

ENTWICKLUNG RETROVIRALER VEKTOREN FÜR DEN EINSATZ IN DER GENTHERAPIE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Markus Hildinger
aus Pforzheim
Hamburg, Mai 1999

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1-2
Abkürzungen	3
Einleitung	4-47
Zielsetzung.....	4-7
Gentherapie.....	8-12
Definition.....	8
Anwendungsfelder der Gentherapie.....	9-10
Gentransfer-Vektoren.....	10-12
Retroviren.....	13-23
Allgemeine Eigenschaften.....	13
Klassifikation.....	14
Genom.....	14-15
Genexpresson.....	16
Retroviraler Lebenszyklus.....	17-20
Regulation der Genexpression.....	21-24
Retrovirale Vektoren.....	25-34
Grundlegendes Prinzip retroviraler.....	
Vektoren.....	26
Historische Entwicklung retroviraler.....	
Vektoren.....	27-30
Verpackungszellen.....	30-31
Entstehung replikationskompetenter.....	
Retroviren.....	31
Rearrangements / Fehlprozessierung.....	
in retroviralen Vektoren.....	32-34
Das Hämatopoetische System.....	35-37
Hämatopoese.....	35
Die hämatopoetische Stammzelle.....	36-37
Stammzellselektion.....	38-41
Bedeutung der Stammzellselektion.....	38
Multidrug-Resistenz-Protein 1.....	39
Anwendungsgebiete für MDR1.....	39-41
Koexpression.....	42-46
Definition.....	42
Koexpression über einen internen.....	
Promotor.....	42
Koexpression über eine IRES.....	43
Koexpression durch alternatives.....	
Spleißen.....	44-45
Anwendungsgebiete für Koexpression.....	46
Fragestellung.....	47

Ergebnisse.....	48-101
Die hohe Expression der FMEV-Vektoren in hämato- poetischen Zellen ist unabhängig vom übertragenen Gen.....	48-56
FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermög- lichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	57-69
Bicistronische retrovirale Vektoren für kombinierte Myelo- protektion und Zelloberflächenmarkierung.....	70-79
Die Modifizierung der <i>Leader</i> -Region in retroviralen Vektoren..... führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und..... verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination.....	80-90
Erhöhung des genotypischen Indexes, der Expression und..... Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryp- tischer Spleißstellen.....	91-101
Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick.....	102-117
Zusammenfassung (deutsch und englisch).....	102-110
Diskussion und Ausblick.....	111-117
MDR1-Resistenzgentransfer.....	111-112
Koexpression mehrerer Gene.....	113
Bedeutung des genotypischen..... Indexes.....	114
Einsatz von Retroviren in der..... Gentherapie.....	114-117
Material und Methoden.....	118-127
Vektorklonierung.....	113-123
Zellkultur.....	124-125
Diagnostische PCRs.....	126-127
Literaturübersicht.....	128-144
Danksagung	145

Abkürzungen

<i>att</i>	<i>attachment site</i>
C/EBP CFU	CAAT- <i>enhancer binding protein</i> <i>colony forming unit</i>
Δ LNGFR DR	<i>low-affinity nerve growth factor receptor</i> <i>direct repeat</i>
ELP EMCV <i>env</i>	<i>embryonal LTR binding protein</i> Encephalomyocarditisvirus <i>envelope</i>
FACS FMCF	<i>fluorescence activated cell sorting</i> <i>Friend Mink Cell Focus-forming Virus</i>
G418 <i>gag</i> GALV GFP GTU	Geneticin 418 <i>group specific antigen</i> <i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i> <i>enhanced humanized green fluorescent protein</i> G418 Resistance Transfer Units
HaMSV HIV	<i>Harvey Murine Sarcoma Virus</i> <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC ₅₀ IRES	halbmaximale inhibitorische Konzentration <i>internal ribosomal entry site</i>
kb(p)	Kilobasen(paare)
<i>leo</i> ^R LTR	<i>lacZ/neo</i> ^R Fusionsprotein <i>long terminal repeat</i>
MESV MDR1 MHC I MOI MoMLV MoMSV MPSV MTU	<i>Murine Embryonic Stem Cell Virus</i> Multidrug-Resistenz-Protein 1 <i>Major Histocompatibility Complex I</i> <i>multiplicity of infection</i> <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> <i>Moloney Murine Sarcoma Virus</i> <i>Myeloproliferative Sarcoma Virus</i> MDR Transduced Units
<i>neo</i> ^R NPTII	Neomycinphosphotransferase II - Gen Neomycinphosphotransferase II
Ψ PBS PEBP Pgp <i>pol</i> PP <i>pro</i>	Verpackungssignal Primerbindungsstelle <i>Polyomavirus-enhancer binding protein</i> P-Glykoprotein <i>polymerase</i> Polypurin-Trakt <i>protease</i>
Rh123	Rhodamin 123
SA SD SFFVp	Spleißakzeptor Spleißdonor <i>Spleen Focus Forming Virus</i> , polyzythemischer Stamm
UCR	<i>upstream control region</i>

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

Retrovirale Vektoren auf der Basis von Mausleukämieviren stellen gegenwärtig das am meisten verwendete und am besten charakterisierte System für den stabilen Gentransfer in somatische Zellen dar und sind somit bevorzugtes Werkzeug der Gentherapie.

Aufgrund der Natur der Retroviren mit bevorzugtem Tropismus in hämatopoetischen Zellen und stabiler Integration des Genoms in die Wirts-DNA bildet das hämatopoetische System ein optimales Anwendungsfeld für eine Gentherapie mit retroviralen Vektoren (Miller *et al.* 1993): Das gesamte hämatopoetische System leitet sich von wenigen, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Infiziert man eine solche Stammzelle, tragen alle davon abgeleiteten Zellen den retroviralen Vektor stabil in ihr eigenes Genom integriert und können das gewünschte Transgen exprimieren. Letztendlich können so aus einer einzigen transduzierten Stammzelle Millionen reifer Zellen hervorgehen, wodurch die Anzahl der Vektor-tragenden Zellen amplifiziert wird. Da sich frühe hämatopoetische Vorläuferzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut isolieren lassen, kann die Transduktion mit retroviralen Vektoren *in vitro* erfolgen. Anschließend werden die transduzierten Zellen dem Patienten reinfundiert.

Welche Anwendungen ergeben sich für eine retrovirale Gentherapie im hämatopoetischen System?

a) Bekämpfung von Tumoren

In der Tumorthherapie werden zwei unterschiedliche Ansätze für retrovirale Gentherapie verfolgt: Zum einen können Gene in die Tumorzellen eingeschleust werden, deren Produkte zum Absterben der Zelle führen oder immunstimulierend wirken (Braun *et al.* 1997; Tuting *et al.* 1997); zum anderen kann man auch Resistenzgene gegen in der Chemotherapie verwendete Zytostatika in die hämatopoetischen Zellen einschleusen, so daß die Myelotoxizität als Nebenwirkung der Chemotherapie vermindert wird (Li *et al.* 1992; Gottesman *et al.* 1993; Greenbaum *et al.* 1994; Magni *et al.* 1996; Jelinék *et al.* 1996; Rappa *et al.* 1997; Licht *et al.* 1997). In dieser Arbeit wird hauptsächlich der letzte Ansatz (Chemoprotektion hämatopoetischer Vorläuferzellen durch Resistenzgentransfer) verfolgt, der jedoch auch über die Tumorthherapie hinaus Anwendung für generelle Stammzellselektion findet (Baum *et al.* 1996a; Baum *et al.* 1997b).

b) Bekämpfung von Infektionskrankheiten

Hier wäre als Beispiel die HIV-Gentherapie anzuführen, bei der mittels retroviraler Vektoren Gene in T-Zellen eingeschleust werden, die eine weitere Vermehrung des HI-Virus unterbinden sollen (Yu *et al.* 1994).

c) Korrektur von Erbkrankheiten

Bei der Korrektur von Erbkrankheiten gibt es zwei Ansätze: Zum einen kann eine intakte Kopie des Gens retroviral in die defekten Zellen bzw. deren Vorläufer eingefügt werden (z. B. Globin-Gen bei Thalassämien in Reticulozyten bzw. deren Vorläufer; Pawliuk *et al.* 1998); zum anderen kann das hämatopoetische System auch als "Protein-Fabrik" ausgenutzt werden und Faktoren anstelle anderer Organe synthetisieren (z. B. α 1-Antitrypsin-Produktion oder Faktor VIII-Produktion durch hämatopoetische Zellen anstelle durch die Leber).

Was sind die Voraussetzungen für eine erfolgreiche retrovirale Gentherapie im hämatopoetischen System?

a) Stammzelltransduktion

Zuerst muß man die Stammzelle oder frühe pluripotente Vorläuferzellen definieren, aufreinigen und transduzieren können (Moritz *et al.* 1996; Conneally *et al.* 1998; von Laer *et al.* 1998). Bei der Transduktion ist der genotypische Index von Bedeutung. Dieser in der vorliegenden Arbeit eingeführte Begriff ist definiert als das Verhältnis der Anzahl der mit einem vollständigen, intakten Transgen transduzierten Zellen zur Anzahl aller transduzierten Zellen. Wünschenswert wäre ein genotypischer Index von 1, so daß alle transduzierten Zellen ein vollständiges, intaktes Transgen besitzen. Bei retroviralen Vektoren wird der genotypische Index hauptsächlich durch drei Faktoren vermindert (Coffin 1996): Fehlerhafte Transgene entstehen durch (I) Punktmutationen aufgrund der Fehlerrate der Reversen Transkriptase und RNA-Polymerase II sowie durch (II) Rearrangements / Rekombination während der reversen Transkription in der Zielzelle oder (III) kryptisches Spleißen in der Verpackungszelle (McIvor 1990; Sorrentino *et al.* 1995; Parthasarathi *et al.* 1995; Mikkelsen *et al.* 1998; Mansky 1998). Geht hierbei die Funktion des Proteins verloren, so zeigen nicht alle transduzierten Zellen den gewünschten Phänotyp. Zudem kann sich das *nonsense*-Protein als immunogen erweisen oder sich andersweitig nachteilig auf den Zellmetabolismus auswirken.

b) Transgen-Expression

Nach erfolgreicher Transduktion sollte das Transgen in den erwünschten Zielzellen exprimiert werden. Als Zielzellen kommen - je nach Anwendung - zum einen die Stammzelle und frühe hämatopoetische Vorläuferzellen direkt (z. B. Chemoprotektion von Stamm- und Vorläuferzellen im Rahmen der Tumorthherapie), zum anderen reifere Zellen (z. B. T-Zellen in der HIV-Gentherapie oder der adoptiven Immuntherapie) in Frage. Bei der Genexpression sollte man die quantitative von der qualitativen Genexpression unterscheiden: Die quantitative Genexpression spiegelt die Stärke des *Enhancers*/Promotors wieder, welches unter anderem in der Menge der synthetisierten RNA zum Ausdruck kommt. Da die synthetisierte RNA-Menge nur aufwendig zu bestimmen ist, verwendet man zumeist Reportergene und setzt die synthetisierte Proteinmenge des leicht nachzuweisenden Reporterproteins mit der synthetisierten RNA-Menge und somit der *Enhancer*/Promotor-Stärke gleich. Die qualitative Genexpression hingegen berücksichtigt die Menge an funktionell exprimiertem Zielprotein. Wenn alle Transkripte das intakte Transgenprodukt kodieren, wäre die qualitative Genexpression gleich der quantitativen. Theoretisch wäre jedoch auch vorstellbar, daß zwar alle Zielzellen eine intakte Kopie des Transgens besitzen (d. h. der genotypische Index 1 beträgt) und in allen Zielzellen

gleich viel RNA synthetisiert wird (gleiche quantitative Genexpression), in einigen Zielzellen jedoch die qualitative Genexpression erniedrigt ist, indem auf RNA-Ebene durch Spleißen des Transgentranskriptes das hieraus synthetisierte Protein deletiert ist und nicht die gewünschte Funktion aufweist.

c) hoher Anteil transduzierter Zellen (Chimärismus) / Stammzellselektion

Der Anteil transduzierter Zellen sollte *in vivo* ausreichend hoch sein, um therapeutischen Erfolg gewährleisten zu können. Da "die Stammzelle" an sich im Humansystem noch nicht ausreichend charakterisiert ist und sich die Infektion sehr früher Vorläuferzellen noch als schwierig erweist (von Laer *et al.* 1998), wäre eine Anreicherung transduzierter Zellen *in vitro* und *in vivo* sinnvoll. Zudem werden selbst bei sehr effizienter Transduktion aufgrund der Größenlimitation des Transplantates vermutlich weniger als 1% der hämatopoetischen Vorläuferzellen das Transgen exprimieren, da im Gegensatz zum Tiermodell eine letale Konditionierung vor Retransplantation beim Menschen medizinisch nicht vertretbar ist. Eine Anreicherung kann durch Koexpression eines therapeutischen Genes (z. B. das Gen für α -L-Iduronidase, ein Enzym, das bei Patienten mit Mucopolysaccharidose I fehlt; Bach *et al.* 1972) zusammen mit einem Oberflächenmarker für Anreicherung *in vitro* oder mit einem Resistenzgen für Anreicherung *in vivo* erfolgen. Als Oberflächenmarker käme z. Bp. der zytoplasmatisch deletierte *low-affinity nerve growth factor receptor* (Δ LNGFR; Ruggieri *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997) in Frage: Nach Transduktion können hier die Vektor-exprimierenden Zellen *in vitro* mit Anti-LNGFR-Antikörper markiert und über Immunoaffinitätssäulen oder *fluorescence activated cell sorting* (FACS) aufgereinigt werden. Im Hinblick auf Resistenzgene scheint das Gen für das Multi-drug-Resistenz-Protein 1 (MDR1), ein Membranprotein, das ein breites Spektrum klinisch relevanter Zytostatika aus Zellen ausschleust, vielversprechend (Gottesman *et al.* 1993). Appliziert man nach Rückgabe der transduzierten Zellen in den Patienten die entsprechenden Zytostatika in nicht-toxischen Dosen, wäre theoretisch eine Anreicherung transduzierter Zellen zu erwarten, da diese geschützt sind und somit einen Selektionsvorteil erfahren.

In der vorliegenden Arbeit sollten ausgehend von von Baum *et al.* 1995 publizierten Vektoren optimierte retrovirale Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie (Abbildung 1) entwickelt werden, die

- a) vom Transgen unabhängige, hohe Genexpression in hämatopoetischen Zellen vermitteln. Da die bisherigen Daten der von Baum *et al.* 1995 beschriebenen Vektoren im retroviralen Kontext ausschließlich unter Verwendung des MDR1-Gens erhoben wurden (Baum *et al.* 1995, 1996b, 1996c; Eckert *et al.* 1996), wurde in der vorliegenden Arbeit die Übertragbarkeit dieser Daten auf andere Transgene evaluiert. Daneben sollte der retrovirale *Leader* auf posttranskriptioneller Ebene optimiert werden unter dem Aspekt gesteigerter, vom Transgen unabhängiger Expression sowie erhöhter Sicherheit. (Der *Leader* ist der 5'-untranslatierte Bereich der retroviralen mRNA.)
- b) einen hohen genotypischen Index bezüglich des Transgens zeigen. So sollte der genotypische Index für MDR1 als Transgen bestimmt werden. Bisherige Daten deuteten bereits auf einen erniedrigten genotypischen Index für MDR1 hin (Sorrentino *et al.* 1995). Daneben sollte versucht werden, den genotypischen Index auf nahezu 1 anzuheben, indem die für den erniedrigten genotypischen Index verantwortlichen genetischen Mechanismen aufgeklärt und durch

konservative Mutationen unterdrückt werden. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die quantitative und qualitative Genexpression war auch Gegenstand dieser Arbeit, da ein größerer Anteil intakter mRNA auch eine erhöhte Transgen-Expression bedingen könnte.

- c) eine Stammzelleselektion und somit Stammzellexpansion ermöglichen durch den Einsatz eines Resistenzgens (MDR1) oder Oberflächenmarkers (Δ LNFR) und gleichzeitig auch die Möglichkeit der Koexpression eines therapeutischen Gens in ausreichenden Mengen bieten.
- d) erhöhte Sicherheit vor Entstehung replikationskompetenter Retroviren oder Synthese von Peptiden/Proteinen unbekannter Funktion bieten. Dies sollte erreicht werden durch Deletion nicht unmittelbar notwendiger viraler Sequenzen, durch Verhindern der Expression weiterer Leserahmen 5' des Transgens und durch Unterdrücken kryptischen Spleißens der cDNA.

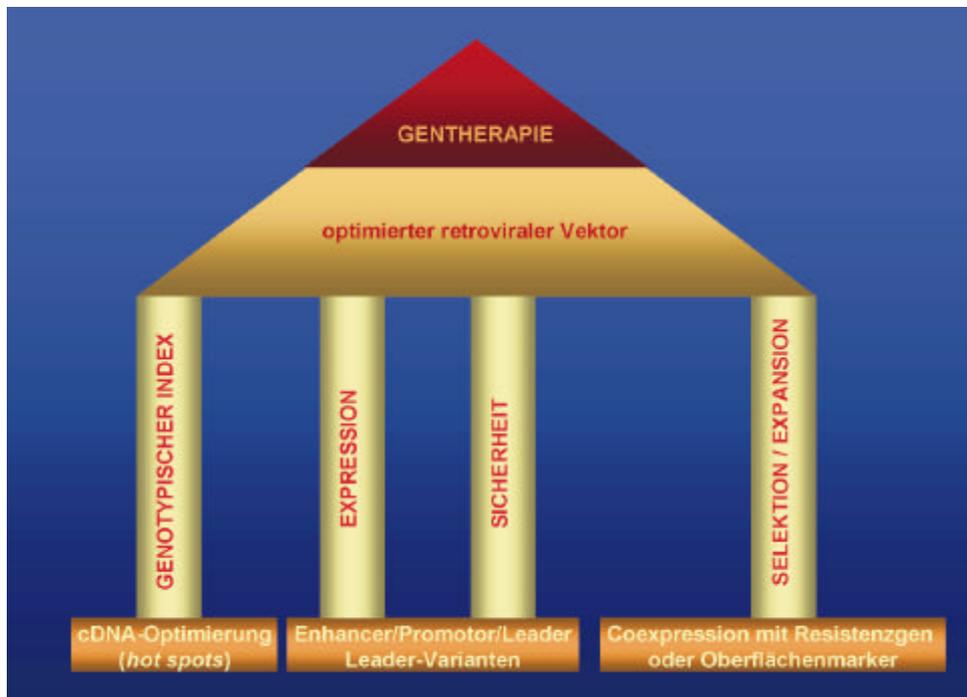


Abbildung 1: Basis eines optimierten retroviralen Vektors

1.2 Gentherapie

1.2.1 Definition

Unter Gentherapie versteht man eine medizinische Intervention, bei der Gene in Zellen eingeführt werden, um Krankheiten zu diagnostizieren oder zu heilen (Mulligan *et al.* 1993).

Hätte man vor 20 Jahren in einer der größeren bibliographischen Datenbanken unter dem Begriff "Gentherapie" gesucht, so hätte man bestimmt weniger als 100 Einträge gefunden. Heute hingegen existieren mindestens ein Dutzend unterschiedlicher Gentransferstrategien, die von Hunderten bis Tausenden Wissenschaftlern weiterentwickelt werden.

Der Anfang der Gentherapie reicht mindestens 25 Jahre zurück. Wissenschaftler, die mit dem *Shope papilloma* Virus arbeiteten, entdeckten, daß dieses das Enzym Arginase kodiert. So infizierten sie Patienten, die unter der seltenen Erbkrankheit *Hyperargininämie* litten, mit diesem Virus in der Hoffnung auf Heilung (Friedmann *et al.* 1972). Keiner der behandelten Patienten litt unter ernsthaften Nebenwirkungen, jedoch wurde auch keiner geheilt, ein Schicksal, welches dieser Ansatz mit vielen heute in klinischen Studien in Anwendung befindlichen Verfahren teilt.

Gentherapie läßt sich hauptsächlich in zwei verschiedene Kategorien unterteilen:

- a) somatische Gentherapie ↔ Keimbahntherapie
- b) *in vivo*-Gentherapie ↔ *ex vivo*-Gentherapie

zu a)

Bei der somatischen Gentherapie werden die Körperzellen des Patienten gentechnisch alteriert. Dies hat lediglich Auswirkungen auf die behandelte Person, meist sogar nur auf ein bestimmtes Organ oder wenige Zellen und zeitlich befristet, jedoch nicht auf deren Nachkommen. Im Gegensatz dazu betrifft die Keimbahntherapie einen ganzen Organismus von Beginn bis zum Ende seines Lebens. Auch dessen Nachkommen sind von der Alterierung betroffen. Die Keimbahntherapie kann in zwei verschiedenen Stadien erfolgen: vor der Befruchtung oder im frühen Postfertilisationsstadium. Die DNA wird entweder in einen der beiden Pronuklei injiziert, mittels eines Vektors in einen 4- oder 8-Zell-Embryo transferiert, oder es werden embryonale Stammzellen verwendet (Wivel *et al.* 1993).

zu b)

Bei der *in vivo*-Gentherapie wird der Vektor oder die DNA direkt in den lebenden Organismus appliziert, während bei der *ex vivo*-Gentherapie dem Patienten Zellen entnommen, außerhalb des Körpers gentechnisch alteriert und anschließend retransplantiert werden. Letztere bietet den Vorteil größerer Sicherheit, da eine Transfektion bzw. Transduktion anderer, nicht-beabsichtigter Zellen leichter vermieden werden kann. Jedoch bieten sich nur wenige Organe für einen *ex vivo*-Gentransfer an.

