

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik
der Universitätsklinik Eppendorf
Abt. Hämatologie und Onkologie
Einrichtung für Knochenmarktransplantation
Universitätskrankenhaus Eppendorf
Leiter: Prof. A. Zander

**Konstruktion und Charakterisierung eines neuartigen
retroviralen Vektors für die Transduktion von
hämatopoetischen Stammzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Peter Lührs
aus Hamburg

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 11. Juli 2000

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. A. Zander

Korreferent: -

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 5 |
| 2. Theorie | 7 |
| 2.1 Die Retroviren | 7 |
| 2.1.1 Morphologie der Retroviren | 8 |
| 2.1.2 Klassifikation und Taxonomie der Retroviren | 9 |
| 2.1.3 Klassifikation der murinen Retroviren | 9 |
| 2.1.4 Die Komponenten der Virionen..... | 13 |
| 2.1.5 Der Replikationszyklus der Retroviren..... | 16 |
| 2.2 Retrovirale Insertionsmutagenese und Onkogenese..... | 24 |
| 2.2.1 Onkogenese durch C-Typ Retroviren, die keine Onkogene enthalten..... | 24 |
| 2.2.2 Polytrophe murine Leukämieviren..... | 25 |
| 2.2.3 Onkogenese durch C-Typ Retroviren, die v-onc Gene enthalten..... | 27 |
| 2.2.4 Identifikation von Genen durch Insertionsmutagenese | 27 |
| 2.3 Verpackungszelllinien | 29 |
| 2.4 Retroviraler Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen | 29 |
| 2.4.1 Die Infektion hämatopoetischer Stammzellen durch retrovirale Vektoren und deren Expression ist ineffizient..... | 32 |
| 2.5 Problemstellung..... | 35 |
| 3. Material und Methoden | 37 |
| 3.1. Allgemeines..... | 37 |
| 3.2. Biochemische Methoden | 37 |
| 3.2.1 Materialien, Puffer und Lösungen | 37 |
| 3.2.2 Plasmide | 38 |
| 3.2.3 Bakterienstämme und Bakterienkulturen..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4 DNA-Restriktionsverdau | 40 |
| 3.2.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration | 40 |
| 3.2.6. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren | 40 |
| 3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel | 40 |
| 3.2.8 DNA Ligation..... | 41 |
| 3.2.9 Transformation kompetenter E.coli Bakterien..... | 42 |
| 3.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA..... | 43 |
| 3.2.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA | 43 |
| 3.2.12 DNA-Sequenzierung | 43 |
| 3.3 PCR..... | 44 |
| 3.4 Zellkultur | 46 |
| 3.4.1 Zelllinien..... | 46 |
| 3.4.2 Kulturbedingungen..... | 47 |
| 3.5 Elektroporation eukaryontischer Zellen..... | 47 |
| 3.5.1 Überblick | 47 |
| 3.5.2 Durchführung | 48 |
| 3.6 Herstellung virusproduzierender Zellklone. | 49 |
| 3.6.1 Selektion stabiler Transfektanden..... | 49 |
| 3.6.2 Virustiterbestimmung der transfizierten Klone | 49 |
| 3.6.3 Reverse Transkriptase-Aktivitäts-Bestimmung (RT-Assay) | 50 |
| 3.6.4 Präparation genomischer DNA | 51 |
| 4. Ergebnisse..... | 52 |
| 4.1 Vektorkonstruktion..... | 53 |
| Das in diesem Arbeitsschritt konstruierte Plasmid pMES- MCFV-MP ergibt nach einer Restriktionsanalyse das erwartete Bandenmuster. Dies belegt eine korrekte Konstruktion des Hybridvektors. | 55 |

| | |
|---|----|
| 4.2 Sequenzierung eines bislang nicht sequenzierten DNA-Abschnittes des MES-MCFV-MP Vektors..... | 55 |
| 4.3 Erzeugung von virusproduzierenden Zelllinien durch Transfektion und Transduktion des Hybridvektors (MES-MCFV-MP) in Zellen..... | 58 |
| 4.4 Die mit dem Hybridvektor MESV-MCFV-MP transduzierten Zellen produzieren meßbare Aktivität der reversen Transkriptase..... | 62 |
| 4.5 Nachweis der Replikationskompetenz des Hybridvektors | 63 |
| 4.6 Bestimmung der Interferenzgruppe des MES-MCFV-MP Vektors..... | 64 |
| 4.7 Infektion von hämatopoetischen Zellen mit Kulturüberstand der Zelllinie 3T3 neo MCF-MP Klon 15 | 65 |
| 4.7.1 Herstellung einer Kontrollzelllinie, die amphotrophe Virionen mit Neomycin-Resistenzmarker freisetzt. | 66 |
| 4.7.2 Vergleich der Infektionseffizienz hämatopoetischer Zelllinien mit MES-MCFV-MP und MES-AmphoV-MP..... | 67 |
| 4.7.3 Infektion von Myl-D-7 Zellen durch Kokultur mit MES-MCFV-MP produzierenden Zellen | 68 |
| 5. Diskussion..... | 69 |
| 6. Zusammenfassung | 75 |
| 7. Literaturverzeichnis | 77 |
| 8. Danksagung | 90 |
| 9. Lebenslauf..... | 91 |
| 10. Erklärung | 92 |

1. Einleitung

Gentransfer durch retrovirale Vektoren

Unter Gentransfer versteht man das Einbringen von genetischem Material in Organismen. Der Gentransfer eröffnet der biomedizinischen Forschung mannigfaltige Möglichkeiten: Die Analyse der Funktion von Genen und ihrer Regulierung sowie die manipulierte Expression von Genen in Organismen. Besonders letzteres ermöglicht die Anwendung des Gentransfers für therapeutische Zwecke im Sinne der Gentherapie.

Für den Gentransfer in Säugetierzellen werden bevorzugt virale Vektorsysteme eingesetzt. Virale Vektoren bieten den Vorteil, daß sie den Transport des genetischen Materials in die Zielzelle, auf dem Wege der Infektion, eigenständig vornehmen und so aufwendige Transfektionen überflüssig machen. Der virale Gentransfer ist also auch *in vivo* möglich, ohne die *in vitro* Transfektion von Zellen. Beispiele für virale Vektoren, die im Humansystem zum Einsatz kommen, sind Adenoviren, Herpesviren, Vacciniaviren, Parvoviren und Retroviren.

Vorteile der retroviralen Vektoren im Vergleich zu anderen viralen Vektoren sind folgende Eigenschaften: Die stabile Integration in das Wirtsgenom, die stabile Expression der eingebrachten Gene, breites Wirtsspektrum, die Möglichkeit der persistierenden Infektion ohne Lyse der Zielzellen und die gute Charakterisierung mancher Retroviren. Nachteile der meisten bisher eingesetzten retroviralen Vektoren sind die Unfähigkeit, nicht replizierende Zellen zu infizieren (Miller et al., 1990) und die begrenzte Größe der zu transportierenden Sequenz (ca. 8-9 kb). Die seit neuerem zur Verfügung stehenden Vektoren auf der Basis von Lentiviren (z.B. HIV) sind jedoch in der Lage, ruhende Zellen zu infizieren (Naldini et al., 1996).

Es besteht potentiell die Möglichkeit der Mutagenese durch Insertion des Vektors in das Wirtsgenom (sog. Insertionsmutagenese), sowie die Entstehung von replikationskompetenten Retroviren durch Rekombinationsereignisse. Die Entstehung replikationskompetenter Retroviren ist bei der Verwendung moderner Verpackungszelllinien allerdings äußerst unwahrscheinlich.

Die Insertionsmutagenese kann zu einer veränderten Genexpression der Wirtszelle führen: Alleine die Insertion des Virusgenoms bewirkt unter Umständen eine Unterbrechung der Organisation des Wirtsgenoms am Insertionsort. Die retroviralen regulatorischen Elemente können Ihre Wirkung auch auf das Wirtsgenom entfalten. Als Folge dieser Ereignisse wird mit einer bestimmten Frequenz eine Alteration des

Phänotyps der Wirtszelle beobachtet. Im Rahmen einer experimentellen Insertionsmutagenese, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden kann, ist über die Identifikation der Insertionsorte die Erforschung der dort lokalisierten Gene möglich.

Retroviraler Gentransfer in hämatopoetische Zellen ist sowohl für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze als auch für die Erforschung der Hämatopoese und der Leukämogenese von Bedeutung. Für diese Fragestellungen ist Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen wichtig, da verschiedene Leukämien aus entarteten Stammzellen hervorgehen. Für Experimente, in denen durch Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen Gene identifiziert werden sollen, ist ein effizienter retroviraler Gentransfer von Bedeutung. Leider ist der retrovirale Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen mit herkömmlichen retroviralen Vektoren ineffizient. Die Konstruktion neuer retroviraler Vektoren ist also notwendig, um einen effizienten Gentransfer zu ermöglichen.

2. Theorie

2.1 Die Retroviren

Die Familie der Retroviren besteht aus RNA-Viren, die sowohl in der Struktur der Virionen als auch in der Art der Replikation gemeinsame Merkmale aufweisen (Levy, 1992). Allen Retroviren gemeinsam ist das Vorkommen des Enzyms reverse Transkriptase, welches Temin und Baltimore unabhängig voneinander 1970 erstmalig beschrieben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die das virale RNA-Genom in eine komplementäre DNA transkribiert, die in das Wirtsgenom integriert wird.

Das Wirtsspektrum der Retroviren umfaßt alle untersuchten Wirbeltiere einschließlich des Menschen (HIV, HTLV). Die Virus-Wirt Beziehung ist ausgesprochen uneinheitlich, so können Infektionen mit Retroviren beim Wirt Erkrankungen wie zum Beispiel Neoplasien hervorrufen oder auch keinerlei pathogene Wirkung aufweisen.

Von großem Interesse sind die Retroviren für die biomedizinische Forschung, insbesondere als Vektoren für den Gentransfer und durch ihre Rolle bei der Entstehung von malignen Tumorerkrankungen.

2.1.1 Morphologie der Retroviren

Die sphärischen Virionen haben einen Durchmesser von ca. 80-130 nm. Sie bestehen aus einem elektronendichten Kern (core), welcher das virale Genom enthält und sind von einer Lipoproteinmembran (envelope) umgeben. Der Kern enthält das dimere Genom aus polyadenylierter RNA, virale Enzyme (Protease, Integrase und reverse Transkriptase) und wird nach außen von einem Nukleoproteinkapsid begrenzt. Zwischen dem Nukleokapsid und der Lipidmembran befindet sich ein Matrixprotein. Ein Teil der Membran des Virions ist zellulären Ursprungs und wird bei der Virusfreisetzung (budding) aus der Wirtszelle mitgenommen. Eingelagert in die äußere Membran sind die viralen Hüllproteine und Proteine der Wirtszelle (siehe Abb. 1). Der kodierende Anteil des 7-10 Kilobasen großen Genoms ist in drei Abschnitte unterteilt: Gag (group-specific-antigen), pol (Polymerase) und env (envelope). Das Nukleokapsid enthält außer dem Genom die reverse Transkriptase, Integrase und Protease, sowie den t-RNA-Primer.

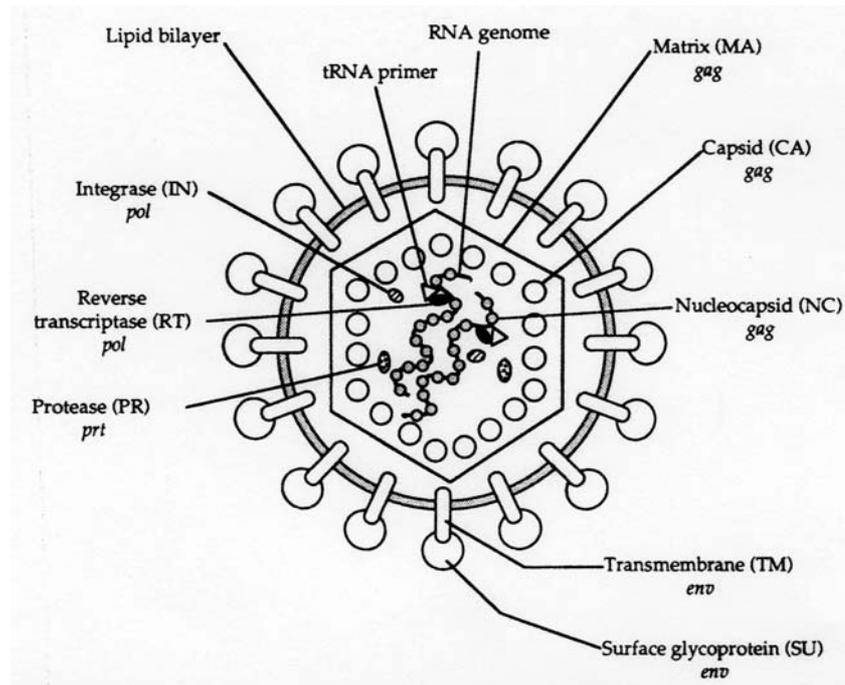


Abb. 1: Schematisiertes Virion

(Aus Levy J. (1992) The Retroviridae, Plenum Press New York)

2.1.2 Klassifikation und Taxonomie der Retroviren

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen werden die retroviralen Partikel in vier Klassen eingeteilt, die mit den Buchstaben A, B, C, und D bezeichnet werden (Bernhard 1960, Fine und Schochetman 1978). Diese Klassifikation berücksichtigt lediglich eine als Onkoviren bezeichnete Gruppe von Viren und enthält nicht die weniger lange bekannten Lenti- und Spumaviren.

Die Einteilung der Retroviren erfolgt mittels bestimmter Merkmale wie der Form und Lokalisation des Nukleokapsids, der Form der Hüllproteine und der Art des Zusammenlagerns der Virusbestandteile.

Die Klassifizierung der Viren wird vom International Committee on Taxonomy of Viruses erstellt (siehe Tab.1). Die Familie der Retroviren teilt sich in sieben Genera, welche ihrerseits in Subgenera und Spezies unterteilt sind (Liebermann, 1992). Der Verwandtschaftsgrad der Retroviren läßt sich anhand des relativ gut konservierten pol-Genes ermitteln (Doolittle et al., 1990).

Eine andere Art der Einteilung der Retroviren erfolgt in Abhängigkeit ihres Übertragungsmodus. Man unterscheidet exogene und endogene Retroviren. Die endogenen Retroviren sind in die Keimbahn integriert und werden vertikal durch Vererbung übertragen, die exogenen werden dagegen horizontal durch Infektion übertragen.

2.1.3 Klassifikation der murinen Retroviren

Ein Klassifikationssystem der Gattung muriner Retroviren beruht auf der Einteilung in Gruppen gemäß des Wirtsspektrums (Levy, 1992; Miller et al., 1996). Die Infektion einer Zelle setzt die Interaktion des Virushüllproteins mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche voraus. Verschiedene Retroviren interagieren mit unterschiedlichen zellulären Rezeptoren. Basierend auf diesen Tatsachen wurden die Typ-C Murinen Leukämie Viren (MuLV) anhand von Wirtsspektrum und Interferenzgruppen in Gruppen eingeteilt (Siehe Tab. 2). Mit Interferenz bezeichnet man den Umstand, daß Zellen, die mit einem Retrovirus infiziert sind, resistent gegenüber einer Superinfektion mit Retroviren der gleichen Interferenzgruppe sind. Dieses Phänomen kommt durch die Blockade der zellulären Rezeptoren mit env-Proteinen zustande, welche durch den bereits vorhandenen Retrovirus exprimiert werden.

| Gattung | Beispiel | Morphologie | Genomstruktur |
|---|---|---|---|
| 1. Vogel Sarkom- und Leukosevirus | Rous Sarkomvirus | zentraler, Kern C-Partikel | einfach |
| 2. Säuger B-Typ Viren | Maus virus (MMTV) | Ma mm atu mor - exzentrischer, sphärischer Kern B-Partikel | komplexer LTR mit kodierenden Sequenzen |
| 3. Murine viren | Moloney murines Leu käm ie- Leukämie Virus (MoMLV) | zentraler, Kern C-Partikel | einfach |
| 4. Humane T-Zell Leukämieviren, Rinder Leukämie- viren | humanes T-Zell- Leukämie Virus (HTLV 1) | zentraler, Kern | komplex |
| 5. D-Typ Viren | Mason-Pfizer Virus | zylindrischer Kern D-Partikel | einfach |
| 6. Lentiviren | HIV | kegelförmiger Kern | komplex |

| | | | | |
|---------------|-----------------------|------------------------|---------------------|---------|
| 7. Spumaviren | Human-foamy- Virus | zentraler, Kern | sph äris cher | komplex |
|---------------|-----------------------|------------------------|---------------------|---------|

Tab 1.: Klassifizierung der Retroviren nach Morphologie und Genomstruktur

| Interferenzgruppe | Wirtsspektrum | | Kommentar |
|-------------------|------------------------------------|--------|---|
| | natürlicher Wirt | Andere | |
| Ökotroph | +(M. musculus) +(M. cervicolor) | - - | Beispiel: Moloney MuLV Beispiel: M813 (Stocking, pers. Mitteilung) |
| Amphotroph | + | + | Replizieren auch in Nicht-Nager-Wirten |
| Xenotroph | - | + | Replizieren auch in Nicht-Nager-Wirten |
| 10A1 | + | + | Replizieren auch in Nicht-Nager-Wirten |
| Polytroph (MCF) | + | + | Beispiel: Friend MCF Replizieren auch in Nicht-Nager-Wirten |

Tab 2.: Wirtsspektrum und Interferenzgruppen muriner Retroviren.

Neben der Rezeptorrestriktion existieren weitere, genetisch determinierte Restriktionen für die Infektion von Mauszellen durch ökotrophe MuLV. Die Genloci Fv-1 bis Fv-6 kontrollieren die Permissivität für eine produktive Infektion mit verschiedenen Retroviren und deren biologische Effekte (Lyon und Searle, 1989). Fv-1 ist für einen Block der Integration des Retrovirus in das Wirtsgenom verantwortlich (Lilly und Pincus, 1973).

Die beiden Allele Fv-1ⁿⁿ und Fv-1^{bb} bestimmen die Permissivität der Zellen für die Replikation verschiedener Retroviren, so daß die Viren gemäß ihrer Replikationsfähigkeit in diesen Zellen eingeteilt werden können (siehe Tab. 3). Das Fv-1 Gen wurde vor Kurzem kloniert und zeigt Homologien zu der gag-Region eines humanen endogenen retrovirus-verwandten Elementes (Best et al., 1996). Murine Leukämieviren vom Moloney Typ, auf denen der in dieser Arbeit konstruierte Virus beruht, sind NB-troph.

| Virustyp | Fv-1 ⁿⁿ -Zellen | Fv-1 ^{bb} -Zellen | Fv-1 ^{nb} -Zellen |
|----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| N-Troph | Replikation | geringe Replikation | geringe Replikation |
| B-Troph | geringe Replikation | Replikation | geringe Replikation |
| NB-Troph | Replikation | Replikation | Replikation |

Tab. 3: Replikation in Fv-1ⁿⁿ und Fv-1^{bb} Zellen

2.1.4 Die Komponenten der Virionen

Das RNA-Genom

Das im Virion enthaltene retrovirale Genom (siehe Abb. 2) wird von einem Dimer aus zwei gleichen, 7-10 Kb langen RNA-Einzelsträngen gebildet. Als Resultat der zellulären Synthese weisen die RNA Moleküle verschiedene posttranskriptionale Modifikationen auf: An ihrem 5'-Ende ein sogenanntes Capping, ein über eine Triphosphatbrücke gebundenes 7-Methylguanylat und an ihrem 3'-Ende eine Polyadenylierung.

Das Genom kann in kodierende und terminale, nichtkodierende Anteile, welche im Sinne einer cis-Regulation für die Replikation von Bedeutung sind, unterteilt werden. Bei Viren mit sogenanntem einfachen Genom besteht der kodierende Anteil aus drei Abschnitten, den gag-, pol- und env-Genen, während bei Viren mit komplexem Genom (Lenti- und Spumaviren) zusätzliche Gene für regulatorische Proteine vorhanden sind.

Das gag-Gen kodiert für die Strukturproteine MA (für Matrix), CA (für Capsid) und NC (für Nukleocapsid), das pol-Gen kodiert für die viralen Enzyme (Polymerase, Integrase und Protease) und das env-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine.

Die nicht kodierenden, terminalen Regionen folgen bei allen Retroviren dem gleichen Grundschema, es bestehen jedoch in Größe und Funktion gewisse Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusgruppen. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der viralen Genexpression, der reversen Transkription und der Verpackung der Viren. Es folgt ein Überblick über den Aufbau dieser terminalen Sequenzen des viralen Genoms, wie es im Virion vorliegt, vom 5'-Ende aus betrachtet :

- R: Eine Sequenz von 15-80 Basen Länge, je nach Virus (Haseltine et al., 1976), die während der reversen Transkription von Bedeutung ist (vgl. Kapitel Replikation)
- U5: Diese Sequenz hat eine Länge von 80-100 Basen und ist ebenfalls für die reverse Transkription wichtig.
- PB: Eine 18 Basen lange Sequenz, die als sog. primer binding site (PBS) die Bindungsstelle für eine zelluläre t-RNA darstellt, welche dann als Primer bei der reversen Transkription dient. (Coffin, 1992)
- L: Die sogenannte Leader Region, welche das Verpackungssignal, oft als Ψ bezeichnet enthält (Linial und Miller, 1990). Ebenfalls in der Leader Region liegt oftmals der Splice Donor für die Synthese der subgenomischen mRNA für die Expression von env.

Stromabwärts folgen nun die kodierenden Segmente des Genoms und die regulatorischen Elemente am 3'-Ende:

- PP: Die sogenannte Polypurinsequenz, welche bei der reversen Transkription als Primer für die Synthese der Plus-Strang DNA dient.
- U3: Dieser Abschnitt des Genoms ist zwischen 200 und 1000 Basen lang und enthält Signale, die für die Steuerung der Transkription des Provirus wichtig sind. Hier binden Transkriptionsfaktoren (Majors, 1990).
- R: Eine Kopie des 5'-R.

Im Verlauf der reversen Transkription werden die terminalen Sequenzen zu einer resultierenden U3-R-U5 Konstellation fusioniert (siehe Replikation), welche dann an beiden Enden der proviralen DNA vorliegt und im allgemeinen mit LTR (für long terminal repeat) bezeichnet wird. Diese LTRs haben eine Länge von 0,3 kb bis 1,4 kb.

Des Weiteren sind bei manchen Laborstämmen virale Genabschnitte durch zelluläre Onkogene ersetzt. Diese meist in Form von cDNA in das virale Genom integrierten Onkogene vermitteln die Fähigkeit, Wirtszellen zu malignen Zellen zu transformieren. Untersuchungen dieser retroviralen Onkogene haben Einblicke in die molekularen Mechanismen der Karzinogenese ermöglicht.

Im Virion befinden sich außerdem tRNA-Moleküle, welche als Primer bei der reversen Transkription dienen.

