL4-Zellen unter Einbeziehung von Vektoren mit LTR-getriebener Expression durchgeführt werden. Die Benutzung von Vektoren mit unterschiedlicher Expressionsstrategie ermöglicht einen Vergleich hinsichtlich der jeweiligen Stabilität der retroviralen Expression.

4.2 Meßsystem zur Untersuchung der Ursachen und der Frequenz des

Verlusts der retroviralen Suizidgenexpression

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Tumorzell-Transplantationsmodell (Maus) zur Untersuchung von Ursachen und Frequenzen des Verlusts der Expression retroviraler Suizidgenvektoren entwickelt. Durch die Verwendung der tumorigenen T-Zelllinie (EL4) können die beiden bisher diskutierten, klinisch relevanten Suizidgen-Therapieansätze (vergl. Kap. 1.4 und 1.4.1) gleichzeitig geprüft werden. Zunächst mußte ein geeigneter Applikationsort der tumorigenen EL4-Zellen bestimmt werden, um ein reproduzierbares und einfach zu bestimmendes Krankheitsbild in den transplantierten Tieren hervorzurufen. Die subkutane Applikation erfüllte im Gegensatz zur intravenösen Injektion diese Bedingungen und wurde deshalb für die weiteren Experimente beibehalten (vergl. Kap. 3.2.1). In einem weiteren Vorversuch wurden Titrationen der subkutan injizierten Zellen

durchgeführt, um eine Zelldosis zu ermitteln, bei der das lokal begrenzte Tumorwachstum innerhalb einer definierten, möglichst kurzen Zeit reproduzierbar hervorgerufen wird (vergl. Kap. 3.2.1, Abb. 7). Der Zeitraum zwischen Zellgabe und Tumorentstehung wurde dabei so eingestellt, daß sich die Suizidgentherapie noch ausreichend gegen die aggressiv wachsenden Tumorzellen durchsetzen kann. Anhand der Titrationsanalysen war außerdem die Bestimmung der Verdopplungszeit der EL4-Zellen in den Mäusen möglich (Kap. 3.2.1, Abb. 8).

Für die folgenden Experimente zur Suizidgentherapie wurden Vektor-transduzierte EL4-Zellen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden sie mit dem klinisch relevanten Suizidgenvektor Mo3TIN infiziert, welcher für die Selektionsmarker HSV1-Tk und neo^R kodiert. Die Kultur wurde in einem zweiten Schritt mit dem Selektionsmittel Geneticin (G418-Sulfat) auf Vektor-transduzierte, Neomycinphosphotransferase-exprimierende Zellen *in vitro* angereichert. Um zu prüfen, ob diese Massenkulturzellen auch den zweiten Selektionsmarker HSV1-Tk ausreichend exprimieren, wurden Selektionsexperimente mit Ganciclovir (GCV) *in vitro* durchgeführt (Kap. 3.2.3, Abb. 15). Es zeigte sich, daß ein Großteil der Zellen bei der Negativ-Selektion entfernt wurde. Der Grund für das Überleben der übrigen Zellen ist vermutlich eine unzureichende GCV-Selektion.

Anschließend erfolgte die Transplantation in Mäuse unter Verwendung unterschiedlicher Protokolle zur Suizidgentherapie (prophylaktische und kurative GCV-Behandlung, siehe Kap. 3.2.4, Abb. 18 und 19). Obwohl jeweils eine deutliche Verzögerung des Tumorstwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe (transplantierte Mäuse mit Mo3N-transduzierten EL4-Zellen) festgestellt wurde, waren innerhalb eines kurzen Zeitraums Tumorrezeidive nachweisbar. Die GCV-Resistenz kann vermutlich auf die für Massenkulturen typische Heterogenität zurückgeführt werden. In einem Kontroll-experiment wurde geprüft, ob eine kontinuierliche G418-Selektion bis zum Zeitpunkt der Transplantation zu einer Auslese von Zellen mit einer stabilen retroviren Transkription führt. Nach Transplantation und anschließender GCV-Selektion bei Mäusen mit Tumorstwachstum wurde deutlich, daß Zellen, die vor der Transplantation kontinuierlich mit G418 selektioniert wurden, weniger häufig Tumorrezeidive in Tieren hervorrufen als Zellen ohne Selektion (siehe Kap. 3.2.4, Abb. 20). Dennoch wurde keine komplette Heilung aller

untersuchten Tiere festgestellt. Zur Analyse der Ursachen, die zu der GCV-Resistenz geführt haben, wurde genomische DNA von reisolierten Tumorzellen auf genetische Veränderungen des Suizidgenvektors untersucht. Im Rahmen der durchgeführten Southern Blot-Analysen war mit der eingesetzten HSV1-Tk Sonde keine Suizidgensequenz nachweisbar (Kap. 3.2.4, Abb. 22). An diesem Punkt erschien die weitere Analyse mit Massenkulturen aufgrund ihrer bereits erwähnten Heterogenität als nicht sinnvoll. Durch ihre Verwendung konnte jedoch gezeigt werden, daß das hier vorgestellte Modell geeignet ist für die Funktionstestung von Suizidgenvektoren. Während die Daten mit Massenkulturen nur für generelle Phänomene interpretierbar sind, sollten Klone mit jeweils einer Vektorkopie wesentliche Fragen nach den Ursachen der Vektorabschaltung und ihren Häufigkeiten beantworten können.

Für die Herstellung von solchen Klonen wurde zur Infektion der EL4-Zellen eine geringe MOI (<1) gewählt. Zur Klonierung wurden bereits einen Tag nach Infektion Endpunktverdünnungen der Massenkulturen durchgeführt (vergl. Kap. 3.2.3, Abb. 12,). Durch den frühen Zeitpunkt der Trennung der Zellen wurde vermieden, daß innerhalb der Massenkultur Klone mit einer bestimmten Integration auswachsen und bei einer anschließenden Klonierung vermehrt auftreten. Durch die Kultivierung der Klone in G418-Selektionsmedium wurde sichergestellt, daß die auswachsenden Zellen Neomycinphosphotransferase exprimieren. Im Rahmen dieses Experiments wurden insgesamt 14 Klone isoliert (Kap. 3.2.3, Tab. 3). Der Einfachheit halber wurden hiervon zunächst neun Klone molekularbiologisch untersucht (Kap. 3.2.3, Abb. 13). Die Analysen zeigten, daß acht Klone jeweils nur eine einzige Vektorkopie trugen. In solchen Fällen können Veränderungen im Genotyp eindeutig festgestellt werden. Bei dem einzigen Klon mit einer Doppelintegration ist dieses nicht möglich. Deshalb wurde er für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Sechs der isolierten Klone mit unterschiedlicher Integration wurden anschließend auf die Expression des zweiten Selektionsmarkers (HSV1-Tk) *in vitro* geprüft. Alle ausgewählten Klone waren mit GCV selektierbar (vergl. Kap. 3.2.3, Abb. 15) und wurden im folgenden für die Transplantation in Mäuse verwendet.

Durch den Nachweis, daß die durch Transduktion genetisch modifizierten EL4-Zellklone unveränderte tumorigene Eigenschaften besitzen (vergl. Kap. 3.2.4, Abb. 16), konnte gezeigt werden, daß sich die Klone für die geplanten Transplantationen in Mäusen eigneten. Bei der ersten Mauskoorte (n=5 pro EL4-Zellklon, Kap. 3.2.5, Tab. 4) wurden Tumorregressionen in allen Tieren nach erfolgter GCV-Selektion festgestellt (Kap. 3.2.5; Abb. 23 und 26). Damit ist gezeigt, daß unter Verwendung der hier eingestellten Bedingungen eine Suizidgentherapie möglich ist. Von besonderem Interesse war jetzt, ob die Heilung der Tiere dauerhaft ist. Aus diesem Grund wurden die Mäuse im weiteren Verlauf des Experiments (Beobachtungszeitraum sechs Monate) auf die Entstehung von Tumorrezidiven untersucht. Für jeden verwendeten Zellklon war erneutes Tumorwachstum nachweisbar. Unterschiede wurden jedoch bezüglich der Inzidenz und Latenzzeit der Rezidive festgestellt (Abb. 23 und 26, Tab. 5 und 6). Die Ergebnisse waren in der zweiten Mauskoorte reproduzierbar (Abb. 26). Durch die Expression der EL4-spezifischen Variante des Lyt5-Oberflächenmoleküls (Lyt5.2) bei aus isolierten Tumorzellen etablierten Linien wurde gezeigt, daß in den Tieren keine spontanen Tumoren aufgetreten sind (vergl. Kap. 3.2.5, Abb. 24). Daraus ergibt sich, daß EL4-Zellen für die Entstehung der Rezidive verantwortlich waren. Die Daten einer zweiten GCV-Selektionsrunde *in vitro* (Kap. 3.2.5, Abb. 25, Tab. 7) bzw. im Rahmen der zweiten Mauskoorte *in vivo* (Kap. 3.2.5, Abb. 26) verdeutlichen, daß die Zellen GCV-resistent waren. Nach molekularbiologischer Analyse (Kap. 3.2.6, Abb. 27 und 28) wurden verschiedene Ursachen für die GCV-Resistenz ermittelt: Verlust des Chromosoms oder Chromosomenbereichs mit integriertem Vektor, provirale Exzision durch LTR-Rekombination und Löschung der retroviralen Suizidgenexpression (siehe Abb. 29).