1.2.2 Anwendungsfelder der Gentherapie

Hauptsächlich ergeben sich drei Anwendungsfelder

- a) Korrektur von Erbkrankheiten
- b) Bekämpfung von Infektionskrankheiten
- c) Bekämpfung von Tumoren (Tumorthherapie)

zu a)

Die Anfänge der Gentherapie beruhen auf der Therapie von Gendefekten. Neben der Hyperargininämie wurde in den Anfangsjahren der Gentherapie zudem an der Therapie einer besonderen Form der schweren kombinierten Immundefizienz gearbeitet, die auf dem Fehlen des Enzyms Adenosin-desaminase beruht (Kantoff *et al.* 1986). Bald folgten Erbkrankheiten wie Mukoviszidose (Drumm *et al.* 1990), lysosomale Speicherkrankheiten (Fink *et al.* 1990), Muskeldystrophie (Partridge 1991) und andere. Heute findet man in den bibliographischen Datenbanken fast zu jeder Erbkrankheit, deren genetische Grundlagen aufgeklärt wurden, einen gentherapeutischen Behandlungsansatz. Bei der Korrektur von Gendefekten unterscheidet man drei generelle Ansätze: Zum einen kann das defekte Gen oder die für den Defekt verantwortliche Mutation direkt ausgetauscht werden. Erste Erfolge zeichnen sich bereits ab durch Verwendung von DNA/RNA-Oligohybriden, die eine ortsspezifische Rekombination oder Sequenzreparatur ermöglichen (Kren *et al.* 1998). Hier wird derzeit jedoch noch die Rekombinationsfrequenz kontrovers diskutiert. Zum anderen kann eine intakte Kopie des Gens in die defekten Zellen bzw. deren Vorläufer mittels unterschiedlicher Methoden (Abbildung 2) eingeschleust werden (z. B. das Globin-Gen bei Thalassämien in Reticulozyten bzw. deren Vorläufer (Pawliuk *et al.* 1998). Zuletzt besteht noch die Möglichkeit, das fehlende Genprodukt durch andere Zellen oder künstliche Organe, sogenannte *Organoide*, synthetisieren zu lassen (z. B. α 1-Antitrypsin, Faktor VIII, Insulin; Culliton 1989).

zu b)

Bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten stehen HIV-Prophylaxe und -Bekämpfung sowie DNA-Vakzinierung im Vordergrund. Im Rahmen der HIV-Immuntherapie versucht man durch Transfektion bzw. Transduktion von Genen, die für transdominante Faktoren kodieren, die Ausbreitung des HIV-Virus in Infizierten zu unterbinden (Yu *et al.* 1994). Bei der DNA-Vakzinierung (Ramsay *et al.* 1997) wird nackte DNA, die für virale oder bakterielle Proteine bzw. Proteinfragmente kodiert, direkt in den Muskel injiziert (vgl. 1.2.3.1). Die DNA oder exprimierte Proteine werden dort von Langerhans-Zellen aufgenommen, die sich zu dendritischen Zellen differenzieren. Diese präsentieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen die synthetisierten Peptide dem Immunsystem, wodurch es zu einer Immunantwort und potentiellen Immunisierung kommt, ohne daß die Gefahr einer tatsächlichen Infektion wie bei der Immunisierung mit attenuierten Pathogenen gegeben ist. Weitere Vorteile von DNA-Vakzinen gegenüber den konventionellen sind die niedrigeren Produktionskosten, die unproblematische Lagerung sowie geringere Entwicklungskosten. Erste DNA-Vakzine werden bereits klinisch getestet (z. B. ein DNA-Vakzin gegen das Hepatitis-C-Virus; Inchauspe 1997).

zu c)

In der Onkologie bzw. Tumorthherapie werden fünf unterschiedliche Ansätze verfolgt (Baum *et al.* 1996e; Davis *et al.* 1996; Dachs *et al.* 1997; Tuting *et al.* 1997; Licht *et al.* 1997): Zum einen können Gene in die Tumorzellen eingeschleust werden, deren Produkte entweder zum Absterben der Zelle führen (Suizidgentransfer), immunstimulierend wirken (Tumorstimmung) oder als Tumorsuppressoren wirken (Tumorsuppressorgentransfer); zum anderen versucht man, schnell-prolierende Nicht-Tumorzellen vor den Nebenwirkungen der Chemotherapie durch den Transfer von Resistenzgenen zu schützen (Resistenzgentransfer). Der letzte Ansatz ist die adoptive Immuntherapie: Im Rahmen der Leukämiebehandlung wird häufig mittels Chemo- und Strahlentherapie das gesamte hämatopoetische System des Patienten und damit auch die leukämischen Blutzellen zerstört. Da sich das gesamte blutbildende System aus Stammzellen regenerieren lässt, kann der Patient anschließend durch Knochenmarktransplantation eines Spenders gerettet werden. In einigen Fällen tritt jedoch eine Autoimmunreaktion beim Empfänger auf (*graft-versus-host-disease*), die durch Spender-Immunkzellen (genauer: T-Zellen) im Transplantat hervorgerufen wird. Transduziert man die T-Zellen *ex vivo* vor Retransplantation mit einem Suizidgenvektor, können, falls es zu einer Immunreaktion kommt, die transduzierten Zellen selektiv eliminiert werden.

1.2.3 Gentransfer-Vektoren

Unter Gentransfer-Vektoren versteht man Hilfsmittel, die genetische Information in Zellen einzuschleusen vermögen. Hierbei unterscheidet man zwischen nicht-viralen, viralen und bakteriellen Vektoren (Abbildung 2):

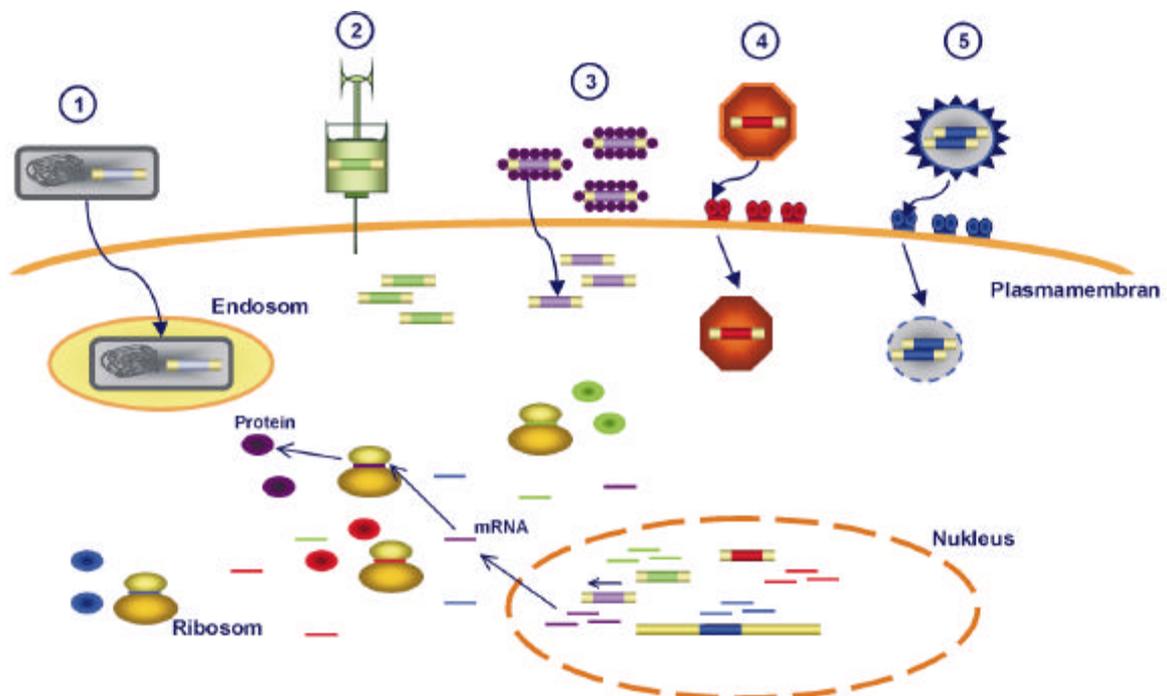


Abbildung 2: Gentransfer-Methoden
nackte DNA (2)
DNA/Lipid/Liposomen-Komplexe (3)
bakterielle Vektoren (1)
adenovirale Vektoren (4)
retrovirale Vektoren (5)

1.2.3.1 Nicht-virale Vektoren

Die Liste nicht-viraler Vektoren (Kay *et al.* 1997) ist umfangreich, angefangen von nackter DNA, die in gelöster Form oder komplexiert mit Goldpartikeln in Muskelzellen im Rahmen der DNA-Vakzinierung injiziert wird, über an Lipide/Liposomen gekoppelte DNA bis zu mit Liganden (z. B. Transferrin) verbundener DNA.

Bei den nicht-viralen Vektoren erfolgt die Verabreichung zumeist *in vivo*, wobei der Vektor mit Ausnahme der Rezeptor/DNA-Komplexe unspezifisch von den Zellen aufgenommen wird; ein spezifisches *targeting*, d. h. eine Transfektion einer definierten Zellpopulation, findet somit nicht statt. Ebenso werden die transferierten Gene nicht stabil in das Wirtsgenom integriert und im Laufe der Zeit abgebaut. Eine Ausnahme hierbei bilden sogenannte episomale Vektoren, die außerhalb des Genoms als Episomen autonom replizieren und auf diese Weise in ihrer Zielzelle mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-5} persistieren können (Günzburg *et al.* 1997).

Eine vielversprechende Anwendung ist die bereits beschriebene DNA-Vakzinierung (Ramsay *et al.* 1997). Ferner wurden Versuche zur Behandlung der Mukoviszidose durch Inhalation von DNA/Liposomen-Komplexen unternommen - bisher jedoch ohne Erfolg (Alton *et al.* 1995).

Nicht-virale Vektoren gewährleisten keine dauerhafte Genexpression (was jedoch im Rahmen der DNA-Vakzinierung sogar vorteilhaft sein kann) und weisen keinen Zelltropismus auf. Zudem ließe sich spekulieren, daß es sowohl bei der DNA-Vakzinierung als auch bei der Verabreichung von Rezeptor/DNA-Komplexen zur Bildung von Autoimmunantikörpern (analog dem Systemischen Lupus Erythematodes) kommen könnte. Ferner zeigen speziell DNA/Liposomen-Komplexe zur Zeit noch eine geringe Transfektionseffizienz *in vivo*, zumal bei Verwendung kationischer Lipide die Komplexe relativ unspezifisch an Endothelzellen binden (Alton *et al.* 1995).

1.2.3.2 Virale Vektoren

Den nicht-viralen Ansätzen stehen die viralen gegenüber: retrovirale Vektoren abgeleitet von Mausretroviren oder Lentiviren, adenovirale Vektoren, parvovirale Vektoren beruhend auf dem Adenoassoziierten Virus und neuerdings auch Vektoren abgeleitet von Simian Virus 40, Epstein-Barr-Virus, Herpes Simplex Virus, Vaccinia-Virus und Baculoviren. Die größte Verbreitung und Bedeutung kommt jedoch den retroviralen und adenoviralen Vektoren zu (Günzburg *et al.* 1997).

Eine stabile Genomintegration gewährleisten aus heutiger Sicht lediglich Retroviren (Coffin 1996) und - mit gewisser Einschränkung - Parvoviren (Cann 1993; Ding *et al.* 1997). Beide rufen zudem kaum immunologische Reaktionen hervor, ganz im Gegensatz zu Adenoviren, die zwar mit hoher Effizienz Zielgewebe wie die Leber transfizieren können, jedoch weder stabil integrieren noch immunologisch unbedenklich sind (Yang *et al.* 1994; Lee *et al.* 1995). Vielmehr sind beim Einsatz adenoviraler Vektoren der ersten Generation gerade die transduzierten Zellen über Expression adenoviraler Proteine für den Angriff durch die körpereigene Abwehr prädestiniert. Jedoch scheint dieses Problem in neueren adenoviralen Vektoren (*gutless* Vektoren) überwunden, da diese bis auf die *inverted repeats* an den Enden keine adenoviralen Sequenzen enthalten (Kochanek *et al.* 1996). Der Nachteil von Retroviren besteht hauptsächlich in ihrer geringen Aufnahmekapazität von ca. 10 Kilobasenpaaren (kbp) sowie ihrer hohen Rekombinations- und Mutationsrate. Außerdem können Retroviren mit Ausnahme der

Lentiviren nur sich teilende Zellen infizieren. Auf Retroviren allgemein und retrovirale Vektoren wird in den beiden nachfolgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen.

Eine Gefahr bei Verwendung viraler Vektoren ist stets eine unbeabsichtigte Kontamination mit (im Falle von Adenoviren) Wildtypviren oder (bei Retroviren) replikationskompetenten Viren, die während der Vektorproduktion entstehen können (Anderson *et al.* 1993). Bei der genomischen Integration kommt zudem die Möglichkeit der Zerstörung wichtiger Gene durch die Insertion sowie die Fremdaktivierung benachbarter Gene hinzu (Gray 1991).

1.2.3.3 Bakterielle Vektoren

Die Verwendung bakterieller Vektoren zum Gentransfer fand erst in den letzten Jahren Einzug in die Genterapie (Sizemore *et al.* 1995). So wurde zum Beispiel ein bakterieller Gentransfer-Vektor auf Shigellen-Basis entwickelt, der in Säugetierzellen eindringen kann und Plasmide in deren Zytosol einschleust. *In vivo* ließen sich auf diese Weise Darmmucosazellen infizieren (Sizemore *et al.* 1995). Erst kürzlich wurde gezeigt, daß sogar *E. coli* K12 Bakterien durch Kokultivierung mit phagozytischen Zellen und Makrophagen Gene in eukaryontische Zellen transferieren können, vorausgesetzt, sie besitzen das *invasin* Gen von *Yersinia pseudotuberculosis* (Grillot-Courvalin *et al.* 1998).

Für die Tumorthherapie wurden anaerobe Bakterien vorgeschlagen, die sich spezifisch in den hypoxischen, nekrotischen Tumorregionen ansammeln und dort keimen, was letztendlich zur Tumorlyse führt. Dies konnte anhand intravenöser Injektion und somit systemischer Applikation von Clostridium-Sporen nachgewiesen werden (Minton *et al.* 1995). Ein Weiterentwicklung dieses Ansatzes stellt die zusätzliche Expression eines Enzyms durch die Clostridien innerhalb des Tumors dar, das eine systemisch applizierte Verbindung in einen toxischen Metaboliten umwandelt. Bisher wurde erfolgreich das bakterielle *E. coli* - Enzym Cytidindesaminase (Fox *et al.* 1996) sowie Nitroreduktase (Lemmon *et al.* 1997) durch Clostridien exprimiert, welches im Falle der Cytidindesaminase das harmlose 5-Fluorocytosin in das toxische 5-Fluoruracil, im Falle der Nitroreduktase das nicht-toxische CB1954 in seine DNA-alkylierende, aktive Form umwandelt.

1.3 Retroviren

1.3.1 Allgemeine Eigenschaften

Retroviren kommen hauptsächlich bei Vertebraten, jedoch auch bei Insekten und Mollusken vor. Sie sind mit vielen Krankheiten wie Krebs, neurologischen Störungen und Immundefizienzen assoziiert, können jedoch auch zu einer lebenslangen Virämie ohne erkennbare Symptomatik führen. Dennoch zeigen die meisten Retroviren in ihrer Virionstruktur, Genomorganisation und Replikationsmethode große Übereinstimmungen (Coffin 1996).

Das Virion bzw. Viruspartikel besitzt einen Durchmesser von ca. 100 nm und ist von einer Membran umgeben. In dieser Membran ist das Hüllprotein, ein Multimer aus zwei Proteinuntereinheiten, kodiert von dem retroviralen *env*-Gen (*env*: *envelope*), verankert. Die Membran umschließt das Nukleokapsid oder *core*, eine sphärische bis konische Struktur, die aus den 3 bis 4 Genprodukten des *gag*-Gens (*gag*: *group specific antigen*) aufgebaut ist. Ebenfalls im Nukleokapsid befinden sich mehrere Proteine, die am korrekten Ablauf des retroviralen Replikationszyklus beteiligt sind. Hier wären eine Protease, kodiert durch das *pro*-Gen (*pro*: *protease*) sowie zwei von dem *pol*-Gen (*pol*: *polymerase*) kodierte Genprodukte zu erwähnen: die Reverse Transkriptase, die das "Umschreiben" von einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA (= reverse Transkription) katalysiert, sowie die Integrase, die für das kovalente Verknüpfen der viralen cDNA mit der genomischen Wirts-DNA verantwortlich ist (Coffin 1996).

Das Genom besteht aus zwei, gewöhnlich identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen aus 7 bis 10 kb. Wie fast alle zellulären mRNAs besitzt auch die virale, genomische RNA eine 5'-*cap* und einen 3'-poly(A)-Schwanz. Die Gene für die Strukturproteine sind immer in der Reihenfolge *gag-pro-pol-env* angeordnet. Einige Retroviren besitzen zudem noch weitere Gene, die an der Regulation der Virusexpression beteiligt sind. Solche Retroviren bezeichnet man als komplexe Retroviren, die anderen als einfache Retroviren (Coffin 1996).

Der Replikationszyklus kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Die erste Phase beinhaltet das Anheften (*attachment*) des Virions über sein Hüllprotein an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor, den Eintritt des *cores* in das Zytoplasma, die reverse Transkription, den Transfer des *cores* in den Nukleus sowie die Integration der retroviralen DNA als sogenanntes Provirus in das Wirtsgenom. Die zweite Phase umfaßt Synthese und Prozessierung des viralen Genoms sowie der viralen mRNAs und Proteine unter Verwendung zellulärer Systeme der Wirtszelle, die Inkapsidation bzw. Verpackung des Genoms zusammen mit unprozessierten Genprodukten von *gag*, *pro* und *pol*, die Assoziation der Nukleokapside mit der Zellmembran, die Freisetzung der Virionen durch Knospung (= *budding*) unter Inkorporieren unprozessierter *env*-Genprodukte in die Hülle und abschließend die Prozessierung der Vorläuferproteine in die fertigen Genprodukte (Coffin 1996).

Zusätzlich wird die virale, integrierte, doppelsträngige DNA zusammen mit der zellulären DNA repliziert, wodurch eine Weitergabe der genetischen Information an die Tochterzellen gewährleistet wird. Da kein natürlicher Mechanismus für das Herausschneiden retroviraler Proviren existiert, verbleiben diese im Genom. Die Replikation erfolgt somit zum einen durch die Replikation der Wirtszelle, zum anderen durch die Synthese neuer Virionen (Coffin 1996).

1.3.2 Klassifikation

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) wird in insgesamt 7 Genera unterteilt (s. Tabelle 1).

Genus	Beispiel für Spezies	Wirt
Alpharetrovirus	<i>Avian leukosis Virus</i>	Vertebraten
Betaretrovirus	<i>Mason-Pfizer monkey Virus</i>	Vertebraten
Gammaretrovirus	<i>Murine Leukemia Virus</i>	Vertebraten
Deltaretrovirus	<i>Bovine leukemia Virus</i>	Vertebraten
Epsilonretrovirus	<i>Walleye dermal sarcoma Virus</i>	Vertebraten
Lentiretrovirus	<i>Human immunodeficiency Virus 1</i>	Vertebraten
Spumaretrovirus	<i>Human Spumavirus</i>	Vertebraten

Tabelle 1: Klassifikation der Retroviren (gemäß *National Institutes of Health, USA*; Dezember 1998) (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/viruslist/dnaandrna_viruses.pdf)

In der Gentherapie finden vor allem retrovirale Vektoren abgeleitet von Gammaretroviren (Miller *et al.* 1989) und Lentiretroviren (Naldini 1998) Anwendung. Bei den Gammaretroviren wiederum beruhen die meisten Vektoren auf Mausleukämieviren, insbesondere Friend- und Moloney-Mausleukämieviren. Das Moloney-Virus in seiner Wildtyp-Form verfügt über einen breiten Zelltropismus und induziert nach langer Latenzperiode in Mäusen ein T-Zell-Lymphom. Die Friend-Viren hingegen induzieren in ihrer Wildtyp-Form eine murine Erythroblastose, die später zu einer Erythroleukämie führen kann (Ostertag *et al.* 1981).

Da in der vorliegenden Arbeit retrovirale Vektoren abgeleitet von Mausleukämieviren vorgestellt werden, widmet sich der Rest des Kapitels dieser Spezies bzw. dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (= MoMLV) als einem Vertreter der Mausleukämieviren.