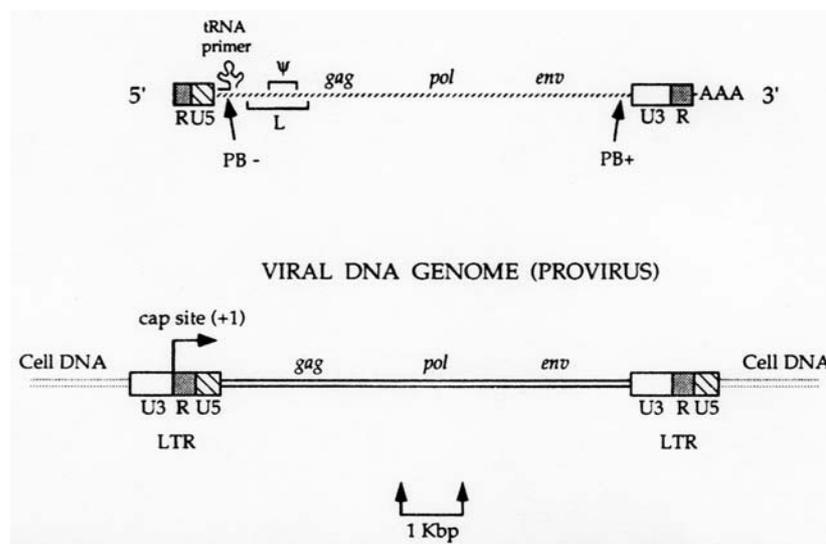


Abb. 2.: Das virale RNA Genom und das provirale DNA Genom
(Aus Levy J. (1992) The Retroviridae, Plenum Press New York)

Die viralen Proteine

gag-Proteine: Sie liegen im Virion als MA-, NC- und CA-Proteine vor. NC Proteine sind eng mit der RNA assoziiert. Die CA-Proteine bilden das Nukleokapsid und MA-Proteine liegen an der Innenseite der Lipidmembran und spielen eine Rolle bei der Virusknospung.

pol-Proteine: Die reverse Transkriptase synthetisiert die virale DNA, sowohl RNA- als auch DNA-abhängig. Sie besitzt zusätzlich eine Endonukleaseaktivität für den Abbau von Primern und der RNA-Matrize (Coffin, 1990). Die virale Protease liegt in ihrer funktionellen Form als Dimer vor. Sie katalysiert die proteolytischen Spaltungen der gag-pol Vorläuferproteine. Die Integrase vermittelt die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom.

env-Proteine: Aus dem env-Vorläuferprotein entstehen durch proteolytische Spaltung und Glykosilierung durch zelluläre Enzyme die beiden Hüllproteine SU (für surface) und TM (für transmembrane). Diese Proteine vermitteln die Bindung und das Eindringen der Virionen in die Wirtszelle (Coffin, 1990).

Die Lipidmembran

Beim Knospen der Virionen werden Anteile der Zellmembran in das Virion einbezogen, wobei neben den viralen Oberflächenproteinen auch zelleigene Proteine (z.B. MHC-Proteine) nachgewiesen werden können (Henderson 1987).

2.1.5 Der Replikationszyklus der Retroviren

Der retrovirale Replikationszyklus zeichnet sich gegenüber dem der anderen Viren durch einige Besonderheiten aus: Das RNA-Genom wird zu einem DNA-Äquivalent umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. Durch die reverse Transkription entsteht, bedingt durch die Duplikation terminaler Sequenzen, ein insgesamt längeres DNA-Genom.

Die sogenannte frühe Phase der Replikation beginnt mit der Adsorption des Virion an einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche und endet mit der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom und somit der Bildung des Provirus (Abb.3). Die späte Phase beinhaltet die Vorgänge von der Transkription des Provirus bis zur Knospung der Virionen, die dann zu einer weiteren Infektion bereit sind (Varmus und Swanstöm, 1984).

Der erste Schritt der Infektion ist die spezifische Interaktion der SU Untereinheit des env-Glykoproteins mit dem entsprechenden zellulären Rezeptor. Der Tropismus der Retroviren wird maßgeblich durch diese Interaktion mitbestimmt (vgl. Klassifikation)

Für einige Retroviren ist der zelluläre Rezeptor bekannt: Als erster retroviraler Rezeptor wurde das CD4 Protein als Rezeptor für HIV identifiziert (Dalglish et al., 1984). Der Rezeptor für ökotrophe MLV ist ein Aminosäuretransportprotein (Kim et al., 1991), für amphotrophe MLV und für das Gibbon Ape Leukämie Virus ein Phosphattransportprotein (Miller et al., 1994 und Johann et al. 1992). Der Rezeptor für polytrophe Retroviren, der

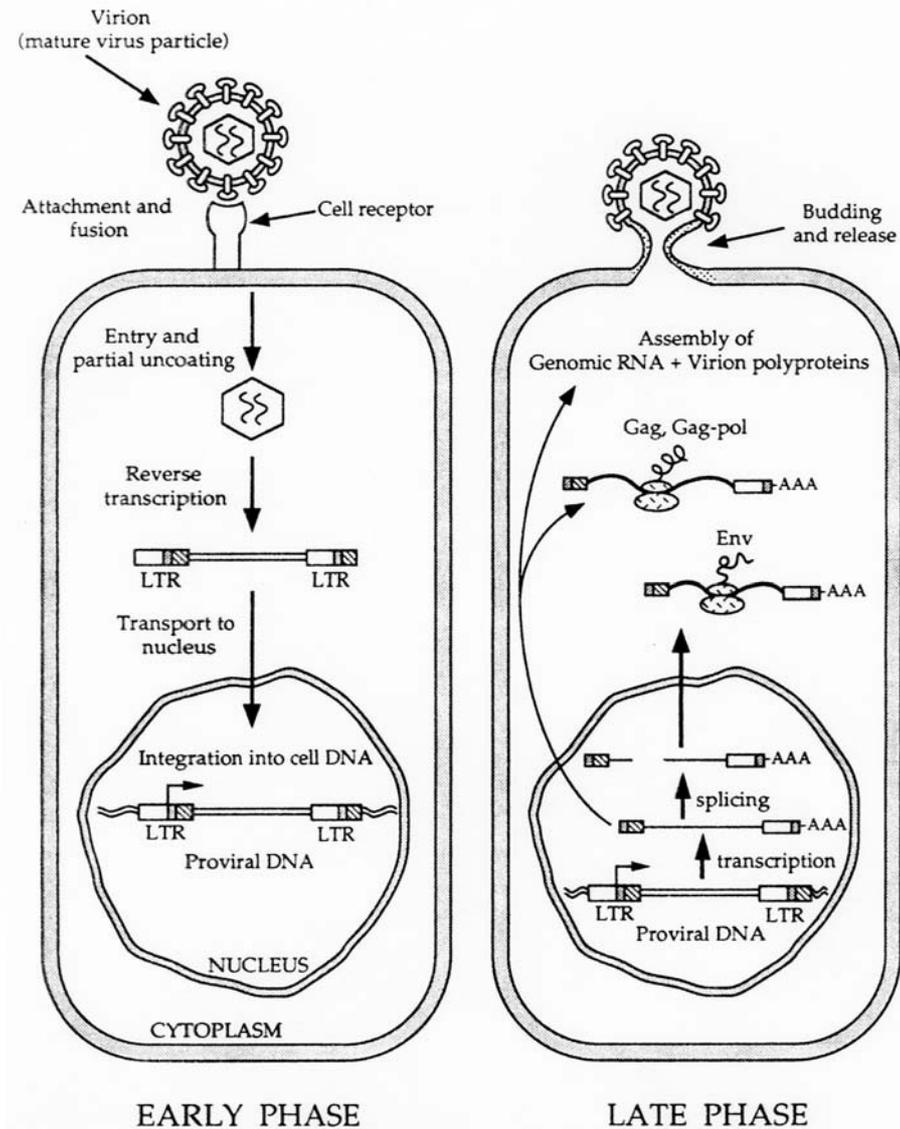


Abb. 3 Der retrovirale Replikationszyklus

(Aus Levy J. (1992) *The Retroviridae*, Plenum Press New York)

Virus-Zell-Interaktion und Eintritt in die Zelle

vor kurzem identifiziert wurde (Yang et al., 1999), liegt im Rmc1 Locus des Chromosoms 1 der Maus (siehe hierzu auch Kap 2.2.2). Im zweiten Schritt erfolgt, abhängig von der Art des Virus, der Eintritt in die Zelle entweder durch Endozytose oder durch Fusion der Virus- und Zellmembran. Bei der Fusion der Membranen spielt die TM-Domäne des env-Proteins eine entscheidende Rolle. Das Ergebnis ist bei beiden Varianten das sog. Uncoating (die Entfernung der Virusmembran) und die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle.

Die Synthese viraler DNA durch reverse Transkription

Die reverse Transkription findet im Zytoplasma der Wirtszelle in einem Nukleoproteinkomplex statt und dauert ungefähr vier Stunden (Coffin, 1997). Die reverse Transkription findet im Replikationszyklus der Retroviren nur zu diesem Zeitpunkt, also vor der Intergration statt. Sie beginnt unmittelbar nach dem Eindringen und dem sog. Uncoating des Virions (Varmus et al., 1978). Die virale Polymerase benötigt zur DNA-Synthese Primer, welche in Form von tRNA, die beim vorhergehenden Infektionszyklus in das Virion verpackt wurde, zur Verfügung stehen. Es folgt eine Darstellung der einzelnen Schritte der reversen Transkription (Gilboa et al., 1979):

- Schritt 1: Die Synthese des zum RNA-Genom komplementären, sogenannten Minus-DNA-Stranges erfolgt von der freien 3'-OH-Gruppe des tRNA Primers (an PB gebunden) in Richtung auf das 5'-Ende der viralen RNA.
- Schritt 2: Die 5' R-Sequenz des RNA-Genoms wird von der RNase-H Aktivität der reversen Transkriptase abgebaut, so daß die DNA-R-Sequenz ungepaart vorliegt.
- Schritt 3: Es erfolgt ein Transfer (auch Sprung genannt) der DNA zum 3'-Ende des RNA-Genoms, und eine Hybridisierung der R-Sequenzen. Dieser Transfer erfolgt vorrangig intermolekular, d.h. zum zweiten RNA-Strang, kann aber auch intramolekular stattfinden.
- Schritt 4: Die reverse Transkriptase elongiert die Minusstrang-DNA vom 3'-Ende aus bis einschließlich des PBS⁻-Elements.
- Schritt 5: Der RNA-Anteil des DNA-RNA-Hybrids wird von der RNase-H Aktivität weitestgehend degradiert. Am 3'-PolypurinTrakt des viralen Genoms entsteht so ein Oligonukleotidprimer mit freier 3'-OH-Gruppe, die als PBS⁺ bezeichnet wird.
- Schritt 6: Die reverse Transkriptase synthetisiert nun von PBS⁺ aus die Plusstrang-DNA. Ein methyliertes Adenosin blockiert am PBS⁻ die Transkriptase und terminiert dort die Elongation.
- Schritt 7: Die RNase H-Aktivität entfernt die tRNA vom 5'-Ende der Minusstrang-DNA und die Primer-RNA bei PBS⁺.

Schritt 8: Nun folgt der zweite, intramolekulare Sprung, dessen Ergebnis die Hybridisierung des PBS⁻ des Minusstranges mit dem komplementären PBS⁻ des Plusstranges ist.

Schritt 9: Die reverse Transkriptase elongiert nun beide Stränge von den PBS-Elementen aus und generiert so zwei vollständige DNA-Stränge.

Als Produkt der reversen Transkription entsteht ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül, welches an beiden Enden duplizierte terminale Sequenzen, die Long Terminal Repeats (LTR), aufweist. Dieses wird nun im Nukleoproteinkomplex in den Zellkern transportiert um in das Wirtsgenom integriert zu werden.

Die bei Retroviren beobachtete hohe Mutationsrate erklärt sich aus der relativ geringen Fidelität der reversen Transkriptase, die keine 3'→5' Exonuklease-Aktivität zur Korrektur von Polymerisationsfehlern besitzt. Die Fehlerrate beträgt je nach Virus 1 pro 4000 Nukleotide bis 1 pro 17000 Nukleotide (Coffin, 1990). Eine weitere Fehlerquelle ist die Transkription des Provirus durch die zelluläre RNA-Polymerase II, die ebenfalls keine Korrekturlesefunktion besitzt. Aus dieser hohen Fehlerrate resultiert eine Variabilität des viralen Genoms mit Konsequenzen für die gentherapeutische Anwendung retroviraler Vektoren: In Viruspräparationen zur therapeutischen Applikation befindet sich ein signifikanter Anteil defekter Vektoren, deren zu transportierendes Nutzgen von den Mutationen betroffen sein kann.

Die retrovirale Integration

Die Integrase vermittelt die Integration des Provirus, welcher kolinear zum RNA-Genom ist. Die Integration erfolgt an zufälligen Positionen im Wirtsgenom, an Orten mit bestimmter DNA-Struktur scheint eine Integration jedoch wahrscheinlicher (Jaenisch et al., 1976; Withers-Ward et al., 1994). Die Integration des Provirus ist für die Virus-Wirt-Beziehung von großer Bedeutung: Die virale Sequenz wird an Tochterzellen weitervererbt und kann durch Integration in die Keimzellen zu einer vertikalen Transmission der Retroviren führen. Die Insertion des Provirus kann durch die Wirkung viraler Enhancer eine Aktivierung zellulärer Gene hervorrufen.

Wichtig für die Integration sind endständige Sequenzen der beiden LTRs, die als Inverted Repeats bezeichnet werden und eine Länge von weniger als 20 Basen haben. Die jeweils letzten vier Basen dieser Sequenzen sind hochkonserviert und lauten 5'-AATG.....CATT-3'.

Die Integrase entfernt an den beiden Enden der linearen viralen DNA bei MuLV je ein Dinukleotid (TT), so daß gestufte Enden resultieren. In die Integrationsstelle der Wirts-

DNA werden ebenfalls gestufte Schnitte eingeführt. Nach der Entfernung nicht komplementärer Dinukleotide von den Enden der viralen DNA lagieren zelluläre Enzyme die gestuften Enden, so daß der Provirus mittels kovalenter Bindungen in die zelluläre DNA integriert wird (Luciw und Leung, 1992).

Die Synthese retroviraler RNA

Wichtige Eigenschaften der Retroviren, wie zum Beispiel der Zelltropismus und die Pathogenität, werden durch die Regulation der Transkription im integrierten Provirus mitbestimmt (Ostertag et al., 1987; Fan, 1990). So ist die Expression des viralen Genoms von der Interaktion zellulärer Faktoren mit regulatorischen Sequenzen des Virus abhängig. Das Verständnis dieser Mechanismen ist also für die Entwicklung von Vektorsystemen für die therapeutische Nutzung (Gentherapie) Voraussetzung.

Die Transkription retroviraler DNA durch den RNA-Polymerase-II-Komplex findet, wie bei der Transkription zellulärer Gene, im Zellkern statt. Das Virus-Genom wird in sich teilenden Zellen stärker exprimiert als in ruhenden Zellen (Humphries et al., 1981).

Die Hauptrolle bei der Regulation der viralen Genexpression spielen die LTRs. Sie enthalten cis-regulatorische Elemente, die mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Transkription initiieren (vgl. Abb. 4). Die LTRs sind außerdem für die Prozessierung der viralen mRNA wichtig. Dagegen befinden sich die Signale für das Splicing der mRNA in der Sequenz zwischen den LTRs (Stoltzfus, 1988).

Der 5'-LTR dient als Promotor für die Initiation der Transkription. Er enthält bei allen bekannten Retroviren in der U3-Region eine sogenannte TATA-Box, die den zellulären Faktor TBP (für "TATA binding protein") bindet. Es bildet sich nun durch die Anlagerung weiterer zellulärer Faktoren der sogenannte Prä-Initiationskomplex, an den sich wiederum die Untereinheiten der RNA-Polymerase-II lagern. Der damit entstandene Initiationskomplex beginnt nun mit der Synthese des mRNA-Stranges.

Neben der TATA-Box enthält die U3-Region noch weitere Bindungsstellen für zelluläre Faktoren. Diese sind meist 8 - 20 Basen lang und befinden sich innerhalb von ca. 150 Basen stromaufwärts der TATA-Box (Majors, 1990). Die U3-Region kann bei einigen Retroviren (z.B. MuLV) auch negativ regulatorische Signale aufweisen, welche die Transkription in bestimmten Wirtszelltypen hemmen können. Die virale Transkription wird von einer weiteren Klasse von cis-agierenden Elementen, den sog. Enhancern, gesteuert. Enhancer regulieren sowohl die zelluläre als auch die virale Genexpression. Sie liegen meistens 100 - 200 Basen stromaufwärts vom Promotor, können jedoch auch weiter stromaufwärts oder stromabwärts liegen. Die Enhancer binden spezifische zelluläre Faktoren, welche die Bindung der RNA-Polymerase-II an den Promotor positiv

beeinflussen und damit die basale Transkription vom Promotor verstärken. Die U3-Region des viralen Genoms enthält mehrere solcher Enhancer.

Die Enhancer sind nicht grundsätzlich in allen Zelltypen aktiv. Einige entfalten ihre Wirkung nur in bestimmten Zelltypen, während andere ein breites Wirkungsspektrum besitzen. Die biologischen Eigenschaften der Retroviren, wie Wirtsspektrum und Pathogenität hängen also auch von der Art der Enhancer in der U3-Region ab (Ostertag et al., 1987; Fan, 1990). Hieraus ergibt sich für die Entwicklung retroviraler Vektoren für den Gentransfer ein interessanter Aspekt: Durch die Konstruktion rekombinanter Vektoren mit ausgewählten Enhancer-Elementen könnte eine gewebsspezifische Expression erreicht werden, welche für gentherapeutische Anwendungen von Bedeutung wäre.

Das virale Transkript, welches in voller Länge synthetisiert wird, wird drei unterschiedlichen Verwendungszecken zugeführt: Als genomische RNA für die Verpackung in Virionen, mRNA für gag-pol-kodierte Polyproteine und als Vorstufe für subgenomische virale Transkripte, die durch Splicing der Transkripte (vgl. das RNA Genom) entstehen.

Die neu synthetisierten viralen Transkripte erhalten an ihrem 5'-Ende ein Cap (siehe das RNA Genom), an Ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz (siehe das RNA Genom) und werden an bestimmten Basen methyliert (Stoltzfus, 1988).

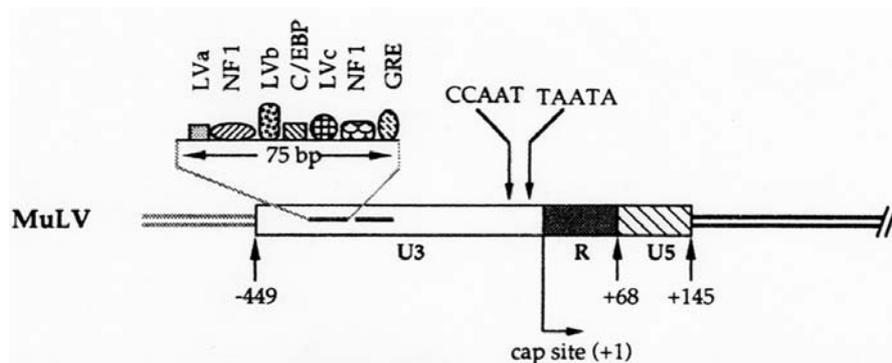


Abb. 4.: Transkriptionelle Kontrollelemente im LTR am Beispiel des Murinen Leukämie Virus (MuLV). Zahlreiche zelluläre Transkriptionsfaktoren binden an Enhancersequenzen in der U3 Region des LTR. (Aus Levy J. (1992) *The Retroviridae*, Plenum Press New York)

Die Translation retroviraler Proteine

Die Translation der viralen Proteine findet an den zytoplasmatischen Polysomen statt und wird vom Translationsapparat der Wirtszelle reguliert. Die Synthese der gag- und pol-Genprodukte erfolgt über Vorläuferpolyproteine, die dann durch die viralen und zellulären Proteasen proteolytisch gespalten werden und so in die reife Form überführt werden. Die Regulation der Menge der gag- und pol-Polyproteine erfolgt auf ribosomaler Ebene oft durch Suppression eines Stopcodons und durch eine Verschiebung des Leserasters. Die Synthese des env-Glykoproteins findet an Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums statt. Das Translationsprodukt wird im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Komplex durch zelluläre Enzyme modifiziert: Es erfolgen multiple Glykosylierungen mit unterschiedlichen Zuckerresten und eine Spaltung in die TM- und SU-Domäne durch eine Endoprotease (Hunter und Swanstrom, 1990). Die reverse Transkriptase reift erst im Virion zu einem funktionellen Enzym.

Die Bildung des Virions

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Abläufe bei der Entstehung der Virionen. Während bei manchen Viren der Aufbau der Virionen über intrazelluläre Vorstufen geht, entstehen andere im Verlauf der Knospung direkt an der Plasmamembran der Wirtszelle (vgl. Klassifikation).

Der erste Schritt scheint jedoch bei beiden Varianten die Interaktion der NC Domäne des gag-Polyproteins mit dem Verpackungssignal Ψ der viralen RNA zu sein (Linial & Miller, 1990). Die Virionen nehmen die env-Glykoproteine, welche vom Sekretionsapparat der Wirtszelle in die Membran inseriert werden, im Verlauf der Knospung auf. Die endgültige Reifung der elektronendichten Kerne erfolgt durch proteolytische Spaltung der viralen Polyproteine in den frisch freigesetzten Virionen.

Zeitlicher Ablauf der Replikation

Der Replikationszyklus wird in eine frühe und in eine späte Phase eingeteilt. Die Frühphase beginnt mit der Adsorption des Virions an die Zellmembran. Virale DNA kann nach ca. zwei Stunden im Zytoplasma nachgewiesen werden. Weitere 4 bis 6 Stunden später findet sich virale DNA in voller Länge im Zellkern und 12 Stunden nach der Infektion läßt sich provirale DNA nachweisen. Die Spätphase beginnt nach ca. 15

Stunden mit der Synthese viraler Transkripte. Nach ungefähr 24 Stunden erfolgt die Freisetzung der Virionen.

2.2 Retrovirale Insertionsmutagenese und Onkogenese

Unter Insertionsmutagenese versteht man die Mutagenisierung des Wirtszellgenoms durch die Insertion des Provirus. Hierbei ist zu beachten, daß der Provirus keine inerte DNA ist, sondern regulatorische Elemente enthält, die ihre Wirkung nicht nur auf virale Gene, sondern auch auf das Wirtsgenom entfalten können.

Bei bestimmten Mausstämmen konnte gezeigt werden, daß Mutationen, die zu einem sichtbar veränderten Phänotyp führen, durch retrovirale Insertionsmutagenese verursacht werden (Jenkins et al., 1981; Stoye et al., 1988). Als Beweis für die Kausalität der Insertion für den veränderten Phänotyp gilt die Identifikation von Revertanten, die den Provirus durch Rekombinationsereignisse verloren haben. Auch beim Menschen wird ein Einfluß auf die Genexpression durch humane endogene retrovirus-ähnliche Elemente (HERV) diskutiert. So kann das Expressionsmuster der Amylase-Gene möglicherweise durch HERV-Insertion moduliert werden (Samuelson et al., 1990). Replizierende humane endogene Retroviren wurden jedoch bisher nicht nachgewiesen.

Retroviren, die maligne Erkrankungen verursachen, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Retroviren, die virale Homologe zellulärer Onkogene (sog. v-onc Gene) enthalten und solche, die diese v-onc Gene nicht aufweisen.

2.2.1 Onkogenese durch C-Typ Retroviren, die keine Onkogene enthalten

Durch onkogene C-Typ Retroviren werden bei der Maus oft Tumoren des hämatopoetischen Systems induziert. Charakteristisch ist eine lange Latenzzeit bis zur Manifestation der Erkrankung. Während dieser Zeit findet eine ausgeprägte Replikation der Retroviren statt und es zeigen sich proliferative Veränderungen in den infizierten Geweben.