4.3 Abschaltungsmechanismen retroviraler Vektoren

a) Verlust des kompletten proviralen Vektors durch chromosomalen Verlust:

Das Auftreten von chromosomalen Verlusten war aufgrund des heteroploiden Karyotyps der EL4-Zellen (Mann *et al.*, 1986) in allen untersuchten Klonen erwartet. Nachgewiesen werden konnte der vollständige Verlust des proviralen Vektors jedoch nur in den Klonen #1, #2, #3 und #6. Da Chromosomen unterschiedlich häufig verloren gehen können, ist der Verlust des Vektors abhängig vom Chromosom, in das sie integriert sind. Vermutlich ist

die Wahrscheinlichkeit für einen Verlust des Provirus-tragenden Chromosoms im Fall der Klone #4 und #5 gering. Diese Vermutung wird durch die vergleichbaren Daten der jeweiligen Tiergruppen in beiden untersuchten Mauskohorten unterstützt (vergl. Kap. 3.2.6, Tab. 6 und 8). Die Bedeutung der berechneten Mutationsrate (Kap. 3.2.6, Tab. 5) für die durch chromosomalen Verlust hervorgerufene Abschaltung der Vektorexpression muß im Zusammenhang mit dem jeweiligen Zellsystem betrachtet werden. In onkologischen Anwendungen kann diese Art der Abschaltung des Vektors von Bedeutung sein, da sich Tumorzellen u.a. durch genomische Instabilität auszeichnen (Varmus *et al.*, 1981b; Stone *et al.*, 1986). Im Gegensatz dazu ist dieser Abschaltungsmechanismus von retroviralen Suizidgenvektoren in diploiden Zellen, wie sie im Rahmen der adoptiven Immuntherapie eingesetzt werden, nicht zu erwarten und deshalb kann die ermittelte Mutationsrate in solchen Fällen vernachlässigt werden.

b) Exzision des Provirus durch LTR-Rekombination:

Bekanntermaßen besitzt provirale DNA nach erfolgter Integration eine hohe Stabilität. Bei der Exzision des Provirus durch homologe Rekombination zwischen den LTR-Sequenzen, im Rahmen dessen eine einzelne LTR zurückbleibt (Jenkins *et al.*, 1981; Varmus *et al.*, 1981a; Copeland *et al.*, 1983; Schade, 2001), handelt es sich um einen vom Integrationsort des Vektors unabhängigen Prozeß, bei dem kein Zusammenhang zwischen einer gerichteten Entfernung von transkribierten oder stillgelegten Vektorsequenzen bestehen sollte (Coffin *et al.*, 1997). Daher sind für die einzelnen Klone ähnliche Frequenzen für dieses Ereignis zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurde LTR-Rekombination jedoch nicht in allen Klonen gefunden (Kap. 3.2.6, Abb. 28, Tab. 8). Es ist nicht auszuschließen, daß dieser seltene Mechanismus (vergl. Kap. 3.2.6, Tab. 8 und Varmus *et al.*, 1981a; Seperack *et al.*, 1988) in den Zellklonen häufig nicht nachgewiesen werden konnte, wenn zusätzlich Verluste des Provirus-tragenden Chromosoms aufgetreten sind.

c) Löschung der retroviralen Suizidgenexpression:

Im Rahmen dieser Untersuchungen war bei einem von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Klonen die Löschung der Suizidgenexpression Ursache für die GCV-Resistenz der EL4-Zellen (vergl. Kap. 3.2.6, Abb. 27, Tab. 8). Der Verlust der Expression trat in diesem Fall besonders häufig auf (vergl. Kap. 3.2.5, Tab. 6). Es ist wenig

wahrscheinlich, daß die Löschung durch inaktivierende Punktmutationen (Varmus *et al.*, 1981b) innerhalb der HSV1-Tk Sequenz hervorgerufen wurde. In diesem Fall hätten in allen untersuchten Mäusen Tumorzidive auftreten müssen, eine Maus blieb jedoch dauerhaft tumorfrei. Die Ergebnisse von Endpunktverdünnungen reisolierter Klon #4 Tumorzellen lassen vermuten, daß beide im Vektor befindlichen Transkriptionseinheiten und nicht nur das Suizidgen (Pellicer *et al.*, 1980; Clough *et al.*, 1982; Graessman *et al.*, 1994) stillgelegt wurde, da die Zellen nicht nur GCV-resistent sind, sondern auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber G418 aufweisen (vergl. Kap. 3.2.5, Tab. 7). Vermutlich hatte der Integrationsort des Vektors Einfluß auf die Abschaltung der retroviralen Expression. Bekanntermaßen ist die Expression des Provirus abhängig von den ihn flankierenden chromosomalen Bereichen (Wyke und Quade, 1980; Jaenisch *et al.*, 1981; Sorge *et al.*, 1984; Jolly *et al.*, 1986). Es wird vermutet, daß in diesen Bereichen regulatorische Elemente für den Expressionsverlust retroviraler Sequenzen verantwortlich sind (Hoeben *et al.*, 1991). Vermutlich ist die Integration im hier untersuchten Klon in einem chromosomalen Bereich erfolgt, der einerseits besonders anfällig für Löschung andererseits aber auch genetisch sehr stabil ist. Hierbei könnte es sich um einen heterochromatischen Bereich handeln, der aufgrund seiner hohen Kompaktierung physikalisch stabiler ist als die von Retroviren für die Integration bevorzugten euchromatischen (Pantazis *et al.*, 1981; Rohdewohld *et al.*, 1987; Mooslehner *et al.*, 1990) und häufig transkriptionsaktiven (Schulz *et al.*, 1987; Scherдин *et al.*, 1990) Genomabschnitte. Kompaktierte Chromatinbereiche sind für Transkriptionsfaktoren schlechter zugänglich. Hieraus kann eine Löschung der Expression resultieren (Aranda und Pascual, 2001). Vermutlich fand die Löschung epigenetisch auf Ebene des retroviralen Promotors stattgefunden hat (Hoeben *et al.*, 1991; Graessmann *et al.*, 1994). Zur Prüfung dieser Möglichkeit könnten zukünftige Transkriptionsanalysen beitragen.

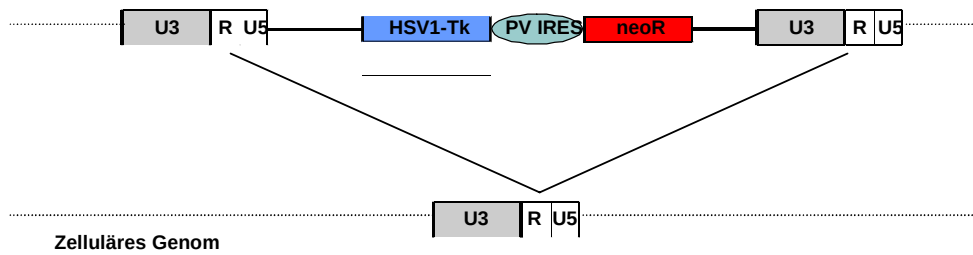
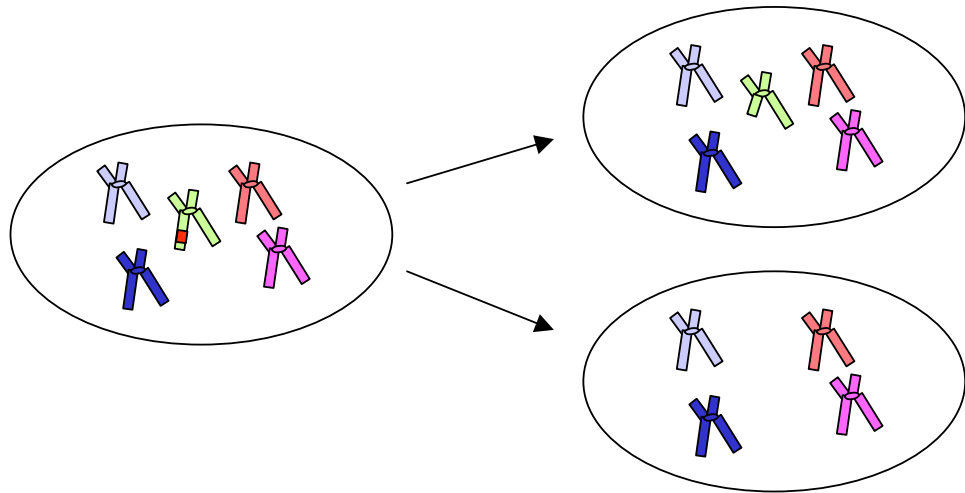
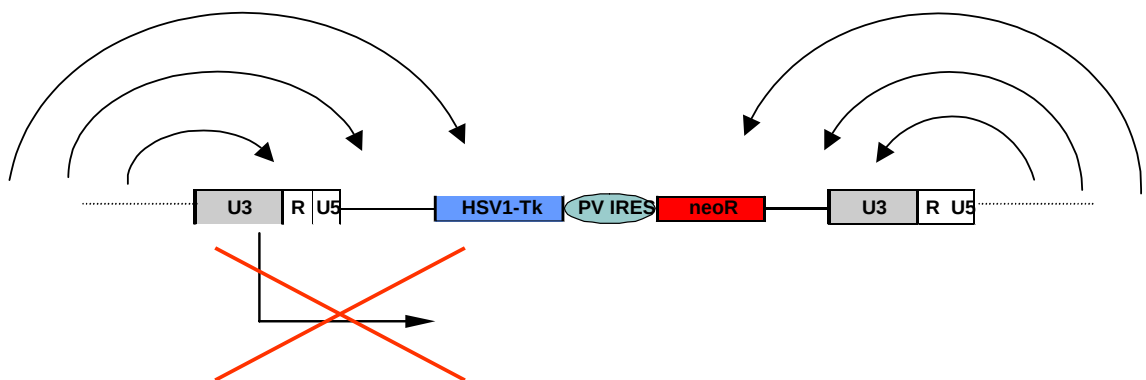
a) LTR-Rekombination:**b) Chromosomaler Verlust:****c) Löschung:**