1.3.3 Genom

Das Genom des MoMLV (Abbildung 3) umfaßt ca. 8 kb und ist diploid, bestehend aus zwei identischen (+)-RNA-Molekülen mit jeweils einem 5'-*cap* und 3'-poly(A)-Schwanz.

Das integrierte Provirus wird von den sogenannten *long terminal repeats* (= LTR) umrahmt. Dies sind direkte Wiederholungen, die erst während der reversen Transkription entstehen. Gegliedert wird die LTR in die U3-Region (U: *unique*), R-Region und U5-Region. Die U3-Region besteht aus ca. 500 bp und nimmt die *Enhancer*- und Promotorfunktionen wahr. Die ca. 60 bp umfassende R-Region enthält das *cap*- und das Polyadenylierungssignal. Die ca. 75 bp große U5-Region ist für die reverse Transkription notwendig. 5' der U3-Region und 3' der U5-Region befindet sich jeweils die *att*-Sequenz (*att*: *attachment*). Diese wird von der Integrationsmaschinerie erkannt und dient somit der Integration der viralen cDNA in das Wirtsgenom (Coffin 1996).

Die R-Region bildet zusammen mit der U5-Region, der Primerbindungsstelle (= PBS) und dem Verpackungssignal (= Ψ) den sogenannten *Leader*, den 5'-untranslatierten Bereich. Die Primerbindungsstelle bindet den tRNA-Primer, der als Startpunkt für die reverse Transkription unerlässlich ist. Die untranslatierte Region zwischen der PBS und dem Beginn des *gag*-Gens besitzt zwei wichtige Funktionen: Sie enthält zum einen das Verpackungssignal Ψ , das für das spezifische Verpacken genomischer Virus-RNA in das Nukleokapsid notwendig ist (Berkowitz *et al.* 1996); zum anderen befindet sich 5' von Ψ der retrovirale Spleißdonor, der für das Entstehen der subgenomischen RNA, die für das *env*-Protein kodiert, verantwortlich ist. Da sich der retrovirale Spleißdonor 5' von Ψ befindet, werden sämt-

liche gespleißten Transkripte, die demzufolge auch kein Verpackungssignal besitzen, nicht in die Nukleokapside verpackt (s. 1.3.5.3).

Auf den *Leader* folgen die Strukturgene *gag*, *pro*, *pol* und *env*, wobei sich im *pol*-Gen ein Spleißakzeptor befindet, der mit dem retroviralen Spleißdonor in Wechselwirkung tritt und somit die subgenomische RNA entstehen läßt, die für das *env*-Protein kodiert. Im engeren Sinn sollte man weder *pro* noch *pol* als selbständige Gene betrachten, da ihre Genprodukte als C-terminale Verlängerungen des Gag-Proteins translatiert werden und erst posttranslational proteolytisch freigesetzt werden (Coffin 1996).

Im 3'-untranslatierten Bereich befindet sich kurz vor der 3'-LTR der Polypurin-Trakt. Dieser ist für ein effizientes Ablaufen des retroviralen Lebenszyklus notwendig, da er als Primer für die Synthese der (+)-Strang-DNA dient. Vor kurzem wurde noch ein weiteres Element, die sogenannte U-Box, 5' des Polypurin-Traktes beschrieben (Ilyinskii *et al.* 1998), das ebenfalls für ein korrektes Ablaufen der reversen Transkription mitverantwortlich ist. In der 3'-LTR - genauer in deren R-Region - befindet sich das Polyadenylierungssignal, welches die Terminierung der viralen mRNA einleitet: Der poly(A)-Schwanz wird ca. 30 bp 3' dieses Signales, d. h. am Ende der R-Region, angeheftet (Coffin 1996).

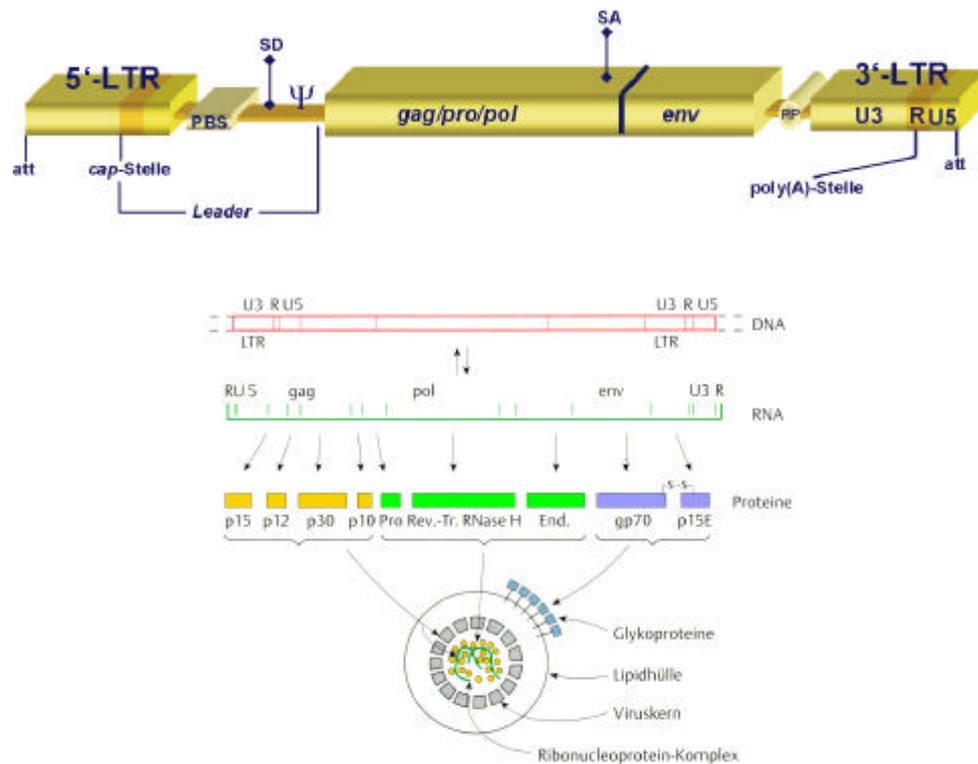


Abbildung 3: Genom des *Moloney Murine Leukemia Virus*

oben: schematische Skizze

unten: Detailansicht (Knippers 1995)

att	attachment site
PBS	Primerbindungsstelle
SD	Spleißdonor
Ψ	Verpackungssignal
SA	Spleißakzeptor
PP	Polypurin-Trakt

1.3.4 Genexpression

Das *gag*-Gen wird von einem ungespleißten Transkript aus translatiert. Das hierbei entstehende Polyprotein wird anschließend proteolytisch gespalten, wodurch die vier Kapsidproteine p15 (Matrixprotein, MA), p12, p30 (Kapsidprotein, CA) und p10 (Nukleinsäure-bindendes Protein, NC) entstehen. Das Matrixprotein wird posttranslational myristyliert und verankert das Nukleokapsid mit der umgebenden Membranhülle. Das hydrophobe Kapsidprotein bildet die Schale (*core*), während das basische NC-Protein mit der genomischen RNA assoziiert ist. Die Funktion des Proteins p12 ist noch nicht geklärt (Coffin 1996).

5' des *gag*-Leserahmens befindet sich im gleichen Leserahmen ein CTG-Startcodon, das auch Verwendung findet und zur Synthese einer glykosilierten Oberflächen-Variante des *gag*-Proteins führt. Außerdem befinden sich noch weitere kurze Leserahmen 5' des *gag*-Leserahmens, deren Funktion noch unbekannt ist. Im Falle der Alpharetroviren konnte jedoch die Translation eines dieser Leserahmen in ein Peptid nachgewiesen werden (Coffin 1996).

Das *pro*-Gen kodiert die Protease, die für die proteolytische Spaltung des Gag/Pro/Pol-Polyproteins verantwortlich ist, das *pol*-Gen die bereits erwähnte Reverse Transkriptase und Integrase. Alle drei Gene werden bei Mausleukämieviren vom gleichen Leserahmen aus gelesen. Jedoch befindet sich zwischen *gag* und *pro-pol* ein UAG-Stoppcodon. Teilweise wird dieses Stoppcodon von der Translationsmaschinerie unterdrückt und ein Glutamin eingebaut (*nonsense* Suppression). Verantwortlich dafür sind RNA-Sequenzen 5' des Stoppcodons. Somit kann das *gag*-Stoppcodon passiert werden, und die Translation zu einem Gag-Pro-Pol-Polyprotein wird fortgesetzt. Dieser Mechanismus reguliert gleichzeitig die Menge synthetisierten Gags zu synthetisiertem Pro und Pol (Coffin 1996)

Bei MoMLV bzw. allgemein bei Mausleukämieviren überlappt das 3'-Ende des *pol*-Gens mit dem Anfang des *env*-Gens, das jedoch in einem anderen Leserahmen translatiert wird. Somit befinden sich keine untranslatierten Sequenzen zwischen *pol* und *env*. Das *env*-Gen kodiert die zwei Hüllglykoproteine, die durch Proteolyse aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entstehen. Das größere der beiden Proteine, das *surface* (SU) Protein, ist für die Erkennung des entsprechenden Rezeptors auf der Zielzelle verantwortlich, während das kleinere Transmembran (TM) Protein den Komplex in der Virionhülle verankert und Domänen für die Fusion der viralen mit der zellulären Membran enthält. Im Gegensatz zu *gag*, *pro* und *pol* wird *env* - wie bereits erwähnt - von einer gespleißten, subgenomischen RNA aus translatiert, wobei sich der Spleißakzeptor im *pol*-Gen befindet.

Das *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Gen bzw. deren Genprodukte sind bei den Mausleukämieviren für ein vollständiges, funktionelles Ablaufen des retroviralen Lebenszyklus ausreichend (Coffin 1996).

1.3.5 Retroviraler Lebenszyklus

Der retrovirale Lebenszyklus lässt sich in mehrere Phasen unterteilen (Coffin 1996), die fließend ineinander übergehen (Abbildung 4):

- 1) *Attachment* (Adsorption bzw. Anheftung) des Virions an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor
- 2) Penetration (Eindringen) des Virions in die Zelle und *uncoating*
- 3) Reverse Transkription innerhalb des *cores*
- 4) Transfer der immer noch mit Virionproteinen assoziierten DNA in den Nukleus
- 5) Integration der viralen DNA als Provirus in das Wirtsgenom an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle
- 6) Synthese viraler RNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II unter Verwendung des integrierten Provirus als Matrize
- 7) Prozessierung der Transkripte: Entstehen genomischer und subgenomischer RNAs
- 8) Synthese der Virionproteine
- 9) *Assembly* (Ansammlung und Zusammenbau) und Freisetzung der Virionen an P-Seite der Plasmamembran durch *budding* (Knospung) ohne Zerstörung der Wirtszelle
- 10) Proteolytische Prozessierung der Kapsidproteine (Maturation bzw. Reifung)

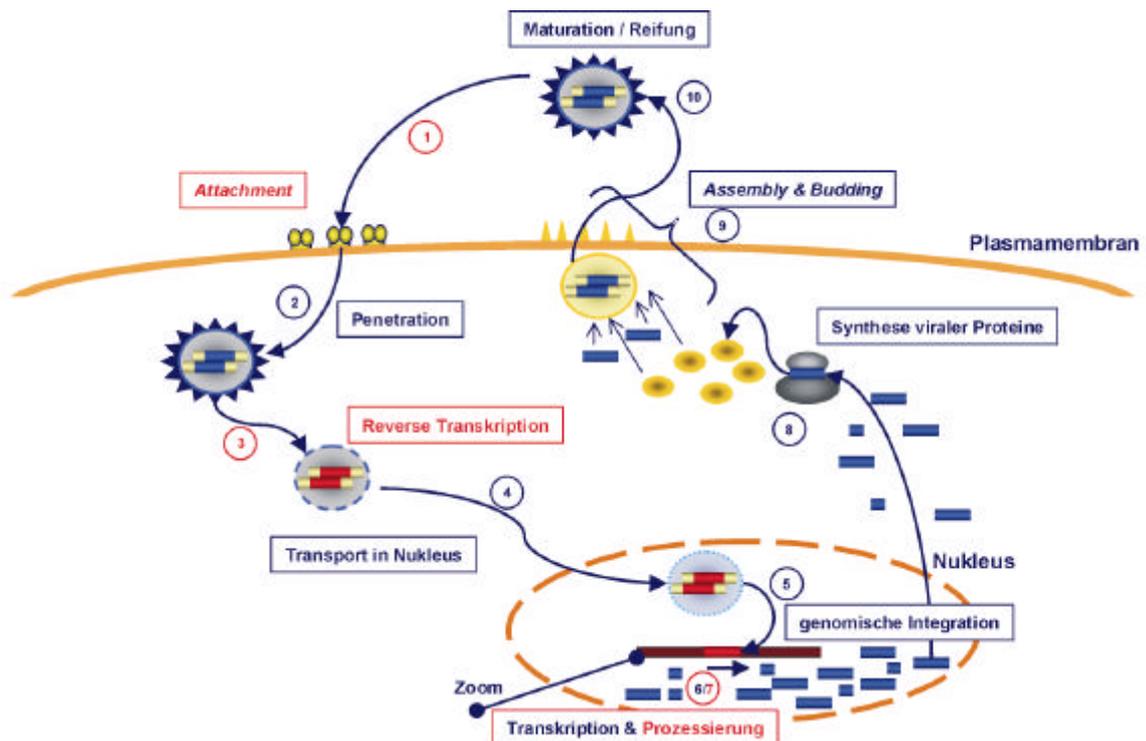


Abbildung 4: Retroviraler Lebenszyklus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind besonders die Phasen *attachment*, reverse Transkription und Prozessierung der Transkripte von Bedeutung und sollen im folgenden näher erläutert werden.

1.3.5.1 Attachment

Unter *attachment* bzw. Adsorption versteht man das Anheften (Erkennen und Binden) des Retrovirus an seinen spezifischen Rezeptor auf der E-Seite der Plasmamembran mittels der SU-Domäne seines Hüllproteins. Es werden verschiedene Hüllproteine unterschieden, die jeweils andere Rezeptoren erkennen. So bindet zum Beispiel das ökotrope *env*-Protein an den MLV-E-Rezeptor (= mCAT-1; Wang *et al.* 1991), einen Translokator für basische Aminosäuren, während das amphotrope *env*-Protein an den MLV-A-Rezeptor (= Pit-2) bindet, einen Phosphat-Translokator (Kavanaugh *et al.* 1994). Die Art des *env*-Proteins determiniert somit den Zelltropismus des Retrovirus, da die Rezeptoren nicht in allen Spezies vorkommen und innerhalb eines Organismus differenzierungsabhängig exprimiert werden. Dies ist besonders wichtig für gentherapeutische Anwendungen (s. 1.4.2), da hier das *env*-Protein darüber entscheidet, ob eine Infektion der beabsichtigten Zielzelle theoretisch überhaupt stattfinden kann (Coffin 1996; von Laer *et al.* 1998).

1.3.5.2 Reverse Transkription

Im Zuge der reversen Transkription wird die virale RNA in einem komplexen Ablauf (Abbildung 5) in DNA umgeschrieben. Hierbei kann es zu Punktmutationen, größeren Sequenzrearrangements und Rekombinationsereignissen kommen. Zwar sind diese genetischen Mechanismen für das Retrovirus evolutionär von Vorteil, weil hierdurch eine Vielzahl neuer Varianten generiert und somit der Genpool vergrößert wird, für Anwendungen in der Gentherapie jedoch von Nachteil, weil hier möglichst alle Virionen den gewünschten Genotyp unverändert besitzen sollten (Coffin 1996).

Da das Auftreten und die Bedeutung von Sequenzrearrangements und Rekombinationsereignissen in retroviralen Gentherapievektoren Teil dieser Arbeit ist, sollen die zugrunde liegenden Mechanismen hier näher erläutert werden.

Die Wahrscheinlichkeit für eine Punktmutation setzt sich aus der Fehlerrate der Reversen Transkriptase und der RNA-Polymerase II zusammen, die beide eine Fehlerrate von ca. 10^{-4} bis 10^{-5} pro Base und Replikationszyklus aufweisen (Mansky 1998), während die Fehlerrate bei der eukaryontischen DNA-Replikation bei ca. 10^{-7} liegt (Knippers 1995). Die erhöhte Mutationsrate der Reversen Transkriptase und RNA-Polymerase II lässt sich durch das Fehlen einer Korrekturlesedomäne erklären.

Neben Punktmutationen kommt es jedoch auch zu intragenomischen Rearrangements: Deletionen, Duplikationen, Inversionen oder Mischformen. Die Ursache dieser Rearrangements liegt großteils in Fehlern während der reversen Transkription, wie falsches Priming, vorzeitige Termination der Strang-Synthese, falscher Ende-zu-Ende-Strang-Transfer oder Rückfaltungen innerhalb der Matrize, die zu Inversionen führen. Die beiden häufigsten Formen des Rearrangements sind jedoch Duplikation und Deletion von Sequenzen, was wahrscheinlich auf "Fehlsprünge" während der reversen Transkription zurückzuführen ist. Mutationen dieser Art können als Folge eines inkorrekten Rekombinationsereignisses betrachtet werden, da häufig kurze identische Sequenzabschnitte an Deletionen und Duplikationen beteiligt sind.

Die hohe Rekombinationsrate ist eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der Retroviren. Rekombinationen können sich bei gleichzeitiger Infektion mit verschiedenen exogenen Retroviren oder zwischen exogenen und endogenen Retroviren, aber auch innerhalb eines Virus oder zwischen dem Virus und nicht-verwandter Wirtszellinformation (s. Entstehung onkogener Retroviren) ereignen. Re-

kombination findet also sowohl innerhalb eines Stranges als auch zwischen verschiedenen Strängen statt, so daß Retroviren auch fremde Sequenzen (wie z. B. Onkogene) erwerben können. Für Mausleukämieviren beträgt die Rekombinationsrate ca. 4% pro kb und Replikationsrunde (Mansky 1998). Durch identische Sequenzabschnitte innerhalb eines Stranges bzw. zwischen verschiedenen Strängen wird die Rekombinationswahrscheinlichkeit zudem um bis zu drei Größenordnungen gegenüber nicht-homologen Sequenzen erhöht: Je höher die Sequenzidentität, desto höher ist auch die Rekombinationswahrscheinlichkeit. Es gibt mehrere Modelle, die die retrovirale Rekombination erklären; allen gemein ist jedoch, daß die Rekombination im Rahmen der reversen Transkription auf DNA-Ebene stattfindet.

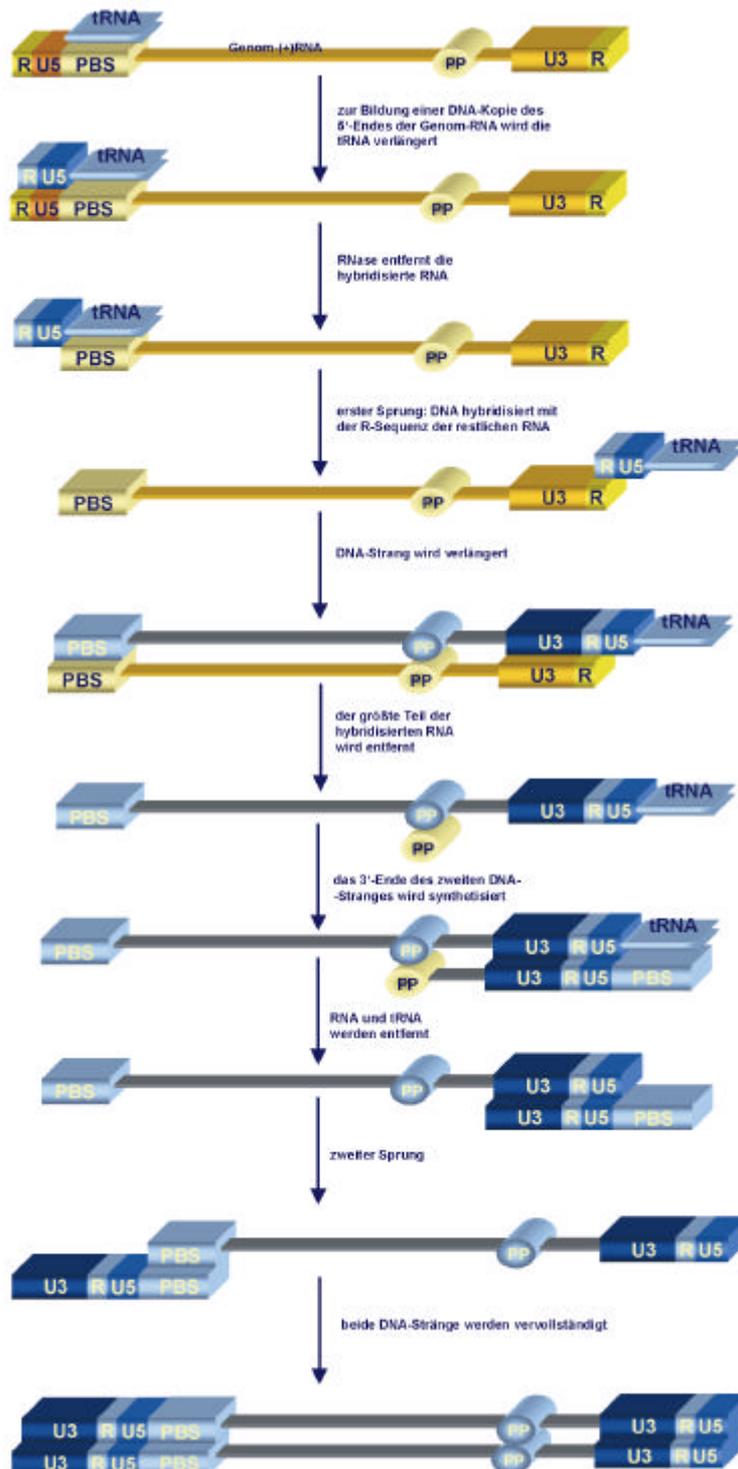


Abbildung 5: Reverse Transkription

1.3.5.3 Prozessierung der viralen Transkripte

Insgesamt entstehen bei Mausleukämieviren zwei Transkripte mit 5'-*cap* und 3'-poly(A)-Schwanz: Ein vollständiges, genomisches Transkript sowie ein gespleißtes, subgenomisches Transkript (Abbildung 6).