Integration eines Provirus in die Nachbarschaft eines zellulären Onkogens kann zu einer Deregulation der Expression dieses Onkogens führen (Hughes et al., 1978). Die Integration kann sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des Onkogens stattfinden. Die Insertion eines Promotors ist nur stromaufwärts eines Genes und in gleicher transkriptioneller Orientierung aktiv. Dagegen können Enhancerinsertionen auch stromabwärts eines Genlokus zu dessen Deregulation führen.

Eine Integration stromaufwärts des Onkogens in der gleichen transkriptionellen Orientierung wird als Promotorinsertion bezeichnet. Ein typisches Beispiel ist die

Provirusinsertion bei ALV induzierten Lymphomen, die zu einer deregulierten Transkription des c-myc Genes vom 3'-LTR führt (Hayward et al., 1981).

Insertion in ein Gen kann zur Initiierung der Transkription vom LTR aus führen, woraus ein verkürztes Protein mit veränderter Funktion resultiert. Dieser Mechanismus führt z.B. bei der ALV induzierten Erythroleukämie des Huhnes zu einem trunkierten EGF-Rezeptor mit deregulierter Signaltransduktion (Downward et al., 1984).

Dies bewirkt unter Umständen einen Wachstumsvorteil der betroffenen Zelle mit nachfolgender klonaler Expansion.

Obwohl eine Infektion verschiedener Zelltypen erfolgt, induzieren Retroviren typischerweise Tumoren einer bestimmten Zellreihe und nicht aller infizierten Gewebe. Es besteht also eine gewisse Spezifität der retroviralen Onkogenese. Als eine virale Determinante für dieses Phänomen wurde die U3 Region des LTR identifiziert (Chatis et al., 1983). Zugrunde liegt die gewebsabhängige Aktivität der LTR verschiedener Retroviren (Li et al., 1987).

Neben den regulatorischen Sequenzen des Provirus spielen env Genprodukte eine Rolle bei der retroviralen Onkogenese. Bestimmte SU-Proteine binden an Wachstumsfaktorrezeptoren an der Oberfläche der Wirtszelle und lösen so ein wachstumsstimulierendes Signal aus. Hierdurch wird die potentielle Zielzellpopulation der sich teilenden Zellen vergrößert. Dies führt zu einer vermehrten Replikation der Retroviren. Dieser Mechanismus ist für Leukämogenese durch polytrophe MuLV von Bedeutung, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird.

2.2.2 Polytrophe murine Leukämieviren

Die polytrophen MuLV, auch MCF (für mink cell focus-forming MuLV) genannt, sind oft replikationskompetente Typ C Retroviren, die sowohl Nagerzellen als auch Zellen anderer Arten, inklusive Humanzellen infizieren (Fischinger et al., 1975). Polytrophe MuLV werden typischerweise aus Labormausstämmen isoliert, die hohe Titer an ökotrophen MuLV produzieren (z.B. AKR Mäuse), aber auch aus manchen wild lebenden Arten. Anders als ökotrophe MuLV liegen polytrophe MuLV nicht in der Keimbahn der Maus vor, sondern entstehen de novo als Rekombinanten aus infektiösen, ökotrophen- und endogenen, polytrophen Sequenzen (Chattopadhyay et al., 1981). Alle polytrophen MuLV enthalten spezifische polytrophe env Gensequenzen, die mindestens für die N-terminale Hälfte der SU-Domäne des env Glykoproteins kodieren. Diese env Gensubstitutionen sind verantwortlich für das Wirtsspektrum der polytrophen MuLV, die einen spezifischen zellulären Rezeptor benutzen, um Zellen zu infizieren (Bosselman et

al., 1982). Dieser Rezeptor, der in dem Rmcf 1 Lokus auf Chromosom 1 liegt, war bis vor kurzem unbekannt. In einer aktuellen Arbeit werden Daten vorgelegt, die darauf hinweisen, daß die MCF-Viren an das Syg1p Membranprotein, welches auf dem Rmcf 1 Lokus kodiert ist, binden (Yang et al., 1999). Die 200 N-terminalen, konservierten Aminosäuren der SU-Domäne der MuLV werden von zwei variablen Regionen, VRA und VRB unterbrochen. Die C-terminale Sequenz ist hoch konserviert und interagiert mit der TM-Domäne des Hüllproteins. Die Bedeutung von VRA und VRB für das Wirtsspektrum wurde mittels rekombinanten env Genen untersucht. Bei polytrophen MuLV scheint die VRA Region die wichtigste Determinante für die Interaktion mit dem spezifischen Rezeptor zu sein (Battini et al., 1992).

Polytrophe Viren sind für die Entstehung von Leukämien, die durch ökotrophen MuLV induziert werden, von Bedeutung. Der Beginn der durch Friend-MuLV verursachten Erythroleukämie der Maus ist mit der Bildung von polytrophen MuLV assoziiert. Möglicherweise infizieren die polytrophen Viren eine Fraktion der hämatopoetischen Zellen, die für die Leukämogenese wichtig ist.

Bestimmte retrovirale env-Glykoproteine stimulieren Rezeptoren für hämatopoetische Wachstumsfaktoren und führen zu einer Proliferation und damit Expansion der Zielzellpopulation. Dies ist bei der Friend-Virus (FV-P) induzierten Erythroleukämie der Fall (Troxler et al., 1977). FV-P besteht aus zwei Komponenten, dem replikationskompetenten Friend-MuLV und dem replikationsdefizienten sogenannten Spleen focus-forming Virus (SFFV-P). SFFV-P besitzt ein deletiertes, rekombinantes env-Glykoprotein welches mit gp55 bezeichnet wird. Dieses Protein stimuliert den Erythropoetinrezeptor auf erythroiden Vorläuferzellen und regt diese zur Proliferation an (Wolff und Ruscetti 1985). Der amino-terminale Teil des gp55 ist homolog zu polytrophen env-Sequenzen, während der carboxy-terminale Teil homolog zu ökotrophen env-Sequenzen ist. Bei der Entstehung der FV-P induzierten Leukämie spielt also die Stimulation von Rezeptoren, die eine Proliferation der Zellpopulation, aus der die Leukämie hervorgeht, eine pathogenetische Rolle. Auch für die Stimulation eines weiteren Zytokinrezeptors, des IL-2 Rezeptors, durch polytrophe env-Proteine gibt es Hinweise. Bestimmte polytrophe env-Proteine stimulieren *in vitro* den IL-2 Rezeptor, der an der Regulation der Proliferation von T-Lymphozyten beteiligt ist (Li und Baltimore, 1991). Dieser Mechanismus der Wachstumsstimulation könnte in einem Mehrschritt-Modell der Leukämogenese zu einer verstärkt proliferierenden Zielzellpopulation führen, die empfänglich für die weitere Akkumulation von Mutationen, auch durch retrovirale Integration, ist.

2.2.3 Onkogenese durch C-Typ Retroviren, die v-onc Gene enthalten

Retroviren, die Onkogene enthalten, verursachen sowohl solide Tumoren als auch hämatopoetische Neoplasien. Für die Tumorinduktion in freier Wildbahn spielen diese Viren eine untergeordnete Rolle, in Experimenten jedoch haben sie sich als wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung der Funktion von Onkogenen erwiesen.

Die Aufnahme der zellulären Onkogene in das virale Genom erfolgt durch Rekombinationsereignisse. Das virale Genom wird hierbei so verändert, daß die rekombinanten Viren nicht mehr replikationskompetent sind. Für die Infektion weiterer Zellen sind sog. Helferviren erforderlich (vgl. Kap 2.2). Unter den v-onc Genen finden sich verschiedene Gruppen von Genen, die für wachstumsregulierende Proteine kodieren: Darunter Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, signaltransduzierende Moleküle, G-Proteine und Transkriptionsfaktoren. Es kommt zu einer deregulierten Transkription des Onkogens unter der Kontrolle des LTR. Weiterhin können Fusionsproteine aus viralen und v-onc kodierten Sequenzen entstehen, die sich in der Funktion von dem zellulären Onkogen unterscheiden.

Ein klassisches Beispiel für v-onc Gene ist das v-src Onkogen des Rous-Sarkom-Virus (Rous et al., 1911; Payne 1992). Das src Genprodukt ist eine Protein Tyrosinkinase, die Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren weiterleitet. Das v-src Genprodukt weist eine Mutation am C-Terminus, den Verlust eines Tyrosins, auf. Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes ist für die Inaktivierung der Proteinkinase notwendig. Das v-src Gen kodiert also für eine Protein Tyrosinkinase mit verstärkter Aktivität.

2.2.4 Identifikation von Genen durch Insertionsmutagenese

Die Gene, die durch Insertionsmutagenese mutiert wurden und zu einem veränderten Phänotyp führen, können identifiziert werden. Die Sequenz des Provirus dient als Markierung des Insertionsortes im Wirtsgenom (van Lohuizen und Berns, 1990). Tumoren, die im Tiermodell experimentell durch einen Retrovirus induziert wurden, lassen sich mit Hilfe virusspezifischer Sonden auf gemeinsame Integrationsorte hin untersuchen (van Lohuizen et al., 1991). Ist ein überzufällig häufiger Integrationsort gefunden, können flankierende Sequenzen des Wirtsgenoms kloniert und sequenziert werden. Auf diese Weise wurde z.B. der Spi-1 Locus identifiziert, der in 95 % der experimentell durch den Spleen-focus-forming-virus (SFFV) induzierten Erythroleukämien rearrangiert ist (Moreau-Gachelin et al., 1988). Das durch Spi-1 kodierte Protein ist PU.1, ein Transkriptionsfaktor der ets-Familie der für die Regulation

der myeloischen Hämatopoese wichtig ist (Klemsz et al., 1990). Die SFFV induzierte Erythroleukämie ist ein Beispiel für die Kooperation verschiedener proliferationsregulierender Gene bei der Tumorentstehung. Das Rearrangement des Spi-1 Locus geht bei dieser Krankheit mit dem Verlust von funktionellem Tumorsuppressorgen p53 einher (Ruscetti et al., 1983).

Das System der experimentellen Insertionsmutagenese läßt sich auch *in vitro* einsetzen. Zelllinien, die in einer Gewebekultur wachsen, können durch Infektion mit geeigneten Retroviren mutagenisiert werden. Die für den veränderten Phänotyp verantwortlichen Gene können durch die Charakterisierung der den Insertionsort flankierenden Sequenzen identifiziert werden. Gegenüber der Insertionsmutagenese *in vivo* bietet die Versuchsanordnung *in vitro* den Vorteil, daß nach der retroviralen Infektion auf definierte Alterationen des Phänotyps selektioniert werden kann. Geeignet für derartige Experimente sind Zellkultursysteme in denen die zu untersuchende phänotypische Veränderung spontan mit einer niedrigen Frequenz auftritt, die durch die retrovirale Infektion deutlich erhöht werden kann. Eine wachstumsfaktorabhängige hämatopoetische Zelllinie ist ein geeignetes Modell. Durch Insertionsmutagenese kann die Rate der faktorunabhängigen Mutanten gesteigert und diese selektioniert werden. Durch Klonierung der flankierenden Sequenzen ist eine Identifikation der Gene, die die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren kontrollieren, möglich. Bei der faktorunabhängigen myeloischen Zellreihe D35 konnten durch Insertionsmutagenese faktorunabhängige Klone isoliert werden. Eine Analyse dieser Klone zeigte ein Rearrangement verschiedener Wachstumsfaktorgene durch Insertion von retrovirus-ähnlichen Elementen (Stocking et al., 1988, 1993).

Aus der Selektivität der LTR-Aktivität verschiedener Retroviren ergibt sich für die experimentelle Insertionsmutagenese das Problem, daß retrovirale Vektoren eingesetzt werden müssen, deren LTR in dem zu untersuchenden Zelltyp aktiv ist. Neben dem LTR sind weitere Sequenzen im 5' untranslatierten Bereich und das env-Gen für eine effiziente Infektion von Bedeutung. Für die experimentelle Insertionsmutagenese sollten also Vektoren eingesetzt werden, die für eine Infektion des zu untersuchenden Zelltypes optimiert wurden. Dies ist besonders für die Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen wichtig, da in diesen die retrovirale Infektion und Expression restringiert sind (Beck-Engeser et al., 1991). Die spezifischen Probleme der retroviralen Transduktion hämatopoetischer Stammzellen und die dafür notwendige Vektorentwicklung wird in Kap. 2.4 behandelt.

2.3 Verpackungszelllinien

Für die retrovirale Infektion von Zielzellen werden infektiöse Viruspartikel benötigt. Diese werden von sog. Verpackungszelllinien produziert, die mit dem gewünschten retroviralen Vektor transfiziert wurden.

Das Genom der retroviralen Vektoren ist inkomplett, da kodierende Abschnitte (gag-pol-env) durch die zu transportierenden Nutzsequenzen ersetzt sind. Es erlaubt deshalb keine Bildung von Virionen. Um trotzdem infektiöse Partikel zu erhalten, wurden Verpackungszelllinien entwickelt, die die Gene zur Expression der viralen Gene (in Form sog. Helferviren) enthalten. Werden nun Vektoren, die das Verpackungssignal Ψ besitzen in eine solche Verpackungszelle gebracht, erfolgt die Bildung von Virionen, die zur Infektion von Zielzellen genutzt werden können (Miller, 1990).

Eine Gefahr bei der Benutzung von Verpackungszelllinien ist die Entstehung von replikationskompetenten Retroviren durch Rekombinationsereignisse zwischen Sequenzen des Vektors und der Verpackungszelllinie. Dies ist grundsätzlich, insbesondere auch für gentherapeutische Ansätze nicht wünschenswert. Bei der Konstruktion moderner Verpackungszelllinien werden deshalb Maßnahmen zur Verhinderung solcher Ereignisse getroffen. Grundsätzlich eignen sich hierfür die Verringerung der Homologien zwischen Vektor und Helfervirus und die Verteilung der Helfersequenzen auf mehrere Plasmide.

Bei der Verpackungszelllinie PA317 (Miller und Buttimore, 1986) ist bei dem Helfervirus das Verpackungssignal Ψ und das 5'-Ende des 5'-LTR deletiert und zusätzlich das PB⁺-Element und das 3'-LTR durch fremde Sequenzen ersetzt. Trotz dieser Sicherheitsmerkmale ist die Entstehung von replikationskompetenten Retroviren in PA317-Zellen möglich (Scarpa et al., 1991). Die Verpackungszelllinie GP+AM12 enthält zwei verschiedene defektive virale Genome. Das eine kodiert für gag und pol, das Andere für env. Bei beiden ist das Verpackungssignal Ψ deletiert und die 5'-LTRs modifiziert (Markowitz et al., 1988).

2.4 Retroviraler Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen

Der Gentransfer in hämatopoetische Zellen ist sowohl für gentherapeutische Ansätze, besonders wegen der Möglichkeit der Transplantation von hämatopoetischen Zellen, als auch für die experimentelle Insertionsmutagenese (vgl. Kap 2.2) von Bedeutung. Gentransfer in pluripotente hämatopoetische Stammzellen ermöglicht die permanente

Präsenz des transferierten Genes im Organismus in allen hämatopoetischen Zelllinien. Erfolgt der Gentransfer dagegen in eine determinierte Vorläuferzelle, so wird das transferierte Gen lediglich in der entsprechenden Zelllinie vorliegen.

Diverse kongenitale Erkrankungen, wie zum Beispiel Faktor VIII-Mangel, β -Thalassämie und die Sichelzellanämie beruhen auf monogenetischen Defekten der hämatopoetischen Zellen und sind somit geeignete Ziele für die Gentherapie (Miller, 1990). Ein funktioneller Ersatz des defekten Genes durch den retroviralen Transfer einer intakten Kopie dieses Genes würde zu einem therapeutischen Effekt führen.

Auch für die Therapie maligner Erkrankungen durch retroviralen Gentransfer wurden unterschiedliche Ansätze entwickelt (Baum et al., 1999). Erste klinische Studien konnten zeigen, daß retroviraler Gentransfer im Humansystem möglich und nach bisherigen Erkenntnissen auch sicher ist. Ein eindeutiger therapeutischer Effekt konnte in diesen Studien bisher nicht belegt werden. Mitverantwortlich für die technischen Probleme wie z.B. die geringe Transfereffizienz des therapeutischen Genes sind die verwendeten retroviralen Vektoren, die den Anforderungen der somatischen Gentherapie nur unzureichend entsprachen.

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß der retrovirale Gentransfer auch in murine und humane hämatopoetische Stammzellen möglich ist (Anderson et al., 1985, Miller et al., 1986, Miller, 1990). Leider ist die Effizienz der retroviralen Infektion, das Niveau und die Dauer der Genexpression, bei herkömmlichen Vektoren, niedrig (Miller, 1992). Diverse Faktoren beeinflussen die Infektion der hämatopoetischen Zellen negativ: Die Anzahl an Stammzellen ist in primären Knochenmarkkulturen sehr gering, so daß die produktive Infektion derselben erschwert wird. Dieses Problem kann durch Anreicherung der Stammzellen mittels Selektion des Immunphänotyps gelöst werden (Jones et al., 1990). Weiterhin befinden sich Teile der Stammzellpopulation in der G₀-Phase des Zellzyklus und sind damit durch Retroviren nicht infizierbar. Durch eine Stimulation mit geeigneten Zytokinen kann ein Teil der Stammzellen zur Proliferation angeregt und somit infizierbar gemacht werden.

Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität retroviraler Vektoren ergaben, daß diese in hämatopoetischen Stammzellen gering ist (Beck-Engeser et al., 1991).

Zur Analyse der Infektions- und Expressionsblocks eignen sich Infektionsassays mit hämatopoetischen Zelllinien (von Laer et al., 1998). Um die Effizienz des retroviralen Gentransfers in hämatopoetischen Zelllinien *in vitro* zu untersuchen, eignet sich die Verwendung von rekombinanten Vektoren, die ein Neomycin-Resistenz-Gen (neo^{R})

enthalten. Dieses vermittelt eine Resistenz der Zellen gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418). Durch Selektion der infizierten hämatopoetischen Zellen mit G418 läßt sich die Effizienz des Gentransfers errechnen.

2.4.1 Die Infektion hämatopoetischer Stammzellen durch retrovirale Vektoren und deren Expression ist ineffizient.

Die Effizienz des retroviralen neo^R-Transfers in die multipotente hämatopoetische Zelllinie FDC-Pmix ist bei Verwendung von Vektoren, die einen Mo-MuLV verwandten LTR enthalten, um mehrere Größenordnungen geringer als in Fibroblasten (Beck-Engeser et al., 1991) (vgl. Tab. 4). Der Transfer in die determinierte Progenitor-Zelllinie FDC-P1 ist nur um 30% weniger effizient als in Fibroblasten. Auch bei embryonalen Karzinom- und Stammzellen (EC- und ES Zellen), die wie hämatopoetische Stammzellen ein breites Differenzierungspotential haben, unterliegen herkömmliche Vektoren einem Expressionsblock. Bestimmte rekombinante retrovirale Vektoren, die auf Mutanten von Mo-MuLV bzw. dem Moloney murinen Sarkom-Virus (Mo-MuSV) beruhen, überwinden diesen Expressionsblock in EC- und ES Zellen.

| Vektor | Fibroblasten | FDC-P1 | FDC-Pmix |
|---------|--------------|-------------|--------------------|
| Mo-MuLV | 1 | 0,3 | 2×10^{-6} |
| MPSV | 1 | 0,15 | 6×10^{-4} |
| PCMV | 1 | keine Daten | 2×10^{-3} |

Tab. 4 Effizienz des neo^R-Transfers in hämatopoetische Zellen mit verschiedenen Vektoren. (Aus Beck-Engeser et al., 1991)

Untersuchungen solcher Vektoren bezüglich Ihrer Gentransfereffizienz in hämatopoetischen liegen nahe, da für undifferenzierte hämatopoetische Zellen und ES Zellen ähnliche Kontrollmechanismen für die Transkription angenommen werden. Die Entwicklung dieser rekombinanten Vektoren ist Abb. 5 schematisch dargestellt.

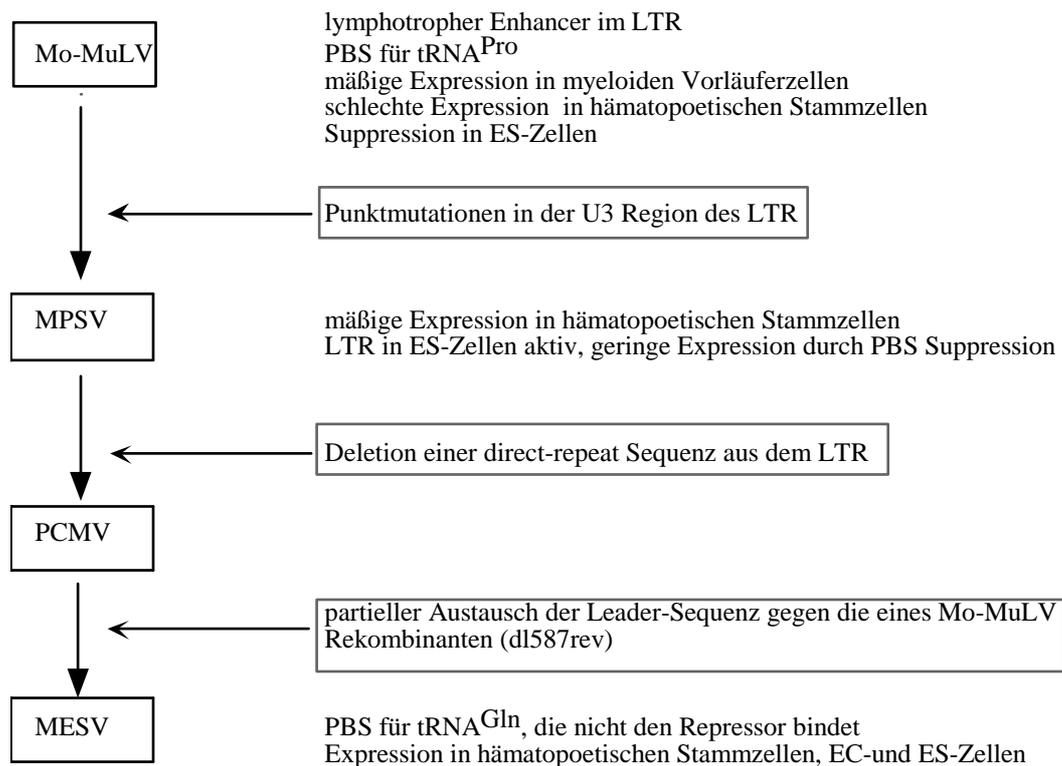


Abb. 5 Entwicklung retroviraler Vektoren, die eine Expression in ES- und EC-Zellen sowie in hämatopoetischen Stammzellen erlauben. MPSV=myeloproliferatives Sarkom-Virus, PCMV=PCC4-Zellen passagiertes MPSV, MESV=muriner embryonaler Stammzell-Virus

Die Ursachen für den Expressionsblock herkömmlicher retroviraler Vektoren in EC- und ES-Zellen werden im folgenden dargelegt: Ein Repressorprotein, welches in EC-Zellen exprimiert wird (ECF-1), bindet stromaufwärts der Mo-MuLV Enhancer Region (Grez et al., 1990b; Tsukiyama et al., 1992). Gegenüber Mo-MuLV weist MPSV Punktmutationen im LTR auf (Franz et al., 1986, Hilberg et al., 1987). Eine dieser Punktmutationen in der U3-Region des MPSV-LTR bei -345 führt zu einer 8-fach verringerten Bindungsaffinität des ECF-1-Repressors. Durch eine Punktmutation bei -166 entsteht eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP-1 (Grez et al., 1991) und die Transkriptionsaktivität in EC- und ES-Zellen erhöht sich um den Faktor drei bis sechs. Eine ca. 18 bp-Sequenz nahe der Mo-MuLV PBS enthält ein sog. Negativ-Regulatorisches-Element (NRE), welches einen Repressor bindet, der die Transkription des Virus inhibiert (Grez et al., 1990a; Petersen et al., 1991). MPSV weist stromaufwärts des NRE Punktmutationen auf, die zu einer verminderten Bindungsaffinität des

Repressors und einer gesteigerten Transkription in EC-Zellen, nicht jedoch in ES-Zellen führt. Die in MESV enthaltene dl578rev Sequenz (Colicelli und Goff, 1987), enthält fünf Punktmutationen, die das NRE deaktivieren und so eine Transkription in ES-Zellen ermöglicht.