Abbildung 29: Ursachen der Abschaltung retroviraler Vektoren: Exzision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination (a), chromosomaler Verlust (b) und Löschung der Vektorexpression (c).

4.4 Schlußfolgerung und Ausblick

Forderungen für die Sicherheit bei der retroviralen Suizidgenexpression sind die Unversehrtheit und Funktionalität des Vektors, die eine jederzeitige Entfernung transduzierter Zellen gestatten. Im Rahmen dieser Arbeit ging es deshalb um die Aufklärung der Ursachen des Verlusts der Suizidgenexpression. In früheren Arbeiten fanden bisher nur generelle Untersuchungen zur Abschaltung von retroviralen Vektoren statt. Durch das hier vorgestellte, sensitive *in vivo*-Validierungssystem wurden Abschaltungsmechanismen erstmals gezielt analysiert und ihre Häufigkeiten bestimmt. Die präsentierten Daten zeigen, daß unterschiedliche Ursachen einem Verlust der Vektorexpression zugrundeliegen können: a) chromosomaler Verlust, b) Exzision des Provirus durch LTR-Rekombination und c) Löschung der Suizidgenexpression.

Bei zelltherapeutischen Anwendungen im Rahmen der adoptiven Immuntherapie sind chromosomale Verluste in den benutzten, diploiden Zellen vermutlich vernachlässigbar. Die beiden anderen aufgeführten Mechanismen für die Abschaltung von Vektoren können jedoch im Rahmen der Bekämpfung der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung von Bedeutung sein. Im Fall von Einzelintegrationen des Suizidgenvektors in den Zielzellen sollte die Exzision des Provirus durch LTR-Rekombination die wichtigste Rolle einnehmen, wohingegen die Bedeutung der Löschung kaum abzuschätzen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Löschung nur in einem einzigen Klon nachgewiesen und stellt damit ein extrem seltenes Ereignis dar. In zukünftigen Analysen müßte unter Verwendung von zusätzlichen Klonen geprüft werden, welchen Stellenwert die Löschung bei der Anwendung von retroviralen Vektoren besitzt.

Während bei onkologischen Anwendungen besonders chromosomale Verluste von Bedeutung sein können, da diese Ereignisse bevorzugt in neoplastisch transformierten Zellen auftreten (Stone *et al.*, 1986), stellen LTR-Rekombinationen vermutlich das Hauptproblem bei der Benutzung von Suizidgenvektoren im Rahmen der adoptiven Immuntherapie dar. Das Risiko der durch die genannten Mechanismen hervorgerufenen Abschaltung der Suizidgenexpression kann durch eine Insertion von multiplen Vektorkopien (Moolten *et al.*, 1990; Wahlers *et al.*, 2001) in das Genom der Zielzellen stark minimiert, wenn nicht ausgeschlossen werden. Anhand der in dieser Arbeit

bestimmten Mutationsraten (Kap. 3.2.6) würde bei Insertion von beispielsweise 2-3 Vektorkopien eine Abschaltungshäufigkeit von nur 10^{-12} - 10^{-18} resultieren und wäre aufgrund der nur geringen Anzahl an kotransplantierten T-Zellen (etwa 1×10^5) bei Knochenmarktransplantationen vernachlässigbar. Abschließende Gewißheit hierüber können allerdings erst klinische Studien liefern. Zur weiteren Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, daß mindestens eine Vektorkopie das Suizidgen funktionell und dauerhaft exprimiert, könnten Modifikationen auf Vektorebene beitragen.

Im Fall der Löschung (Davidson *et al.*, 1973) der hier verwendeten HSV1-Tk Sequenz könnte durch die Insertion eines zweiten Suizidgens in den Vektor (Uckert *et al.*, 1998) eine Entfernung transduzierter Zellen dennoch gewährleistet werden. In der Literatur sind eine Reihe von *cis*-Elementen beschrieben, die eine positive Wirkung auf die Stabilität der retroviralen Vektorexpression ausüben können (Überblick in: Baum *et al.*, 2002 und Lund *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1997). Zur Verhinderung von Löschung retroviraler Vektoren in humanen T-Zellen wurde die Einführung von "Scaffold"-Anheftungs-Regionen (SARs) des humanen β -Interferon Gens beschrieben (Agarwal *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 2000). SARs können wie eine Vielzahl anderer Sequenzelemente (Ellis *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1997; Pikaart *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 1999; Phi-Van *et al.*, 1990; McKnight *et al.*, 1992) vor negativ regulatorischen Mechanismen aus dem umgebenden Chromatin schützen. Zur Vermeidung von durch Positionseffekten vermittelte Löschung ist das langfristige Ziel unserer Abteilung die Entwicklung von Vektoren mit der Fähigkeit zur sequenzspezifischen Integration in transkriptionsaktive Bereiche des zellulären Genoms. Zur Zeit werden dafür retrotransposable Vektoren mit heterologen Integrasen getestet (Nora Zingler und Gerald Schumann, persönliche Mitteilung).

5. Literaturverzeichnis

Agarwal M., Austin T. W., Morel F., Chen J., Böhnlein E. und Plavec I. (1998): Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells. *J. Virol.* **72** (5): 3720-3728.

Akyürek L. M., Nallamshetty S., Aoki K., San H., Yang Z.-Y., Nabel G. J. und Nabel E. G. (2001): Coexpression of guanylate kinase with thymidine kinase enhances prodrug cell killing *in vitro* and suppresses vascular smooth muscle cell proliferation *in vivo*. *Mol. Ther.* **3** (5.1): 779-786.

Albritton L. M., Tseng L., Scadden D. und Cunningham J. M. (1989): A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* **57**: 659-666.

Alford R. L., Honda S., Lawrence C. B. und Belmont J. W. (1991): RNA secondary structure analysis of the packaging signal for Moloney murine leukemia virus. *Virology* **183**: 611-619.

Anonym (1997): Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum. Gene Ther.* **8**: 1499-1530.

Appleyard R. K. (1954): Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**: 440-452.

Aranda A. und Pascual A. (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81** (3): 1269-1304.

Asche W., Colletta G., Warnecke G., Nobis P., Pennie S., King R. M. und Ostertag W. (1984): Lack of retrovirus gene expression in somatic cell hybrids of Friend cells and teratocarcinoma cells with a teratocarcinoma phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 923-930.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. und Struhl K.: *Current protocols in molecular biology* (Volume 1-4), John Wiley & Sons, Inc., 2001.