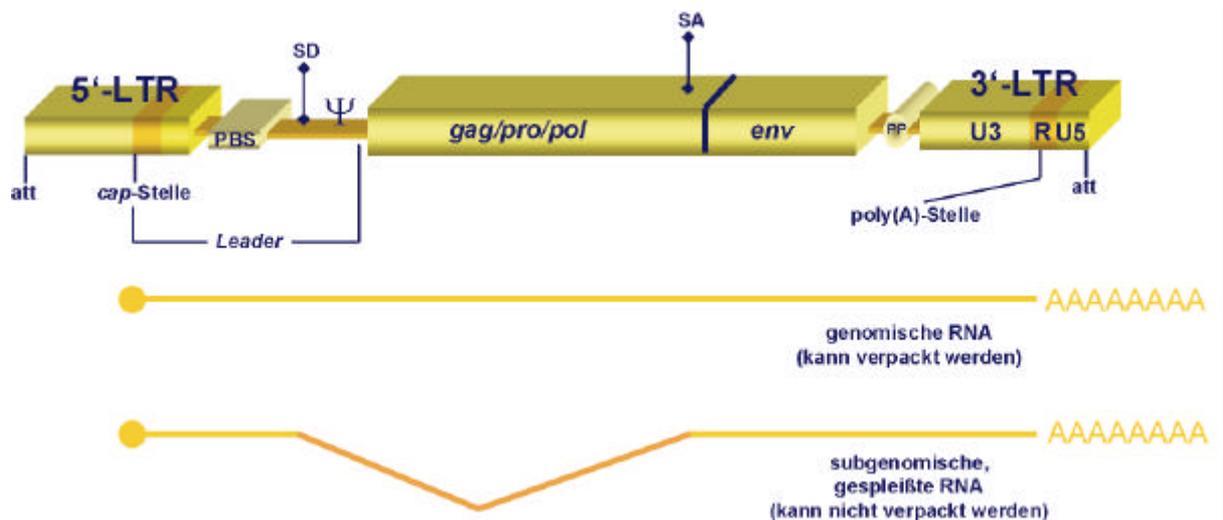


Abbildung 6: Prozessierung der viralen Transkripte

Nach dem Transport ins Zytoplasma wird ein Teil der genomischen RNA für die Verpackung in die Virionen reserviert; der Rest wird als mRNA für die Translation von *gag*, *pro* und *pol* verwendet. Die gespleißte, subgenomische RNA wird an ER-Membran gebundenen Polyribosomen in das *env*-Vorläuferprotein übersetzt. Als Donor wird der retrovirale Spleißdonor im *Leader*, 5' des Verpackungssignales, verwendet. Somit fehlt der subgenomischen RNA ein Großteil des *Leaders* einschließlich des Verpackungssignales. Dies besitzt zwei Vorteile für das Virus: Zum einen kann die Translationsinitiation effektiver erfolgen, da das Verpackungssignal mit seiner komplexen, und daher energieaufwendig zu entwindenden Sekundärstruktur herausgespleißt und zugleich der 5'-untranslatierte Bereich verkürzt wird (Die beste Translation erfolgt bei AT-reichen 5'-untranslatierten Bereichen aus 20 bis 50 bp und einer Kozak-Konsensussequenz um das Startkodons herum; Brewer 1993); zum anderen kann, da das Verpackungssignal fehlt, die subgenomische RNA nicht in Virionen verpackt werden. Dies ist für das Retrovirus aus evolutionärer Sicht von Vorteil, da bei Verpackung der subgenomischen RNA zwar eine weitere Zielzelle erfolgreich infiziert werden könnte und auch eine Integration in das Wirtsgenom stattfinden könnte, jedoch aufgrund des fehlenden *gag-pro-pol*-Gens die Bildung neuer Virionen in dieser Zielzelle nicht möglich wäre: Das Retrovirus könnte sich nicht weiter aktiv ausbreiten (nur passiv durch Teilung der Zielzelle).

Eine exakte Balance zwischen Spleißen und Nicht-Spleißen ist für den funktionellen Ablauf des retroviralen Lebenszyklus notwendig. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet eine Regulation der relativen RNA-Mengen über eine Regulation der Spleißeffizienz sowie über Signale, die es gestatten, daß die nicht-gespleißte, genomische RNA aus dem Kern exportiert wird.

1.3.6 Regulation der Genexpression

Die Genexpression erfolgt nach der Integration des Retrovirus als Provirus in das Wirtsgenom.

Für die meisten Anwendungen im Bereich des somatischen Gentransfers ist eine hohe Genexpression in den entsprechenden Zielzellen wünschenswert. So sollte zum Beispiel beim hämatopoetischen Stammzellschutz durch MDR1-Gentransfer vor den Nebenwirkungen der Chemotherapie die Expression in den Stammzellen ein Überleben der Zellen ermöglichen; ansonsten scheitert der Ansatz. Ebenso sollte beim Transfer zweier Gene (zum Beispiel eines *in vivo* Selektionsmarkers und eines therapeutischen Gens) die Expressionshöhe des Resistenzgens die Selektion ermöglichen, während die des therapeutischen Zweitgens einen kurativen Effekt bewirkt.

Mehrere Elemente beeinflussen die retrovirale Genexpression. An erster Stelle wäre der *Enhancer/Promotor*-Bereich, der sich in der U3-Region der LTR befindet, zu erwähnen. Dieser reguliert hauptsächlich die Menge der synthetisierten RNA. Daneben spielt jedoch auch der *Leader* eine wichtige Rolle. So ist beschrieben, daß die Primerbindungsstelle, ein Teil der *Leader*-Region (1.3.3), einen Repressor binden kann, der die Genexpression negativ beeinflusst (Grez *et al.* 1990). Die zelltypspezifische Höhe und Dauer der Genexpression werden von dem Zusammenspiel dieser *cis*-regulatorischen Elemente des Virus und der genomischen Integrationsstelle mit den *trans*-aktiven Transkriptionsfaktoren der Zielzelle bestimmt.

Da die Genexpression von größter Bedeutung in retroviralen Gentransfervektoren ist, erscheint an dieser Stelle ein Vergleich der *Enhancer/Promotoren* des bereits erwähnten *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV), des *Myeloproliferative Sarcoma Virus* (MPSV) und des polyzythemischen *Spleen Focus-forming Virus* (SFFVp) sinnvoll, ebenso wie ein Vergleich der *Leader* des *Moloney Murine Sarcoma Virus* (MoMSV) und des *Murine Embryonic Stem cell Virus* (MESV). Die Analyse der Genexpression dieser Elemente ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.3.6.1 Vergleich des *Enhancers*

Die U3-Region (Abbildung 7) übernimmt Promotor- und *Enhancer*-funktion und beherbergt zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

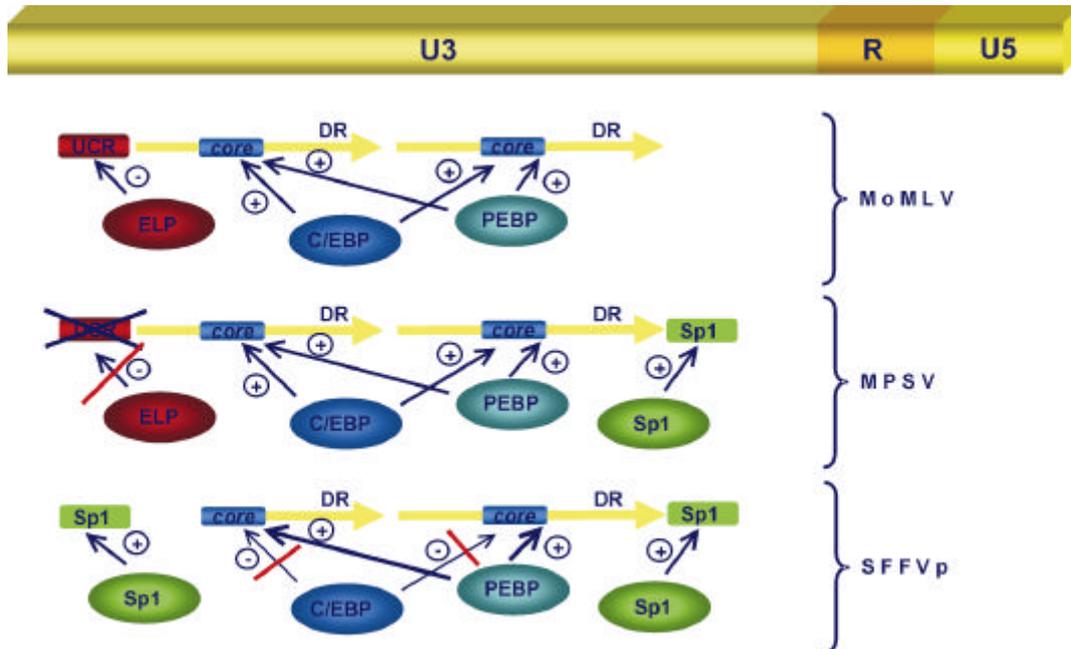


Abbildung 7: Vergleich der *Enhancer* in den U3-Regionen von MoMLV, MPSV und SFFVp

1.3.6.1.1 *Moloney Murine Leukemia Virus*

Das *Moloney Murine Leukemia Virus* besitzt in der U3-Region zwei direkte Wiederholungen (= *direct repeats*; DR). Diese ca. 80 Basenpaare umspannende Region enthält Erkennungssequenzen für mindestens acht verschiedene Transkriptionsfaktoren (Baum *et al.* 1997a). Jedes DR enthält ein Zentralelement (= *Enhancer-Core-Element*), das als Bindungsstelle für differenzierungsabhängige Transkriptionsfaktoren (CAAT-*Enhancer-binding protein* (= C/EBP) oder Polyomavirus-*Enhancer binding protein* (= PEBP)) dient. 5' vom DR befindet sich eine Repressorbindungsstelle in der sogenannten *upstream control region* (= UCR). Diese wird von dem *embryonal LTR binding protein* (= ELP) erkannt, dessen Bindung die virale Genexpression in embryonalen Karzinomzellen inhibiert (Akgün *et al.* 1991).

1.3.6.1.2 *Myeloproliferative Sarcoma Virus*

Das *Myeloproliferative Sarcoma Virus* ist mit dem MoMLV eng verwandt. Der MPSV-*Enhancer* weist sieben Punktmutationen im Vergleich zum MoMLV-*Enhancer* auf (Stocking *et al.* 1986; Baum *et al.* 1997a). So ist zum einen die UCR-Repressorbindungsstelle zerstört, während eine Punktmutation 3' vom DR erhöhte Affinität zum ubiquitär vorkommenden Spezifitätsprotein 1 (= Sp1) vermittelt.

1.3.6.1.3 Spleen Focus Forming Virus

Das *Spleen Focus Forming Virus* zeigt im Vergleich zum MoMLV einen unvollständigen *direct repeat*. Zudem bindet das PEBP mit deutlich höherer Affinität an das *Core-Element* des SFFVp. In der UCR 5' vom DR befindet sich anstelle der im MoMLV vorhandenen Repressorbindungsstelle die Sp1-Konsensussequenz. Die erhöhte Affinität des PEBP zum SFFVp-*Core-Element* im DR zusammen mit dem Vorkommen der Sp1-Bindungsstelle anstelle der Repressorbindungsstelle im UCR vermitteln ca. 50% der Expressionsstärke des SFFVp-*Enhancers* in hämatopoetischen Zellen (Baum *et al.* 1997a).

1.3.6.2 Vergleich der Promotoren

Der SFFVp-Promotor verfügt über eine der Konsensussequenz vollständig entsprechende TATA-Box, die von zwei palindromischen *direct repeats* (GAGCTC) eingerahmt wird (Abbildung 8). MoMLV und MPSV verfügen über den gleichen Promotor und weisen im Vergleich zum SFFVp drei entscheidende Punktmutationen auf: Die erste Punktmutation befindet sich exakt 10 Basenpaare, welches genau einer Windung der DNA-Doppelhelix entspricht, vom Beginn der TATA-Box entfernt: Die zweite Mutation liegt direkt am Beginn der TATA-Box, wobei eine von der Konsensussequenz abweichende Substitution von Thymin gegen Adenin zu verzeichnen ist. Die dritte Punktmutation zerstört den zweiten *direct repeat*. Es ist bisher noch unklar, ob sich diese drei Punktmutationen getrennt oder zusammen auf die Expressionsunterschiede von MoMLV und MPSV zu SFFVp auswirken.

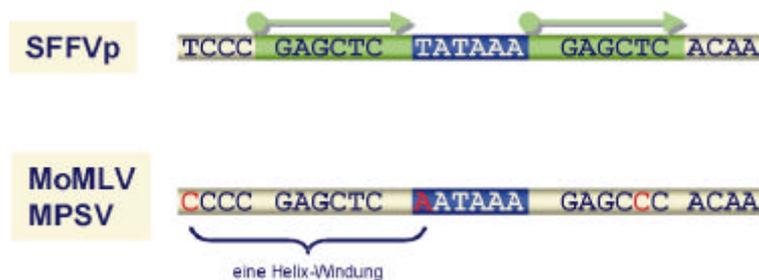


Abbildung 8: Vergleich der Promotoren von MoMLV, MPSV und SFFVp

1.3.6.3 Vergleich des Leaders

Zwei verschiedene *Leader* wurden bisher im Kontext muriner retroviraler Vektoren in der Literatur publiziert: der MoMSV-*Leader*, der in der LX-Serie von A. D. Miller (Miller *et al.* 1989) verwendet wurde, und der MESV-*Leader* (Grez *et al.* 1990).

Ein Sequenzvergleich des MoMSV-*Leaders* des Vektors LN sowie des in der vorliegenden Arbeit verwendeten MESV-*Leaders* zeigt 80% Sequenzhomologie 5' der *Pst* I-Schnittstelle (Abbildung 9; Colicelli *et al.* 1987; Baum *et al.* 1996d; Hildinger *et al.* 1998b). Besonders wichtig sind die fünf Punktmutationen, die die Primerbindungsstelle für tRNA^{Pro} des MoMSV in eine Primerbindungsstelle für tRNA^{Gln} umwandeln. Die Primerbindungsstelle tRNA^{Pro} überlappt in 17 ihrer 18 Basenpaare mit der Bindungsstelle für einen bisher unbekanntem transkriptionellen Repressor, der nicht an die PBS für tRNA^{Gln} binden kann (Kempler *et al.* 1993). Die ersten 80 Basenpaare der zentralen Verpackungsregion (Ψ) zwischen den Schnittstellen *Msc* I und *Xma* III enthalten einen Abschnitt auffällig niedriger

Sequenzhomologie (weniger als 50%). Die *Leader*-Sequenzen 3' der *Pst* I-Schnittstelle sind bei beiden identisch.

Diese beiden *Leader* werden in der vorliegenden Arbeit im Kontext verschiedener *Enhancer*/Promotoren verglichen. Ferner wurden, ausgehend von dem *MESV-Leader*, neue *Leader*-Varianten kloniert und analysiert.

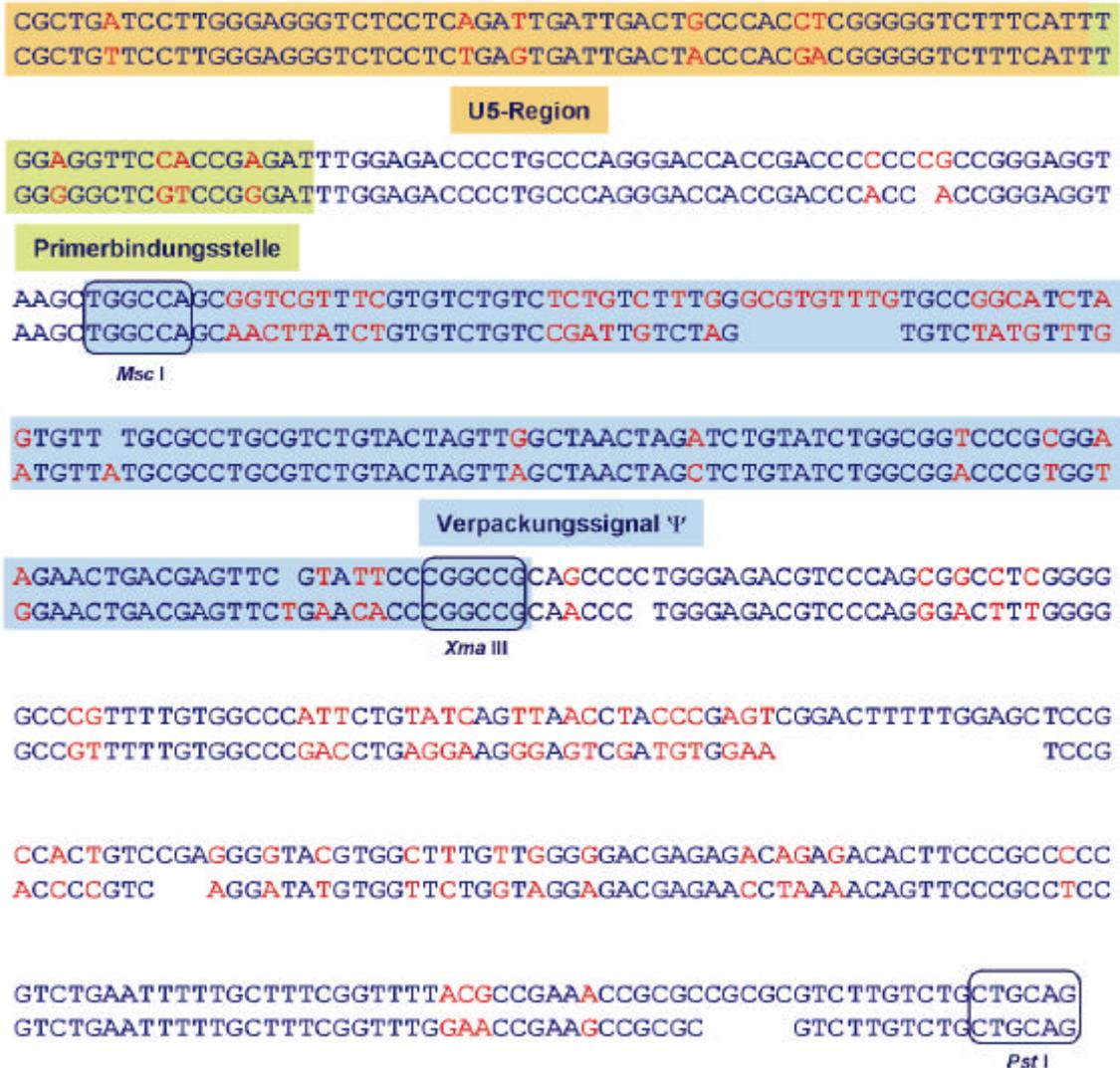


Abbildung 9: Vergleich von MoMSV- und MESV-*Leader* (5' von *Pst* I)

1.4 Retrovirale Vektoren

Retroviren, insbesondere Mausleukämieviren, eignen sich aus mehreren Gründen als Grundlage für Gentransfer-Vektoren (vgl. 1.2.3.2; 1.3.2):

- 1) Retroviren zeigen einen breiten Zelltropismus bezüglich Infektion und Expression (Coffin 1996).
- 2) Sie gewährleisten eine effiziente Integration in das Genom der Zielzelle. Sofern die Zielzelle teilungsaktiv ist, führt in der Regel jede Infektion auch zur Integration (zum Vergleich: Die Integrationsrate bei Transfektion mit nackter DNA liegt bei 10^{-5} ; Hwang *et al.* 1984).
- 3) Die Integration erfolgt ortsspezifisch bezüglich des retroviralen Genoms, wobei die *attachment sites*, die die LTRs flankieren, als Integrationsstellen dienen (zum Vergleich: Bei Transfektion mit nackter DNA kann die Integration an beliebigen Stellen des Konstruktes eintreten, so daß unter Umständen das Transgen zerstört wird; Prasolov 1989).
- 4) Nach Integration wird das retrovirale Genom stabil zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert und an alle Nachkommen der transduzierten Zellen weitergegeben. Es erfolgt also - im Vergleich zu Retrotransposons - keine erneute Mobilisierung und Integration an anderen Stellen des Wirtsgenoms. Dies mindert die Gefahr einer Insertionsmutagenese.
- 5) Die Abhängigkeit der Genexpression vom Integrationsort ist im Vergleich zur Transfektion mit nackter DNA verringert (Hwang *et al.* 1984; Prasolov 1989).
- 6) Ihr Genom ist überschaubar (ca. 10 kb) und alle notwendigen *cis*-aktiven Sequenzen sind bekannt. Zudem sind bei Mausleukämieviren keine Virus-kodierten *trans*-aktiven Faktoren für die Genexpression notwendig.
- 7) Retroviren besitzen die Fähigkeit, auch nicht-retrovirale Sequenzen (wie Onkogene) in ihr Genom zu integrieren und zu transduzieren. Außerdem kann die Genomgröße über einen weiten Bereich variieren (Ostertag *et al.* 1986).