Eine Analyse der Transkriptionsaktivität der MPSV und MESV Vektoren in hämatopoetischen Zelllinien zeigte einen deutlichen Vorteil dieser Vektoren gegenüber herkömmlichen Mo-MuLV Vektoren (Baum et al., 1995).

Trotz der verbesserten Expression in hämatopoetische Zellen durch MPSV/PCMV ist die Gentransfer Effizienz noch um Größenordnungen geringer als in Fibroblasten. Untersuchungen ergaben, daß auch eine Restriktion der Infektion von hämatopoetischen Zellen bereits vor der Synthese der proviralen DNA vorliegt. So wurden bei FDC-P1- und FDC-Pmix Zellen, verglichen mit Fibroblasten, sehr geringe Mengen unintegrierter, viraler DNA gemessen, obwohl die Zellen mit gleich vielen Viruspartikeln infiziert wurden. Dieser Infektionsblock ist also bei dem Eintritt des Virus in die Zelle aktiv (von Laer et al., 1998).

2.5 Problemstellung

Die retrovirale Infektion hämatopoetischer Stammzellen unterliegt, wie in Kap 2.4 dargestellt, Restriktionen, die einen Einsatz der retroviralen Insertionsmutagenese in diesen Zellen erschweren. Dies erfordert die Konstruktion von Vektoren, die hämatopoetische Stammzellen effizient infizieren und zu einer deutlich gesteigerten Rate an veränderten, selektionierbaren Phänotypen führen. Ziel dieser Arbeit ist die Konstruktion und Charakterisierung eines Vektors, der folgende Merkmale aufweist:

1. Ein polytropes env-Glykoprotein, um ein breites Wirtsspektrum einschließlich humaner Zellen und Mauszellen zu gewährleisten.

Die bisher verwendeten amphotropen Vektoren liefern für den Gentransfer in humane und murine hämatopoetische Stammzellen nur unbefriedigende Ergebnisse. Die Gentransfereffizienz des polytrophen Vektors in hämatopoetische Stammzelllinien soll mit der von amphotropen Vektoren verglichen werden.

2. Replikationskompetenz. Dies ermöglicht, durch Ausbreitung des Virus, die Infektion eines größeren Anteils der Zielzellpopulation als dies mit der einfachen Infektion von replikationsdefizienten Vektoren der Fall ist. Ein replikationskompetenter Retrovirus könnte selbst bei geringer Infektionseffizienz für die experimentelle Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen eingesetzt werden. Die Replikation des Virus mit einer Ausbreitung in der Zielzellpopulation könnte zu einer Steigerung der Frequenz von Insertionsereignissen Vektoren führen. Dagegen ist ein replizierender Virus als Vektor für gentherapeutische Ansätze primär nicht geeignet.

3. Die MESV-Leadersequenz, deren PBS nicht den in hämatopoetischen Stammzellen vorhandenen Repressor bindet.

4. Den MPSV LTR, der in hämatopoetischen Stammzellen aktiver ist als der Mo-MuLV LTR.

Anschließend an die Klonierung dieses Vektors soll eine virusproduzierende Zelllinie etabliert und das Wirtsspektrum des Vektors untersucht werden. Die

Replikationskompetenz soll nachgewiesen und die Effizienz der Infektion von hämatopoetischen Zelllinien mit herkömmlichen Vektoren verglichen werden.

Die in dem Labor von Professor Ostertag etablierte hämatopoetische Zelllinie Myl-D7 weist Merkmale einer frühen hämatopoetischen Stammzelle mit breitem Differenzierungspotential auf (Itoh et al., 1996). Myl-D7 Zellen sind bereits mit ökotrophen und amphotrophen Retroviren infiziert. Eine retrovirale Insertionsmutagenese durch Superinfektion mit ökotrophen und amphotrophen Retroviren ist aufgrund der Interferenz nicht möglich. Deshalb soll die Infizierbarkeit von Myl-D7 Zellen durch den zu konstruierenden polytrophen Retrovirus untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeines

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Difco-Laboratories (Nordwald, Hamburg), Sigma (München), und Serva (Heidelberg) bezogen.

Die DNA-modifizierenden Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligasen, Polymerasen, u.a.) inklusive Reaktionspuffer stammen von Gibco/BRL (Eggenstein) und New England Biolabs (Schwalbach).

Die Zellkulturmedien und das fötales Kälberserum lieferte Gibco/BRL

3.2. Biochemische Methoden

3.2.1 Materialien, Puffer und Lösungen

| | |
|-----------------------------|---|
| - Agarose: | Ultra Pure TM Electroporesis Grade (BRL) |
| - Tris-Acetat-Puffer (TAE): | 40 mM Tris/Base (pH 7,6) 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA |
| - Tris-Borat-Puffer (TBE): | 89 mM Tris/Base (pH 7,6) 89 mM Borsäure 1 mM EDTA |
| - TE-Puffer: | 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA |
| - Phenol-Lösung: | Phenol in 100 mM Tris (pH 7,6) |

| | |
|------------------------|---|
| | 0,1 % (w/v) 8-Hydroxycholelin |
| - Phenol / Chloroform: | Mischung Phenol Lösung / Chloroform / Isoamylalkohol (24:4:1) |
| - P1 Puffer: | RNase A (10µg/ml) 50 mM Tris/HCl 10mM EDTA in H ₂ O, pH8,0 |
| - P2 Puffer: | 0,2 M NaOH 1% SDS in H ₂ O |
| - P3 Puffer: | 2.55 M KAc in H ₂ O, pH 4,8 |
| - 10 X PCR-Puffer: | 500 mM KCl 200 mM Tris-HCl, pH 8,4 25 mM MgCl ₂ 1 mg/ml BSA (Nuklease-frei) |

3.2.2 Plasmide

Die Laborinterne Nomenklatur ist in Klammern angegeben. Diese Plasmide wurden im Labor von Prof. Ostertag zur Verfügung gestellt.

(# 27): pMMCI, enthält Mo-MCF (Bosselmann et al., 1982) in dem Plasmid pBR 327 (Soberon et al., 1980)

(#270): pAMS: Basis dieses Konstrukts ist der Mo-MuLV Klon MLV-K (Miller et al., 1984). Ein Sal I-Cla I Fragment dieses Plasmides (3'-pol- und env-Sequenzen) wurde gegen das entsprechende Fragment des A-MuLV Klones 4070 ausgetauscht. Es resultierte das Plasmid pAMS, welches freundlicherweise von A.D. Miller zur Verfügung gestellt wurde.

(R320): pMES-AmphoV-MP, enthält einen replikationskompetenten, amphotrophen Retrovirus mit MESV Leader und MPSV LTR in dem Plasmid pUC9. Ein Cla I Fragment des Plasmides pAMS, welches den Provirus ohne das 3'-LTR enthält, wurde in den 3'-MPSV-LTR inseriert. pMES-AmphoV-MP wurde

durch den Austausch eines Kpn I-Pst I Fragmentes gegen das entsprechende Fragment des MESV konstruiert.

(R273): pUC-LTR-3'delta , enthält den MPSV LTR in dem Plasmid pUC9.

DSP-

Hygro: Enthält Hygromycin Resistenzgen in dem Plasmid bBR322 unter der Kontrolle des SV 40 Promotors (Gaken et al., 1992)

pUC19: (Vierra und Messing, 1982) diente als Klonierungsvektor und als Träger-DNA bei der Elektroporation.

pBluescript II SK +/-: (Stratagene, LaJolla, USA) diente als Klonierungsvektor.

3.2.3 Bakterienstämme und Bakterienkulturen

Die Kulturbedingungen von Bakterien, ihre Lagerung, sowie die Herstellung kompetenter Bakterien, erfolgten wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben. Zur Transformation und Amplifikation der Plasmide wurden die Bakterienstämme Escherichia coli K12 HB101 (Boyer and Roulland-Dussoix 1969) und CMK 603 (Derivat von C 600) eingesetzt.

| | | |
|---------------|---------------------|--|
| Kulturmedien: | LB-Medium: | 10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt 10g/l NaCl pH 7,5, autoklaviert |
| | LB-Amp: | LB-Medium mit 100 ng/ml Ampicillin, welches nach dem Autoklavieren zugefügt wurde. |
| Zugabe | LB-Amp-Agarplatten: | Vor dem Autoklavieren Zusatz von 1,5 % Agar (difco), 100 ng/ml Ampicillin, nach dem Autoklavieren. |

3.2.4 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA an einer spezifischen Sequenz unter definierten Bedingungen. Die Reaktion erfolgt nach Herstellerangaben in einem entsprechendem Puffer bei festgelegten Temperaturen. Pro mg DNA werden 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt.

3.2.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels einer Messung der Extinktion der Lösung bei 260 nm im Photometer. Die optische Dichte bei 260nm (OD₂₆₀) von 1 entspricht 50 µg/ml für doppelsträngige DNA. Der Grad der Verunreinigung der Lösungen durch Proteine lässt sich anhand des Quotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ bestimmen. Der Quotient sollte >1,7 sein.

3.2.6. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung auftrennen. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die entsprechende Agarosemenge (0,8 bis zu 1,6% Agarose w/v) abgewogen, durch Aufkochen im jeweiligen Puffer (TAE- oder TBE-Puffer) gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in die Gelform gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Proben, versetzt mit 10 Vol% Ladepuffer (15% Ficoll, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau, 0,1% EDTA), aufgetragen und bei 1,5 bis 12 V/cm aufgetrennt. Die Gele wurden durch Transillumination mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm ausgewertet und photographisch dokumentiert.

Die Fragmentlänge wurde anhand des Vergleichs mit einem mitlaufenden DNA-Standard (z.B. Lambda-DNA mit HindIII gespalten) abgeschätzt.

3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Der Restriktionsverdau der DNA erfolgte entsprechend der im Kapitel 3.2.4. aufgeführten Bedingungen. In den Verdau wurde je nach Größe der zu isolierenden Fragmente zwischen 5 und 20 µg DNA und eine Enzymaktivität von 1U/µg DNA eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte wie in 3.2.6 beschrieben. Nach der Identifizierung

der gewünschten Banden wurde das Gel vor dem Fragment eingeschnitten und eine NA-45-Anionenaustauscher Membran (Schleicher & Schüll) eingesteckt. Durch Fortsetzen der Elektrophorese bindet sich die gewünschte DNA an die Membran, die nun aus dem Gel entfernt wurde.

Die Elution der gebundenen DNA-Fragmente erfolgte durch Inkubation der Membran in NA-45-Puffer (1 M NaCl; 0,05 M Arginin) bei 70°C. Aus dem Eluat wurde die DNA mit Isopropanol gefällt und 30 Minuten bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) sedimentiert. Die DNA wurde mit 70 % Äthanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im Vakuum getrocknet und in 10 - 20 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.8 DNA Ligation

Um DNA-Fragmente in linearisierte Plasmidvektoren einzubringen, wurde die T4-DNA-Ligase (Gibco/BRL) verwendet. Dieses Enzym katalysiert ATP abhängig die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen doppelsträngiger DNA mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden (Weiss et al., 1968).

- Ligationspuffer (5 x): 250 mM Tris/HCl, pH 7,6 (Gibco/BRL)
 50 mM MgCl₂
 5 mM ATP
 5 mM DTT
 25 % (w/v) Polyethylenglykol

- Reaktionsansatz: 100 ng isoliertes Fragment
 50 ng linearisierte Plasmid-DNA
 2 µl Ligationspuffer
 1 U T4-DNA-Ligase
 ad 10 µl mit aqua bidest.

Die Ligation wurde in 10 µl Reaktionsvolumen durchgeführt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Das molare Verhältnis von Insert zu linearisiertem Vektor betrug 3 : 1.

Um die Religation des linearisierten Plasmidvektors ohne Insert zu verhindern, wurde das geschnittene Plasmid vor dem Einsatz in die Ligation, mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (Boehringer, Mannheim) dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase entfernt den 5'-Phosphatrest am linearisierten Vektor und verhindert somit eine intramolekulare Ligation.

- Reaktionspuffer (10 x): 500 mM Tris/HCl (pH 9,0)
 10 mM MgCl₂
 10 mM ZnCl₂
 10 mM Spermidin

- Reaktionsansatz: x µl linearisierte Plasmid-DNA
 10 µl Reaktionspuffer (10 x)
 1 µl alkalische Phosphatase
 ad. 100 µl mit aqua bidest.

Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C wurde noch einmal 1 µl der alkalischen Phosphatase zugegeben und weitere 20 Minuten inkubiert.

Zur Aufreinigung der DNA wurde der Reaktionsansatz zweimal mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 2,5-fachem Volumen Äthanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH4,8) gefällt. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 13000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) und Waschen des Sedimentes in 70 % Äthanol wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen. Der derart vorbereitete Plasmidvektor wurde bei der Ligation eingesetzt.

3.2.9 Transformation kompetenter E.coli Bakterien

Um die direkte Aufnahme von Plasmidvektoren in Bakterien zu gewährleisten, müssen diese mit einem bestimmten Verfahren aufnahmefähig (kompetent) gemacht werden. Die im Labor von Prof. Ostertag zur Verfügung gestellten, kompetenten E.coli Stämme CMK 603 und HB 101 wurden mit der CaCl₂-Methode (Mandel et al.,1970) behandelt.

Durchführung: 5 µl des in Kap. 3.2.8 beschriebenen Ligationsansatzes wurden zu 50 µl, auf Eis aufgetauter, Bakteriensuspension gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit die Plasmid-DNA an die Bakterien adsorbiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nun wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und für 30 Minuten inkubiert, um ein unselektioniertes Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Die Selektion auf erfolgreiche Transformation erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Amp.-Agarplatten. Da die rekombinierten Plasmide das Ampicillin-Resistenzgen tragen, bilden nur die erfolgreich transformierten Bakterien Kolonien. Diese wurden nach einer Inkubation der Agarplatten bei 37°C über Nacht sichtbar.

3.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA

2 ml LB-Amp-Medium wurden mit den in Kap. 3.2.9 beschriebenen Ampicillin resistenten Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Diese Kulturen wurden in einer Tischzentrifuge bei 5000 UpM 5 Minuten zentrifugiert. Die Aufbereitung der DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989). Das Bakteriensediment wurde in 200 µl P1 Puffer resuspendiert und dann durch die Zugabe von 200 µl P2 Puffer lysiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die Suspension durch 300 µl P3 Puffer neutralisiert. Die Bakterienreste wurden durch Zentrifugation (5 Minuten bei 5000 UpM) von der Plasmid-DNA im Überstand getrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol kombiniert, 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert und mit 70% Äthanol gewaschen. Die DNA wurde im Vakuum getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien, wurde mittels Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Säulen (QIAGEN - tip 500) der Firma Qiagen (Chatsworth) verwendet. Die Aufarbeitung der 250 ml Übernachtskulturen erfolgte gemäß dem vom Hersteller gelieferten Protokoll. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid DNA erfolgte photometrisch (vgl. Kap. 3.2.5).

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977). Die zu sequenzierenden DNA Fragmente wurden in pUC19 subkloniert. Zur Durchführung wurde ein kommerzielles System (Dye-Primer-Kit, Applied Biosystems) nach Herstellerangaben angewendet. Die Polymerasereaktion erfolgte in einem Thermal-Cycler (Perkin Elmer). Die automatisierte Sequenzbestimmung wurde vom Institut für Zellbiochemie und Neurobiologie durchgeführt.

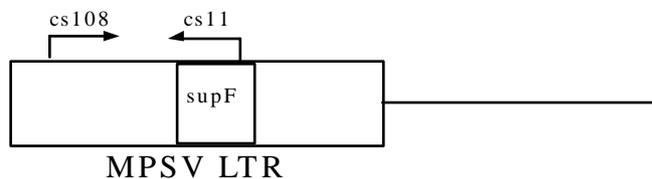
- Reaktionsansatz: 9,5 µl Terminator-Premix
 1,5 µg ds DNA-Template
 32,0 pmol Oligonukleotid-Primer

ad. 15 µl mit aqua dest.

3.3 PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion können spezifische Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden (Mullis and Faloona, 1987). Die Polymeraseprimer sollten etwa 18-25 Basen lang sein und einen GC-Gehalt von ca. 50% aufweisen. Die Schmelztemperatur der Primer wurde sich nach der Formel $((A+T) \times 2) + ((G+C) \times 4)$ berechnet.

Die eingesetzten Primer binden im MPSV-LTR und standen im Labor von Prof. Ostertag zur Verfügung:



| Primer | Sequenz |
|--------|--------------------------------|
| CS 11 | 5' CAAATGACGCGCCGCTGTAAAGTG 3' |
| CS 108 | 5' TTCCTGGACTTTACTGGGAC 3' |

PCR-Ansatz:

| | |
|-------|--------------------------|
| 100,0 | ng Template DNA |
| 1,0 | µM Oligonukleotid-Primer |
| 0,5 | mM dNTP |
| 2,5 | mM MgCl ₂ |
| 20,0 | mM Tris-HCl, pH 8,4 |
| 50,0 | mM KCl |
| 0,1 | mg/ml BSA |
| 0,625 | µl Taq-Polymerase |

- ad 25 µl H₂O

Die Reaktion erfolgte im Thermal-Cycler (Perkin Elmer), bei einer Schmelztemperatur von 94°C (1 Minute), einer Annealing-Temperatur von 62°C (2 Minuten) und einer Synthesetemperatur von 72°C (2 Minuten). Die Anzahl der Zyklen betrug 25.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zelllinien

- NIH-3T3: Klonale, kontaktinhibierte Mausfibroblastenzelllinie (Jainchill et al., 1969).
- GPE-86: Ökotrophe Helferzelllinie. Ein NIH-3T3-Klon, der die Mo-MuLV gag, pol und env Gene auf zwei Plasmiden enthält und durch deren Expression defektive retrovirale Vektoren verpacken kann (Markowitz et al., 1988).
- PA317: Amphiotrophe Helferzelllinie, ein NIH-3T3 Derivat. (Miller und Buttimore, 1986), vgl. Kap. 2.2
- NIH-3T3 mos⁻ neo: NIH-3T3 Zellen, die mit einem MPSV-Vektor infiziert sind, der ein Neomycin-Resistenzgen enthält (Stocking et al., 1985; Laker et al., 1987)
- NIH-MCF U1 neo: NIH-3T3 Zellen, die einen replikationskompetenten Moloney-MCF Virus freisetzen und einen retroviralen Neomycin-Resistenzvektor enthalten .
- MS-5: Eine aus murinem Knochenmark entwickelte Stromazelllinie (Itoh et al., 1989)
- MS-5 neo: MS-5 mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der ein Neomycin-Resistenzgen enthält.
- Myl-D-7: Stromazellabhängige, hämatopoetische Zelllinie der Maus mit lymphoidem und myeloidem Differenzierungspotential, die mit ökotrophen- und amphiotrophen Retroviren infiziert ist. (Itoh et al., 1996).
- FDCPmix A4: Murine, multipotente hämatopoetische Stammzellen mit IL-3 abhängigem Wachstum (Spooncer et al., 1986). A4 bezeichnet einen bestimmten Klon. Durch das breite Differenzierungspotential dieser Zellen gelten sie als Modell für hämatopoetische Stammzellen. Die FDCPmix Zellen enthalten Mo-MuLV.
- K-562: Humane Erythroleukämie-Zelllinie mit Differenzierungspotential zu Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten.

3.4.2 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 vol% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95% in Gewebekulturflaschen (25 cm² oder 75 cm²), bzw. Gewebekultur-Petrischalen (21 cm²) gehalten. In der Regel wurde das Medium alle drei Tage ausgetauscht. Subkonfluent gewachsene Fibroblastenkulturen wurden mit PBS gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,1% Trypsin, Seromed; 0,02% EDTA in PBS) in Suspension gebracht und 1:10 in neuen Kulturflaschen ausgesät. Die in Suspension wachsenden K-562-Zellkulturen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium 1:10 verdünnt. Die ebenfalls in Suspension wachsenden FDCPmix-Zellen wurden durch Verdünnung mit Medium bei einer Konzentration von 5 x 10⁴ bis 10⁶ pro ml gehalten.

Die Fibroblastenzelllinien wurden in MEM mit 10 vol% fötalem Kälberserum (FCS), 2 vol% Glutaminlösung (4mM) kultiviert. MS-5 Zellen wurden in α-MEM mit 20 vol% Pferdeserum und 0,5 vol% Glutaminlösung gehalten. FDCPmix Zellen wurden in MEM mit 10 vol% Pferdeserum, 2 vol% Glutamin, 1 vol% Pyruvat (2 mM) und 10 vol% Wehi 3b⁻ - konditioniertem Medium (Medium einer IL-3 produzierenden Zelllinie) gehalten. Als Medium für die K-562-Zellen diente IMDM mit 10 vol% FCS, 2 vol% Glutaminlösung (2mM) und 1 vol% Pyruvat (2 mM).

Die stromazellabhängigen Myl D-7 Zellen wurden in Kokultur mit bestrahlten MS-5 Zellen (18 000 Rad) , die alle 10 Tage ersetzt wurden, in MEM gehalten.

3.5 Elektroporation eukaryontischer Zellen

3.5.1 Überblick

Die Elektroporation ist ein Verfahren zur Transfektion von DNA in Zellen. Bei der Elektroporation wird eine Zellsuspension, die neben den Zielzellen auch die zu transfizierende DNA enthält, einem elektrischen Hochspannungspuls ausgesetzt. Dadurch entstehen in der Zellmembran Poren, die so groß sind, daß die DNA in die Zellen eintreten kann. Die vorübergehende Expression dieser DNA wird als transiente Expression bezeichnet. Eine Fraktion dieser DNA wird in den Zellkern transportiert und stabil in das Wirtsgenom integriert. Letzteres wird als stabile Transformation bezeichnet. Die Effizienz der Elektroporation ist gegenüber anderen Transfektionsverfahren (z.B. Calciumphosphat- und DEAE-Dextran Präzipitation) weniger von der verwendeten Zelllinie abhängig. Allerdings wird eine vergleichsweise große Menge der

Ausgangszellen benötigt. Folgende Faktoren beeinflussen das Ergebnis der Elektroporation: Die Konformation der DNA hat Auswirkungen auf die Effizienz. Linearisierte DNA führt zu einer höheren Ausbeute an transformierten Zellen, obwohl zirkuläre DNA ebenfalls verwendet werden kann. Die Feldstärke muß groß genug sein, um Poren in der Membran zu erzeugen, sie darf jedoch nicht so hoch sein, daß ein zu großer Anteil der Zellen im Ansatz stirbt. Die Dauer des Pulses variiert mit dem verwendeten Gerät, sollte aber zwischen 20 und 100 ms liegen (Baum et al., 1994). Enthält das transfizierte Plasmid ein Resistenzgen, können stabil transfizierte Klone wie folgt selektioniert werden: Durch Zugabe eines Antibiotikums zu der elektroporierten Massenkultur in einer Konzentration, die Zellen ohne entsprechendes Resistenzgen tötet, können Zellen, die das Resistenzgen durch die Elektroporation aufgenommen haben, selektioniert werden. Diese einzelnen resistenten Zellen expandieren klonal und können weiter analysiert werden. Der in dieser Arbeit konstruierte retrovirale Vektor enthält kein Resistenzgen. Zur Selektion stabiler Transfektanten wurde daher eine Koelektroporation mit einem Hygromycinresistenz Plasmid (DSP-Hygro) durchgeführt. Das Mengenverhältnis von Resistenzplasmid zu Vektorkonstrukt-DNA betrug 1:20. Aufgrund dieses Verhältnisses enthalten Hygromycin resistente Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit auch den retroviralen Vektor.