- Baum C., Hegewisch-Becker S., Eckert H.-G., Stocking C. und Ostertag W. (1995): Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (*mdr-1*) gene in early hematopoietic cells. *J. Virol.* **69** (12): 7541-7547.
- Baum C., Eckert, H.-G., Stockschröder M., Just U., Hegewisch-Becker S., Hildinger M., Uhde A., John J. und Ostertag W. (1996): Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and *in vivo* selection. *J. Hematother.* **5**: 323-329.
- Baum C., Itoh K., Meyer J., Laker C., Ito Y. und Ostertag W. (1997): The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. *J. Virol.* **71** (9): 6323-6331.
- Baum C., Ostertag W., Stocking C. und D. von Laer (2002): Retroviral vector design for cancer gene therapy. In: Lattime E. C. und Gerson S. L., eds. *Gene therapy of cancer* (2nd edition), Academic Press (Elsevier, San Diego), 3-29.
- Baum C. und Ostertag W. (1994): Somatischer und Gentherapie -Prinzipien und Perspektiven. *Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen* **91** (46), A: 3180-3184.
- Baum C. und Ostertag W. (1996): Somatischer Gentransfer in der Onkologie. In: Zeller, zur Hausen (Hrsg.) *Onkologie Grundlagen Diagnostik Therapie Entwicklungen*: 1-21.
- Bayle J. Y., Johnson L. G., St. George J. A., Boucher R. C. und Olsen J. C. (1993): High-efficiency gene transfer to primary monkey airway epithelial cells with retrovirus vectors using the gibbon ape leukemia virus receptor. *Hum. Gene Ther.* **4** (2): 161-170.
- Beck C., Cayeux S., Lupton S. D., Dörken B. und Blankenstein T. (1995): The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Hum. Gene Ther.* **6**: 1525-1530.
- Bender M. A., Palmer T. D., Gelinas R. E. und Miller A. D. (1987): Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the *gag* region. *J. Virol.* **61**: 1639-1646.

- Bender W. und Davidson N. (1976): Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA. *Cell* **7**: 595-607.
- Bergemann J., Kühlcke K., Fehse B., Ratz I., Ostertag W. und Lothar H. (1995): Excision of specific DNA-sequences from integrated retroviral vectors via site-specific recombination. *Nucl. Acids Res.* **23** (21): 4451-4456.
- Birnboim H. C. und Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
- Blaese R. M. und Anderson W. F. (1990): The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum. Gene Ther.* **1**: 327-329.
- Boasberg P. D. (1996): Lymphocyte transfusion therapy for cancer patients. *Blood* **87**: 3522-3523.
- Boehme R. E. (1984): Phosphorylation of the antiviral precursor 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine monophosphate by guanylate kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **259** (20): 12346-12349.
- Bonini C., Ferrari G., Verzeletti S., Servida P., Zappone E., Ruggieri L., Ponzoni M., Rossini S., Mavilio F., Traversari C. und Bordignon C. (1997): HSV1-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276** (5319): 1719-1724.
- Bordignon C., Bonini C., Verzeletti S., Nobili N., Maggioni D., Traversari C., Giavazzi R., Servida P., Zappone E., Benazzi E., *et al.* (1995): Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for *in vivo* modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum. Gene Ther.* **6** (6): 813-819.
- Bortin M. M., Truitt R. L., Rimm A. A., Bach F. H. (1979): Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity. *Nature* **281**: 490-491.

- Braiden V., Nagayama Y., Iitaka M., Namba H., Niwa M. und Yamashita S. (1998): Retrovirus-mediated suicide gene/prodrug therapy targeting thyroid carcinoma using a thyroid-specific promoter. *Endocrinology* **139** (9): 3996-3999.
- Bulger M. und Groudine M. (1999): Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* **13**: 2465-2477.
- Caruso M., Panis Y., Gagandeep S., Houssin D., Salzmann J. L. und Klatzmann D. (1993): Regression of established macroscopic liver metastases after *in situ* transduction of a suicide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (15): 7024-7028.
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bay S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.-L., Bousso P., Le Deist F. und Fischer A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-672.
- Cepko C. L., Ryder E. F., Austin C. P., Walsh C. und Fekette M. D. (1993): Lineage analysis using retroviral vectors. *Methods Enzymol.* **225**: 933-960.
- Challita P.-M. und Kohn D. B. (1994): Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2567-2571.
- Charak B. S., Brynes R. K., Chogyoji M. und Mazumber A. (1992): Lymphokine-activated killer cells in autologous bone marrow transplantation -evidence against inhibition of engraftment *in vivo*. *Transplantation* **54**: 1008-1013.
- Chen D., Riesbeck K., McVey J. H., Kemball-Cook G., Tuddenham E. G., Lechler R. I. und Dorling A. (1999): Regulated inhibition of coagulation by porcine endothelial cells expressing P-selection-tagged hirudin and tissue factor pathway inhibitor fusion proteins. *Transplantation* **68** (6): 832-839.
- Clough D. W., Kunkel L. M. und Davidson R. L. (1982): 5-azacytidine-induced reactivation of a *herpes simplex* thymidine kinase gene. *Science* **216** (4541): 70-73.

- Coffin J. M. (1996): Retroviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology* 3rd Ed. (B. N. Fields, D. M. Knipe und P. M. Howley, eds.), 763-844, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Coffin J. M., Hughes S. H. und Varmus H. E. (1997): Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Cohen J. L., Boyer O., Salomon B., Onclercq R., Charlotte F., Bruel S., Boisserie G. und Klatzmann D. (1997): Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. *Blood* **89** (12): 4636-4645.
- Collins R. H., Spilberg O., Drobyski W. R., Porter D. L., Giralt S., Champlin R., Goodman S. A., Wolff S. N., Hu W., Verfaillie C., List A., Dalton W., Ognoskie N., Chetrit A., Antin J. H. und Nemunaitis J. (1997): Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* **15**: 433-444.
- Copeland N. G., Hutchinson K. W. und Jenkins N. A. (1983): Excision of the DBA ecotropic provirus in dilute coat-color revertants of mice occurs by homologous recombination involving the viral LTRs. *Cell* **33**: 379-387.
- Correll P. H., Colilla S. und Karlsson S. (1994): Retroviral vector design for long-term expression in murine hematopoietic cells *in vivo*. *Blood* **84** (6): 1812-1822.
- Cosset F.-L., Takeuchi Y., Battini J.-L., Weiss R. A. und Collins M. K. L. (1995): High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* **69** (12): 7430-7436.
- Culver K. W., Ram Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E. H. und Blaese R. M. (1992): *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256** (5063): 1550-1552.
- Dang Q., Auten J. und Plavec I. (2000): Human beta interferon scaffold attachment region inhibits *de novo* methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* **74** (6): 2671-2678.

- Davidson R. L., Adelstein S. J. und Oxman M. N. (1973): *Herpes simplex* virus as a source of thymidine kinase for thymidine kinase-deficient mouse cells: suppression and reactivation of the viral enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** (7): 1912-1916.
- Dilber M. S. und Smith E. (1997): Suicide genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther.* **4**: 273-274.
- Drobyski W. R., Piaskowski V., Ash R. C., Casper J. T. und Truitt R. L. (1990): Preservation of lymphokine-activated killer activity following T cell depletion of human bone marrow. *Transplantation* **50**: 625-632.
- Drobyski W. R., Agostini T., Burns W. H., Morse H. und Sandford G. (1999): Mitigation of murine graft versus host disease (GVHD) without compromise of alloengraftment using transgenic donor T cells expressing a thymidine kinase (TK) suicide gene. *Blood* **94** (Suppl. 1): 550a.
- Drobyski W. R., Morse III H. C., Burns W. H., Casper J. T. und Sandford G. (2001): Protection from lethal murine graft-versus-host disease without compromise of alloengraftment using transgenic donor T cells expressing a thymidine kinase suicide gene. *Blood* **97** (8): 2506-2513.
- Dube S., Kung H. J., Bender W., Davidson N. und Ostertag W. (1976): Size, subunit composition, and secondary structure of the Friend virus genome. *J. Virol.* **20** (1): 264-272.
- Einfeld D. (1996): Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. In: *Morphogenesis and maturation of retroviruses* (H.-G. Kräusslich, ed.), 133-176. Springer-Verlag, Berlin.
- Ellis J., Tan-Un K. C., Harper A., Michalovich D., Yannoutsos N., Philipsen S. und Grosveld F. (1996): A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human β -globin locus control region. *EMBO J.* **15** (3): 562-568.
- Elshami A. A., Saavedra A., Zhang H., Kucharczuk J. C., Spray D. C., Fishman G. I., Amin K. M., Kaiser L. R. und Albelda S. M. (1996): Gap junctions play a role in the bystander effect of the *herpes simplex* virus thymidine kinase/ganciclovir system *in vitro*. *Gene Ther.* **3**: 85-92.