Generell beinhaltet die Entwicklung retroviraler Vektoren die Konstruktion eines "Provirus" mit allen *cis*-aktiven Sequenzen für Vektorverpackung, reverse Transkription und Integration, jedoch ohne die kodierenden Sequenzen für die meisten oder alle viralen Proteine. Neben der Entwicklung des Vektors an sich bedarf es zudem der Konstruktion einer entsprechenden Verpackungszelllinie (s. 1.4.3), die die für die Virus-*assembly* und Transduktion notwendigen viralen Proteine bereitstellt (Miller *et al.* 1993).

In der Gentherapie werden hauptsächlich Vektoren abgeleitet von Gamma- (Miller *et al.* 1989) und Lentiretroviren (Naldini 1998) verwendet. Bei den Gammaretroviren wiederum beruhen die meisten Vektoren auf Mausleukämieviren, insbesondere Friend- und Moloney-Mausleukämieviren. Deshalb bezieht sich der Rest des Kapitels auf Mausleukämievirus-abgeleitete retrovirale Vektoren, die auch Gegenstand dieser Arbeit sind.

1.4.1 Grundlegendes Prinzip retroviraler Vektoren

Retrovirale Vektoren sind im Vergleich zu Wildtyp-Retroviren replikationsdefekt, ein wichtiger Sicherheitsaspekt, um eine unkontrollierte Ausbreitung des Virus zu verhindern. So wäre bei Verwendung von replikationskompetenten Retroviren sowohl eine unkontrollierte, potentiell schädliche Ausbreitung im Patienten denkbar als auch eine Transmission auf dessen Kinder (vertikaler Gentransfer), sofern Keimzellen infiziert werden, wie auch eine Infektion anderer Menschen (horizontaler Gentransfer) über direkten oder indirekten Kontakt.

Zwar können retrovirale Vektoren Zellen infizieren, jedoch keine erneuten Virionen bilden. Die Ursache hierfür liegt in einer weitgehenden Deletion der *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Gene. Deren Deletion ist möglich, da die frühen Phasen des retroviralen Lebenszyklus (*attachment*, Penetration, reverse Transkription, Kerntransport, Integration in das Wirtsgenom, Synthese und Prozessierung der RNA-Transkripte) nicht von viraler Proteinsynthese abhängen (Coffin 1996). Durch das Entfernen dieser Gene entsteht zugleich Platz für die Integration anderer Gene. Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren folgen mehr oder weniger dem gleichen Grundaufbau (Abbildung 10).

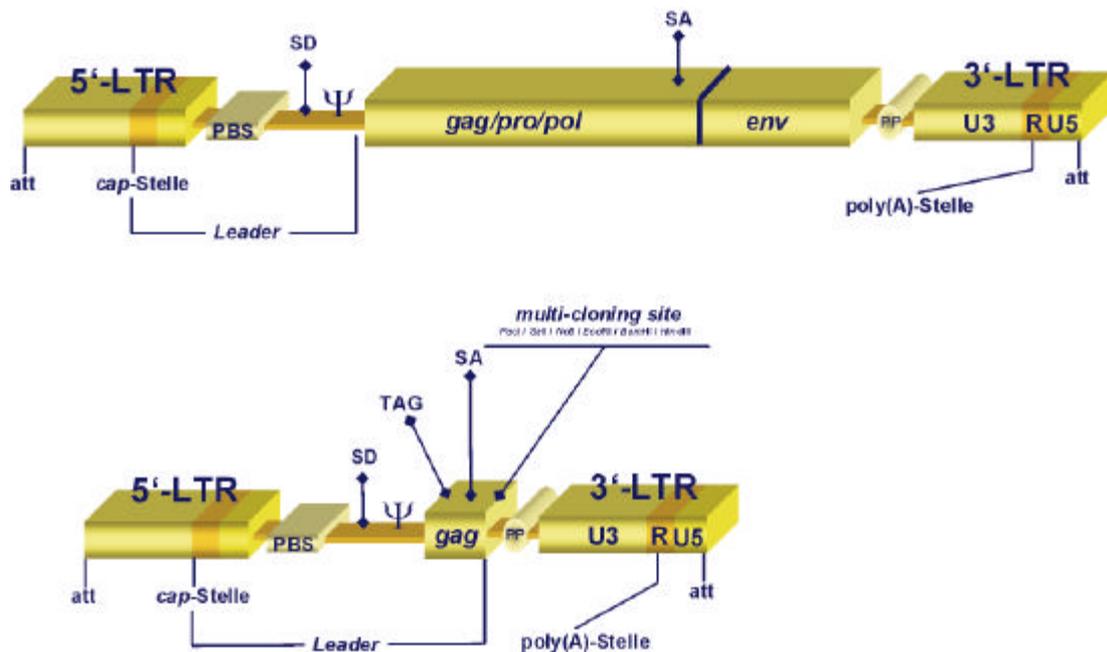


Abbildung 10: Grundlegender Vektoraufbau (Darstellung in proviraler Form nach retroviraler Integration)
 oben Wildtyp-Retrovirus
 unten retroviraler Vektor
 att *attachment site* (wird von der Integrase erkannt und dient der Integration in das Wirtsgenom)
 PBS Primerbindungsstelle
 SD Spleißdonor
 Ψ Verpackungssignal
 SA Spleißakzeptor
 PP Polypurin-Trakt

Viele retrovirale Vektoren besitzen vor der *multi-cloning site*, in die das gewünschte Transgen inseriert werden kann, noch ca. 400 bp *gag*-Sequenz, wobei das Startkodon deletiert wurde. Diese Vektoren werden als *gag*⁺ Vektoren bezeichnet (s. 1.4.2.1).

1.4.2 historische Entwicklung retroviraler Vektoren

Der erste retrovirale Vektor wurde 1981 von Wei *et al.* beschrieben: Dieser inserierte das Thymidinkinase-Gen des Herpes Simplex Virus in das Rückgrat des *Harvey Murine Sarcoma Virus* und konnte Thymidinkinase-Aktivität in transduzierten, ursprünglich Thymidinkinase-negativen Zellen nachweisen. Dasselbe gelang Tabin *et al.* ein Jahr später unter Verwendung des *Moloney Murine Leukemia Virus*. Ein weiterer Meilenstein bedeutete die Entwicklung eines funktionellen, positiv-selektierbaren retroviralen Vektors (Ostertag *et al.* 1986; Friel *et al.* 1987; Beck-Engeser *et al.* 1991) auf Basis des replikationsdefekten *Myeloproliferative Sarcoma Virus* (MPSV; Ostertag *et al.* 1980; Stocking *et al.* 1986), welches das *v-mos* Onkogen trägt. In dieses Virus wurde *neo^R* als Selektionsmarker inseriert, ohne die transformierenden Eigenschaften von MPSV zu zerstören. Dieser Vektor stellt zudem gleichzeitig den ersten funktionellen retroviralen Koexpressionsvektor dar. Den nächsten Schritt bildeten die sogenannten *gag⁺* Vektoren (Bender *et al.* 1987; Armentano *et al.* 1987): Diese MoMLV-abgeleiteten Vektoren sind die ersten retroviralen Vektoren, die keine viralen Proteine mehr synthetisieren und einen Polylinker für die Insertion von Transgenen aufweisen. Zwar befinden sich in den Vektoren noch ca. 400 Basenpaare *gag*-Sequenz; jedoch wurde das *gag*-Startkodon zu einem Stoppkodon mutiert. Da diese Vektoren breite Anwendung in der Gentherapie finden, wird auf diese (1.4.2.1) und deren Weiterentwicklung (1.4.2.2) noch genauer eingegangen.

Weitere retrovirale Vektoren folgten, die sich hauptsächlich in der LTR und dem *Leader* unterscheiden. Rationale für die Entwicklung dieser Vektoren war hauptsächlich eine erstrebte Verbesserung der Genexpression in hämatopoetischen Zellen. Zu erwähnen wären unter anderem Vektoren abgeleitet vom *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV; Bestwick *et al.* 1988) und *Malignant Histiocytosis Sarcoma Virus* (MHSV; Friel *et al.* 1990). Besondere Bedeutung kommt jedoch dem *PCC4 cell passaged Myeloproliferative Sarcoma Virus* (PCMV; Hilberg *et al.* 1987) zu. Hierbei handelt es sich um eine MPSV-U3-Mutante mit Expression in embryonalen Karzinomzellen F9. Dieses wiederum bildete die Grundlage für die Entwicklung des *Murine Embryonic Stem Cell Virus* (MESV; Grez *et al.* 1990). MESV unterscheidet sich im *Leader*-Bereich von PCMV. Der MESV-*Leader* stammt vom dl-587-rev Retrovirus, der über eine andere Primerbindungsstelle verfügt und somit die Bindung eines transkriptionellen Repressors ausschließt (vgl. 1.3.6.3). MESV wiederum diente als Vorbild für die Klonierung des *Murine Stem Cell Virus* (MSCV; Hawley *et al.* 1992), das bis auf die Primerbindungsstelle den *Leader* des *Moloney Murine Sarcoma Virus* besitzt; die PBS stammt von MESV. Ausgehend von MSCV wurden von Chalhita *et al.* (1995) Vektoren vorgestellt, die anstelle der PCMV-LTR des MSCV eine MPSV-ähnliche LTR besitzen. Im gleichen Jahr wurden Hybridvektoren mit SFFVp-LTR bzw. MPSV-LTR und MESV-*Leader* von Baum *et al.* publiziert. Diese Hybride bilden die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten retroviralen Vektoren und werden im folgenden (1.4.2.2) noch genauer beschrieben.

1.4.2.1 Gag⁺ Vektoren

Gag⁺ Vektoren (Abbildung 11) wurden zuerst von Bender *et al.* (1987) und Armentano *et al.* (1987) beschrieben. Diese Vektoren besitzen neben einem MoMLV-LTR und einem MoMSV-*Leader* 418 Basenpaare *gag*-Sequenz, wobei das *gag*-Startkodon zu einem Stoppkodon mutiert wurde. Der Vorteil dieser Vektoren besteht - gemäß Publikation - zum einen in einem höheren Virustiter, da sich das Verpackungssignal angeblich in die *gag*-Sequenzen erstrecken soll, zum anderen in höherer Trans-

genexpression aufgrund eines kryptischen Spleißakzeptors in der *gag*-Sequenz, der mit dem retroviralen Spleißdonor in Wechselwirkung treten kann. (Dessen bisheriger Partner, der retrovirale Spleißakzeptor im *pol*-Gen für die Expression des *env*-Gens, ist in den konventionellen *gag*⁺ Vektoren nicht mehr vorhanden.) Durch alternatives Spleißen zwischen dem retroviralen Spleißdonor und dem kryptischen *gag*-Spleißakzeptor wird ein Großteil des *Leaders* entfernt einschließlich des Verpackungssignales mit seiner komplexen Sekundärstruktur. Hierdurch wird der 5'-untranslatierte Bereich sowohl kürzer als auch leichter zu entwinden, was zu einer Erhöhung der Translation und somit Genexpression führt. Ferner ist auch beschrieben, daß gespleißte Transkripte aus dem Kern effektiver exportiert (Stutz *et al.* 1998) und ebenso effektiver translatiert (Matsumoto *et al.* 1998) werden.

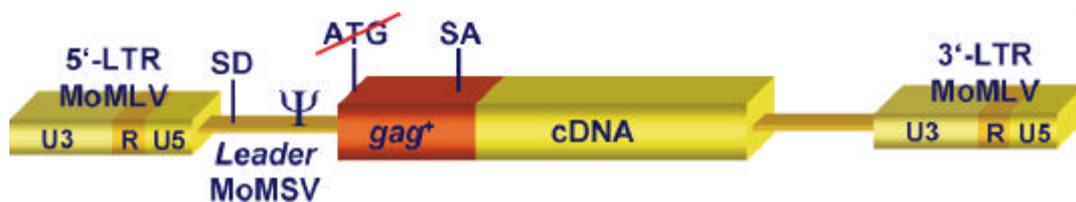


Abbildung 11: Provirale Form eines *gag*⁺ Vektors
(Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde mutiert)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die restlichen *gag*-Sequenzen sowohl für den Virustiter als auch für eine erhöhte Genexpression verantwortlich sind. Hierzu wurden verschiedene *Leader*-Varianten mit oder ohne *gag*-Sequenzen und mit anderen Spleißakzeptoren vor der *multi-cloning site* verglichen.

1.4.2.2 MFG-Vektor

Einem ähnlichen Prinzip wie die *gag*⁺ Vektoren folgt der MFG-Vektor (Abbildung 12; Rivière *et al.* 1995). Dieser Vektor enthält jedoch neben einem MoMLV-LTR, einem MoMSV-*Leader* und den *gag*-Sequenzen zusätzlich ca. 400 Basenpaare *pol*-Sequenz einschließlich des *env*-Spleißakzeptors, die direkt auf die *gag*-Sequenzen vor dem Transgen folgen. Das Einführen dieses Spleißakzeptors soll die Transgenexpression weiter erhöhen, da der *env*-Spleißakzeptor stärker als der kryptische *gag*-Spleißakzeptor ist. Dieser Effekt trifft jedoch nicht auf jedes Transgen zu (Krall *et al.* 1996). Der Titer wird durch das vermehrte Spleißen nicht signifikant beeinträchtigt, da immer noch genügend vollständige genomische RNA synthetisiert wird.

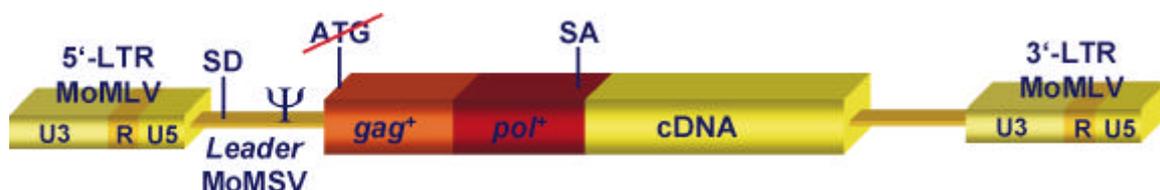


Abbildung 12: Provirale Form eines MFG-Vektors
(Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde mutiert)

1.4.2.3 FMEV- und MPEV-Vektoren

Eine Weiterentwicklung der MoMLV-LTR und MoMSV-*Leader* abgeleiteten Vektoren stellen die von Baum *et al.* 1995 publizierte FMEV- und MPEV-Vektoren dar (Abbildung 13). Diese Vektoren kombinieren im Falle von FMEV die SFFVp-LTR und den MESV-*Leader* (LTR des *Friend Mink cell focus-forming Virus*, zu denen auch das polyzythemische SFFV gehört, *Leader*-Region von MESV), im Falle von MPEV die MPSV-LTR und den MESV-*Leader*. Beide Vektoren verfügen ebenfalls über ca. 400 bp *gag*-Sequenz. Diese Vektoren erwiesen sich bezüglich der Genexpression in myeloiden (Baum *et al.* 1995) und humanen CD34-positiven Zellen (Eckert *et al.* 1996) im MDR1-System nach retroviralem Transfer den MoMLV-LTR, MoMSV-*Leader* abgeleiteten Vektoren überlegen. Dies beruht zum einen auf der höheren Aktivität des SFFVp- und MPSV-Enhancers im Vergleich zum MoMLV-Enhancer in den entsprechenden Zielzellen (s. 1.3.6.1), zum anderen auf der Verwendung des MESV-*Leaders*, der im Vergleich zum MoMSV-*Leader*, die Bindung eines transkriptionellen Repressors an die PBS ausschließt (s. 1.3.6.3).

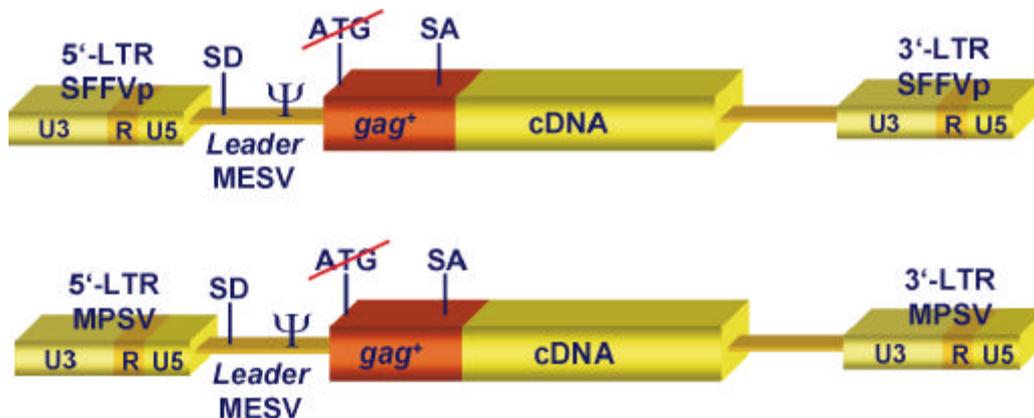


Abbildung 13: Provirale Form eines FMEV- (oben) und MPEV- (unten) Vektors
(Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde mutiert)

1.4.2.4 Nachteile der klassischen Vektoren

Nachteile der beschriebenen klassischen Vektoren sind insbesondere auf zwei Ebenen zu sehen: auf der Ebene der Genexpression, sowie auf der Ebene der Sicherheit.

Was die Genexpression anbetrifft, stellen - wie bereits erwähnt - die FMEV- bzw. MPEV-Vektoren eine deutliche Verbesserung gegenüber dem klassischen *gag*⁺ Vektor und MFG-Vektor dar. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Genexpression - ausgehend von dem FMEV-Vektor - auf posttranskriptioneller Ebene zu optimieren, so daß diese im Gegensatz zum MFG-Vektor unabhängig vom jeweiligen Transgen erhöht ist. Hierzu wurden Modifikationen in den *Leader* eingeführt, die sich auf das alternative Spleißen auswirken.

Ebenfalls sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Sicherheit der retroviralen Vektoren erhöht werden. Zum einen sollte die Gefahr vor Entstehung replikationskompetenter Retroviren (s. 1.4.3) gemindert werden, indem noch vorhandene retrovirale Sequenzen, insbesondere die restlichen *gag*-Sequenzen deletiert werden; zum anderen sollte die Expression weiterer Leserahmen außer dem des Transgens durch Deletion bzw. Mutation noch vorhandener ATG-Startkodons 5' des Transgens verhindert werden. So befinden sich im *gag*⁺ Vektor sieben, im MFG-Vektor sogar zehn ATG-Startkodons (Tabelle 2), wobei jedoch nicht alle die Kozak-Konsensussequenz erfüllen (andere Startkodons außer

ATG wurden nicht berücksichtigt). Diese aberranten Startkodons könnten die Translation von Peptiden oder Proteinen unbekannter Funktion initiieren, die immunogen oder andersweitig für die Zelle nachteilig sein könnten. Denkbar wäre zum einen eine Präsentation dieser Peptide als Antigene durch MHC-I-Moleküle oder eine Inhibition von Chaperonen, die für die korrekte Faltung von Proteinen verantwortlich sind. Derartige Nebenwirkungen könnten bei einer medizinischen Anwendung in der Gentherapie großen Schaden anrichten.

Die Auswirkungen dieser Deletionen und Mutationen auf die Genexpression und den Virustiter waren ebenfalls Gegenstand der Arbeit.