3.5.2 Durchführung

Am Tage vor der Elektroporation wurden die Zielzellen, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit frischem Medium versorgt. Dieses Vorgehen vergrößert die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen während der Elektroporation. Die Zielzellen wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsinierung geerntet, 5 Minuten bei 4°C und 1000 UpM sedimentiert und in Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Konzentration auf 5×10^6 Zellen pro ml eingestellt. 400 µl dieser Suspension wurden in Elektroporationsküvetten pipettiert, die zu transfizierende DNA (1 µg DSP-Hygro-DNA und 19 µg Konstrukt-DNA) dazugegeben und mit der Pipette durchmischt.

Die Elektroporation erfolgte bei Raumtemperatur in entsprechendem Medium mit ein "Easyject plus"-Gerät und dazugehörigen Küvetten (Eurogentec, Seraing/Belgien) bei 250 bzw. und 1050 µF. Nach dem ca. 30 ms langen Puls wurden die Zellen sofort in Kultur-Petrischalen mit frischem Medium ausgesät und in einem Brutschrank inkubiert. Nach drei Stunden wurde das Medium gewechselt, um toxischen Zelldebris zu eliminieren.

3.6 Herstellung virusproduzierender Zellklone.

3.6.1 Selektion stabiler Transfektanden

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion mit Hygromycin (50 µg/ml für MS-5 neo-Zellen, bzw. 400 µg/ml für NIH-3T3 mos⁻ neo-Zellen) begonnen. Nach 10-14 Tagen wurden Hygromycin resistente Zellklone sichtbar, die isoliert, in Kulturflaschen expandiert und nachfolgend analysiert wurden.

3.6.2 Virustiterbestimmung der transfizierten Klone

Der retrovirale neo^R-Vektor der elektroporierten Zellen wird bei erfolgreicher Transfektion durch die Genprodukte des Konstruktes verpackt und liegt als infektiöser Partikel im Kulturüberstand vor. Die Infektion von Zielzellen mit diesen Partikeln vermittelt eine Resistenz gegenüber Geneticin (G-418, Gibco/BRL).

Die Titerbestimmung erfolgte mittels des Geneticinresistenz-Transfer-Tests (GTU-Assay). Am Vortag des Versuchs wurden in jedem Loch einer 24-Loch Platte 2×10^3 NIH-3T3-Zellen ausgesät. Am Versuchstag wurde steril filtrierter (1,2 µm Porengröße), seriell verdünnter Überstand des zu analysierenden Klones zugegeben (je 3 Löcher pro Verdünnungsstufe). Dem Überstand wurde Polybren, welches die Infektionsrate erhöht, in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugesetzt. 48 Stunden nach der Infektion wurde das Medium gegen G-418 haltiges Medium (400mg/ml) ausgetauscht. Dieses wurde alle 2-3-Tage erneuert, bis resistente Klone heranwuchsen, die unter dem Lichtmikroskop gezählt wurden. Die Anzahl der Klone pro Verdünnungsstufe wurden gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der resultierende Wert ist die Geneticinresistenz Transfer Einheit pro ml (GTU/ml).

3.6.3 Reverse Transkriptase-Aktivitäts-Bestimmung (RT-Assay)

Der RT-Assay dient zur Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase in Zellkulturüberständen und wurde modifiziert nach dem Protokoll von Pragnell durchgeführt (Pragnell et al., 1977).

- Lösung A:
 - 100 μ l 1 M Tris/HCl, pH 8,2 (0,1 mM)
 - 50 μ l 1 mM dTTP (44 μ M)
 - 100 μ l 3H TTP (100 μ Ci; 30 Ci/mM)
 - ad 1000 μ l mit aqua bidest.

- Lösung B:
 - 500 μ l 1 M Tris/HCl, pH 8,2 (0,5 M)
 - 200 μ l 1 M KCl
 - 100 μ l Poly(A)d(pT)10 (10 U/ml, Boehringer)
 - 40 μ l 1 M DTT (25 mM)
 - 40 μ l Triton X-100 (25 % v/v, Serva)
 - ad. 1000 μ l mit aqua bidest.

Das RT-Assay wurde mit eingefrorenem (-20°C) Überstand einer exponentiell wachsenden Kultur durchgeführt. Zu einem 15 μ l Aliquot des Überstandes wurden 10 μ l Reaktionslösung (Lösung A +B, 1:1) gegeben und in einer Microtiterplatte (Nuncclon) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 22,5 μ l des Ansatzes auf ein Filterpapierplättchen (DE 81, 2 cm, Whatman) gegeben und nach kurzem Trocknen wie folgt gewaschen:

- 4 x 5 Minuten mit 6 % (w/v) NaH₂PO₄
- 1 x 5 Minuten mit aqua bidest.
- 2 x 2 Minuten mit 96 % (v/v) Äthanol

Die Filter wurden wieder getrocknet und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Scintiquick, Packard) 5 Minuten in einem Beckman-Szintillationszähler ausgezählt. Pro Probe wurden zwei Messungen durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente DMEM, als Positiv-Kontrolle der Überstand der virusproduzierenden Zelllinie F4-6. Die relative RT-Aktivität wurde auf die Aktivität der im selben Testansatz bestimmten Aktivität der F4-6-Kultur bezogen.

3.6.4 Präparation genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA aus konfluenten Zellkulturen (ca. 5×10^5 bis 5×10^7 Zellen) erfolgte mit der Hochsalzmethode. Den adhären Zellen (in T 25 Flaschen) wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS 3 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl ; 10 mM EDTA, pH 8,0), SDS in einer Endkonzentration von 0.5% und 100 µg/ml Proteinase-K zugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nun wurden 1,1 ml einer gesättigten NaCl-Lösung zugegeben, der Ansatz durchmischt, in Zentrifugenröhrchen dekantiert und die denaturierten Proteine bei 4500 UpM sedimentiert. Die DNA im Überstand wurde mit 8 ml 96% Äthanol gefällt, auf eine Glaspipette aufgewickelt, in 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 400 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch.

4. Ergebnisse

Es sollte ein neuer, replikationskompetenter Retrovirus konstruiert werden, der ein breites Wirtsspektrum aufweist und eine Überwindung des Expressionsblocks herkömmlicher Vektoren in hämatopoetischen Stammzellen gewährleistet. Funktionelle Rezeptoren für die bisher hauptsächlich verwendeten amphotrophen Vektoren werden auf hämatopoetischen Stammzellen nur unzureichend exprimiert (vgl. Kap. 2.4.1) . Daher wurde ein Hybridvektor mit einem polytrophen env-Gen konstruiert. Das polytrope env-Protein ermöglicht die Infektion diverser humaner Zelllinien und Zelllinien anderer Säugetiere. Der Vektor enthält MPSV und MESV Kontrollsequenzen, die eine Expression in hämatopoetischen Stammzellen erlauben. Dieser Hybridvektor wird mit MES-MCFV-MP bezeichnet. Die MESV Leadersequenz des MES-MCFV-MP Vektor enthält die PBS für tRNA^{Glu}, die nicht den Transkriptionsrepressor bindet, der in EC-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen vorliegt. Der MPSV LTR ist in Stammzellen deutlich aktiver als der Mo-MuLV LTR (Vgl. Kap. 2.4). MES-MCFV-MP wurde durch die Rekombination eines replikationskompetenten, amphotrophen Retrovirus, der den MPSV LTR und die MESV Leader-Sequenz aufweist, mit dem env-Gen eines polytrophen Retrovirus konstruiert (Abb. 6). Die Leader Sequenz liegt im 5' nicht translatiertem Bereich des retroviralen Genoms. Das Verpackungssignal Ψ und die Primer Binding Site (PBS) liegen in dieser Leader-Region. Eine Übersicht über den in dieser Arbeit konstruierten Vektor MES-MCFV-MP ist in Abb. 6 gegeben.

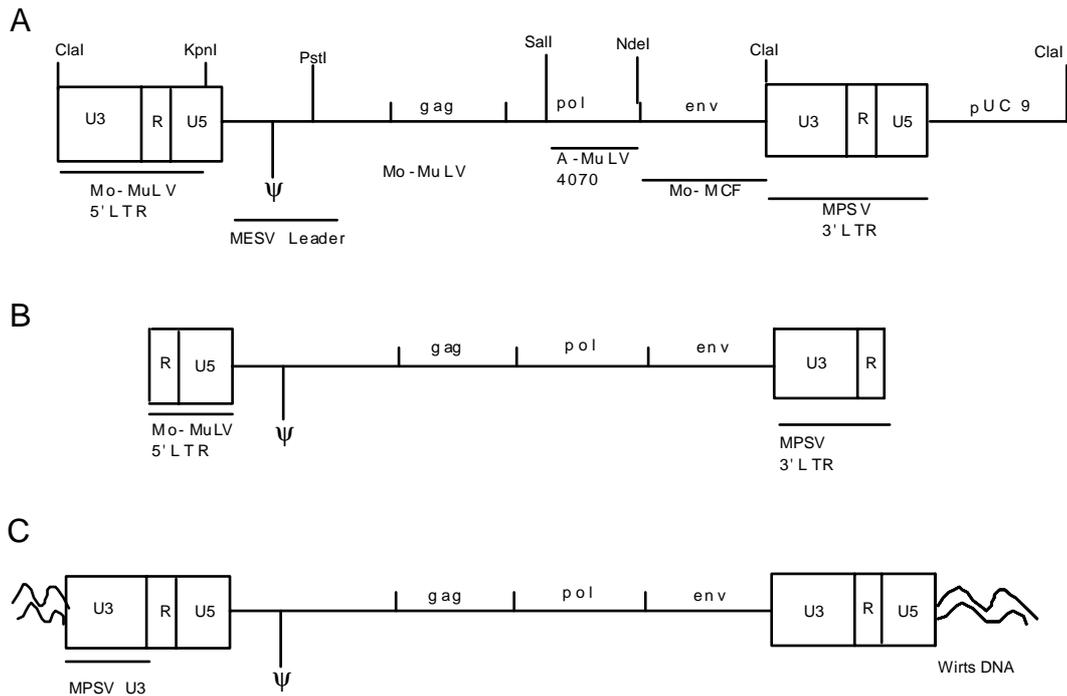


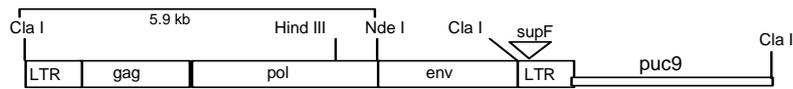
Abb. 6 Der Vektor MES-MCFV-MP A) Schema des Plasmides pMES-MCFV-MP. Überblick über die Herkunft der verschiedenen Fragmente des Plasmides pMES-MCFV-MP. Mit diesem Plasmid wurden Zellen transfiziert. B) Genomische retrovirale RNA nach zellulärer Transkription. Diese RNA wird in Virionen verpackt. C) In das Wirtsgenom integrierte provirale DNA einer transduzierten Zelle. Bei der reversen Transkription der genomischen RNA wird der MPSV-Enhancer und Promotor des 3'LTR an den 5'LTR dupliziert.

4.1 Vektorkonstruktion

Um den oben beschriebenen Vektor zu konstruieren wurde folgende Klonierungsstrategie gewählt: Die amphiotrophen env-Sequenzen des Plasmides pMES-AmphoV-MP (R320), welches die MESV Leader Region besitzt (vgl. Kap. 2.3.1), wurden durch entsprechende polytrope Sequenzen des Plasmides pMo-MCF (#27) ersetzt: Das Plasmid pMES-MCFV-MP wurde durch die Ligation eines Nde I- Cla I Restriktionsfragmentes von pMo-MCF, welches die polytrophen env Sequenzen enthält, mit einem Nde I-Cla I Fragment von pMES-AmphoV-MP und dem Plasmid pUC-LTR-3' (R273) konstruiert. In Abb. 7 ist die Klonierung der beiden Vektoren schrittweise dargestellt.

1)

R320 pMES-AmphoV-MP

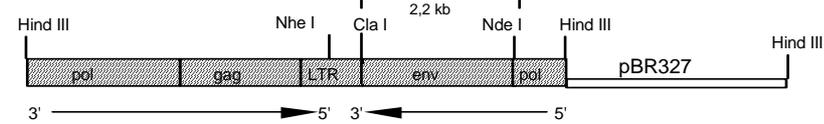


- Spaltung Nde I und Cla I

- Isolierung des 5,9 kb Fragmentes

2)

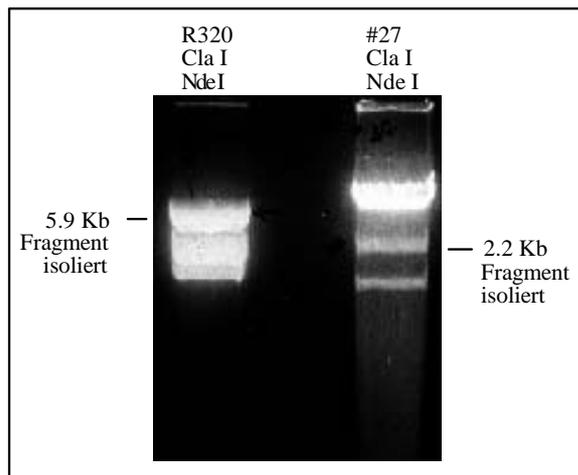
#27 pMMCI Mo-MCF circularly permuted



- Spaltung Hind III und Cla I

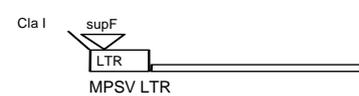
- Isolierung des 2.2 kb Fragmentes

2a)



3)

R273

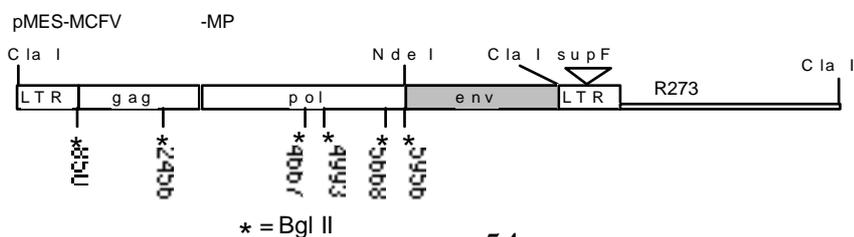


- Spaltung Cla I

- Dephosphorylierung

4)

- Ligation der Fragmente (5,9 kb und 2,2 kb) mit R273



* = Bgl II

5' ————— 3'
1 kb

5)

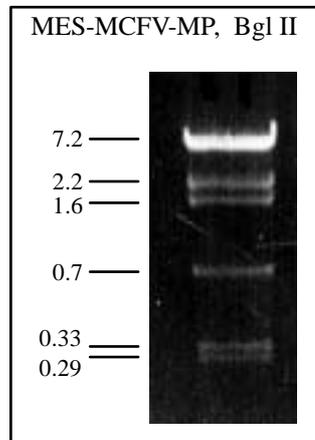


Abb. 7: Konstruktion des Plasmides pMES-MCFV-MP. Schrittweise Darstellung der durchgeführten Restriktionsspaltungen, Fragmentisolierungen und Ligationen. 1) Aus dem Plasmid R320 wurde ein Cla I-Nde I Fragment isoliert, welches den 5'LTR, das gag- und pol-Gen des konstruierten Vektors enthält. 2) Ein Cla I-Nde I Fragment des Plasmides #27, welches ein polytropes env-Gen enthält wurde isoliert. 2a) Agarose-gelelektrophorese der Restriktionsansätze aus 1) und 2). 3) Das Plasmid R273, welches den MPSV LTR enthält wurde mit Cla I geschnitten und dephosphoryliert. 4) Durch eine 3-Fragmentligation wurde pMES-MCFV-MP konstruiert. 5) Überprüfung des Klonierungsergebnisses durch Bgl II Restriktionsverdau, der die erwarteten Fragmente zeigt.

Das in diesem Arbeitsschritt konstruierte Plasmid pMES-MCFV-MP ergibt nach einer Restriktionsanalyse das erwartete Bandenmuster. Dies belegt eine korrekte Konstruktion des Hybridvektors.

4.2 Sequenzierung eines bislang nicht sequenzierten DNA-Abschnittes des MES-MCFV-MP Vektors

Da die DNA-Sequenz eines ca. 1 kb großen Abschnittes aus dem amphiotrophen pol-Gen des MES-MCFV-MP Vektors bislang unbekannt war, wurde diese sequenziert. Nun steht die komplette Sequenz des Vektors zur Verfügung, denn bis auf den o.g. Abschnitt kann diese von den verwendeten Komponenten, deren Sequenz bekannt ist, abgeleitet werden.

Es wurde ein 1,2 kb großes Sal I - Hind III Fragment aus dem pol-Gen des Plasmides pMES-AmphoV-MP sequenziert. Diese Region des pol-Genes stammt aus dem

amphotrophen MuLV Klon 4070, dessen Polymerase bisher nicht vollständig sequenziert war. Die gesamte DNA-Sequenz des MES-MCFV-MP Vektors liegt nun vor. Das 1,2 kb große Fragment wurde in ein 800 bp Sal I - Sma I Fragment, ein 550 bp Spe I - Sma I Fragment und ein 400 bp Sma I - Hind III Fragment gespalten. Diese Fragmente wurden in das Plasmid pUC19 subkloniert und jeweils in 5' -> 3' und 3' -> 5' Richtung sequenziert.

Die Spe I Schnittstelle des Spe I - Sma I Fragment wurde in die Xba I Schnittstelle des pUC19 Polylinkers kloniert. Abb. 8 zeigt, wie die sequenzierten Fragmente kloniert wurden. Die gebogenen Pfeile stellen die Position der Primer dar.

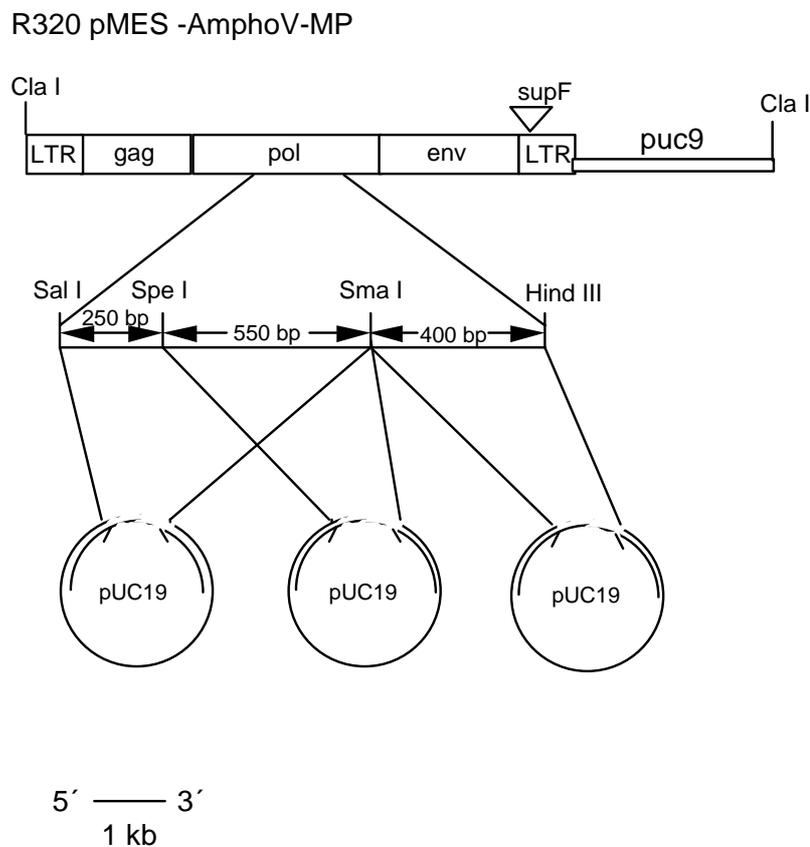


Abb. 8: Klonierungsstrategie für die Sequenzierung eines 1,2 kb großen Fragmentes aus dem amphotrophen pol Gen. Ein 800 bp Sal I - Sma I Fragment, ein 550 bp Spe I - Sma I Fragment und ein 400 bp Sma I - Hind III Fragment wurden in den Vektor pUC 19 subkloniert und sequenziert.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des sequenzierten, amphotrophen pol Fragmentes mit der Sequenz des entsprechenden MoMu-LV Fragmentes zeigt Abb. 9.

| | | | | | | |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| ampho pol | RREAGLRQRCLTQKLGFWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGKLTMGQ | | | | | |
| | X:: | | | | | |
| MoMu-LV pol | RREAGLRQRCLTQKLGFWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGKLTMGQ | | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| ampho pol | PLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGP VVALN PATLLPLPEEG | | | | | |
| | :: | | | | | |
| MoMu-LV pol | PLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGP VVALN PATLLPLPEEG | | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| ampho pol | LQHDCLDILAEAHGTRSDLT DQALPDGDHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAR | | | | | |
| | : : . : . | | | | | |
| MoMu-LV pol | LQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAK | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| ampho pol | ALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKLNLYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKE | | | | | |
| | : | | | | | |
| MoMu-LV pol | ALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKLNLYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKE | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| ampho pol | IKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKQKQRTARGNRMADQAAREVATRETPGTSTL | | | | | |
| | : | | | | | |
| MoMu-LV pol | IKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKQKQRTARGNRMADQAARKAAITETPDTSTL | | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| ampho pol | LIENSTPYTHEHFHYTVTDTKDLTKLGATYDSAKKYWVYQGKPVMPDQFTFELLDLFLHQL | | | | | |
| | : | | | | | |
| MoMu-LV pol | LIENSSPYTSEHFHYTVTDIKDLTKLGAIYDKTKKYWVYQGKPVMPDQFTFELLDLFLHQL | | | | | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| | 370 | 380 | 390 | | | |
| ampho pol | THLSFSKTKALLERSPPYYMLNRDRTLKNITETCKA | | | | | |
| | : | | | | | |
| MoMu-LV pol | THLSFSKMKALLERSHSPYYMLNRDRTLKNITETCKA | | | | | |
| | 370 | 380 | 390 | | | |

Abb. 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen des sequenzierten Fragmentes und des korrespondierenden Abschnittes der Mo-MuLV Polymerase. Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Kode dargestellt. Doppelpunkte zwischen den verglichenen Aminosäuren zeigen Homologie an.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen ergab eine Homologie von 94 % zu Mo-MuLV. Die DNA-Sequenzen dieses Abschnittes sind zu 86 % homolog. Die Sequenz wurde der Datenbank des Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL, Accession No. X78945) zur Verfügung gestellt.