- Emerman M. und Temin H. M. (1984): Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* **39**: 459-467.
- Faulds D. und Heel R. C. (1990): Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficiency in cytomegalovirus infections. *Drugs* **39**: 597.
- Fehse B., Schade U. M., Li Z., Uhde A., Koch S., Goller B., Ruger R., Fehse N., Stockschröder M. und Zander A. R. (1998): Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br. J. Haematol.* **102** (2): 566-574.
- Feng Y.-Q., Alami R. und Bouhassira E. E. (1999): Enhancer-dependent transcriptional oscillations in mouse erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* **19** (7): 1907-4917.
- Ferrara J. L. M., Abhyanker S. und Gilliland D. G. (1992): IL-1: a pivotal effector in the cytokine storm of acute GvHD. *Blood* **80**: 270.
- Franz T., Hilberg F., Seliger B., Stocking C. und Ostertag W. (1986): Retroviral mutants efficiently expressed in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3292-3296.
- Freeman S. M., Abboud C. N., Whartenby K. A., Packman C. H., Koeplin D. S., Moolten F. L. und Abraham G. N. (1993): The bystander effect: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* **53**: 5274-5283.
- Freeman S. und Gardiner J. M. (1996): Acyclic nucleosides as antiviral compounds. *Mol. Biotechnol.* **5**: 125-137.
- Gale R. P. und Champlin R. E. (1984): How does bone-marrow transplantation cure leukaemia? *Lancet* **2**: 28-30.
- Gautsch J. W. und Wilson M. C. (1983): Delayed *de novo* methylation in teratocarcinoma suggests additional tissue-specific mechanisms for controlling gene expression. *Nature* **301**: 32-37.
- Giralt S., Hester J., Huh Y., Hirsch-Ginsberg C., Rondon G., Seong D., Lee M., Gajewski J., van Besien K., Khouri I., Mehra R., Przeciorka D., Körbling M., Talpaz M., Kantarjian

- H., Fischer H., Deisseroth A. und Champlin R. (1995): CD8-depleted donor lymphocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **86**: 4337-4343.
- Golumbek P. T., Hamzeh F. M., Jaffee E. M., Levitsky H., Lietman P. S. und Pardoll D. M. (1992): *Herpes simplex*-1 virus thymidine kinase gene is unable to completely eliminate live, nonimmunogenic tumor cell vaccines. *J. Immunother.* **12**:224-230.
- Gorer P. A. (1950): Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br. J. Cancer* **4**: 372-379.
- Gorman C. M., Rigby P. W. J. und Lane D. P. (1985): Negative regulation of viral enhancers in undifferentiated embryonic stem cells. *Cell* **42**: 519-526.
- Graessmann A., Sandberg G., Guhl E. und Graessmann M. (1994): Methylation of single sites within the *herpes simplex* virus tk coding region and the simian virus 40 T-antigen intron causes gene inactivation. *Mol. Cell. Biol.* **14** (3): 2004-2010.
- Gratwohl A., Hermans J., Apperley J., Arcese W., Bacigalupo A., Bandini G., di Bartolomeo P., Boogaerts M., Bosi A., Carreras E., Devergie A., Ferrant A., Fibbe W. E., Frassoni F., Gahrton G., Goldman J., Iriondo A., Jacobson N., Kolb H. J., Link H., Michallet M., Prentice H. G., Reiffers J., v. Rhee F., Ruutu T., Schwaighofer H., Vernant J. P., de Witte T. und Niederwieser D. (1995): Acute graft-versus-host disease: Grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* **86**: 813-818.
- Gray K. D. und Roth M. (1993): Mutational analysis of the envelope gene of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **67**: 3489-3496.
- Grez M., Akgün E., Hilberg F. und Ostertag W. (1990): Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (23): 9202-9206.
- Grez M., Zörnig M., Nowock J. und Ziegler M. (1991): A single point mutation activates the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in embryonal stem cells. *J. Virol.* **65** (9): 4691-4698.

- Grignat-Debrus C. und Calberg-Bacq C. M. (1997): Potential of *varicella zoster* virus thymidine kinase as a suicide gene in breast cancer cells. *Gene Ther.* **4**: 560-569.
- Hamel W., Magnelli L., Chiarugi V. P. und Israel M. A. (1996): *Herpes simplex* virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.* **56**: 2697-2702.
- Hartley J. W. und Rowe W. P. (1975): Clonal cell lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* **65** (1): 128-134.
- Haseltine W. A., Maxam A. M. und Gilbert W. (1977): Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 989-993.
- Helene M., Lake-Bullock V., Bryson J. S., Jennings C. D. und Kaplan A. M. (1997): Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene. *J. Immunol.* **158**: 5079-5082.
- Heslop H. E., Ng C. Y. C., Li C., Smith C. A., Loftin S. K., Krance R. A., Brenner M. K. und Rooney C. M. (1996): Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat. Med.* **2**: 551-555.
- Hilberg F., Stocking C., Ostertag W. und Grez M. (1987): Functional analysis of a retroviral host-range mutant: Altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5232-5236.
- Hildinger M., Eckert H.-G., Schilz A. J., John J., Ostertag W. und Baum C. (1998): FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther.* **5**: 1575-1579.
- Hock R. A., Miller A. D. und Osborne W. R. A. (1989): Expression of human adenosine deaminase from various strong promoters after gene transfer into human hematopoietic cell lines. *Blood* **74** (2): 876-881.
- Hoeben R. C., Migchielsen A. A. J., van der Jagt R. C. M., van Ormondt H. und van der Eb A. J. (1991): Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in

murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol.* **65** (2): 904-912.

Horowitz M. M., Gale R. P., Sondel P. M., Goldman J. M., Kersey J., Kolb H. J., Rimm A. A., Ringden O., Rozman C., Speck B., *et al.* (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**: 555-562.

Howard B. D., Kalthoff H. und Fong T. C. (1999): Ablation of tumor cells *in vivo* by direct injection of HSV-thymidine kinase retroviral vector and ganciclovir therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **880**: 352-365.

Hunter E. und Swanstrom R. (1990): Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**: 187-253.

Ish-Horowicz D. und Burke J. F. (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2989-2998.

Ishii-Morita H., Agbaria R., Mullen C. A., Hirano H., Köplin D. A., Ram Z., Oldfield E. H., Johns D. G. und Blaese R. M. (1997): Mechanism of bystander effect killing in the *herpes simplex* thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther.* **4**: 244-251.

Isner J. M. und Asahara T. (1999): Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* **103** (9): 1231-1236.

Jähner D., Stuhlmann H., Stewart C. L., Harbers K., Löhler J., Simon I. und Jaenisch R. (1982): *De novo* methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298** (5875): 623-628.

Jaenisch R., Jähner D., Nobis P., Simon I., Löhler J., Harbers K. und Grotkopp D. (1981): Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice. *Cell* **24** (2): 519-529.

Jenkins N. A., Copeland N. G., Taylor B. A. und Lee B. K. (1981): Dilute (d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome. *Nature* **293**: 370-374.

- Jolly D. J., Willis R. C. und Friedmann T. (1986): Variable stability of a selectable provirus after retroviral vector gene transfer into human cells. *Mol. Cell. Biol.* **6** (4): 1141-1147.
- Just U., Stocking C., Spooncer E., Dexter T. M. und Ostertag W. (1991): Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* **64**: 1163-1173.
- Kay M. A., Manno C. S., Ragni M. V., Larson P. J., Couto L. B., McClelland A., Glader B., Chew A. J., Tai S. J., Herzog R. W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W. und High K. A. (2000): Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* **24** (3): 201-202.
- Keller G. und Snodgrass R. (1990): Life span of multipotential hematopoietic stem cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* **171**: 1407-1418.
- Kempler G., Freitag B., Berwin B., Nanassy O. und Barklis E. (1993): Characterisation of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* **193**: 690-699.
- Klatzmann D. (1996): Gene therapy for metastatic malignant melanoma: evaluation of tolerance to intratumoral injection of cells producing recombinant retroviruses carrying the *herpes simplex* virus type 1 thymidine kinase gene, to be followed by ganciclovir administration. *Hum. Gene Ther.* **7** (2): 255-267.
- Klatzmann D., Valery C. A., Bensimon G., Marro B., Boyer O., Mokhtari K., Diquet B., Salzmann J. L. und Philippon J. (1998): A phase I/II study of *herpes simplex* virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum. Gene Ther.* **9** (17): 2595-2604.
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I und Khorana H. G. (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **56** (2): 341-361.
- Kolb H. J., Mittermuller J., Clemm C., Holler E., Ledderose G., Brehm G., Heim M. und Wilmanns W. (1990): Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* **76**: 2462-2465.

Kolb H. J., Schattenberg A., Goldmann J. M., Hertenstein B., Jacobsen N., Arcese W., Ljungmann P., Ferrant A., Verdonck L., Niederwieser D., van Rhee F., Mittermüller J., Witte T., Holler E. und Ansari H. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* **86**: 2041-2050.