AUG-Position ¹	Kozak-Konsensus (A/G)CC-AUG-G	Länge des offenen Leserahmens ²	Peptidsequenz
270	CUA-AUG-U (-)	10	MFAPASVLVG
680	AAG-AUG-U (-)	10	MSSGSLTTSR
713	UAG-AUG-U (-)	65	MSRRDDGLPSALQNGQPLTSDGRETAPTETS-SPRLRSRSFHLARMDTQTRSPTS
729	ACG-AUG-G (+)	12	MGYLLLCRMANL
753	AGA-AUG-G (+/-)	4	MANL
774	CGG-AUG-G (+/-)	7	MAARRHL
848	CGC-AUG-G (+)	10	MDTQTRSPTS
1077 ³	CAU-AUG-A (-)	11	MRSYMGHPRPL
1089 ³	UAU-AUG-G (+/-)	7	MGHPRPL
1130 ³	GAC-AUG-A (+/-)	>110	MTRVTNSPSLQAHLQA-LYLVGHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGDTVVVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAADPGGGPSSRLRPP (geht in Transgen über)

Tabelle 2: Positionierung potentieller Startcodons im 5'-untranslatierten Bereich

¹ AUG-Position bzgl. *cap*-Signal

² Länge des offenen Leserahmens bzgl. Anzahl der Aminosäuren

³ nur in Vektoren mit *pol*-Sequenzen (s. MFG-Vektor)

1.4.3 Verpackungszellen

Um infektiöse Viruspartikel aus retroviralen Genomen ohne *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Gene zu gewinnen, bedient man sich sogenannter Verpackungszellen. Diese enthalten die genetische Information für die *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Genprodukte, jedoch kein Verpackungssignal, so daß keine infektiösen Virionen gebildet werden. Schleust man nun ein Konstrukt mit der genetischen Information für ein replikationsdefektes Retrovirus ein, welches - wie zuvor bereits erwähnt - selbst nicht für Gag, Pro, Pol und Env kodiert, jedoch über ein Verpackungssignal verfügt, so werden die RNA-Transkripte des Konstruktes durch die von der Verpackungszelle beigesteuerten *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Genprodukte verpackt und bilden infektiöse Viruspartikel, die in den Überstand abgegeben werden.

Die erste retrovirale Verpackungszelllinie ψ 2 wurde 1983 von Mann *et al.* beschrieben. Hierzu wurde die murine embryonale Fibroblastenzelllinie NIH3T3 mit einem ökotropen, proviralen MoMLV-Genom transfiziert, dessen Verpackungssignal deletiert war.

Zwei häufig und auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Verpackungszelllinien sind die von Markowitz *et al.* (1988a und 1988b) beschriebenen GP+E-86 sowie GP+envAm12, die ebenfalls aus NIH3T3-Fibroblasten angelegt wurden. GP steht jeweils für, **G**ag/**P**ol, das nachfolgende Kürzel für das entsprechende *env*-Protein. Diese Verpackungszellen unterscheiden sich von ψ 2 darin, daß hier die

Expression von *gag/pro/pol* einerseits und von *env* andererseits durch zwei getrennte Plasmide erfolgt. Hierdurch vermindert sich die Wahrscheinlichkeit der Entstehung replikationskompetenter Retroviren, da ein weiteres Rekombinationsereignis notwendig wäre.

Die Zelllinie GP+E-86 exprimiert das sogenannte *ökotrope env*-Genprodukt. Dieses bindet an den ökotropen Rezeptor mCAT-1, der die biologische Funktion eines basischen Aminosäure - Translokators besitzt (d. h. er transportiert basische Aminosäuren aus dem extrazellulären Raum in die Zelle hinein).

Die Zelllinie GP+envAm12 exprimiert das sogenannte *amphotrope (Am 12) env*-Genprodukt. Dieses bindet an den amphotropen Rezeptor (= Pit-2), einen Phosphat-Translokator (d. h. er transportiert anorganische Phosphat-Anionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle hinein). Dieser Rezeptor kommt im Gegensatz zum ökotropen Rezeptor nicht nur auf murinen, sondern auch auf Humanzellen vor, so daß amphotrope Retroviren auch menschliche Zellen infizieren können (vgl. 1.3.5.1).

A. D. Miller *et al.* publizierten 1991 eine weitere NIH3T3 abgeleitete Verpackungszelllinie, PG13 (P: P(ackaging); G: G(ALV); 13: Klonnummer), die das Hüllprotein des *Gibbon Ape Leukemia Virus* (GALV) exprimiert. Es bindet an einen Internalisierungsrezeptor, der ebenso wie der amphotrope Rezeptor als Natrium-abhängiger Phosphat-Symporter fungiert (Kavanaugh *et al.* 1994). Dieser Rezeptor kommt zwar auf menschlichen Zellen, nicht jedoch auf Mauszellen vor.

1.4.4 Entstehung replikationskompetenter Retroviren

Die Entstehung replikationskompetenter Retroviren stellt - wie bereits erwähnt - ein großes Gefahrenpotential bei der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren im Rahmen einer Gentherapie dar. Sie können durch Rekombination replikationsinkompetenter, retroviraler Vektoren mit endogenen retroviralen Sequenzen der Verpackungszellen entstehen (Anderson *et al.* 1993; Münk *et al.* 1997; Chong *et al.* 1998). Wie bereits erwähnt werden stets zwei RNA-Moleküle in ein Virion verpackt. Wird nun der Vektor zusammen mit viraler RNA (kodiert von endogenen Retroviren der Verpackungszelle oder revertierten Verpackungskonstrukten) verpackt, so kann der Vektor mit viruskodierenden Sequenzen während der reversen Transkription rekombinieren (Chong *et al.* 1998; Patience *et al.* 1998; Mikkelsen *et al.* 1998), was zur Entstehung neuartiger replikationskompetenter Viren Anlaß geben kann. Hierbei nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit dem Ausmaß an Homologie zwischen den beiden Molekülen zu. Deshalb ist es sinnvoll, soviel virale Sequenz wie möglich aus retroviralen Vektoren zu eliminieren, um die Sicherheit retroviraler Vektoren zu erhöhen. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4.5 Rearrangements / Fehlprozessierung in retroviralen Vektoren

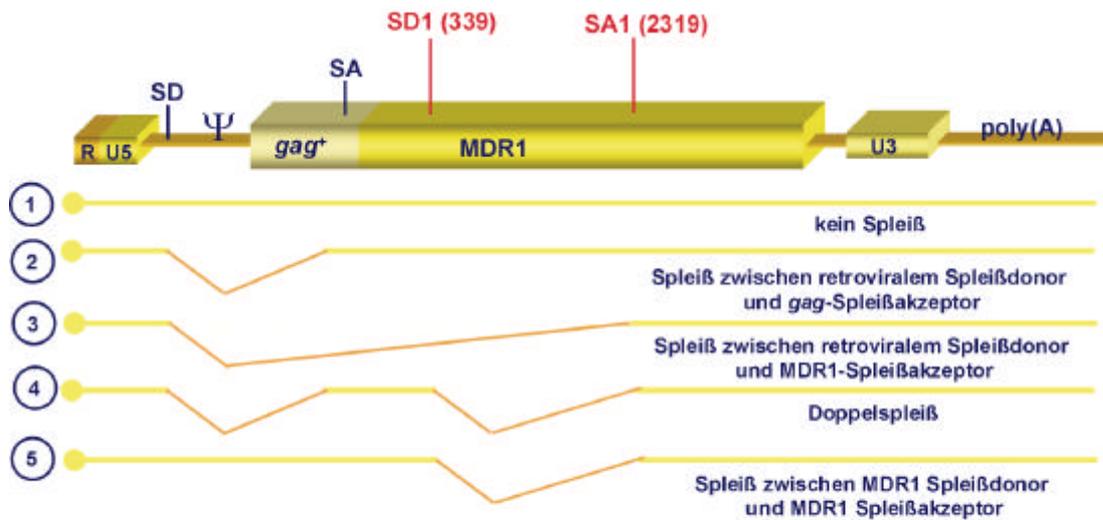
1.4.5.1 Rekombination in retroviralen Vektoren

Neben Rekombination mit endogenen Retroviren oder den Verpackungszellkonstrukten, was zur Entstehung replikationskompetenter Retroviren führen kann, können auch Rearrangements innerhalb der retroviralen Vektoren auftreten. Beschrieben wurde dies für retrovirale Vektoren mit Thymidinkinase als Transgen (Parthasarathi *et al.* 1995), wobei hier ca. 10% der Proviren Rearrangements nach einer Replikationsrunde aufwiesen, also mehr als doppelt so viele wie im Wildtyp-Retrovirus (s. 1.3.5.2). Inwiefern dies auch auf retrovirale MDR1-Vektoren zutrifft, ist Gegenstand dieser Arbeit: Da das MDR1-Gen vermutlich durch interne Duplikation entstand (s. 2×6 Membrandurchgänge; 1.6.2), sind große Abschnitte homolog. Diese könnten zu Fehlern während der reversen Transkription führen, indem die Reverse Transkriptase zu "Fehlsprüngen" verleitet wird, wodurch über homologe Rekombination große Bereiche der cDNA deletiert würden.

1.4.5.2 Kryptisches Spleißen in retroviralen Vektoren

Neben Rearrangements können jedoch auch Fehlprozessierungen in retroviralen Vektoren durch Spleißereignisse (kryptisches Spleißen) auftreten (McIvor 1990 (Purinnukleosidphosphorylase); Sorrentino *et al.* 1995 (MDR1), Lee *et al.* 1998 (DHFR)). Wie in 1.3.5.3 erläutert, entstehen in Mausleukämieviren normalerweise nur zwei Transkripte: ein genomisches Transkript und ein subgenomisches Transkript. Doch zeigte bereits die fast vollständige Deletion der *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Gene in den *gag*⁺ Vektoren, daß der retrovirale Spleißdonor bei Deletion des retroviralen Spleißakzeptors im *pol*-Gen mit einem alternativen kryptischen Spleißakzeptor im *gag*-Gen in Wechselwirkung treten kann (s. Abbildung 10 und 1.4.5.1). Dieser *gag*-Spleißakzeptor ist zwar auch im Wildtyp-Retrovirus vorhanden, wird dort jedoch nicht benutzt. Umso komplexer werden die möglichen Spleißereignisse, wenn nun noch zusätzliche Sequenzen (z. B. in Form von cDNAs) in den retroviralen *gag*⁺ Vektor eingebracht werden, wobei neben Spleißereignissen zwischen dem retroviralen Spleißdonor und dem kryptischen *gag*- oder eventuellen cDNA-Spleißakzeptoren auch Spleißereignisse innerhalb der cDNA auftreten können.

In retroviralen Vektoren übt kryptisches Spleißen seinen Einfluß auf insgesamt vier Ebenen aus: Vektortiter, genotypischer Index, qualitative Vektorexpression und Vektorsicherheit. Dies soll anhand der MDR1-cDNA näher erläutert werden, für die bereits ein kryptischer Spleißdonor und -akzeptor beschrieben wurde (Sorrentino *et al.* 1995; Abbildung 14).



	1	2	3	4	5
Verpackung	ja	nein	nein	nein	ja
MDR1 funktionell	ja	ja	nein	nein	nein

Abbildung 14: Mögliche Spleißereignisse in retroviralen MDR1-Vektoren

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, können insgesamt fünf verschiedene Transkripte gebildet werden. Verpackt werden können jedoch nur Transkript 1 und Transkript 5, weil nur diese das Verpackungssignal enthalten. Da somit nur 40% der Transkripte verpackt werden können und insgesamt nur 20% aller Transkripte sowohl ein funktionelles MDR1-Gen besitzen als auch verpackungsfähig sind, wäre demzufolge auch ein um den Faktor 5 verringerter funktioneller Virustiter zu erwarten.

Zudem verringert das kryptische Spleißen den genotypischen Index. Hierfür ist in diesem Fall Transkript 5 verantwortlich, da es das einzige Transkript mit nicht-funktioneller MDR1-Transkriptionseinheit ist, das noch über ein Verpackungssignal verfügt. Es kann also in der Verpackungszelle verpackt und nach reverser Transkription als Provirus in das Genom der Zielzelle integriert werden, verleiht jedoch keinen MDR1-Phänotyp.

Den Transkripten 3 und 4 fehlt das Verpackungssignal: Sie werden demzufolge nicht verpackt (beeinflussen demzufolge auch nicht den genotypischen Index), führen jedoch (ebenso wie Transkript 5) zur Synthese eines *nonsense*-Proteins unbekannter Funktion, was in einer erniedrigten qualitativen Genexpression zum Ausdruck kommt (s. 1.1). Zudem könnten die entstehenden *nonsense*-Proteine immunogen oder andersweitig für die Zelle schädlich sein, so daß die Unterbindung ihrer Synthese die Vektorsicherheit deutlich erhöhen würde.

Ob in der MDR1-cDNA noch weitere Spleißsignale vorkommen und inwiefern sich die Zerstörung der kryptischen MDR1-Spleißsignale auf den genotypischen Index und die Genexpression auswirkt, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Zudem besitzt kryptisches Spleißen - unabhängig von dem hier aufgezeigten und in der vorliegenden Arbeit untersuchten Beispiel des MDR1-Gentransfers mit retroviralen Vektoren - auch Bedeutung über retrovirale Vektoren und MDR1 hinaus: So kann der gleiche Spleißmechanismus auch in mit einer intakten cDNA transduzierten Zellen auftreten, wobei dieser Mechanismus nicht auf retrovirale Vektoren beschränkt bleibt: Die entstehenden, kryptisch gespleißten Transkripte kodieren mit hoher Wahrscheinlichkeit ein infunktionelles Protein, das immunogen oder andersweitig für die Zelle nachteilig sein

könnte. Vorstellbar wäre, daß das kryptische Spleißen zu einer Verschiebung des Leserahmens führt; somit wird ein dem Immunsystem bisher unbekanntes Protein synthetisiert, und Zellen, die das Protein herstellen, werden von Immunzellen angegriffen. Daneben bestünde bei an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen die Möglichkeit, daß diese durch partielle Deletion onkogen werden könnten, indem wichtige Kontrollregionen entfernt werden. Eliminiert man die kryptischen Spleißsignale, sollten alle Zielzellen nicht nur ausschließlich die korrekte cDNA integriert haben, sondern auch nur das intakte Transkript synthetisieren. So kommt der Spleißbereinigung von cDNAs zentrale Bedeutung - unabhängig vom verwendeten Gentransfer-Vektor - zu, vor allem im Hinblick auf klinische Anwendungen am Menschen.

1.5 Das Hämatopoetische System

1.5.1 Hämatopoese

Das Blut enthält viele Zelltypen unterschiedlicher Funktion. Allen gemein ist jedoch ihre begrenzte Lebensdauer und lebenslange Neubildung. Letztendlich stammen alle Blutzellen von ähnlichen Stammzellen ab. Diese hämatopoetischen Stammzellen sind pluripotent, die Vorläufer aller terminal differenzierten Blutzellen (Abbildung 15; Dexter *et al.* 1987).

Die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen teilen sich und erzeugen entweder mehr pluripotente Stammzellen (Selbsterneuerung) oder determinierte Vorläuferzellen, die irreversibel dazu programmiert sind, sich in einen oder wenige Typen von Blutzellen terminal zu differenzieren (myeloische Reihe, lymphatische Reihe, erythroide Reihe). Die Vorläuferzellen werden durch spezifische Wachstumsfaktoren (*colony stimulating factors*; Metcalf 1984) zur Proliferation angeregt, aber verlieren mit der Zeit ihr proliferatives Potential, und zwar in dem Maße, in dem ihre Differenzierung zunimmt (Ostertag *et al.* 1987; Ogawa 1993). Terminal differenzierte Blutzellen leben mit Ausnahme bestimmter T-Zell-Subpopulationen und Makrophagen in der Regel nur einige Tage bis Wochen.

Im erwachsenen Organismus findet die gesamte Hämatopoese im Knochenmark und der Milz statt (außer T-Lymphozyten und Makrophagen). Hier befinden sich neben den verschiedenen Blutzelltypen und ihren unmittelbaren Vorläufern auch Stromazellen, die ein feines Netzwerk aus Kollagen und anderen extrazellulären Matrixkomponenten bilden und an der Differenzierung der Blutzellen durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren oder direkte Zell-Zell-Wechselwirkung beteiligt sind (Alberts *et al.* 1994).

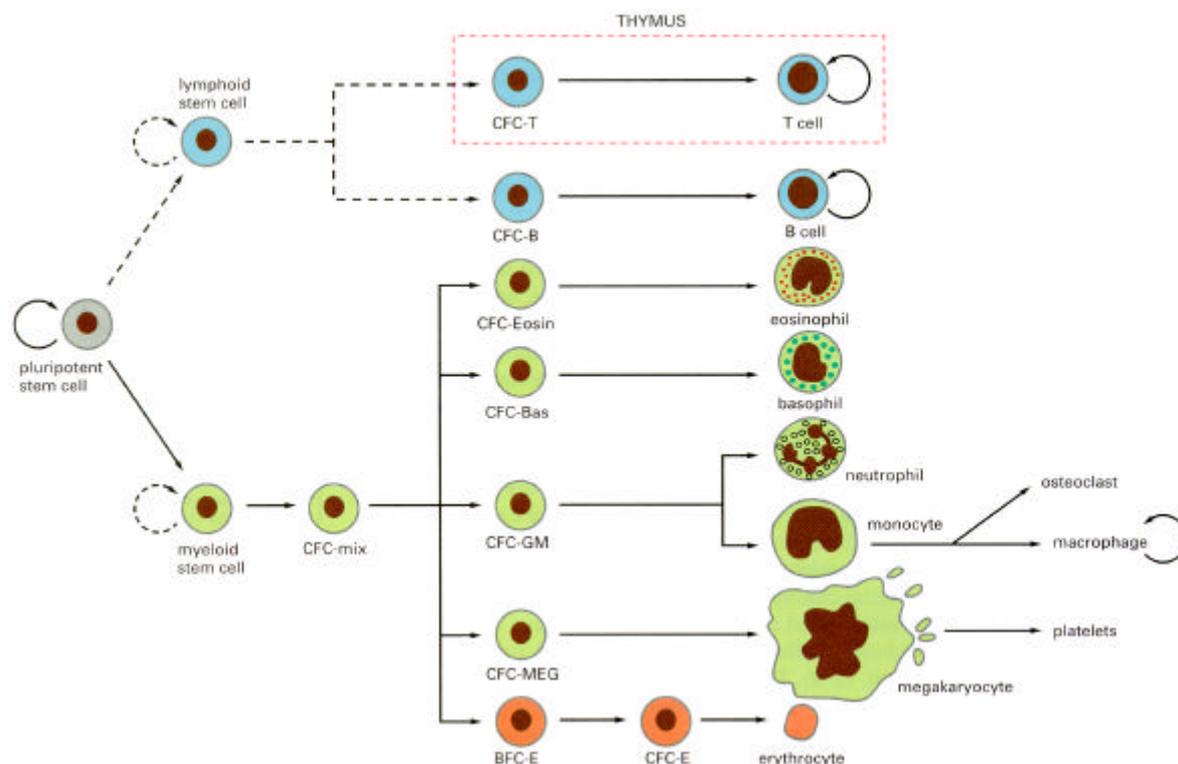


Abbildung 15: Vereinfachtes Schema der Hämatopoese (Alberts *et al.* 1994)

BFC *burst forming cell*
 CFC *colony forming cell*
 GM Granulozyten / Makrophagen
 MEG Megakaryozyten

1.5.2 Die hämatopoetische Stammzelle

Eine exakt definierte, hämatopoetische Stammzelle ist noch nicht isoliert worden; jedoch können Populationen mit Stammzellpotential angereichert werden (Spangrude *et al.* 1995: eine von fünf angereicherten Zellen zeigt Stammzellfunktion). Es existieren sowohl funktionelle als auch durchflußzytometrische Nachweismethoden für hämatopoetische Stammzellen:

Funktionell lassen sich Stammzellen durch serielle Transplantation nachweisen. Hierbei wird ein Empfänger (in der Regel eine Maus) tödlich bestrahlt und durch Transplantation von Knochenmarkzellen oder Subgruppen von Knochenmarkzellen eines gesunden Donors gerettet. Ein anderer Nachweis ist der sogenannte *spleen colony assay* (Till *et al.* 1972; Magli *et al.* 1982): Auf der Milz tödlich bestrahlter Tiere bilden sich Kolonien hämatopoetischer Zellen nach Transfusion von Knochenmarkzellen eines gesunden Donors, wobei jede Kolonie (CFU-S; CFU: *colony forming unit*, S: *spleen*) von einer einzelnen injizierten Vorläuferzelle abstammt. Die bisher erwähnten Nachweismethoden verbieten sich aus ethischen Gründen am Menschen. Das Stammzellpotential humaner Zellen läßt sich (wie auch bei Mauszellen) zum einen *in vitro* nachweisen (*long-term culture-initiating cells*; Dexter 1979; Eaves *et al.* 1991; Dooley *et al.* 1992), zum anderen durch die Repopulierung immundefekter SCID-Mäuse (Dick 1996; Eaves *et al.* 1997; Conneally *et al.* 1998).

Durchflußzytometrisch läßt sich eine humane Stammzellpopulation über die Oberflächenmarker CD34 positiv und CD38 negativ anreichern, eine murine über Sca-1, Thy-1 und c-Kit positiv, wobei in beiden Fällen die Stammzelle keine linienspezifischen Marker aufweist (Spangrude *et al.* 1988; Golde 1991). Ein anderer durchflußzytometrischer Nachweis für eine Stammzellpopulation ist die Effluxaktivität bezüglich fluorogener Substrate (Goodell *et al.* 1997). Den CD34-Oberflächenmarker nutzt man im humanen System zur Anreicherung einer Stammzellpopulation über Immunoaffinität oder FACS aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder mobilisierten peripheren Blutzellen für gentherapeutische Anwendungen.