4.3 Erzeugung von virusproduzierenden Zelllinien durch Transfektion und Transduktion des Hybridvektors (MES-MCFV-MP) in Zellen.

Um die biologische Aktivität (Transduktions- und Replikationsfähigkeit) des MES-MCFV-MP Vektors zu untersuchen, wurden Zellen durch Elektroporation mit pMES-MCFV-MP transfiziert. Eine Transfektion des Plasmides pMESV-MCF-MP in eukaryonte Zellen sollte zu einer Expression der viralen Proteine und einer Transkription des viralen Genoms führen. Wenn pMESV-MCF-MP für intakte virale Proteine kodiert, sollten die transfizierten Zellen infektiöse Viruspartikel freisetzen, die weitere Zellen durch Infektion transduzieren können.

Um Zellklone zu erhalten, die das MES-MCFV-MP Genom stabil integriert haben, wurde das Plasmid pMES-MCFV-MP, zusammen mit dem Hygromycin Resistenzplasmid DSP-Hygro, durch Koelektroporation (vgl. Kap 3.5), in die Zelllinie 3T3 mos⁻ neo transfiziert. Die Generierung stabiler, klonaler Zelllinien erfolgte durch Selektion mit Hygromycin. Die so erzeugten Zellen werden im folgenden mit 3T3 neo MCF-MP bezeichnet. Um eine polyklonale virusproduzierende Zelllinie zu erzeugen wurde pMES-MCFV-MP in 3T3 mos⁻ neo Zellen transfiziert, ohne daß eine nachfolgende Selektion erfolgte.

Da MES-MCFV-MP keinen Selektionsmarker enthält, der eine Selektion eukaryonter Zellen erlaubt, wurde zum Nachweis einer Infektion von Zellen mit MES-MCFV-MP ein Versuchsaufbau gewählt, der mit "Neomycin-Rescue" bezeichnet wird. Hierbei wird der retrovirale Neomycin Resistenzvektor der 3T3 neo MCF-MP Zellen durch die von MES-MCFV-MP kodierten viralen Proteine verpackt und in Virionen in den Kulturüberstand abgegeben. Der Titer der etablierten virusproduzierenden Zellklone konnte dann anhand des GTU-Assays auf verschiedenen Zielzelllinien bestimmt werden. Die Bezeichnung "Neomycin-Rescue" stammt daher, daß MES-MCFV-MP als Helfervirus für den defizienten Neomycin Resistenzvektor wirkt und diesen dadurch mobilisiert, also quasi rettet. Dieser Versuch ist in Abb. 10 schematisch dargestellt. Als Positivkontrolle für den Geneticin-Resistenztransfer wurde das Plasmid pAMS (#270), welches einen replikationskompetenten, amphotrophen Retrovirus enthält, eingesetzt. Als Negativkontrolle für den Geneticin-Resistenztransfer diente das Plasmid pUC19. Dieser Versuch zeigt, daß MES-MCFV-MP funktionelle Proteine kodiert, die in der Lage sind, retrovirale RNA zu verpacken und Viruspartikel zu bilden. In die Elektroporation

wurden 400 µl einer 3T3 mos⁻ neo Zellsuspension (5 x 10⁶ Zellen / ml) eingesetzt. Die Zellen wurden in der Phase des exponentiellen Wachstums geerntet, um die größtmögliche Überlebensrate zu erreichen. Es wurden vier Versuche durchgeführt (Abb. 11).

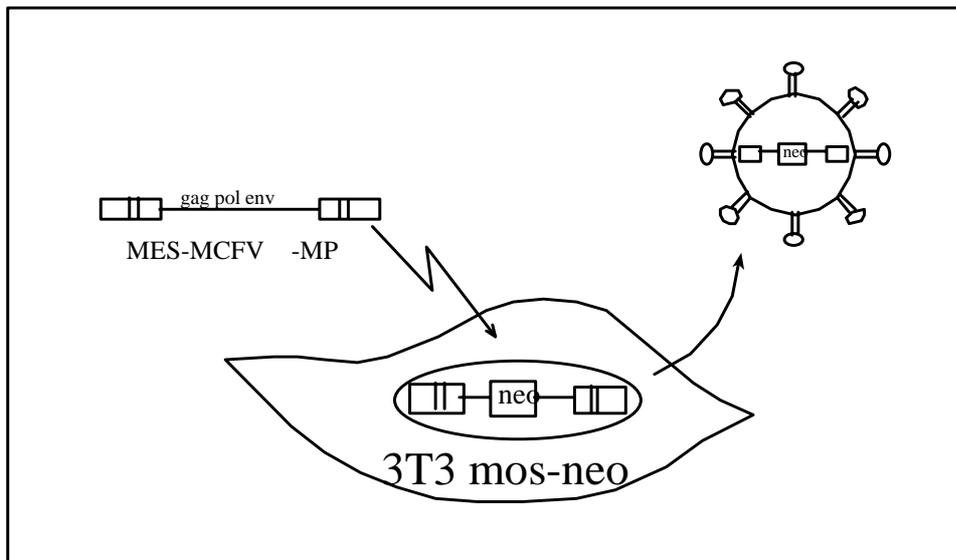


Abb. 10 Prinzip des Neomycin-Rescue. NIH 3T3 mos⁻neo Zellen werden mit einem Plasmid transfiziert, welches für die viralen gag, pol und env Gene kodiert (bei diesem Beispiel pMESV-MCFV-MP). Die durch pMESV-MCFV-MP kodierten viralen Proteine verpacken den in NIH 3T3 mos⁻neo Zellen enthaltenen defizienten retroviralen Vektor, der das neo^R Resistenzgen kodiert. Die freigesetzten Virionen können Zielzellen infizieren und eine Geneticin Resistenz vermitteln.

Die in Versuch Nr. 1 transfizierten Zellen wurde auf stabile Transfektanden selektioniert. 10 Tage nach Beginn der Hygromycin Selektion wurden 20 resistente Klone sichtbar, die isoliert und subkultiviert wurden. Die Expansion gelang bei 7 Klonen (3T3 neo MCF-MP Nr. 2, 3, 6, 7, 12, 15 und 21), die weiter subkultiviert wurden und deren genomische DNA präpariert wurde.

Von den in Versuch Nr. 2, Nr. 3 und Nr. 4 transfizierten Zellen wurde nach sechs Tagen Kulturüberstand gewonnen. Die Kulturüberstände wurden mittels Transfer der Geneticinresistenz auf NIH 3T3 Zellen auf infektiöse Viruspartikel hin untersucht (Tab. 5).

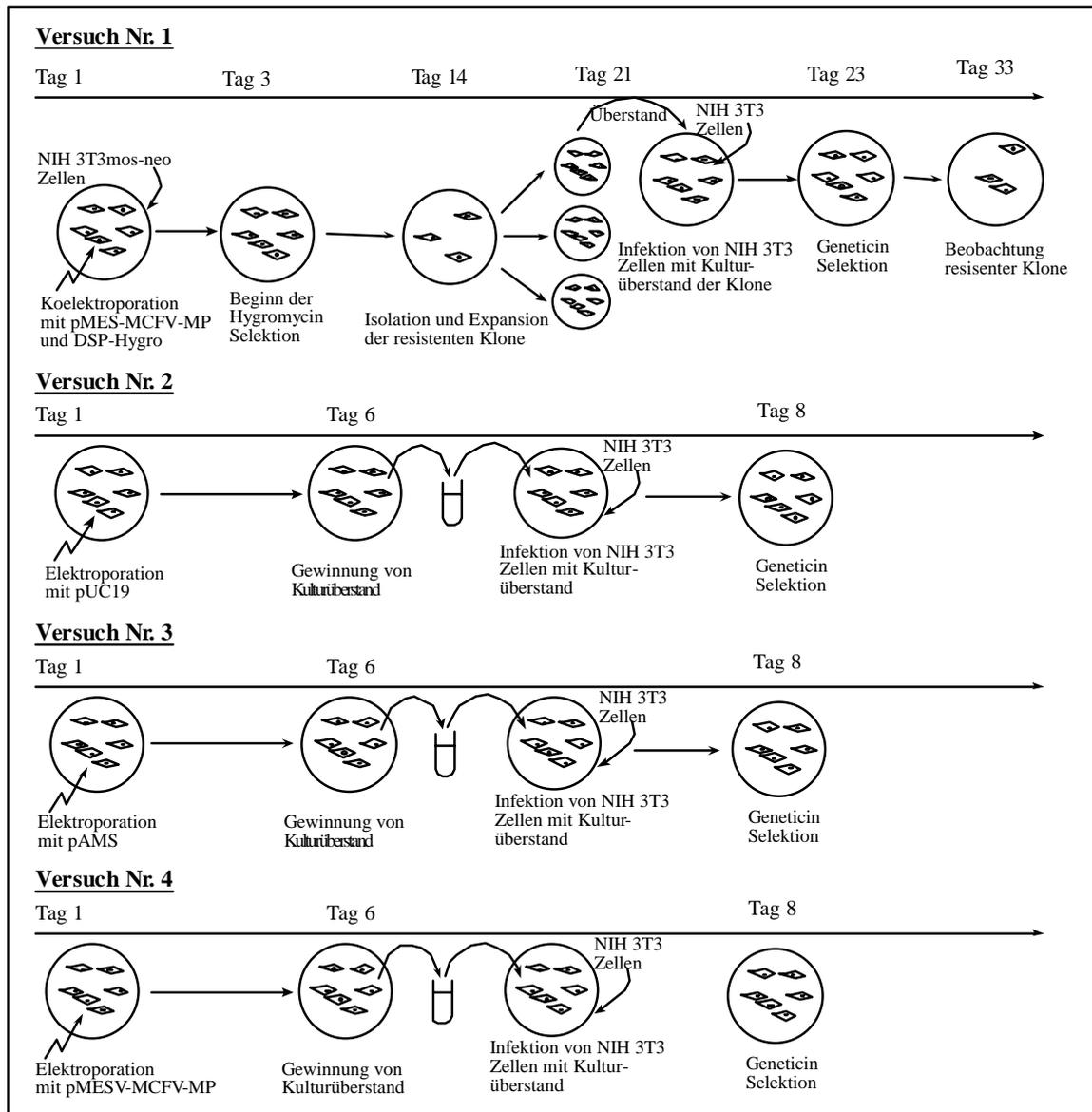


Abb. 11 Schematische Darstellung der durchgeführten Elektroporationen und Transduktionen. Es wurde folgende DNA in 3T3 mos- neo Zellen elektroporiert: Versuch Nr. 1: 19 µg pMES-MCFV-MP Nde I DNA und 1 µg DSP-Hygro DNA, Versuch Nr. 2 : 20 µg pUC19 DNA, Versuch Nr. 3: 20 µg pAMS DNA, Versuch Nr.4: 20 µg pMES-MCFV-MP DNA

| Kulturüberstand | Transfer der Geneticinresistenz |
|-----------------|---------------------------------|
|-----------------|---------------------------------|

Versuch Nr.1

(3T3 neo MCF-MP)

| | |
|---------|---------------|
| Klon 1 | negativ |
| Klon 3 | negativ |
| Klon 6 | negativ |
| Klon 7 | negativ |
| Klon 12 | negativ |
| Klon 15 | 10^5 GTU/ml |
| Klon 21 | negativ |

Versuch Nr. 2 negativ

Versuch Nr. 3 >20 GTU/ml

Versuch Nr. 4 >20 GTU/ml

Tab 5. Ergebnis der Infektion von NIH 3T3 Zellen mit Kulturüberständen der elektroporierten 3T3 mos-neo Zellen. Überstand des Klonen Nr. 15 enthält Virionen, die NIH 3T3 Zellen durch Infektion transduzieren können.

Der Klon 3T3 neo MCF-MP Nr.15 produziert Virionen, die NIH 3T3 Zellen transduzieren können. Dieser Klon synthetisiert alle viralen Proteine, die nötig sind um den in 3T3 mos⁻ neo Zellen enthaltenen retroviralen Neomycin Resistenzvektor zu verpacken und Virionen freizusetzen. pMESV-MCFV-MP kodiert also für funktionelle virale Proteine

Zusammenfassend zeigen die unter 4.1 bis 4.3 dargestellten Ergebnisse, daß das Plasmid pMESV-MCFV-MP korrekt kloniert wurde und der Hybridvektor in der Lage ist, Zellen zu transduzieren, was die reverse Transkription des Vektors voraussetzt (vgl. Abb. 6). Es wurden nun Experimente durchgeführt um diese funktionellen Daten molekularbiologisch zu überprüfen.

Um zu kontrollieren, ob MES-MCFV-MP in das Genom der 3T3 neo MCF-MP Klone aus Versuch Nr. 1 integriert ist, wurde die genomischen DNA dieser Zellen mittels PCR untersucht. Für diese PCR wurde das Primerpaar cs 11 / cs 108 (vgl. Kap. 3.3), welches ein 357 bp großes Fragment des MPSV LTR amplifiziert, verwendet (Abb.12).

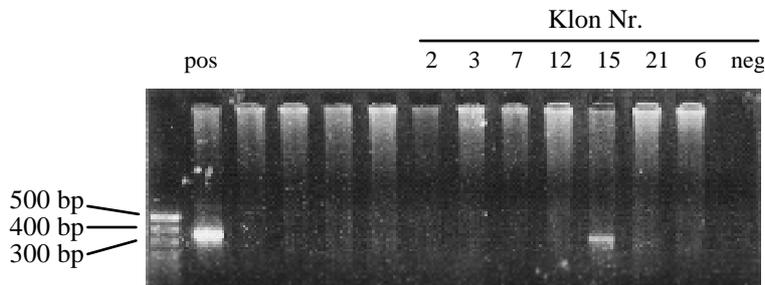


Abb. 12.: PCR der genomischen DNA der Hygromycin resistenten 3T3 neo MCF-MP Klone. Bei Klon Nr. 15 ist die erwartete Bande sichtbar.

Korrespondierend zu den Ergebnissen des Geneticin-Resistenztransfers (vgl. Tab. 5) ergab die PCR bei Klon Nr. 15 das erwartete Signal. Diese Klon wird nachstehend mit 3T3 neo MCF-MP K15 bezeichnet.

4.4 Die mit dem Hybridvektor MESV-MCFV-MP transduzierten Zellen produzieren meßbare Aktivität der reversen Transkriptase

Zellen, die Retroviren produzieren, geben diese in den Kulturüberstand ab. Die in den Überstand abgegebene reverse Transkriptase kann durch Messung der Enzymaktivität quantifiziert werden. Um zu überprüfen, ob das rekombinante pol-Gen des MES-MCFV-MP für eine funktionelle reverse Transkriptase kodiert, wurde die RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der 3T3 neo MCF-MP K15 Zellen und der 3T3 neo MCF-MP Massenkultur (MK) bestimmt. Als Kontrolle wurde die RT-Aktivität in Überständen von NIH 3T3 mos⁻ neo Zellen gemessen, die keine RT produzieren (Tab. 6).

| Überstand: | 3T3 mos ⁻ neo | 3T3 neo MCF-MP K15 | 3T3 neo MCF-MP MK |
|----------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|
| RT-Aktivität (cpm) : | 100 | 8000 | 5000 |

Tab. 6 RT-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Negativkontrolle des RT-Assays betrug 70 cpm.

In den Überständen der 3T3 neo MCF-MP K15 Kultur und der 3T3 neo MCF-MP MK Kultur ließ sich RT-Aktivität nachweisen, während im Überstand der untransfizierten 3T3 mos⁻ neo Zellen keine RT-Aktivität nachweisbar war. Dieses Ergebnis zeigt, daß pMES-MCFV-MP eine funktionelle reverse Transkriptase kodiert.

4.5 Nachweis der Replikationskompetenz des Hybridvektors

Zellen, die mit einem replikationskompetenten Retrovirus infiziert werden, setzen nach erfolgter viraler Replikation Virionen in den Kulturüberstand frei. Mit diesem Überstand können erneut Zellen infiziert werden, die dann wiederum Virion abgeben. Im Gegensatz dazu sind replikationsdefiziente retrovirale Vektoren, die von Verpackungszellen freigesetzt werden nur zu einer einmaligen Infektion von Zellen in der Lage. Das replikationsdefiziente retrovirale Genom kodiert in diesem Fall nicht für alle Proteine, die zu erneuten Bildung von Virionen benötigt werden (vgl. Kap. 2.3 Verpackungszelllinien).

Durch eine serielle Infektion mit MES-MCFV-MP und eine Bestimmung der RT-Aktivität in dem Kulturüberstand der infizierten Zellen wurde die Replikationskompetenz des MES-MCFV-MP Vektors nachgewiesen. Es wurden NIH 3T3 Zellen mit Kulturüberstand von 3T3 neo MCF-MP K15 Zellen infiziert. Nach 14 Tagen wurde in dem Kulturüberstand dieser NIH 3T3 Zellen die RT-Aktivität bestimmt und Überstand abgenommen. Mit diesem Überstand wurden erneut NIH 3T3 Zellen infiziert, deren RT-Aktivität ebenfalls nach 14 Tagen bestimmt wurde. Dieser Versuch ist in Abb. 13 A) und B) dargestellt.

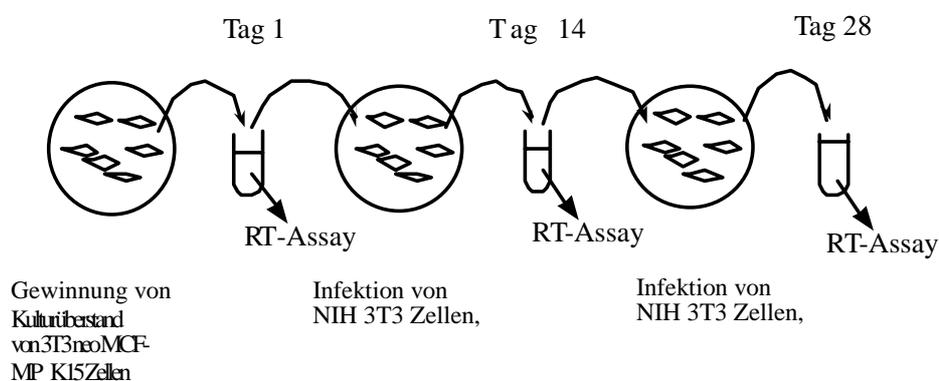


Abb. 13: A) Schema des Versuchsaufbaus, Serielle Infektion von NIH 3T3 Zellen

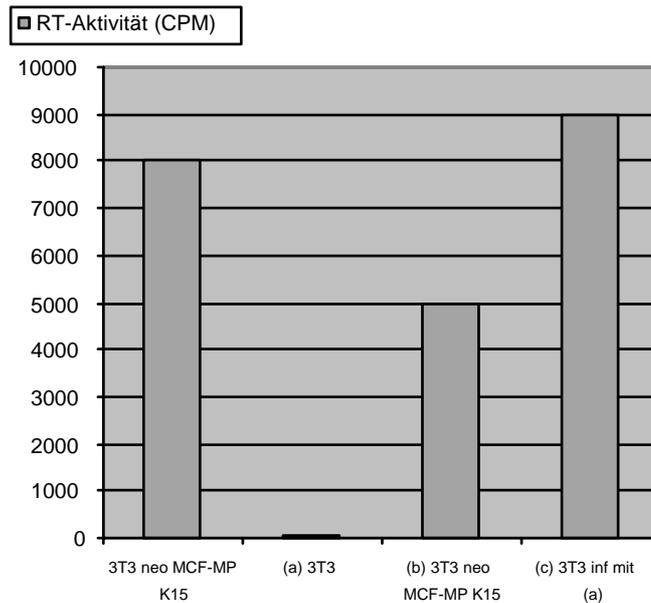


Abb. 13: B) RT-Aktivität in Zellkulturüberständen. Oberer Teil der Abbildung: Schema des Versuchsaufbaus. Unterer Teil: (a) Naive 3T3 Zellen zeigen keine RT-Aktivität. (b) Mit 3T3 neo MCF-MP K15 Überstand infizierte 3T3 Zellen produzieren RT-Aktivität. (c) 3T3 Zellen, die mit Überstand von (b) infiziert wurden, produzieren ebenfalls RT-Aktivität.

Der serielle Transfer von RT-Aktivität, der in diesem Versuch nachgewiesen wurde, zeigt, daß MES-MCFV-MP ein replikationskompetentes Retrovirus ist. Das MES-MCFV-MP Genom kodiert also für funktionelle virale Proteine, die für die Replikation benötigt werden.

4.6 Bestimmung der Interferenzgruppe des MES-MCFV-MP Vektors

Polytrophe murine Retroviren haben ein breites Wirtsspektrum. Sie infizieren neben Nagetierzellen auch Zellen anderer Säuger, einschließlich humaner Zellen (vgl. Kap. 2.1.3). Polytrophe Retroviren benutzen einen anderen zellulären Rezeptor als ökotrophe und amphotrophe Retroviren. Sie sind in der Lage, Zellen zu infizieren, welche bereits mit ökotrophen oder amphotrophen Viren infiziert sind, da sie zu einer anderen Interferenzgruppe gehören.

Die murine hämatopoetische Stammzelllinie Myl-D7 ist bereits mit öko- und amphotrophen Retroviren infiziert. Eine retrovirale Insertionsmutagenese in Myl-D7 Zellen mit MES-MCFV-MP ist also möglich, wenn dieser weder zur amphi- noch zur

ökotrophen Interferenzgruppe gehört. Zur Bestimmung der Interferenzgruppe des MES-MCFV-MP Vektors wurden je zwei GTU-Assays mit Überstand von 3T3 neo MCF-MP K15 auf drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Tab 7): Die Zelllinien NIH 3T3, 3T3+N (3T3 mit ökotrophen MuLV infiziert) und 3T3+AMT (3T3 mit amphotropen MuLV infiziert). Ein polytrophenes Retrovirus sollte diese drei Zelllinien infizieren können. Als Positivkontrolle wurde Überstand der Zelllinie NIH 3T3 MCF U1 neo verwendet, die polytrophen Retroviren freisetzt.

| Zellkultur- überstand | GTU / ml auf: | | | RT-Aktivität in % der pos Kontrolle |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| | 3T3 | 3T3+N | 3T3+AMT | |
| 3T3neoMCF-MP K15 | 1,3 x 10 ³ | 2,2 x 10 ³ | 2,2 x 10 ² | 129 |
| | 1,8 x 10 ³ | 1,8 x 10 ³ | 7,2 x 10 ² | 79 |
| 3T3 MCF U1 neo | 8,2 x 10 ² | 2,5 x 10 ² | 5,4 x 10 ² | 140 |

Tab. 7: Bestimmung der Interferenzgruppe des MES-MCFV-MP Vektors. Die Zielzellen NIH 3T3, 3T3+N und 3T3+AMT wurden mit Kulturüberstand von 3T3 neo MCF-MP K15 bzw. 3T3 MCF U1 neo infiziert und der Titer durch GTU-Assays bestimmt.

Dieses Experiment zeigt, daß MES-MCFV-MP weder zur amphotropen, noch zur ökotrophen Interferenzgruppe gehört. MES-MCFV-MP kann Zellen, die mit amphotropen und mit ökotrophen Retroviren infiziert sind, superinfizieren.

Zusammenfassend zeigen die unter 4.1 bis 4.6 dargestellten Ergebnisse, daß MES-MCFV-MP ein replikationskompetentes, polytrophenes Retrovirus ist.