Kornblau S. M., Stiouf I., Snell V., Przepiorka D., Stephens L. C., Champlin R. und Marini III F. C. (2001): Preemptive control of graft-versus-host disease in a murine allogeneic transplant model using retrovirally transduced murine suicidal lymphocytes. *Cancer Res.* **61**: 3355-3360.

Kozak S. L., Siess D. C., Kavanaugh M. P., Miller A. D. und Kabat D. (1995): The envelope glycoprotein of an amphotropic murine retrovirus binds specifically to the cellular receptor/phosphate transporter of susceptible species. *J. Virol.* **69** (6): 3433-3440.

Kräusslich H.-G. und Welker R. (1996): Intracellular transport of capsid components. In: *Morphogenesis and maturation of retroviruses* (H.-G. Kräusslich, ed.), 25-64. Springer-Verlag, Berlin.

Kung M. R., Bailey J. M., Davidson N., Vogt P. K., Nicolson M. O. und McAllister R. M. (1975): Electron microscope studies of tumor virus RNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**: 827-834.

Laker C., Stocking C., Bergholz U., Hess N., DeLamarter J. und Ostertag W. (1987): Autocrine stimulation after transfer of the granulocyte/macrophage colony stimulating factor gene and autonomous growth are distinct but interdependent steps in the oncogenic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8458-8462.

Laker C., Meyer J., Schopen A., Friel J., Heberlein C., Ostertag W. und Stocking C. (1998): Host *cis*-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J. Virol.* **72** (1): 339-348.

Lim B., Williams D. A. und Orkin S. H. (1987): Retrovirus-mediated gene transfer of human adenosine deaminase: Expression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **7** (10): 3459-3465.

- Lim B., Apperley J. F., Orkin S. H. und Williams D. A. (1989): Long-term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus-infected hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (22): 8892-8896.
- Lipps H. J. und Bode J. (2001): Exploiting chromosomal and viral strategies: the design of safe and efficient non-viral gene transfer systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3** (2): 133-141.
- Liu F. und Huang L. (2002): Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control Release* **78** (1-3): 259-266.
- Losordo D. W., Vale P. R., Hendel R. C., Milliken C. E., Fortuin F. D., Cummings N., Schatz R. A., Asahara T., Isner J. M. und Kuntz R. E. (2002): Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* **105** (17): 2012-2018.
- Lund A. H., Duch M. und Pedersen F. S. (1996): Transcriptional silencing of retroviral vectors. *J. Biomed. Sci.* **3** (6): 365-378.
- Lupton S. D., Brunton L. L., Kalberg V. A. und Overell R. W. (1991): Dominant positive and negative selection using a hygromycin phosphotransferase-thymidine kinase fusion gene. *Mol. Cell. Biol.* **11** (6): 3374-3378.
- Mann V., Szyf M., Razi A., Chriqui-Zeira E. und Kedar E. (1986): Characterization of a tumorigenic murine T-lymphoid-cell line spontaneously derived from an IL-2-dependent T-cell line. *Int. J. Cancer* **37**: 781-786.
- Marini F. C., Snell V., Yu Q., Zhang X., Singletary S. E., Champlin R. und Andreeff M. (1999): Purging of contaminating breast cancer cells from hematopoietic stem cell grafts by adenoviral GAL-TEK gene therapy and magnetic antibody cell separation. *Clin. Cancer Res.* **5** (6): 1557-1568.
- Markowitz D., Goff S. P. und Baltimore D. (1988): A safe packaging cell line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62**: 1120-1142.

- Marmont A. M., Horowitz M. M., Gale R. P., Sobocinski K., Ash R. C., van Bekkum Champlin R. E., Dicke K. A., Goldmann J. M., Good R. A., *et al.* (1991): T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**: 2120-2130.
- Matthews T. und Boehme R. (1988): Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* **10** Suppl 3: S490-S494.
- McAllister R. M., Isaacs H., Rongey R., Peer M., Au W., Soukup S. W., Gardner M. B. (1977): Establishment of a human medullablastoma cell line. *Int. J. Cancer* **20** (2): 206-212.
- McKnight R. A., Shamay A., Sankaran L., Wall R. J. und Hennighausen L. (1992): Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (15): 6943-6947.
- Miller A. D. (1990): Retrovirus packaging cells. *Hum. Gene Ther.* **1**: 5-14.
- Miller W. H. und Miller R. L. (1980): Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem.* **255**: 7204-7207.
- Miller D. G., Adam M. A. und Miller A. D. (1990): Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4239-4242.
- Moloney (1960): Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37.I. Origin and introductory investigations. *J. Natl. Cancer Inst.* **24**: 933-951.
- Moolten F. L. (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted *herpes* thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* **46** (10): 5276-5281.
- Moolten F. L., Wells J. M., Heyman R. A. und Evans R. M. (1990): Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a *herpes* thymidine kinase transgene. *Hum. Gene Ther.* **1**: 125-134.

- Mooslehner K., Karls U. und Harbers K. (1990): Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J. Virol.* **64** (6): 3056-3058.
- Morgan R. A., Cornetta K. und Anderson W. F. (1990): Applications of the polymerase chain reaction in retroviral-mediated gene transfer and the analysis of gene-marked human TIL cells. *Hum. Gene Ther.* **1**: 135-149.
- Morgan R. A., Nussbaum O., Muenchau D. D., Shu L., Couture L. und Anderson W. F. (1993): Analysis of the functional and host range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* **67**: 4712-4721.
- Morita S., Kojima T. und Kitamura T. (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* **7** (12): 1063-1066.
- Mullen C. A., Kilstrup M. und Blaese R. M. (1992): Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1): 33-37.
- Mulligan R. C. (1993): The basic science of gene therapy. *Science* **260** (5110): 926-932.
- Munshi N. C., Govindarajan R., Drake R., Ding L. M., Iyer R., Saylor R., Kornbluth J., Marcus S., Chiang Y., Ennist D., Kwak L., Reynolds C., Tricot G. und Barlogie B. (1997): Thymidine kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remain fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir. *Blood* **89** (4): 1334-1340.
- Murray L., Luens K., Tushinski R., Jin L., Burton M., Chen J., Forestell S. und Hill B. (1999): Optimization of retroviral gene transduction of mobilized primitive hematopoietic progenitors by using thrombopoietin, Flt3, and Kit ligands and RetroNectin culture. *Hum. Gene Ther.* **10** (11): 1743-1752.
- Nishihara E., Nagayama Y., Mawatari F., Tanaka K., Namba H., Niwa M. und Yamashita S. (1997): Retrovirus-mediated *herpes simplex* virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* **138** (11): 4577-4583.

- Niwa O., Yokoto Y., Ishida H. und Sugahara T. (1983): Independent mechanisms in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* **32**: 1105-1113.
- Oldfield E. H., Ram Z., Culver K. W., Blaese R. M., DeVroom H. L., Anderson W. F. (1993): Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.* **4** (1): 39-69.
- Ortiz B. D., Cado D., Chen V., Diaz P. W. und Winoto A. (1997): Adjacent DNA elements dominantly restrict the ubiquitous activity of a novel chromatin-opening region to specific tissues. *EMBO J.* **16** (16): 5037-5045.
- Osborne C. S., Pasceri P., Singal R., Sukonnik T., Ginder G. D. und Ellis J. (1999): Amelioration of retroviral vector silencing in locus control region β -globin-transgenic mice and transduced F9 embryonic cells. *J. Virol.* **73**: 5490-5496.
- Ostertag W., Roesler G., Krieg C. J., Kind J., Cole T., Crozier T., Gaedicke G., Steinheider G., Kluge N. und Dube S. (1974): Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71** (12): 4980-4985.
- Packer R. J., Raffel C., Villablanca J. G., Tonn J. C., Burdach S. E., Burger K., LaFond D., McComb J. G., Cogen P. H., Vezina G. und Kapcala L. P. (2000): Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with *herpes simplex* virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration. *J. Neurosurg.* **92**: 249-254.
- Pantazis P., Schulz R. A., Chirikjian J. G. und Papas T. S. (1981): Distribution of proviral sequences in chromatin of embryonic fibroblasts infected by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (5): 2669-2672.
- Papadopoulos E. B., Ladanyi M., Emanuel D., Mackinnon S., Boulad F., Carabasi M. H., Castro-Malaspina H., Childs B. H., Gillio A. P., Small T. N., Young J. W., Kernan N. A. und O'Reilly R. J. (1994): Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-

associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1185-1191.

Paquin A., Jaalouk D. E. und Galipeau J. (2001): Retrovector encoding a green fluorescent protein-herpes simplex virus thymidine kinase fusion protein serves as a versatile suicide/reporter for cell and gene therapy applications. *Hum. Gene Ther.* **12** (1): 13-23.