Um die Limitationen der Stammzellenanreicherung zu umgehen, bedient man sich zu Forschungszwecken immortalisierter Zelllinien als Modellsystem. Diese repräsentieren ein bestimmtes Differenzierungsstadium der Hämatopoese. Für die Analyse der Stammzellfunktion eignet sich hierbei insbesondere die murine Zelllinie FDCEP-mix (Sponcer *et al.* 1986). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit fanden daneben die erythroleukämische, humane Zelllinie K562 (Klein *et al.* 1976), die T-lymphoblastäre, humane Zelllinie CCRF-CEM (Schachtschabel *et al.* 1966), die erythroleukämische, murine Friendzelllinie F4-12-B2 (Swetly *et al.* 1974) und die myeloide, murine Vorläuferzelllinie FDCEP-1 (Dexter *et al.* 1980) Verwendung.

Neben der Stammzellenanreicherung ist auch eine erfolgreiche Transduktion der hämatopoetischen Stammzelle für eine erfolgreiche retrovirale Gentherapie notwendig. Da die hämatopoetische Stammzelle in Abwesenheit spezifischer Stimuli teilungsinaktiv ist, Mausretroviren jedoch nur sich teilende Zellen infizieren können, muß man die Stammzelle *in vitro* durch Zugabe von Wachstumsfaktoren zur Proliferation anregen. Ein hierfür geeigneter Zytokin-Cocktail besteht aus Interleukin-3, *Stem Cell Factor* und Flt3-Ligand (Conneally *et al.* 1997, 1998).

Doch selbst bei Stammzellenanreicherung über den CD34-Oberflächenmarker und effizienter Transduktion werden aufgrund der Größenlimitation des Transplantates vermutlich weniger als 1% der hämatopoetischen Stammzellen das Transgen exprimieren, da im Gegensatz zum Tiermodell eine letale Konditionierung vor Retransplantation beim Menschen medizinisch nicht vertretbar ist und nur eine begrenzte Zahl der Zellen *ex vivo* manipuliert werden kann. Dieser Prozentsatz ist jedoch sowohl für onkologische Ansätze als auch bei der Behandlung monogener Erbkrankheiten für einen deutlichen palliativen oder kurativen Effekt zu gering (mindestens 3 - 10% der Gesamthämatopoese sollte von den transduzierten Zellen übernommen werden). Vielmehr muß der Anteil transgener Zellen erhöht werden; dies könnte durch eine *in vivo* - Selektion von Stammzellen geschehen (s. 1.6).

1.6 Stammzellselektion

1.6.1 Bedeutung der Stammzellselektion

Unter Stammzellselektion versteht man den Schutz der Stammzelle durch Resistenzgentransfer vor den Wirkungen bestimmter Zytostatika (Baum *et al.* 1996a, 1996e, 1997b; Licht *et al.* 1997). Dadurch erfährt die geschützte Stammzelle gegenüber den ungeschützten einen Selektionsvorteil und nimmt daher einen größeren Anteil an der Gesamthämatopoese ein. Resistenzgentransfer stellt somit eine zentrale und nicht nur onkologisch relevante Anwendungsmöglichkeit retroviraler Vektoren dar. Bei monogenen Erbkrankheiten könnte der Anteil transduzierter Stammzellen erhöht werden, indem man das therapeutische Gen zusammen mit einem Resistenzgen koexprimiert. Nur über *in vivo* - Selektion ließe sich in diesen Fällen ein therapeutisch sinnvoller Grad an Chimärismus einstellen (Baum *et al.* 1997b).

Die Wahl des Resistenzgens sowie das entsprechende Selektionsprotokoll muß unterschiedliche Kriterien erfüllen: So sollte das im Selektionsprotokoll vorgesehene Zytostatikum möglichst geringe Nebenwirkungen aufweisen, nicht mutagen sein und auf Ebene der Stammzellen wirken. Dies ist jedoch vom verwendeten Resistenzgen abhängig. Dieses sollte nicht oder nur in geringem Maße in den Stammzellen exprimiert werden, da sonst keine hintergrundfreie Selektion möglich ist. Außerdem sollte das vom Resistenzgen kodierte Protein weder onkogen noch toxisch oder immunogen sein. Ferner sind Stammzellen nicht sehr teilungsaktiv, so daß zellzyklusunabhängige Zytostatika zu bevorzugen sind. Eine Reihe von Resistenzgenen, deren Wirkungsmechanismus, Mutagenität und Zellzyklusabhängigkeit sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 3) aufgeführt:

Protein	Mechanismus	Zytostatika	Mutagenität	Zellzyklusabhängigkeit	Expression in der Stammzelle
Multidrug-Resistenz-Protein 1 (= MDR-1)	Ausschleußen von Zytostatika	Taxoide, Colchicin, Vinca-Alkaloide, Anthracycline, Etoposid, Podophyllotoxine	keine	ja	mittel bis hoch
Dihydrofolat-Reductase (= DHFR)	Überexpression	Methotrexat	keine	ja	gering
Alkyltransferasen	DNA-Reparatur	Nitrosoharnstoffe	hoch	nein	gering
Aldehyd-Dehydrogenase (= ALDH)	Metabolisierung des Zytostatikums	Cyclophosphamid Mafosfamid	gering	nein	mittel bis hoch
Glutathion-S-Transferase	Metabolisierung des Zytostatikums	Nitrosoharnstoffe Cisplatin	hoch	nein	gering

Tabelle 3: Überblick über die verschiedenen Selektionsmarker (nach Baum *et al.* 1997b)

In dieser Arbeit wurde insbesondere auf das Multidrug-Resistenz-Protein 1 eingegangen, welches im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

1.6.2 Multidrug-Resistenz-Protein 1

Von Multidrug-Resistenz (MDR) spricht man, wenn eine Kreuzresistenz gegen mehrere, chemisch nicht verwandte Substanzen vorliegt (Ling 1997). Vermittelt wird die klassische Multidrug-Resistenz gegen Zytostatika wie Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Epidophyllotoxine und Taxane durch Expression des Multidrug-Resistenz-Proteins 1 (= MDR1), ein 1280 Aminosäuren großes Transmembranprotein, das auch als P(ermeabilitäts)-Glykoprotein (= Pgp) bezeichnet wird (Roninson *et al.* 1986; Abbildung 16). Es gehört zur Gruppe der ABC-Translokatoren, da es zwei **ATP-bindende Cassetten** enthält. Hierzu gehören unter anderem auch der CFT-Rezeptor, der bei Mukoviszidose defekt ist, das *pfmdr*-Gen des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* und das Ste6-Protein der Hefe. Das P-Glykoprotein ist aus zwei nahezu identischen Hälften aufgebaut, die wiederum aus jeweils sechs Membrandurchgängen und einer ATP-bindenden katalytischen Domäne bestehen. Neuere Daten scheinen jedoch für die Existenz von 10 Membrandurchgängen zu sprechen (Cianfriglia *et al.* 1996). Insgesamt bildet das Protein einen Translokationskanal, durch den lipophile Verbindungen aus der Zelle unter ATP-Verbrauch herausgepumpt werden.

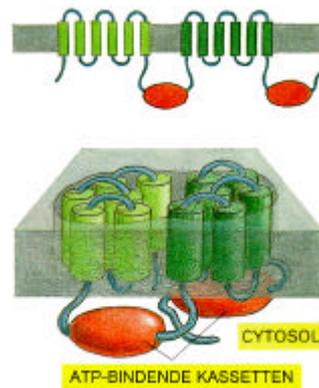


Abbildung 16: Modell des Multidrug-Resistenz-Proteins 1 (Alberts 1994)

1.6.3 Anwendungsgebiete für MDR1

Mehrere Resistenzmarker wurden für die dominante Selektion transduzierter Zellen vorgeschlagen (Tabelle 3). Unter diesen ist das Multidrug-Resistenz-Protein 1 eines der vielversprechendsten. Für MDR1 ergeben sich im Rahmen der Stammzellselektion sowohl Anwendungen im Bereich der Tumorthherapie als auch im Bereich der Korrektur von Erbkrankheiten.

Für zahlreiche maligne Erkrankungen (Sarkome, Mamma- und Ovarialkarzinome, maligne Lymphome und multiple Myelome) konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß durch eine Intensivierung der Chemotherapie die Ansprechraten verbessert werden können. Die dosislimitierende Nebenwirkung zahlreicher Zytostatika beruht auf deren Knochenmarktoxizität. Um diese Nebenwirkungen zu mildern, könnten autologe Stammzellen vor Retransplantation mit einem MDR1-exprimierenden Vektor transduziert werden. Ist somit die Zytostatikaresistenz in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen höher als in den Tumorzellen, kann eine Hochdosischemotherapie den Tumor erfolgreich bekämpfen.

Neben dem Einsatz in der Tumorthherapie kann MDR1 auch als Selektionsmarker zur Anreicherung transduzierter Zellen mittels *in vivo* - Selektion bei der Korrektur von Erbkrankheiten verwendet werden (Abbildung 17). Hierbei erfolgt eine Koexpression von MDR1 zusammen mit dem therapeutischen

Gen. Selbst bei sehr effizienter Transduktion werden aufgrund der Größenbegrenzung des Transplantates zumeist deutlich weniger als 1% der hämatopoetischen Vorläuferzellen das Transgen tragen. Nur über eine *in vivo* - Selektion transduzierter Zellen ließe sich in diesem Fall ein therapeutisch sinnvoller Grad an Chimärismus einstellen (mindestens 3 - 10% der Gesamthämatopoese sollte von den transduzierten Zellen übernommen werden), sofern das therapeutische Gen an sich keinen Selektionsvorteil bewirkt.

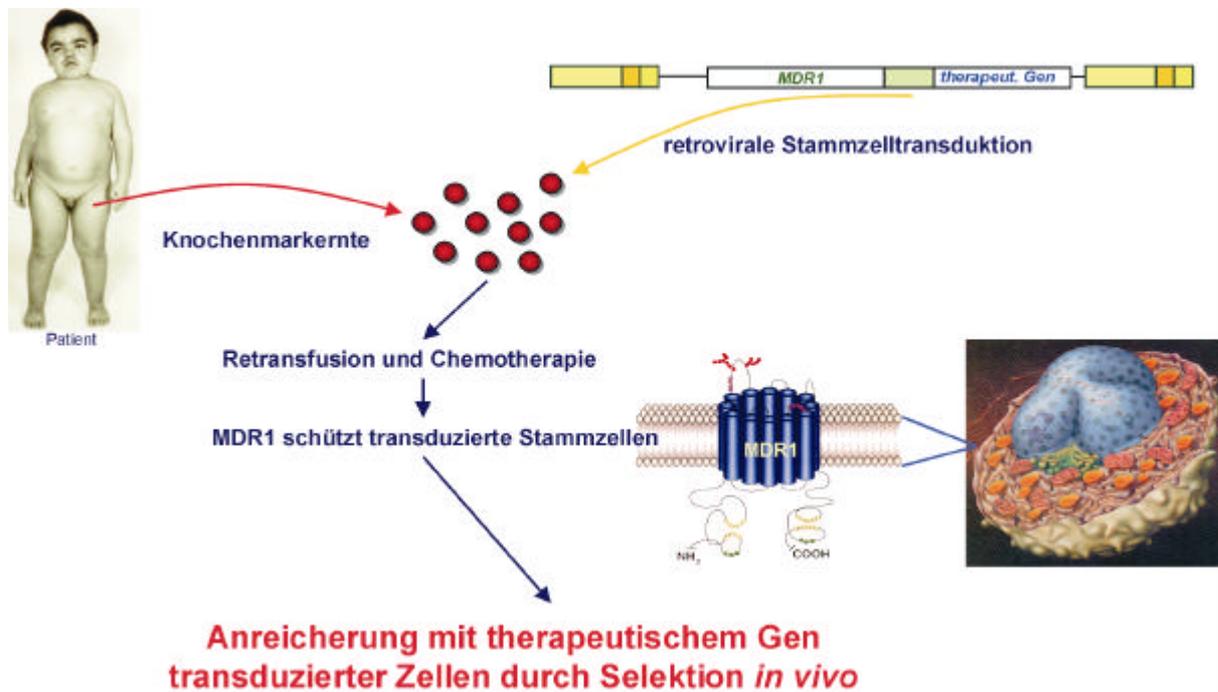


Abbildung 17: MDR1 schützt transduzierte Stammzellen vor Zytostatika, indem es die Zytostatika unter ATP-Verbrauch aus den Zellen ausschleußt. Hierauf beruht der Einsatz von MDR1 als Selektionsmarker bei der Behandlung monogener Erbkrankheiten.

1.6.3.1 MDR1 in der Tumorthherapie

Der erfolgreiche Transfer des MDR-Phänotyps mittels retroviraler Vektoren wurde sowohl anhand von Zelllinien (McLachlin *et al.* 1990) als auch im Mausmodell (Sorrentino *et al.* 1992; Mickisch *et al.* 1992) und in humanen Progenitorzellen (Hanania *et al.* 1995b) nachgewiesen. Aufgrund dieser Daten begannen Anfang der 90er Jahre in den USA mehrere Phase-I- und -II-Studien. In diesen Studien sollten MDR1-transduzierte hämatopoetische Stammzellen bei Patientinnen mit metastasiertem Mamma- oder Ovarkarzinom im Anschluß an eine Hochdosistherapie reinfundiert werden. Dies sollte eine Erhaltungstherapie mit Paclitaxel in steigender Dosierung ermöglichen. Normalerweise dauern die Remissionen nach Hochdosistherapie bei diesen beiden Tumorformen nur kurz an. Die weitere Chemotherapeutika-Verabreichung nach einer Hochdosistherapie gestaltet sich problematisch, da die Knochenmarkreserven erschöpft sind. Würde es jedoch gelingen, das Knochenmark durch MDR1-Gentransfer zu schützen, könnte man die Myelotoxizität von Paclitaxel herabsetzen und somit die Remissionsdauer durch steigende Paclitaxelgabe verlängern. Die bisherigen Ergebnisse zeigten nur eine schwache MDR1-Expression in hämatopoetischen Zellen; zudem erwies sich die Transduktionsrate als gering (Deisseroth *et al.* 1994, 1996; Hanania *et al.* 1996; Hesdorffer *et al.* 1998; Devereux *et al.* 1998). Ferner wurde die Paclitaxel-Gabe nur langsam erhöht, wodurch die Ausbildung einer Chemotherapieresistenz in den Tumorzellen gefördert wird (Hegewisch-Becker *et al.* 1996).

Zukünftige Protokolle müßten daher sowohl eine höhere Transduktionsrate gewährleisten (von Laer *et al.* 1998) als auch eine höhere Expression und einen höheren genotypischen Index, wobei sich ein höherer genotypischer Index auch positiv auf die Transduktionsrate auswirken kann (s. 1.4.5.2). Eine Verbesserung der Expression und des genotypischen Indexes sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6.3.2 MDR1 als Selektionsmarker bei der Behandlung monogener Erbkrankheiten

Neben dem Einsatz in der Tumorthherapie kann MDR1 auch als Selektionsmarker zur Anreicherung transduzierter Zellen mittels *in vivo* - Selektion bei der Korrektur von Erbkrankheiten verwendet werden. Hierbei erfolgt eine Koexpression von MDR1 zusammen mit dem therapeutischen Gen. Ein derartiger Ansatz wurde zum Beispiel von Aran *et al.* 1994 beschrieben: Sie koexprimierten MDR1 zusammen mit Glucocerebrosidase, einer membranassoziierten lysosomalen Hydrolase, die bei Patienten mit Gaucher Krankheit, einer besonderen Form lysosomaler Speicherkrankheiten, defekt ist, und konnten Expression beider Gene in Mausfibroblasten nachweisen. Ein Jahr später veröffentlichten Sugimoto *et al.* einen Vektor für Koexpression von MDR1 und α -Galactosidase A, die bei Patienten mit Fabry Krankheit, ebenfalls eine lysosomale Speicherkrankheit, defekt ist oder vollständig fehlt. In beiden Fällen beruhen die Vektoren auf einem *Harvey Murine Sarcoma Virus* (= HaMSV), und die Koexpression erfolgt über die interne ribosomale Eintrittsstelle des Encephalomyocarditis-Virus (= EMCV-IRES; s. 1.7). Neben lysosomalen Speicherkrankheiten gibt es auch Ansätze zur Behandlung hämatopoetischer Erbkrankheiten. So publizierten Sokolic *et al.* 1996 einen MFG-abgeleiteten Vektor, der MDR1 und gp91phox über eine EMCV-IRES koexprimiert. Gp91phox kodiert für ein Enzym, das in Phagozyten für die Produktion von Superoxidanionen zuständig ist. Bei Patienten mit chronischer Granulomatose fehlt dieses Enzym, was zu häufig wiederkehrenden Infekten führt. Anhand Epstein-Barr-Virus-transformierter B-Zellen aus Patienten konnte die Funktionalität dieses Vektors bewiesen werden. Eine weitere Erbkrankheit im hämatopoetischen System ist die bereits erwähnte Adenosin-desaminase-Defizienz, zu deren Behandlung ein MDR1-EMCV-IRES-Adenosin-desaminase-Koexpressionsvektor entwickelt wurde (Zhou *et al.* 1998).

In all diesen Arbeiten (Aran *et al.* 1994; Sugimoto *et al.* 1995; Sokolic *et al.* 1996; Zhou *et al.* 1998) wurde beschrieben, daß die Expression im Vergleich zum monocistronischen Vektor geringer ist, speziell die des IRES-kontrollierten Gens. Daten bezüglich einer Expression in frühen und primären humanen hämatopoetischen Zellen existierten bisher noch nicht, vermutlich, da die verwendeten *Enhancer/Promotoren* und *Leader* transkriptionell in früheren Zellen eine zu geringe Aktivität besaßen, um den durch die Koexpression bedingten Expressionsverlust ausgleichen zu können. Im monocistronischen Kontext erwiesen sich FMEV-MDR1 Vektoren den MoMLV- bzw. HaMSV-LTR / MoMSV-*Leader* abgeleiteten Vektoren unter Hochdosisselektion in CD34-positiven humanen Progenitorzellen überlegen, was auf der Stärke des SFFVp-Enhancers und der tRNA^{Gln}-Primerbindungsstelle, die die Bindung eines transkriptionellen Repressors ausschließt, beruht (Baum *et al.* 1995; Eckert *et al.* 1996). In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, ob FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ihre Funktionalität in frühen und primären humanen hämatopoetischen Zellen aufrechterhalten, Grundvoraussetzung für die all diesen Koexpressionsstrategien zugrundeliegende Selektion auf Stamm- und Vorläuferzellebene zur Anreicherung transduzierter Zellen.

1.7 Koexpression

1.7.1 Definition

Für viele Anwendungen im Bereich der Gentherapie ist es sinnvoll, mehrere Gene, zum Beispiel ein therapeutisches Gen und ein Marker- oder Selektionsgen (s. 1.7.5), parallel zu exprimieren (Koexpression). Folgende Koexpressionsstrategien (Abbildung 18) werden in der vorliegenden Arbeit im Kontext retroviraler Vektoren analysiert:

- Koexpression über einen internen, zweiten Promotor
- Koexpression über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES)
- Koexpression durch alternatives Spleißen

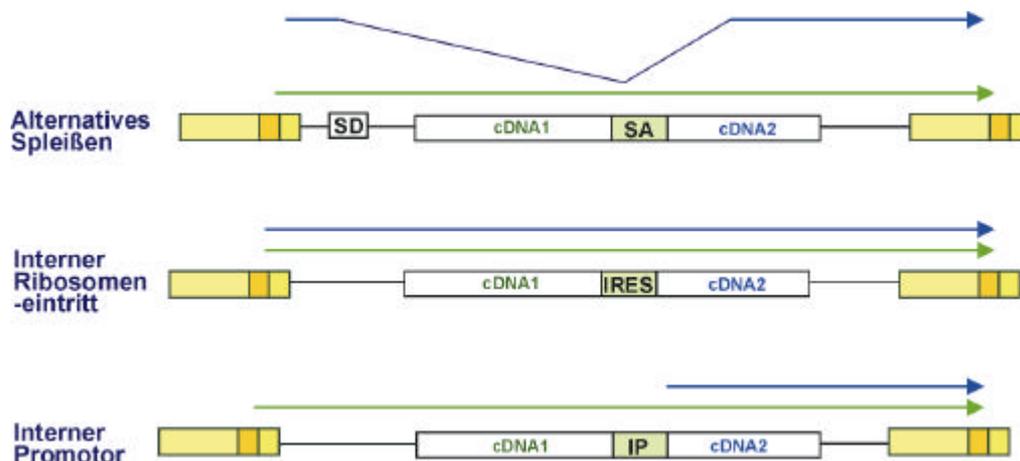


Abbildung 18: Koexpressionsstrategien
(Pfeile: synthetisierte mRNA)

1.7.2 Koexpression über einen internen Promotor

Bei dieser Art der Koexpression werden die Transkripte von unterschiedlichen *Enhancern*/Promotoren aus transkribiert, die sich in enger räumlicher Nähe befinden. Als heterologer Promotor kommt sowohl ein Haushaltsgenpromotor (breites Zellspektrum) als auch ein gewebe- oder zelltypspezifischer Promotor in Frage. Einige Arbeitsgruppen stellten jedoch Interferenzen zwischen dem heterologen und retroviralen Promotor fest (Emerman *et al.* 1984; Li *et al.* 1992; Wu *et al.* 1996). Dies könnte alternativ auch auf einer Instabilität des Gesamtkonstruktes beruhen, da durch die Neukombination verschiedener Gene/Promotoren in einem retroviralen Konstrukt neue Möglichkeiten für Rearrangements auf DNA- und RNA-Ebene entstehen können (Mclvor 1990: kryptisches Spleißen zwischen Metallothionein-I-Promotor und Purinnukleosidphosphorylase-Gen).