4.7 Infektion von hämatopoetischen Zellen mit Kulturüberstand der Zelllinie 3T3 neo MCF-MP Klon 15

Es wurden humane myeloide Vorläuferzellen (K-562) und murine (FDC-Pmix, Myl-D-7) hämatopoetische Zelllinien mit 3T3 neo MCF-MP K15 und 3T3 neo MCF-MP MK Überständen infiziert. FDC-Pmix Zellen (Klon A4) sind murine, multipotente hämatopoetische Stammzellen mit IL-3 abhängigem Wachstum. Myl-D7 ist eine stromazellabhängige, hämatopoetische Zelllinie der Maus mit lymphoidem und

myeloidem Differenzierungspotential, die mit ökotrophen- und amphotropen Retroviren infiziert ist Die Effizienz der Infektion wurde durch GTU-Assays ermittelt.

4.7.1 Herstellung einer Kontrollzelle, die amphotrophe Virionen mit Neomycin-Resistenzmarker freisetzt.

Um die Effizienz der Infektion verschiedener Zielzellen durch MES-MCFV-MP verpackte Neomycin-Resistenzvektoren mit den von MES-AmphoV-MP verpackten Vektoren zu vergleichen, wurde die Zelllinie NIH 3T3 mos⁻ neo mit Überstand der Zelllinie SC-1+MES-AmphoV-MP infiziert (Stocking et al., unpublizierte Daten), die das amphotrophe Virus produziert. Der Erfolg der Infektion wurde durch ein RT-Assay und ein GTU-Assay bestätigt: Am Tag der Infektion betrug die RT-Aktivität der NIH 3T3 mos⁻ neo Zellen 100 cpm, 14 Tage später 2100 cpm. Das GTU-Assay ergab einen Virustiter von 6×10^3 GTU / ml auf NIH-3T3 Zellen. In dieser Vergleichszelllinie wird der defiziente retrovirale Vektor, der die Genetecin-Resistenz vermittelt, von MES-AmphoV-MP kodierten Proteinen verpackt. Es werden somit amphotrophe Virionen produziert. Diese Zelllinie wird mit 3T3 neo amphi-MP bezeichnet.

4.7.2 Vergleich der Infektionseffizienz hämatopoetischer Zelllinien mit MES-MCFV-MP und MES-AmphoV-MP

Um die Effizienz der Infektion hämatopoetischer Zelllinien zu untersuchen, wurden K-562 Zellen, FDC-Pmix Zellen und Myl-D7 Zellen mit Überständen der Zelllinien 3T3 neo MCF-MP K15, 3T3 neo ampho-MP und Überstand der Zelllinie NIH MCF U1 neo, die polytrophe MoMu-LV mit Genetizin-Resistenzmarker freisetzt, infiziert. Als Negativkontrolle diente Überstand der NIH 3T3 mos⁻ neo Zellen (Tab. 8).

| | GTU / ml: | | | |
|------------------------------|-----------------|-----------------|----------|---------|
| | 3T3 | K-562 | FDC-Pmix | Myl-D-7 |
| 3T3 neo ampho-MP | 7×10^3 | 1×10^4 | 10 | 0 |
| NIH MCF U1 neo | 5×10^3 | 0 | 0 | 0 |
| 3T3 neo MCF-MP MK | 1×10^6 | 0 | 0 | 0 |
| 3T3 neo MCF-MP K15 | 1×10^5 | 0 | 0 | 0 |
| NIH 3T3 mos ⁻ neo | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 8: Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien durch MES-MCFV-MP. Das GTU-Assay wurde mit 24-Loch Platten, die 1 ml einer Zellsuspension (5×10^4 K-562 Zellen bzw. FDC-Pmix Zellen, Klon A4 pro ml) pro Loch enthielten durchgeführt. Die Myl-D-7 Zellen (5×10^3 Zellen / ml) wurden in Kokultur mit bestrahlten MS-5 neo Zellen (5×10^3 Zellen / Loch) gehalten. Die G 418 Konzentration der Selektionsmedien betrug 1200 µg / ml für Myl-D-7 Zellen, 1000 µg / ml für FDC-Pmix Zellen und 1000 µg / ml für K-562 Zellen.

Die K-562 Zellen waren durch 3T3 neo ampho-MP Überstand infizierbar aber nicht durch 3T3 neo MCF-MP Überstand, während FDC-Pmix Zellen und Myl-D7 Zellen weder durch 3T3 neo MCF-MP - noch durch 3T3 neo ampho-MP Überstand infiziert wurden.

4.7.3 Infektion von Myl-D-7 Zellen durch Kokultur mit MES-MCFV-MP produzierenden Zellen

Es wurde untersucht, ob Myl-D7 Zellen durch Kokultivierung mit virusproduzierenden Zellen infiziert werden können. Myl-D7 Zellen wurden mit bestrahlten 3T3 neo MCF-MP, 3T3 neo amphi-MP und NIH MCF U1 Zellen kokultiviert. Durch anschließende serielle Verdünnung der infizierten Myl-D7 Zellen und Selektion mit G 418 wurde die Effizienz der Infektion ausgewertet.

| | Resistente Myl-D-7 Klone | | | | |
|------------------------------|---|------|-----|-----|----|
| | Anzahl der ausgesäten Myl-D-7 Zellen pro Loch | | | | |
| | 1,5 x 10 ⁴ | 3000 | 600 | 120 | 24 |
| 3T3 neo amphi-MP | - | - | - | - | - |
| NIH MCF U1 neo | - | - | - | - | - |
| 3T3 neo MCF-MP MK | + | + | + | - | - |
| 3T3 neo MCF-MP K15 | + | + | + | + | - |
| NIH 3T3 mos ⁻ neo | - | - | - | - | - |

Tab. 9: Infektion von Myl-D-7 Zellen durch Kokultur mit virusproduzierenden Zellen. Mit 1800 Rad bestrahlte 3T3 neo MCF-MP, 3T3 neo amphi-MP und NIH MCF U1 Zellen wurden mit jeweils 4 x 10⁴ Myl-D-7 Zellen für 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die Myl-D-7 Zellen in serieller Verdünnung (1 : 5) in 24-Loch Platten ausgesät (je 3 Löcher pro Verdünnung), die bestrahlte MS-5 neo Stromazellen (5 x 10³ Zellen / Loch) enthielten. Die Selektion erfolgte mit 1200 µg / ml G 418. Nach 14 Tagen wurden die Platten unter dem Lichtmikroskop auf resistente Myl-D-7 Klone untersucht.

Die Kokultur von MES-MCFV-MP produzierenden Zellen mit Myl-D7 Zellen führte zu einer Infektion der Myl-D7 Zellen. Mit dem durchgeführten Infektionsprotokoll (vgl. Tab. 9) betrug die Effizienz der Infektion ca. 1/120 Zielzellen.

5. Diskussion

Die retrovirale Insertionsmutagenese ist ein attraktiver experimenteller Ansatz zur Identifikation von Genen, welche die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen regulieren. Herkömmliche retrovirale Vektoren sind für die Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen nicht problemlos einsetzbar, da sie nur eine geringe Infektionseffizienz aufweisen. Aufgrund der geringen Effizienz des Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen ist der Nutzen dieser herkömmlichen retroviralen Vektoren auch für den therapeutischen Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen sehr limitiert (Baum et al., 1999). Um eine effiziente retrovirale Infektion hämatopoetischer Stammzellen für die Insertionsmutagenese und gentherapeutische Ansätze zu ermöglichen, bedarf es der Entwicklung neuer Vektoren.

Deshalb wurde in dieser Arbeit erstmalig ein replikationskompetenter, polytropher Retrovirus (MES-MCFV-MP) konstruiert. Ein polytrophen env-Glykoprotein wurde verwendet, um ein breites Wirtsspektrum einschließlich humaner Zellen und Mauszellen zu gewährleisten (Loiler et al., 1997, Cloyd et al., 1985). Konventionelle amphotrophe Vektoren transduzieren humane und murine hämatopoetische Stammzellen nur unbefriedigend. Die Gentransfereffizienz des polytrophen Vektors in hämatopoetische Stammzelllinien sollte mit der von amphotropen Vektoren verglichen werden.

Um eine, gegenüber Mo-MuLV basierten Vektoren, verbesserte Expression in Stammzellen zu erreichen, wurde MES-MCFV-MP mit dem LTR des myeloproliferativen Sarkom Virus (MPSV) und der Leadersequenz des MES-Virus konstruiert.. Der MPSV-LTR ist in hämatopoetischen Stammzellen aktiv und bewirkt in diesen eine höhere Expression als konventionelle retrovirale Vektoren. Die Leadersequenz des MES-Virus weist gegenüber der Mo-MuLV Leadersequenz Punktmutationen auf, welche die Bindung negativ regulatorischer Elemente (NRE) verhindern, die in frühen hämatopoetischen Stammzellen aktiv sind (Baum et al., 1995).

Die durch Infektionsversuche bestimmte Interferenzgruppe des MES-MCFV-MP Vektors entspricht erwartungsgemäß der eines polytrophen Retrovirus. Es konnten Zelllinien mit MES-MCFV-MP infiziert werden, die bereits mit amphotropen und ökotrophen Retroviren infiziert waren. Der Austausch des env-Gen enthaltenden Nde I - Cla I Fragmentes des Ausgangsplasmides pMES-AmphoV-MP (R320) durch das entsprechende Fragment des polytrophen Mo-MCF Virus führt also zu der erwarteten Veränderung der Interferenzgruppe.

Das MES-MCFV-MP Konstrukt kodiert für eine funktionsfähige reverse Transkriptase: Diese Enzymaktivität wurde sowohl durch ein RT-Aktivitätsassay als auch durch die

Transduktionsfähigkeit des Vektors nachgewiesen, welche funktionierende RT voraussetzt. Das rekombinante pol-Gen, welches bis zur Nde I Schnittstelle Sequenzen des amphiotrophen pol-Genes und ab der Nde I Schnittstelle Sequenzen des MoMu-LV pol-Genes aufweist, ist also, im Bezug auf die RT-Aktivität, voll funktionell.

Der Nachweis der Replikationskompetenz des MES-MCFV-MP Vektors gelang durch die serielle Infektion von NIH 3T3 Zellen, die nach der Infektion meßbare RT-Aktivität produzierten. Diese serielle Infektion setzt voraus, daß MES-MCFV-MP den retroviralen Replikationszyklus durchläuft und funktionelle Virionen produziert werden.

Um zu untersuchen, mit welcher Effizienz der MES-MCFV-MP Vektor die hämatopoetischen Zelllinien K-562 (Mensch), FDC-Pmix und Myl-D-7 (Maus) infiziert, wurden GTU-Assays mit 3T3 neo MCF-MP Kulturüberständen durchgeführt. Der gemessene Titer betrug bei allen drei hämatopoetischen Zelllinien 0 GTU/ml, während mit dem MES-AmphoV-MP Vektor (R320) ein Titer von 1×10^4 GTU/ml auf K562 Zellen und 10 GTU/ml auf FDC-Pmix Zellen gemessen wurde. Der Titer des Vektors MES-AmphoV-MP auf FDC-Pmix Zellen war wie vorbeschrieben ca. 1000-fach geringer als auf Fibroblasten (Beck-Engeser et al., 1991). Diese Differenz zwischen den Titern auf FDC-Pmix Zellen (0 GTU/ml) und Fibroblasten (1×10^5 GTU/ml) war für den MES-MCFV-MP Vektor noch größer. Die vorliegenden Daten zeigen, daß der MES-MCFV-MP Vektor die Zelllinien FDC-Pmix und K-562 nicht effizienter infiziert als MES-AmphoV-MP. Die Verwendung des polytrophen Mo-MCF env-Genes führt also nicht zu einer Überwindung der Infektionsblockade hämatopoetischer Zellen.

Die Kokultur von virusproduzierenden Zellen mit hämatopoetischen Zellen gilt als effiziente Methode zur Infektion dieser Zellen (Karlsson et al., 1988). Die bereits mit ökotrophen und amphiotrophen Retroviren infizierten Myl-D-7 Zellen konnten in einer Kokultur mit 3T3 neo MCF-MP Zellen mit geringer Effizienz infiziert werden. Aus dieser geringen Infektionseffizienz resultiert für die experimentelle Insertionsmutagenese in Myl-D-7 Zellen, daß diese nur durch eine Verbreitung des MES-MCFV-MP Vektors durch Replikation möglich wäre.

Eine Kokultur mit 3T3 neo amphi-MP Zellen führt dagegen zu keiner Infektion der Myl-D-7 Zellen. Die Beobachtung, daß eine Kokultur der Myl-D-7 Zellen mit Mo-MCF produzierenden Zellen (NIH MCF U1 neo) nicht zu einem Transfer führte, könnte durch den niedrigeren Titer der NIH MCF U1 neo Zellen, verglichen mit den MES-MCFV-MP produzierenden Zellen erklärt sein.

In einer neueren Arbeit über Gentransfer in humane Zellen mit einer polytrophen Verpackungszelllinie wurde auch die Transfereffizienz in hämatopoetische Zellen, u.a. K-562, untersucht. Die dort dargestellten Daten bezüglich der Infizierbarkeit von K-562 Zellen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Keine der analysierten

hämatopoetischen Zelllinien, einschließlich K562 Zellen, konnten infiziert werden (Loiler et al., 1997).

Als Ursachen für die geringe Infektionseffizienz konnten in den letzten Jahren Barrieren auf verschiedenen Ebenen der Infektion identifiziert werden. Eine dieser Barrieren verhindert die effiziente Transkription des Provirus und wird auch als Postintegrationsblock bezeichnet. Die Steuerung der Transkription der proviralen DNA erfolgt durch cis-aktive Elemente in der U3- und der Leader Region. Herkömmliche, von MoMu-LV abgeleitete Vektoren unterliegen einer Restriktion der Transkription in hämatopoetischen Stammzellen, besonders der myeloiden Reihe. Durch die Charakterisierung von retroviralen Mutanten, die in hämatopoetischen Zellen transkribiert werden, gelang die Konstruktion der MPSV- und MESV Vektoren, die den Postintegrationsblock teilweise umgehen (Stocking et al., 1985; Beck-Engeser et al., 1991, Baum et al., 1995). Durch eine systematische Untersuchung verschiedener LTR- und Leadersequenzen bezüglich der Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen konnte demonstriert werden, daß sowohl der LTR als auch die Leadersequenz wichtig für eine effiziente Expression sind (Hildinger et al. 1998).

Ergebnisse verschiedener Experimente deuten auf die Existenz einer zweiten Barriere gegen die effiziente Infektion hämatopoetischer Stammzellen hin, die vor der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom liegt. So konnte in einem dieser Experimente kein integrierter Provirus in hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden, obwohl diese mit Virusüberständen mit hohem Titer infiziert wurden. Auch die Menge der unintegrierten viralen DNA in FDC-Pmix Zellen ist, verglichen mit Fibroblasten, sehr gering, nachdem beide Zelltypen dem gleichen Virusüberstand ausgesetzt wurden (Beck-Engeser et al., 1990).

Als mögliche Ursachen für einen Präintegrationsblock werden folgende Mechanismen diskutiert:

Eine insuffiziente Bindung des viralen Hüllproteins an zelluläre Rezeptoren. Eine behinderte Penetration des Virus in die Zelle und eine Hemmung der reversen Transkription. In der *in vivo* Situation spielt außerdem eine Rolle, daß sich die pluripotente hämatopoetischen Stammzellen, unter physiologischen Umständen, mehrheitlich nicht im Zellzyklus befinden und daher einer Infektion mit herkömmlichen retroviralen Vektoren nicht zugänglich sind (Morrison et al., 1995). Dieser Punkt spielt bei der Untersuchung des Präintegrationsblocks in hämatopoetischen Stammzelllinien *in vitro* keine Rolle, da diese proliferieren.

Der erste Schritt der retroviralen Infektion ist die Interaktion des viralen Hüllproteins mit dem zellulären Rezeptor. Um zu untersuchen, ob bereits auf dieser Ebene eine Infektionsblockade vorliegt, wurde die Bindung amphotropher und 10A1-pseudotypisierter Retroviren an die murine hämatopoetische Stammzelle FDC-Pmix analysiert. Das amphotrophe env-Glykoprotein bindet an den zellulären Rezeptor Pit2, während das 10A1 env-Glykoprotein sowohl an den Pit1 als auch an den Pit2 Rezeptor bindet. Durchflußzytometrisch konnte keine Bindung der Viren an die FDC-Pmix Zellen nachgewiesen werden (von Laer et al., 1998). Die quantitative Analyse des Pit2 mRNA Transkriptes dagegen ergab keinen deutlichen Unterschied zwischen FDC-Pmix Zellen und Fibroblasten, die mit hoher Effizienz von amphotropen Retroviren infiziert werden (Thomsen et al., 1998). Die Infektion der FDC-Pmix Zellen mit VSV G Protein pseudotypisierten Viruspartikeln war dagegen so effizient wie die Infektion von Fibroblasten. Das VSV G Protein bindet an ein ubiquitäres Phospholipid der Wirtszelle, so daß ein Rezeptormangel der Wirtszelle als Infektionshindernis ausscheidet (Friedmann und Yee, 1995).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Präintegrationsblock bei amphotropen Viren durch einen Mangel an funktionellen Rezeptormolekülen mitverursacht wird. Dieser Mangel scheint jedoch nicht durch eine zu geringe Transkription des Pit2 Gens begründet zu sein, da die Pit2 mRNA in FDC-Pmix Zellen in ähnlichen Mengen vorliegt wie in Fibroblasten.

Eine interessante Alternative zu amphotropen Hüllproteinen für den Gentransfer in humane hämatopoetische Stammzellen ist das Hüllprotein des Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV). Der GALV Rezeptor wird mit GLVR1 bezeichnet und ist ein membranständiger Phosphattransporter, der beim Menschen in diversen Geweben einschließlich des Knochenmarks exprimiert wird. Humane Zellen, die GLVR1 exprimieren, werden von GALV infiziert. (O'Hara et al., 1990; Miller et al., 1991). Die ausgeprägte Expression des GLVR1 Rezeptors auf hämatopoetischen Zellen legt nahe, Vektoren mit GALV-env für einen therapeutischen Gentransfer in humane hämatopoetische Zellen zu testen (Egletis et al., 1995).

Das in Mauszellen exprimierte GLVR1 Homolog erlaubt keine Infektion von Mauszellen durch GALV (Johann et al., 1993). Ein retroviraler Vektor mit GALV Hüllprotein könnte sich daher für die *in vivo* Insertionsmutagenese im human rekonstituierten SCID-Mausmodell eignen. Die SCID-Maus (severe combined immunodeficiency disease = schweres kombiniertes Immundefizienz Syndrom) verfügt über keine funktionellen T- und B-Zellen (Bosma et al., 1983). In dieser Maus kann durch Transplantation humanen Knochenmarks ein humanes hämatopoetisches System

etabliert werden. (McCune et al., 1988). Mit einem replikationskompetenten GALV Vektor könnte in diesem Modell eine Insertionsmutagenese im humanen hämatopoetischen System *in vivo* durchgeführt werden. Dieser Ansatz hat gegenüber der Verwendung von Vektoren, die auch Mauszellen infizieren den Vorteil, daß keine rekombinanten Viren durch Rekombination mit endogenen Retroviren der Maus entstehen, die ebenfalls zur Insertionsmutagenese des hämatopoetischen Systems beitragen und damit die molekularbiologische Analyse erschweren.

Um den Präintegrationsblock auf der Ebene der Virus-Rezeptorinteraktion zu überwinden werden derzeit retrovirale Pseudotypen, die das G Protein des Vesicular-Stomatitis-Virus (s.o.) enthalten, getestet. Diese Vektoren, die sich durch eine hohe Infektionseffizienz in hämatopoetischen Zellen auszeichnen, zeigen leider einen ausgeprägten VSV G Protein vermittelten zytotoxischen Effekt bei den infizierten hämatopoetischen Zellen (von Laer et al., 1998). Die Konstruktion eines rekombinanten VSV G Proteins, welches weiterhin eine effiziente Infektion gewährleistet und dabei keinen zytotoxischen Effekt mehr aufweist, wäre ein Fortschritt. Aktuell wurden murine retrovirale Vektoren mit dem Hüllprotein des Lymphozytischen-Choriomeningitis-Virus (LCMV) hergestellt (Miletic et al., 1999). Diese Vektoren lassen sich, wie VSV-Pseudotypen durch Ultrazentrifugation konzentrieren, um einen hohen Titer zu erhalten. Im Gegensatz zu dem VSV G Protein ist das LCMV Hüllprotein jedoch nicht Zytotoxisch. Diese Pseudotypen sind in der Lage, verschiedene humane und murine Zelllinien, einschließlich humaner myeloider Progenitoren, zu infizieren.

Ein anderer Ansatz, die retrovirale Transfereffizienz zu verbessern, ist die Verwendung von Vektoren auf der Basis der Lentiviren. Lentiviren sind in der Lage, auch Zellen zu infizieren, die sich nicht im Zellzyklus befinden (Lewis et al., 1992). Auf der Basis des HI-Virus, welches zur Gruppe der Lentiviren gehört, wurden Vektoren entwickelt, die ruhende Zellen infizieren (Naldini et al., 1996). Für die *in vivo* und die *in vitro* Insertionsmutagenese von nicht stimulierten hämatopoetischen Stammzellen hätte die Verwendung derartiger Vektoren den Vorteil, daß auch die ruhenden hämatopoetische Stammzellen transfiziert würden.

Interessante Perspektiven eröffnen sich durch den Einsatz des lox-cre Rekombinasesystems in der Insertionsmutagenese. Lox Sequenzen sind DNA-Sequenzen, die durch die Cre Rekombinase erkannt werden. DNA Abschnitte die in 5' und 3' Position von lox Sequenzen flankiert sind werden durch die Cre Rekombinase aus dem Genom entfernt. Integrierte provirale DNA, die entsprechende lox Sequenzen enthält wird also durch die Expression der Cre Rekombinase aus dem Wirtsgenom entfernt. Vektoren mit lox Sequenzen erlauben eine quasi reversible

Insertionsmutagenese (Bergemann et al., 1995). Wenn ein, durch retrovirale Insertion erzeugter, veränderter Phänotyp der Wirtszelle durch Expression der Cre Rekombinase revertiert werden kann, beweist dies die Kausalität der Insertion für den veränderten Phänotyp. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, bei mehreren Zellklonen mit einem bestimmten veränderten Phänotyp, die gleiche Insertion nachzuweisen, um die Kausalität der Insertion zu zeigen (sog. crossmatch).

Die weitere Aufklärung der Ursachen des Prä- und des Postintegrationsblocks und die Entwicklung retroviraler Vektoren, die diese Blockaden überwinden, sollte eine Steigerung der Infektionseffizienz auf ein Niveau ermöglichen, welches eine erfolgreiche Insertionsmutagenese und die eventuelle therapeutische Anwendung in hämatopoetischen Zellen erlaubt.