Pawliuk R., Eaves C. J. und Humphries K. R. (1997): Sustained high-level reconstitution of the hematopoietic system by preselected hematopoietic cells expressing a transduced cell-surface antigen. *Hum. Gene Ther.* **8**: 1595-1604.

Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L. und Baltimore D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (18): 8392-8396.

Pellicer A., Wagner E. F., el Karez A., Dewey M. J., Reuser A. J., Silverstein S., Axel R. und Mintz B. (1980): Introduction of a viral thymidine kinase gene and the human β -globin gene into developmentally multipotential mouse teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (4): 2098-2102.

Phi-Van L., von Kries J. P., Ostertag W. und Strätling W. H. (1990): The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol. Cell. Biol.* **10** (5): 2302-2307.

Piguet P. F., Grau E. und Allet B. (1987): Tumor necrosis factor (cachectin) is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **166**: 1280-1289.

Pikaart M. J., Recillas-Targa F. und Felsenfeld G. (1998): Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12** (18): 2852-2862.

Plavec I., Voyovich A., Moss K., Webster D., Hanley M. B., Escaich S., Ho K. E., Boehnlein E. und DiGiusto D. L. (1996): Sustained retroviral gene marking and expression

in lymphoid and myeloid cells derived from transduced hematopoietic progenitor cells. *Gene Ther.* **3**: 717-724.

Porter D. L., Roth M. S., McGarigle C., Ferrara J. L. M. und Antin J. H. (1994): Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **330**: 100-106.

Pulkkanen K. J., Parkkinen J. J., Laukkanen J. M., Kettunen M. I., Tynnelä K., Kauppinen R. A., Ala-Opas M. Y. Ylä-Herttuala S. (2001): HSV-tk gene therapy for human renal cell carcinoma in nude mice. *Cancer Gene Ther.* **8** (7): 529-536.

Ramsey C. A. und Panganiban A. T. (1993): Replication of the retroviral terminal repeat sequence during in vivo reverse transcription. *J. Virol.* **67**: 4114-4121.

Rasheed S., Nelson-Rees W. A., Toth E. M., Arnstein P. und Gardner M. B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33** (4): 1027-1033.

Reusser P., Riddell S. R., Meyers J. D. und Greenberg P. D. (1991): Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation. Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**: 1373-1380.

Riddell S. R., Watanabe K. S., Goodrich J. M., Li C. R., Agha M. E. und Greenberg P. D. (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**: 238-241.

Ritchey J. und DiPersio J. F. (1999): Control of GVHD using novel chimeric suicide genes (SG): preclinical models. *Blood* **94** (Suppl. 1): 552a.

Rocha M., Umansky V., Lee K. H., Hacker H. J., Benner A. und Schirmacher V. (1997): Differences between graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactivity. Interaction of donor immune T cells with tumor and/or host cells. *Blood* **89**: 2189-2202.

Roe T., Reynolds T., Yu G. und Brown P. O. (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**: 2099-2108.

- Rogers R. P., Ge J. Q., Holley-Guthrie E., Hoganson D. K., Comstock K. E., Olsen J. C. und Kenney S. (1996): Killing Epstein-Barr virus-positive B lymphocytes by gene therapy: comparing the efficacy of cytosine deaminase and *herpes simplex* virus thymidine kinase. *Hum. Gene Ther.* **7**: 2235-2245.
- Rohdewohld H., Weiher H., Reik W., Jaenisch R. und Breindl M. (1987): Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J. Virol.* **61** (2): 336-343.
- Rooney C. M., Smith C. A., Ng C. Y. C., Loftin S., Li C., Krance R. A., Brenner M. K. und Heslop H. E. (1995): Use of gene-modified virus-specific T-lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* **345**: 9-13.
- Rosenberg S. A., Packard B. S., Aebersold P. M., Solomon D., Topalian S. L., Toy S. T., Simon P., Lotze M. T., Yang J. C., Seipp C. A., Simpson C., Carter C., Bock S., Schwartzentruber D., Wie J. P. und White D. E. (1988): Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **319**: 1676-1680.
- Saiki R. K., Bugawan T. L., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A. (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324** (6093): 163-166.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (12): 5463-5467.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T.: Molecular cloning (Volume 1-3), A laboratory manual, 2nd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
- Schade U. M. (2001): Adoptive Immuntherapie: Entwicklung eines neuen Protokolls für die effiziente Transduktion primärer T-Lymphozyten mit retroviralen Vektoren. *Dissertation*, Hamburg.
- Scherdin U., Rhodes K. und Breindl M. (1990): Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J. Virol.* **64** (2): 907-912.

- Schuler U. und Ehninger G. (1992): Inzidenz, Therapie und Prophylaxe der Zytomegalievirus- (CMV-) Erkrankung nach Knochenmarktransplantation. *Med. Klein.* **1**: 30-38.
- Schulz M., Freiser-Rabien U., Jessberger R. und Doerfler W. (1987): Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. *J. Virol.* **61** (2): 344-353.
- Schwieger M. (2000): Untersuchungen zum Einfluß der retroviralen Promotor- und Enhancersequenzen auf die Abschaltungshäufigkeit retroviraler Vektoren in verschiedenen Zellsystemen. *Dissertation*, Hamburg.
- Seliger B., Kollek R., Stocking C., Franz T. und Ostertag W. (1986): Viral transfer, transcription, and rescue of a selectable myeloproliferative sarcoma virus in embryonal cell lines: expression of the *mos* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 286-293.
- Seperack P. K., Strobel M. C., Corrow D. J., Jenkins N. A. und Copeland N. G. (1988): Somatic and germ-line reverse mutation rates of the retrovirus-induced dilute coat-color mutation of DBA mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1): 189-192.
- Shimotohno K. und Temin H. M. (1980): No apparent nucleotide sequence specificity in cellular DNA juxtaposed to retrovirus proviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (12): 7357-7361.
- Shivdasani R. A. und Orkin S. H. (1996): The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**: 4025-4039.
- Smiley W. R., Laubert B., Howard B. D., Ibanez C., Fong T. C., Summers W. S. und Burrows F. J. (1997): Establishment of parameters for optimal transduction efficiency and antitumor effects with purified high-titer HSV-TK retroviral vector in established solid tumors. *Hum. Gene Ther.* **8**: 965-977.
- Soiffer R. J. (1997): Donor lymphocyte infusion. The door is open. *J. Clin. Oncol.* **15**: 416-417.

- Sorge J., Cutting A. E., Erdman V. D. und Gautsch J. W. (1984): Integration-specific retrovirus expression in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (21): 6627-6631.
- Soriano P. und Jaenisch R. (1986): Retroviruses as probe for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* **46**: 18-29.
- Soriano P., Friedrich G. und Lawinger P. (1991): Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells. *J. Virol.* **65** (5): 2314-2319.
- Sosman J. A. und Sondel P. M. (1993): The graft-vs.-leukemia effect: Implications for post-marrow transplant antileukemia treatment. *Am. J. Ped. Hematol. Oncol.* **15**: 185-195.
- Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** (3): 503-517.
- Stewart C. L., Stuhlmann H., Jähner D. und Jaenisch R. (1982): *De novo* methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4098-4102.
- Stocking C., Kollek R., Bergholz U. und Ostertag W. (1985): Long terminal repeat sequences impart hematopoietic transformation properties to the myeloproliferative sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5746-5750.
- Stocking C., Kollek R., Bergholz U. und Ostertag W. (1986): Point mutations in the U3 region of the long terminal repeat of Moloney murine leukemia virus determine disease specificity of the myeloproliferative sarcoma virus. *Virology* **153**: 145-149.
- Stocking C. und Ostertag W. (1990): Interleukin-3: a multilineage hematopoietic growth factor. In: *Growth factors, differentiation factors and cytokines*. (A. Habenicht, ed.), 115-129. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Stocking C., Grez M. und Ostertag W. (1993): Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells. In: *Virus strategies: Molecular biology and Pathogenesis* (W. Doerfler und P. Böhm, eds.), 433-455. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Stone J. C., Dower N. A. und Siminovitch L. (1986): Stability of retrovirally transduced markers in a rat cell line. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **12** (6): 575-583.

Sullivan K. M., Storb R., Buckner C. D., Fefer A., Fisher L., Weiden P. L., Witherspoon R. P., Appelbaum F. R., Banaji M., Hansen J., Martin P., Sanders J. E., Singer J. und Thomas E. D. (1989): Graft *versus* host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **320**: 828-834.

Tabin C. J., Hoffmann J. W., Gott S. P. und Weinberg R. A. (1982): Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the *herpes simplex* virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 426-436.

Takamiya Y., Short M. P., Moolten F. L., Fleet C., Mineta T., Breakefield X. O. und Martuza R. L. (1993): An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. *J. Neurosurg.* **79** (1): 104-110.