6. Zusammenfassung

Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen ist aufgrund der potentiell möglichen therapeutischen Anwendung und für die Erforschung der Biologie dieser Zellen ein attraktives Verfahren. Retrovirale Vektoren bieten für die Infektion hämatopoetischer Stammzellen gegenüber anderen Vektoren Vorteile wie u.a. die stabile Integration des Vektorgenoms in das Wirtszellgenom. Daraus kann eine lang anhaltende Expression des Transgenes resultieren. Voraussetzung für diese Anwendungen ist eine hohe Gentransfereffizienz in Stammzellen. Konventionelle retrovirale Vektoren weisen eine geringe Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen auf. Als Ursachen dafür sind Blockaden auf verschiedenen Ebenen der retroviralen Infektion und Expression beschrieben: Die Bindung von amphiotrophen Retroviren an Stammzellen ist aufgrund der geringen Expression funktioneller Rezeptormoleküle ineffizient. Die Expression der integrierten Mo-MuLV basierten Vektoren wird durch verschiedene Mechanismen behindert: Unzureichende Aktivierung der Transkription durch den LTR und die Bindung

eines negativ regulatorischen Elementes (NRE) an die Leadersequenz. Die Blockade der Expression kann durch MPSV und MESV überwunden werden. MPSV und MESV sind rekombinante Retroviren, die verglichen Mo-MuLV eine höhere Expression in Stammzellen erlauben. Der MPSV LTR ist in diesen Zellen aktiver als der Mo-MuLV LTR und die MESV Leadersequenz bindet nicht das NRE. Vektoren, die andere Hüllproteine als das amphiotrophe env benutzen, könnten potentiell die Infektionsblockade auf der Ebene der Virus - Rezeptor Interaktion umgehen.

Für die experimentelle Insertionsmutagenese in hämatopoetischen Stammzellen könnte ein replikationskompetenter Retrovirus selbst dann einsetzbar sein, wenn er diese nur ineffizient infiziert: Durch Replikation und Infektion könnte sich dieser Virus in der Zielzellpopulation verbreiten und zu einer Vielzahl an Insertionsereignissen führen.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger, replikationskompetenter Hybridvektor (MES-MCFV-MP) konstruiert, der den MPSV LTR, die MESV Leadersequenz und ein polytrophen env Glykoprotein besitzt. Durch vergleichende Infektionsexperimente wurde untersucht, ob MES-MCFV-MP verschiedene humane und murine hämatopoetische Zelllinien aufgrund des polytrophen env-Glykoproteins effizienter infiziert als ein vergleichbarer amphiotropher Vektor.

Die korrekte Konstruktion des neuen Hybridvektors wurde durch Restriktionsanalysen bestätigt. Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde durch den Nachweis der Enzymaktivität und durch Transduktionsexperimente nachgewiesen. Durch

Infektionsversuche konnte gezeigt werden, daß MES-MCFV-MP einen polytrophen Wirtsbereich hat und replikationskompetent ist.

Die vergleichenden Infektionsexperimente ergaben, daß MES-MCFV-MP die murine Stammzelllinie FDC-Pmix nicht effizienter infiziert als der amphotrophe Kontrollvektor. Die humane myeloide Vorläuferzelllinie K-562 war durch MES-MCFV-MP im Gegensatz zum amphotrophen Kontrollvektor nicht infizierbar. Die Gentransfereffizienz in diese Zelllinien wird also durch das polytrope Hüllprotein im Vergleich zum amphotrophen Hüllprotein nicht gesteigert.

Die murine pluripotente Stammzelllinie Myl-D-7 ist bereits durch amphotrophe und ökotrophe Retroviren infiziert. Insertionsmutagenese ist daher in Myl-D-7 Zellen mit diesen Retroviren unmöglich. Die Transduzierbarkeit der Myl-D-7 Zellen durch MES-MCFV-MP wurde untersucht. Während die Myl-D-7 Zellen durch virushaltige Kulturüberstände nicht infiziert werden konnte, gelang dies mit geringer Effizienz durch eine Kokultur mit den virusproduzierenden Zellen. Wegen dieser geringen Transduktionseffizienz wäre die Insertionsmutagenese in Myl-D-7 Zellen nur durch eine Verbreitung des replikationskompetenten MES-MCFV-MP Vektors in der Zellpopulation möglich.

Die Entwicklung neuer retroviraler Vektoren durch Pseudotypisierung mit anderen Hüllproteinen und die weitere Optimierung der transkriptionsregulierenden Sequenzen sollte die Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen weiter verbessern.

7. Literaturverzeichnis

Akgün E., Ziegler M. und Grez M. (1991) Determinants of retrovirus gene expression in embryonal carcinoma cells. *J. Virol.* 65: 382-388.

Battini J., Heard J. und Danos O. (1992) Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *J. Virol* 66:1468-1475

Baum C., Foster P., Hegewisch-Becker S. und Harbers K. (1994) An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *BioTechniques* 17:1058

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.* 69:7541-7547

Baum Ch., Ostertag W., Stocking C. und von Laer D. (1999) Retroviral vector design for cancer gene therapy. *Gene Therapy of Cancer*, Academic Press, S. 51-75

Beck-Engeser G., Stocking C., Just U., Albritton L., Dexter M., Spooncer E. und Ostertag W. (1991) Retroviral vectors related to the myeloproliferative sarcoma virus allow efficient expression in hematopoietic stem and precursor cell lines, but retroviral infection is reduced in more primitive cells. *Human Gene Therapy* 2:61-70.

Bergemann J., Kuhlcke K., Fehse B., Ratz I., Ostertag W. und Lothar H. (1995) Excision of specific DNA sequences from integrated retroviral vectors via site specific recombination. *Nucleic Acid Res.* 23:4451-4456

Bernhard W. (1960) The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.* 18:491-509.

Best S., Tissier P., Towers G. und Stoye J.P. (1996) Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* 382:826

Bosma G.C., Custer R.P. und Bosma M.J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530

Bosselman R., Straaten F., Beveren C., Verma I. und Vogt M. (1982) Analysis of the env gene of a molecularly cloned and biologically active Moloney Mink Cell Focus-Forming proviral DNA. *J. Virol.* 44:19-31

Boyer H.W. und Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-468.

Chatis P.A., Holland C.A., Hartley J., Rowe W.P. und Hopkins N. (1983) Role of the 3' end fragment of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4408-4411

Chattopadhyay S., Lander M., Gupta S., Rands E. und Lowy D. (1981) Origin of Mink Cytopathic Focus-Forming (MCF) Viruses: Comparison with Ecotropic and Xenotropic Murine Leukemia Virus Genomes. *Virology* 113:465-483

Cloyd M.W., Thompson M. M. und Hartley J. W. (1985) Host cell of mink cell focus forming virus. *Virology* 140:239-248

Coffin J.M. (1990) Retroviridae and their replication IN *Virology* 2nd ed. (eds. B. Fields, D. Knipe und R. Chanock) Seite 1437-1500, Raven Press, New York

Coffin J.M., Varmus H.E. und Hughes S.H. (eds.) *Retroviruses*. Cold Spring Harbour Press 1997

Coffin J.M. (1992) Structure and classification of retroviruses IN *The Retroviridae* Vol. 1 Ed Levy J. , Plenum Press (New York)

Colicelli J. und Goff S.P. (1987) Isolation of a recombinant murine leukemia virus utilizing a new primer tRNA. *J. Virol.*, 57:37-45

- Dalgleish A.G., Beverly P.C.L., Clapham P.R., Crawford D.H., Greaves M. und Weiss R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature* 312:763
- Dick J.E., Magki M.C., Huszar D., Philips R.A. und Bernstein A. (1985) Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hematopoietic system of W/W^V mice. *Cell* 42:71
- Doolittle R.F., Feng D.F., McClure M.A. und Johnsons M.S. (1990) Retrovirus phylogeny and evolution. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 157:1-18
- Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scarce G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J. und Waterfield M.D. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene sequences. *Nature* 307:521-527
- Egletis M.A., Gilboa E., Kantoff P. und Anderson W.F (1985) Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* 230:1395-1398
- Egletis M.A., Schneiderman R.D., Rice P.M. und Eiden M.V. (1995) Evaluation of retroviral vectors based on the gibbon ape leukemia virus. *Gene Ther.* 2:486-492
- Fan H. (1990) Influences of the long terminal repeats on retrovirus pathogenicity IN *Retrovirus Genome Organisation and Gene Expression* (I.S.Y. Chen ed.) Saunders, Philadelphia, Pennsylvania
- Fine D. und Schochetman G. (1978) Type D primate retroviruses: A review. *Cancer Res.* 38:3123-3139
- Fischinger P. J., Nomura S. und Bolognesi D. P. (1975) A novel murine oncornavirus with dual eco- and xenotropic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:5150:5155
- 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.

Friedmann T. und Yee J-K. (1995) Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy. *Nature Medicine* 1: 275-282

Gaken J., Farzaneh F., Stocking C. und Ostertag W. (1992) Construction of a versatile set of retroviral vectors conferring hygromycin resistance. *Biotechniques* 13:32

Gilboa E., Mitra S., Goff S. und Baltimore D. (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* 18:93

Grez M., Akgün E., Hilberg F. und Osterag W. (1990a) Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9202-9206.

Grez M., Hilberg F., Akgün E., Ziegler M. und Ostertag W. (1990b) Retroviral expression in murine stem cells. IN "Recombinant Systems in Protein Expression" (eds. K. Alitalo, M.-L. Huhtala, J. Knowles, A. Vaheri), Elsevier (Amsterdam), S.149-165.

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.* 65:4691-4698.

Haseltine W.A., Kleid D.G., Panet A., Rothenberg und Baltimore D. (1976) Ordered transcription of RNA tumor virus genomes. *J. Mol. Biol.* 106:109

Hawley R.G., Fong A., Burns B. und Hawley T. (1992) Transplantable myeloproliferative disease in mice induced by an interleukin 6 retrovirus. *J. Exp. Med.* 176:1149-1164

Hawley R.G., Fong A., Ngan B., de Lanux V. Clarc S. und Hawley T. (1993) Progenitor cell hyperplasia with rare development of myeloid leukemia in interleukin 11 bone marrow chimeras. *Exp. Med.* 178:1175-1188

Hayward W.S., Nell B.G. und Astrin S.M. (1981) Activation of a cellular onc gene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290:465

Heberlein C., Kawai M., Franz M.-J., Beck-Engeser G., Daniel C.P., Ostertag W. und Stocking C. (1990) Retrotransposons as mutagens in the induction of growth autonomy in hematopoetic cells. *Oncogene* 5:1799-1807.

Henderson L.E., Snowden R., Copeland T.D., Oroszlan S. und Fischinger P.J. (1987) Direct identification of class II Histocompatibility DR proteins in preparation of human T-cell lymphotropic virus type III. *J. Virol.* 61:629.

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., John J., Ostertag W. und Baum C. (1998) FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoetic cells. Im Druck

Hughes S.H., Shank P.R., Spector D.H., Kung H.J., Bishop J.M, Varmus H.E., Vogt P.K. und Breitmann (1978) Proviruses of avian sarkoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. *Cell* 15:1397-1410

Humphries E.H., Glover C. und Reichmann M.E. (1981) Rous sarcoma virus infection of synchronized cells establishes provirus integration during S phase DNA synthesis prior to cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2601

Hunter E. und Swanstrom R. (1990) Retrovirus envelope glycoproteins IN *Retroviruses - Strategies of Replication*. (eds. R. Swanstrom and P.K. Vogt), Springer Verlag (Berlin)

Itoh K., Friel J., Kluge N., Kina T., Kondo-Takaori A., Kawamata S., Uchiyama T. und Ostertag W. (1996) Anovel hematopoetic multilineage clone Myl-D-7, is stromal cell-dependent and supported by an alternative mechanism(s) independent of stem cell factor / c-kit interaction. *Blood* 87:3218-28

Itoh K., Tezuka H., Sakoda H., Konno M., Nagata K., Uchiyama T., Ucino H. und Mori K. (1989) Reproducible establishment of hemopoetic supportive stroma cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* 17:145-153

Jaenisch R. (1976) Germline integration and Mendelian transmission of the Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1260

Jainchill J., Aaronson S.A. und Todardo G.J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact inhibited mouse cells. *J. Virol.* 4:549-553.

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

Johann S. V., Gibbons J.J. und O'Hara B. (1992) GLVR1, a Receptor for Gibbon Ape Leukemia Virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus. *J. Virol.* 66:1635

Johann S.V., Zeijl M., Cekleniak J. und O'Hara B. (1993) Defenition of a domain of GLVR1 which is necessary for infection by gibbon ape leukemia virus and which is highly polymorohic between species. *J. Virol.* 67:6733-6736

Jones R.J., Wagner J.E., Celano P., Zicha M.S. und Sharkis S.J. (1990) Separation of pluripotent hematopoetic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347:188-189

Kabat D. (1989) Molekular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 148:1

Karlsson S., Bodine D. M., Perry L., Papayannopoulou T. und Nienhuis A. W. (1988) Expression of the human beta-globin gene following retroviral-mediated transfer into multipotential hematopoietic progenitors of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6062-6066

Keller G., Paige C., Gilboa E. und Wagner E. F. (1985) Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursors. *Nature* 318:149-154

Klemsz K.J., McKercher S.R., Celada A., Van Beveren C. und Maki R.A. (1990) The macrophage and cell-specific transcription factor PU.1 is related to the Ets oncogene. *Cell* 61:113-124

von Laer D., Thomsen S., Vogt B., Donath M., Kruppa J., Rein A., Ostertag W. und Stocking C. (1998) Entry of amphotropic and 10A1 pseudotyped murine retroviruses is restricted in hematopoietic stem cell lines. *J. Virol.* 72:1424-1430

Laker C., Stocking C., Bergholz U., Hess N., De Lamarter J. F. 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

Levy J.A. (1973) Xenotropic viruses: Murine leukemia viruses associated with NIH Swiss and other mouse strains. *Science* 182:1151

Lewis P., Hensel M. und Emerman M. (1992) Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* 11:3053-3058

Li J. P. und Baltimore D., (1991) Mechanism of leukemogenesis induced by mink cell focus forming murine leukemia viruses. *J. Virol.* 65:2408

Li Y., Golemia E., Hartley und Hopkins N. (1987) Disease specificity of nondefective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides. *J. Virol.* 61:693-700

Liebermann H. (1992) *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie*. Gustav Fischer Verlag (Jena-Stuttgart).

- Lilly F. und Pincus T. (1973) Genetic control of murine viral leukemogenesis. *Adv. Cancer Res.* 17:231
- Linial M.L. und Miller A.D. (1990) Retroviral RNA packaging: Sequence requirements and implications. IN *Retroviruses - Strategies of Replication* (eds. R. Swanstrom and P.K. Vogt), Springer Verlag (Berlin)
- van Lohuizen M. und Berns A. (1990) Tumorigenesis by slow transforming retroviruses- an update. *Biochem. Biophys. Acta* 1032:213-235
- van Lohuizen M., Verbeek S., Scheijen B., Wientjens E., van der Gulden H. und Berns A. (1991) Identification of cooperating oncogenes in Eu-Myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65:737-752
- Loiler S., DiFronzo N. und Holland C. (1997) Gene transfer to human cells using retrovirus vectors produced by a new polytropic packaging cell line. *J. Virol.* 71:4825-4828
- Luciw P.A. und Leung N.J. (1992) IN *The Retroviridae* (ed. Levy) . Plenum Press (New York).
- Lyon M.F. und Searle A. G. (Eds.) (1989) *Genetic variants and stains of the laboratory mouse*, Oxford University Press, Oxford
- McCune J.M., Namikawa R., Kaneshima H., Shultz L.D., Liebermann M. und Weissmann I.L. (1988) The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632
- Majors J. (1990) The structure and function of retroviral long terminal repeats. IN *Retroviruses - Strategies of Replication* (eds. R. Swanstrom and P.K. Vogt), Springer Verlag (Berlin)
- Mandel M. und Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159-167.

Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982) "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).

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.

Miletic, H., Bruns M., Konstantinos T., Vogt B., Rezai R., Baum Ch., Kühlek K., Cosset F., Ostertag W., Lothar H. und von Laer D. (1999) Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 73: 6114-6116

Miller A.D. (1990) Progress toward human gene therapy. *Blood* 76:271-278

Miller A.D. (1990) Retrovirus packaging cells. *Human Gene Therapy* 1:5

Miller A.D. (1992) Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455-460

Miller A.D. Bonham L., Alfano J., Kiem H-P., Reynolds T. und Wolgamot G. (1996) A novel murine leukemia virus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials. *J. Virol.* 70:1804-1809

Miller A.D. und Hock R.A. (1986) Retrovirus mediated transfer and expression of drug resistance genes in human hematopoietic progenitor cells. *Nature* 320:275

Miller, A.D. und Verma, I.M. (1984) *J. Virol.* 49:214-222

Moreau-Gachelin F., Tavittian A. und Tambourin P. (1988) Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukemias. *Nature* 331:277-280

Miller A.D., Garcia J.V., von Suhr N., Lynch C., Wilson C.A. und Eiden M.V. (1991) Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 65:2220-2224

- Miller D.G. (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
- Miller D.G., Edwards R.H. und Miller A.D. (1994) Cloning of the cellular Receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:78
- Morrison S. J., Uchida N. und Weissman I.L. (1995) The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:35-71
- Mullis K. B. und Falloona F. A. (1987) Spezific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaktion. *Methods Enzymol.* 155:335
- Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M. und Trono D. (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267
- O'Hara B., Johann S.V., Klinger H.P., Blair D.G., Rubinsoen H., Dunn K.J., Sass P., Vitek S.M. und Robins T. (1990) Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Different.* 1:119-127
- Orlic D., Girard L., Jordan C., Anderson S., Cline A. und Bodine D. (1996) The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11097-11102
- Ostertag W., Stocking C., Johnson G.R., Kluge N., Kollek R., Franz T. und Hess N. (1987) Transforming genes and target cells of murine spleen focus-forming virus. *Adv. Cancer Res.* 48: 193-355
- Payne J.N. (1992) The biology of avian retroviruses. In *The retroviridae* (ed. Levin, J.A.) 299-404. Plenum Press. New York

Petersen R., Kempler G. und Barklis E. (1991) A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol. Cell. Biol.* 11:1213-1221.

Pragnell I.B., Ostertag W. und Paul J. (1977) The expression of viral and globin genes during differentiation of the Friend cell. *Experimental Cell Research* 108:269-278.

Rous P. (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13:397-411

Ruscetti S.K. und Scolnick E.M. (1983) Expression of a transformation-related protein (p53) in the malignant stage of Friend virus-induced diseases. *J Virol* 46:1022-26

Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual " Zweite Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).

Samuelson L.C., Wiebauer K., Snow C.M. und Meisler M.M. (1990) Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2513-2520

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5468.

Scarpa M., Cournoyer D., Muzny D.M., Moore K.A., Belmont J.W. und Caskey C.T. (1991) Characterization of recombinant helper retroviruses from Moloney-based vectors in ecotropic and amphotropic packaging cell lines. *Virology* 180:849-52.

Spooncer E., Heyworth C.M., Dunn A., und Dexter T.M. (1986) Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31:111-118.

Stead R.B., Kwok W.W., Storb R. und Miller A.D. (1988) Canine model for gene therapy: Inefficient gene expression in dogs reconstituted with autologous marrow infected with retroviral vectors. *Blood* 71:742

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., Bergholz U., Friel J., Klingler K., Wagener T., Starke C., Kitamura T., Miyajima A. und Ostertag W. (1993) Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* 8(3):197-209

Stocking C., Grez M., und Ostertag W. (1993) Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells. IN *Virus Strategies* (eds. W. Doefler & P. Böhm), VCH Verlag (Heidelberg) S.433-455.

Stocking C., Loliger C., Kawai M., Suciú S., Gough N. und Ostertag W. (1988) Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants. *Cell* 53(6):869-79

Stoltzfus C.M. (1988) Synthesis and processing of avian sarcoma virus RNA. *Adv. Virus Res.* 35:1-25

Stoye J.P., Fenner S., Greenoak G.E., Moran C. und Coffin J.M. (1988) Role of endogenous retroviruses as mutagens: The hairless mutation of mice. *Cell* 54:383-391

Thomsen S., Vogt B., von Lear D., Heberlein C., Rein A., Ostertag W. und Stocking C. (1998) Lack of functional Pit-1 and Pit-2 expression on hematopoietic stem cell lines. *Acta Haematol.* 99:148-155

Troxler D.H., Parks W.P., Vass W.C. und Scolnick E.M. (1977) Isolation of a fibroblast nonproducer cell line containing the Friend strain of the spleen focus-forming virus. *J. Virol.* 76:606-615

van der Putten H., Quint W., van Raaij J., Robanus-Maandag E., Verma I. M. und Berns A. (1981) M-MuLV-induced leukemogenesis: Integration and structure of recombinant proviruses in tumors. *Cell* 24:729-739

Varmus H. und Swanstrom (1984) Replikation of retrovirus. IN RNA Tumor Viruses (eds. R. Weiss, N. Teich, HJ. Varmus, J. Coffin) Cold Spring Harbour (New York) S. 369-512

Varmus H. (1988) Retroviruses. Science 240:1427-1435.

Varmus H.E., Heasley S., Kung H.J., Oppermann H., Smith V.C., Bishop J.M. und Shank P.R. (1978) Kinetics of synthesis, structure and purification of avian sarcoma virus-specific DNA made in the cytoplasm of acutely infected cells. J. Mol. Biol. 120:55

Vierra J. und Messing J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19:259-267.

Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T.R., Fareed F.D. und Richardson C.C. (1968) enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide oligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 243:4543-4549.

Withers-Ward E.S., Kitamura Y., Barnes J.P. und Coffin (1994) Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration *in vivo*. Genes & Development 8:1473

Wolff L. und Ruscetti S. (1985) malignant transformation of erythroid cells *in vivo* by introduction of a nonreplicating retrovirus vector. Science 228:1549-1552

Yang, Y.L., Guo L., Xu S., Holland C.A., Kitamura T., Hunter K. und Cunningham J.M. (1999) Receptors for polytropic and xenotropic mouse leukaemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. Nat Genet. 21(2):216-9.

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. A. Zander und der Abteilung für Zell- und Virusgenetik des Heinrich-Pette-Institutes unter der Leitung von Herrn Prof. W. Ostertag durchgeführt.

Mein Dank gilt den Herren Professoren Ostertag und Zander für die engagierte Betreuung dieser Arbeit und die vielen lehrreichen Diskussionen.

Für die freundliche und hilfreiche Unterstützung im Verlauf der experimentellen Arbeit bedanke ich mich bei Frau Dr. C. Stocking, Herrn Dr. Ch. Baum, Herrn Dr. Th. Wagner und Herrn Dr. A. Schopen.

9. Lebenslauf

- Geburtsdatum: 11.7.1970
Geburtsort: Hamburg
- Schulbildung: 1976-1980 Grundschule Braamkamp, Hamburg
1980-1982 Schweizer-Schule, Bangkok, Thailand
1982-1989 Heilwig-Gymnasium, Abitur Juni 1989
- Zivildienst: 1989-1990 Kinderkrankenhaus Altona, Hamburg
- Studium: Oktober 1990 - Juni 1997 Humanmedizin an
der Universität Hamburg
August 1992 ärztliche Vorprüfung
1993 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
August 1993 1. Staatsexamen
Juli 1994 - Juli 1995 Studium der Medizin in London
(University College London Medical School)
März 1996 2. Staatsexamen
April 1996 - April 1997 praktisches Jahr,
Universitätsklinik Hamburg
Juni 1997 Ärztliche Prüfung
- Doktorarbeit: Doktorvater: Prof. A. Zander. 1993 - 1996 experimentelle Arbeit
im Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und
Immunologie in der Abteilung von Prof. Ostertag. Thema:
"Konstruktion und Charakterisierung eines neuartigen retroviralen
Vektors für die Transduktion von hämatopoetischen
Stammzellen"
- Arzt im Praktikum: Oktober 1997 - März 1999 in der Abteilung für Hämatologie und
Onkologie (Leiter Prof. Dörken) der Robert-Rössle-Klinik der
Charité.

Seit April 1999 Assistenzarzt in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Robert-Rössle-Klinik der Charité.

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.