Taketo M., Gilboa E. und Sherman M. I. (1985): Isolation of embryonal carcinoma cell lines that express integrated recombinant genes flanked by the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (8): 2422-2426.

Taylor J. M. (1977): An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genomes. *Biochem. Biophys. Acta* **473**: 57-71.

Tiberghien P., Reynolds C. W., Keller J., Spence S., Deschaseaux M., Certoux J. M., Contassot E., Murphy W. J., Lyons R., Chiang Y., *et al.* (1994): Ganciclovir treatment of *herpes simplex* thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* **84** (4): 1333-1341.

Tiberghien P., Cahn J. Y., Contassot E., Ferrand C., Reynolds C. W. und Hervé P. (1996): Gene transfer applied to the modulation of alloreactivity. *Hematol. Cell Ther.* **38** (2): 221-224.

Tiberghien P., Ferrand C., Lioure B., Milpied N., Angonin R., Deconinck E., Certoux J. M., Robinet E., Saas P., Petracca B., Juttner C., Reynolds C. W., Longo D. L., Hervé P.

- und Cahn J. Y. (2001): Administration of *herpes simplex*-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* **97** (1): 63-72.
- Truitt R. L. und Atasoylu A. A. (1991): Impact of pretransplant conditioning and donor T cells on chimerism, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia reactivity, and tolerance after bone marrow transplantation. *Blood* **77**: 2515-2523.
- Tybulewicz V. L., Crawford C. E., Jackson P. K., Bronson R. T. und Mulligan R. C. (1991): Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene. *Cell* **65** (7): 1153-1163.
- Uckert W., Kammertöns T., Haack K., Qin Z., Gebert J., Schendel D. J. und Blankenstein T. (1998): Double suicide gene (cytosine deaminase and *herpes simplex* virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **9** (6): 855-865.
- Varmus H. E., Quintrell N. E. und Ortiz S. (1981a): Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a non-transforming provirus alters expression of a resident transforming provirus. *Cell* **25**: 23-26.
- Varmus H. E., Quintrell N. und Wyke J. (1981b): Revertants of an ASV-transformed rat cell line have lost the complete provirus or sustained mutations in *src*. *Virology* **108** (1): 28-46.
- Varmus H. E. (1988): Retroviruses. *Science* **240**: 1427-1435.
- Verma I. M. und Somia N. (1997): Gene therapy -promises, problems and prospects. *Nature* **389** (6648): 239-242.
- Verzeletti S., Bonini C., Marktel S., Nobili N., Ciceri F., Traversari C. und Bordignon C. (1998): *Herpes simplex* virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. *Hum. Gene Ther.* **9** (15): 2243-2251.

- Wagner E. F., Vanek M. und Vennström B. (1985): Transfer of genes into embryonal carcinoma cells by retrovirus infection: efficient expression from an internal promoter. *EMBO J.* **4** (3): 663-666.
- Wahlers A., Schwieger M., Li Z., Meier-Tackmann D., Lindemann C., Eckert H.-G., von Laer D. und Baum C. (2001): Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Gene Ther.* **8** (6): 477-486.
- Wallace P. K., Palmer L. D., Perry-Lalley D., Bolton E. S., Alexander R. B., Horan P. K., Yang J. C. und Muirhead K. A. (1993): Mechanisms of adoptive: improved methods for *in vivo* tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res.* **53**: 2358-2367.
- Walsh C. E. (2002): Gene therapy for hemophilias. *Curr. Opin. Pediatr.* **14** (1): 12-16.
- Walters M. C., Fiering S., Bouhassira E. E., Scalzo D., Goeke S., Magis W., Garrick D., Whitelaw E. und Martin D. I. K. (1999): The chicken β -globin 5' HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. *Mol. Cell. Biol.* **19** (5): 3714-3726.
- Walter E. A., Greenberg P. D., Gilbert M. J., Finch R. J., Watanabe K. S., Thomas E. D. und Riddell S. R. (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333** (16): 1038-1044.
- Walther J., Holler E. und Kolb H. J. (1996): Proinflammatorische Zytokine und adoptive Immuntherapie bei allogener Knochenmarktransplantation. In: Bartsch H. H., Mertelsmann R. (Hrsg.): Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation, Medizinische Probleme der Posttransplantationsphase und Rehabilitationsstrategien. Karger 1996 Basel-Freiburg-Paris-London-New York-New Delhi-Bangkok-Singapore-Tokyo-Sydney, S. 32-37.
- Weiden P. L., Flournoy N., Sanders J. E., Sullivan K. M. und Thomas E. D. (1981a) Antileukemic effect of graft-versus-host disease contributes to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *Transplant.Proc.* **13**: 248-251.

- Weiden P. L., Sullivan K. M., Flournoy N., Storb R. und Thomas E. D. (1981b): Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **304**: 1529-1533.
- Weinberg K. I. und Kohn D. B. (1998): Gene therapy for congenital lymphoid immunodeficiency diseases. *Semin. Hematol.* **35** (4): 354-366.
- Weiss L., Weigensberg M., Morecki S., Bar S., Cobbold S., Waldmann H. und Slavin S. (1990): Characterization of effector cells of graft vs. leukemia following allogeneic bone marrow transplantation in mice inoculated with murine B-cell leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.* **31**: 236-242.
- Weiss R., Clapham P. R., McClure M. und Marsh M. (1989): The CD4 receptor for the AIDS virus. *Biochem. Soc. Trans.* **17**: 644-647.
- Withers-Ward E. S., Kitamura Y., Barnes J. P. und Coffin J. M. (1994): Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration *in vivo*. *Genes Dev.* **8** (12): 1473-1487.
- Woods N.-B., Fahlman C., Mikkola H., Hamaguchi I., Olsson K., Zufferey R., Jacobson S. E., Trono D. und Karlsson S. (2000): Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood* **96** (12): 3725-3733.
- Wu X., Holschen J., Kennedy S. C. und Ponder K. P. (1996): Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression. *Hum. Gene Ther.* **7** (2): 159-171.
- Wyke J. A. und Quade K. (1980): Infection of rat cells by avian sarcoma virus: factors affecting transformation and subsequent reversion. *Virology* **106** (2): 217-233.
- Yamamoto S., Suzuki S., Hoshino A., Akimoto M. und Shimada T. (1997): *Herpes simplex* virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther.* **4** (2): 91-96.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1): 103-119.

Die vorliegende Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, Abteilung Zell- und Virusgenetik, in der Zeit von Mai 1998 bis Juni 2002 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Wolfram Ostertag für das interessante Thema, die Anregungen und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken.

Herrn Dr. Christoph Heberlein danke ich sehr für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und seinem Interesse an dem Fortgang der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Carol Stocking für ihre stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Ratschläge in wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Hinsicht.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Christopher Baum für seine Kooperationsbereitschaft, die interessanten Ideen und hilfreichen Vorschläge.

Mein herzlicher Dank gilt Michaela Rodenburg und Martin Forster für die Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit und Gökhan Arman-Kalcek für ihre Hilfsbereitschaft bei den Maus-Transplantationen. Allen Mitarbeitern möchte ich danken für ihre Kollegialität und die jederzeit tolle Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Partnerin Ilka und meinen Eltern für die aufmunternde Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name:	Oliver Frank
Geburtsdatum, -ort:	28.01.1971, Celle
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung/Zivildienst:

1977-1981	Grundschule Lachendorf
1981-1983	Orientierungsstufe Lachendorf
1983-1990	Hermann-Billing-Gymnasium Celle, Erhalt der allgemeinen Hochschulreife
1991-1992	Zivildienst im Bereich Krankentransport/Rettungsdienst, Qualifikation als Rettungssanitäter

Studium:

1992-1998	Diplomstudiengang Biologie an der Georg-August- Universität zu Göttingen
1992-1994	Grundstudium mit Diplomvorprüfung
1994-1998	Hauptstudium mit Diplomarbeit an der Uni Göttingen, III. Zoologisches Institut-Entwicklungsbiologie, Abteilung Herr Prof. Dr. U. Grossbach, AG Herr Dr. J. R. Wisniewski
22.07.1998	Studienabschluß als Diplom-Biologe

Promotion:

seit 05/1998: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Abteilung Herr Prof. Dr. W. Ostertag.

seit 06/1999: Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes als Promotionsstipendiat

Publikationen:

Frank O., Schwanbeck R. und Wisniewski J. R. (1998): Protein footprinting reveals specific binding modes of a high mobility group I protein to DNAs of different conformation. *J. Biol. Chem.* **273** (32): 20015-20020.

Li Z., Düllmann J., Schiedlmeier B., Schmidt M., von Kalle C., Meyer J., Forster M., Stocking C., Wahlers A., Frank O., Ostertag W., Köhlcke K., Eckert H.-G., Fehse B. und Baum C. (2002): Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296** (5567): 497.