1.7.3 Koexpression über eine IRES

Die Verwendung von internen ribosomalen Eintrittsstellen (*internal ribosomal entry sites*, IRES) gestattet die Expression mehrerer Gene vom gleichen Transkript aus, d. h. beide Gene werden vom gleichen Promotor aus transkribiert (Morgan *et al.* 1992). Der erste offene Leserahmen auf der mRNA wird 5'-*cap*-abhängig translatiert, der zweite offene Leserahmen, der auf die IRES folgt, *cap*-unabhängig. Hierbei erfolgt kein Abtasten der mRNA durch das Ribosom vom 5'-Ende aus (wie bei der *cap*-abhängigen Translation); vielmehr erkennt das Ribosom interne Sequenzen der IRES (analog zur prokaryontischen Translation).

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von IRES: Bei Typ 1 ist eine genaue Positionierung des Startkodons innerhalb der IRES nicht notwendig, bei Typ 2 erfolgt eine effektive Translation nur bei exakter Positionierung des Startkodons. Zudem erfolgt IRES-abhängige Translation zelltypspezifisch, da zelltypspezifische Proteine beteiligt sind (Borman *et al.* 1997).

IRES-abhängige Translation kommt sowohl bei Eukaryonten (z. B. BiP-mRNA, Antennapedia-mRNA, Ultrabithorax-mRNA; Knippers 1995) als auch bei Viren (z. B. Picornaviren; Adam *et al.* 1991) vor. Bei dem Poliovirus erfüllt die IRES eine wichtige Funktion: Das virale Protein V2A spaltet hier p220, ein Protein, das für die Ausbildung des 5'-*cap*-abhängigen Translationsinitiationskomplexes notwendig ist. Somit erfolgt keine *cap*-abhängige Translation mehr. Die eigene, virale RNA kann jedoch weiterhin translatiert werden, da dies *cap*-unabhängig, über eine IRES, erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei picornavirale IRES verwendet: Die IRES des Poliovirus (Typ-1-IRES; Abbildung 19; Dirks *et al.* 1993) und des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV; Typ-2-IRES; Ghattas *et al.* 1991).

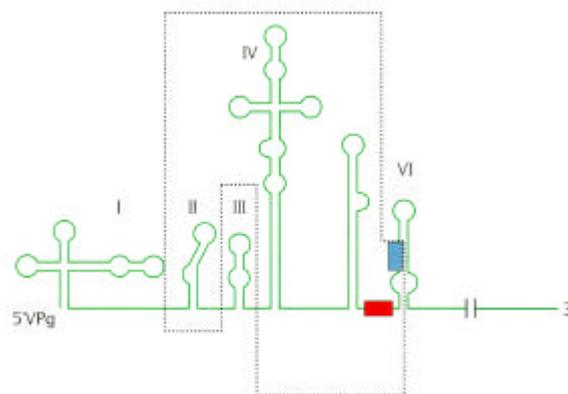


Abbildung 19: IRES im 5'-Nichtkodierungsbereich der Poliovirus-RNA (Knippers 1995)

- VPg Kovalent gebundenes terminales Peptid
 (wird in retroviralen Vektoren nicht benötigt)
 - I-VI Bezeichnung der 6 aufeinanderfolgenden RNA-Schleifen
 - rote Box Folge von Pyrimidin-Nucleotiden
 - blaue Box AUG-Startkodon
- Der gesamte dargestellte Bereich ist für die Erkennung durch das Ribosom notwendig.

1.7.4 Koexpression durch alternatives Spleißen

Alternativ zu den unter 1.7.2 und 1.7.3 erwähnten Methoden kann das Zweitgen auch an die Stelle des *env*-Gens eingefügt werden. Da sich vor dem *env*-Gen ein alternativer Spleißakzeptor befindet, erfolgt die Expression dann über die subgenomische, virale RNA (Ostertag *et al.* 1987). Wie bei der Koexpression über eine IRES ist auch hier die Genexpression LTR-gesteuert. Da der Mechanismus des Spleißens auch für die Betrachtung der *Leader*-Modifikationen und des genotypischen Indexes (s. 1.4.4.2) eine wichtige Rolle spielt, sei er im folgenden kurz erläutert.

Für das Spleißen nukleärer prä-mRNA sind vier konservierte Elemente verantwortlich (Abbildung 20): Das 5'-Ende des Introns (blau), die Verzweigungsstelle (orange), die ca. 20 bis 50 Basenpaare vor dem 3'-Ende des Introns liegt und ein Adenin enthält, die Polypyrimidinregion (grün) kurz vor dem 3'-Ende des Introns und das 3'-Ende des Introns (gelb) (Knippers 1995).

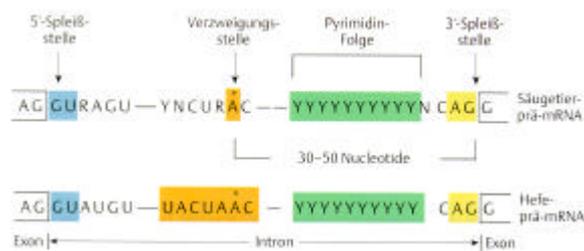


Abbildung 20: Spleiß-Konsensussequenzen (Knippers 1995)

Mechanistisch ist das Spleißen eine Folge von zwei Umesterungen, die von dem sogenannten Spleißosom katalysiert wird (Abbildung 21):

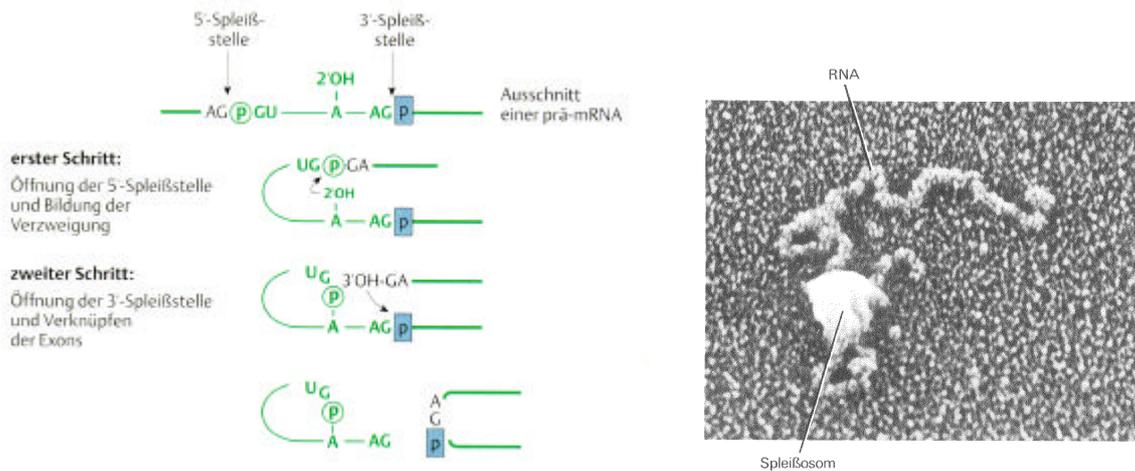


Abbildung 21: Spleißen
links: Mechanismus (chemisch; Knippers 1995)
rechts: Spleißosom (Katalysator; Alberts 1994)

Der Gesamtzyklus lässt sich in 5 Stufen (Abbildung 22) einteilen:

- Spleißosombildung
- katalytische Reaktionen
- Trennung von reifer mRNA und herausgeschnittenem Intron
- Spleißosomdissoziation
- Rezyklisieren der Spleißfaktoren

Zuerst lagert sich das U1-snRNP (snRNP: *small nuclear ribonucleoprotein particle*, ein RNA/Protein-Komplex aus Proteinen und der U1-snRNA) über komplementäre Basenpaarung an die 5'-Spleißstelle, anschließend das U2-snRNP an die Verzweigungsstelle und die Polypyrimidinregion. Daraufhin nimmt das U1-snRNP unter Mitwirkung weiterer Proteine Kontakt mit der 3'-Spleißstelle auf, wodurch der sogenannte A-Komplex entsteht. Durch Anlagern des [U4/U6.U5]-Triple-snRNPs an den A-Komplex entsteht dann der sogenannte B-Komplex. Nach Abdissoziation der U4-snRNA bildet sich das aktive Zentrum des Spleißosoms bestehend aus der U6-snRNA (die vorher mit der U4-snRNA basengepaart war) und der U2-snRNA. Man spricht jetzt vom C-Komplex, der das eigentlich aktive Spleißosom darstellt. Dieser katalysiert die beiden Umesterungen. Danach wird zuerst die mRNA freigesetzt, kurze Zeit darauf das Intronlariat. Abschließend dissoziieren die einzelnen Spleißfaktoren vom Spleißosom ab und ein neuer Zyklus kann beginnen (Knippers 1995). Die Effizienz des Spleißens hängt hauptsächlich von zwei Faktoren ab: der Übereinstimmung der entsprechenden Sequenzen mit der Konsensussequenz (Stryer 1991) und der An- bzw. Abwesenheit von Spleiß-Enhancern (Graveley *et al.* 1998), die sich auch im Intron befinden können.

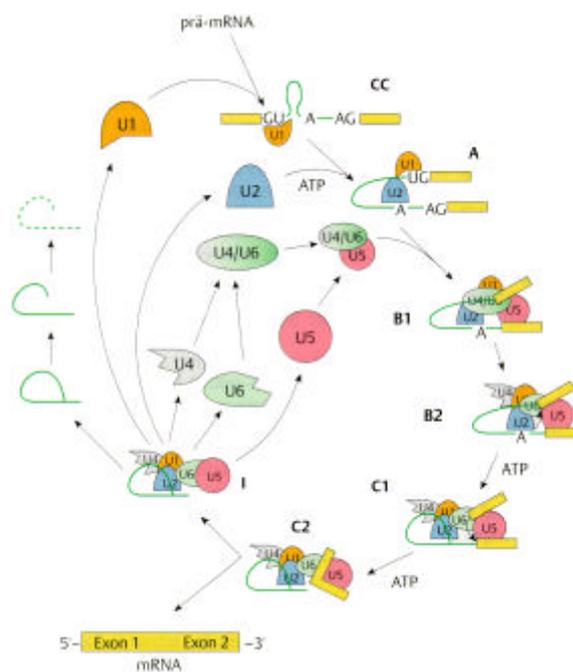


Abbildung 22: Gesamtzyklus des Spleißens (Knippers 1995)

1.7.5 Anwendungsgebiete für Koexpression

Für viele Applikationen ist es sinnvoll, zwei Gene parallel zu exprimieren.

In der Tumorthherapie werden häufig Kombinationen verschiedener Zytostatika im Rahmen einer Chemotherapie eingesetzt, um der Entstehung chemoresistenter Tumorzellklone vorzubeugen. Hier würde sich ein Stammzellschutz durch Gentransfer zweier Resistenzgene anbieten. So ist eine Koexpression von MDR1 mit Aldehyddehydrogenase (Magni *et al.* 1996), O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (Jelinék *et al.* 1996), Glutathion-S-Transferase (Greenbaum *et al.* 1994; Doroshow *et al.* 1995), Dihydrofolatreduktase (Li *et al.* 1992; Zhao *et al.* 1997) oder *Lung Resistance-related Protein* (Scheffer *et al.* 1995) denkbar. Alternativ könnte auch ein Suizidgen wie Thymidinkinase, Cytidindesaminase oder Nitroreduktase koexprimiert werden (Davis *et al.* 1996), um eine negative Selektion im Falle der ungewollten Transduktion von Tumorzellen zu ermöglichen.

Neben der Koexpression zweier Resistenzgene hat auch die gleichzeitige Expression eines therapeutischen Gens mit einem Resistenzgen praktische Bedeutung, um transduzierte Zellen mittels *in vivo* - Selektion anreichern zu können (s. 1.6.3.2).

Zusätzlich könnten neue Behandlungsstrategien für HIV ins Auge gefaßt werden, indem man die Viruslast durch Myeloablation im Rahmen einer Chemotherapie vermindert und gleichzeitig die Hämatopoese mit genetisch modifizierten Vorläuferzellen rekonstituiert, die HIV-antagonistische Moleküle synthetisieren (RRE-Köder; Ribozyme; transdominantes Tat oder Rev; Baum *et al.* 1997b).

Ferner könnten sowohl Resistenzgene in der Tumorthherapie als auch therapeutische Gene mit einem Oberflächenmarker wie Δ LNCFR koexprimiert werden. Dies würde zum einen eine Anreicherung transduzierter, exprimierender Progenitorzellen *in vitro* über Immunoaffinität oder FACS vor Replantation erlauben (Pawliuk *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997); zum anderen kann das Schicksal der retransplantierten Zellen und deren Nachkommen *in vivo* weiterhin verfolgt werden (Genmarkierung; Philips *et al.* 1996).

1.8 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung retroviraler FMEV-Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie, die

- a) eine vom verwendeten Transgen unabhängige, hohe Expression in hämatopoetischen Zellen ermöglichen.
 - 2.1 Die hohe Expression der FMEV-Vektoren in hämatopoetischen Zellen ist unabhängig vom übertragenen Gen
 - 2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination
- b) eine dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen mit retroviralen MDR1-Koexpressionsvektoren erlauben, Voraussetzung für eine erfolgreiche Stammzellselektion und Stammzellexpansion *in vivo* (vgl. 1.6.3).
 - 2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen
- c) eine Anreicherung transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen *in vitro* über Koexpression mit einem Zelloberflächenmarker gestatten.
 - 2.3 Bicistronische retrovirale Vektoren für kombinierte Myeloprotektion und Zelloberflächenmarkierung
- d) erhöhte Sicherheit vor Entstehung replikationskompetenter Retroviren oder Synthese von Peptiden/Proteinen unbekannter Funktion bieten. Dies sollte erreicht werden durch Deletion aller nicht unmittelbar notwendigen retroviralen Sequenzen (insbesondere der *gag*-Sequenzen), der Deletion bzw. Mutation von ATG-Leserahmen 5' des Transgens und durch Unterdrücken kryptischen Spleißens der cDNA.
 - 2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination
 - 2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes und der Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen
- b) einen hohen genotypischen Index bezüglich MDR1 als Transgen zeigen.
 - 2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes und der Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

2. Ergebnisse

2.1 Die hohe Expression der FMEV-Vektoren in hämatopoetischen Zellen ist unabhängig vom übertragenen Gen

2.1.1 Fragestellung

In vorherigen Studien wurde mittels transienter Transfektion bereits gezeigt, daß der *Enhancer/Promotor* des SFFVp bis zu einer Größenordnung aktiver ist als der des MoMLV, daß die Verwendung der PBS des MESV transkriptionelle Repression der LTR verhindert und eine Kombination aus SFFVp-LTR und MESV-*Leader* sehr gute Expression von MDR1 mittels retroviralem Gentransfer vermittelt (Baum *et al.* 1995; Eckert *et al.* 1996).

Die Bedeutung jedes einzelnen dieser Module (*Enhancer/Promotor* bzw. *Leader*) wurde jedoch bisher noch nicht nach retroviralem Gentransfer aufgezeigt. Ebenso stellt sich die Frage, ob die bisherigen Beobachtungen auch auf andere Systeme nach retroviraler Transduktion (neben MDR1) übertragbar sind, insbesondere auch auf Systeme ohne Selektion. Diese Punkte sind Gegenstand des vorliegenden Kapitels.

Hierzu erfolgte eine Analyse in insgesamt vier verschiedenen Reportersystemen: Neomycinphosphotransferase II (NPTII; kodiert durch *neo^R*), β -Galactosidase (kodiert durch *lacZ*), *enhanced humanized green fluorescent protein* (GFP) und Δ LNGFR, wobei die beiden letzten eine Analyse auf Einzelzellebene und ohne Selektion erlauben.

2.1.2 Aufbau der Vektoren

Um die unterschiedlichen retroviralen Vektoren miteinander vergleichen zu können, wurde ein retroviraler Basisvektor kloniert, der den Austausch wichtiger Kontrollelemente erlaubt (Abbildung 23). Somit können die LTR und/oder der *Leader* ausgetauscht werden, während alle anderen Elemente vollständig identisch sind. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die eingeführten Veränderungen miteinander vergleichen zu können.

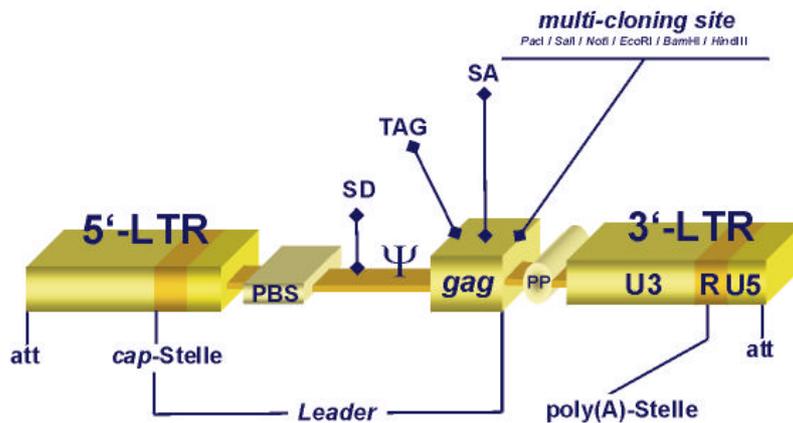


Abbildung 23: Retroviraler Basisvektor, der den Austausch wichtiger Kontrollelemente mittels geeignetem Restriktionsverdau gestattet. Der *Enhancer/Promotor* der 3'-LTR wird während der retroviralen Replikation in die 5'-LTR kopiert. Alle Vektoren enthalten eine vollständig *env*-deletierte 3'-untranslatierte Region, entlehnt aus der LX-Retrovirus-Serie von A. D. Miller (Miller *et al.* 1989). Außerdem wurde ein Polylinker (*multi-cloning site*) inseriert.

- att attachment site
- LTR Long Terminal Repeat
- PBS Primerbindungsstelle
- SD Spleißdonor
- Ψ Verpackungssignal
- SA Spleißakzeptor
- PP Polypurin-Trakt

Auf die Unterschiede der verschiedenen *Enhancer/Promotoren* und *Leader*-Regionen wurde bereits in der Einleitung (1.3.6) hingewiesen. Folgende Kombinationen wurden kloniert (Abbildung 24):

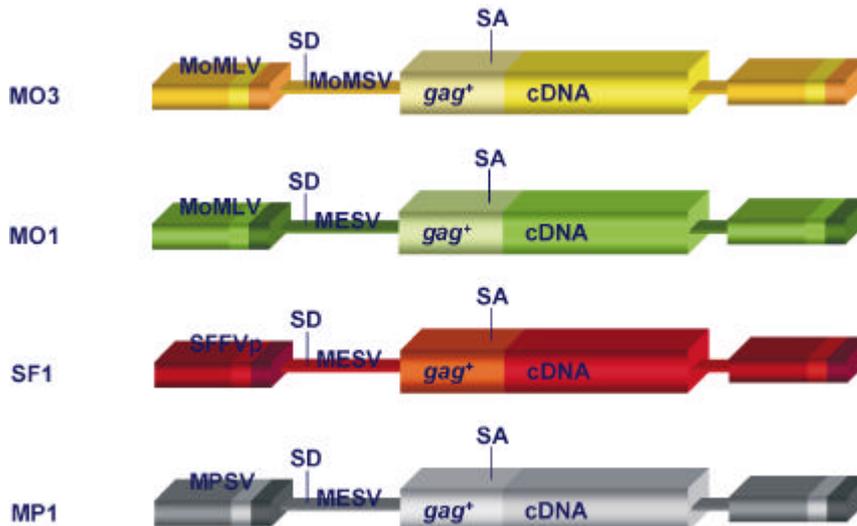


Abbildung 24: Kombination der *Enhancer/Promotoren* von MoMLV, SFFVp und MESV mit dem *Leader* von MoMSV und MESV. Dargestellt ist die provirale Form nach retroviraler Integration. Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde jeweils mutiert.

Als Reporter wurden - wie bereits erwähnt - NPTII, ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und NPTII (*leo^R*; Baum *et al.* 1996c), GFP und Δ LNGFR verwendet (Abbildung 25). NPTII vermittelt Resistenz gegen Geneticin 418 (= G418), indem es sein Substrat phosphoryliert, so daß es seine toxische Funktion (Inhibition der Translation) nicht mehr ausüben kann.

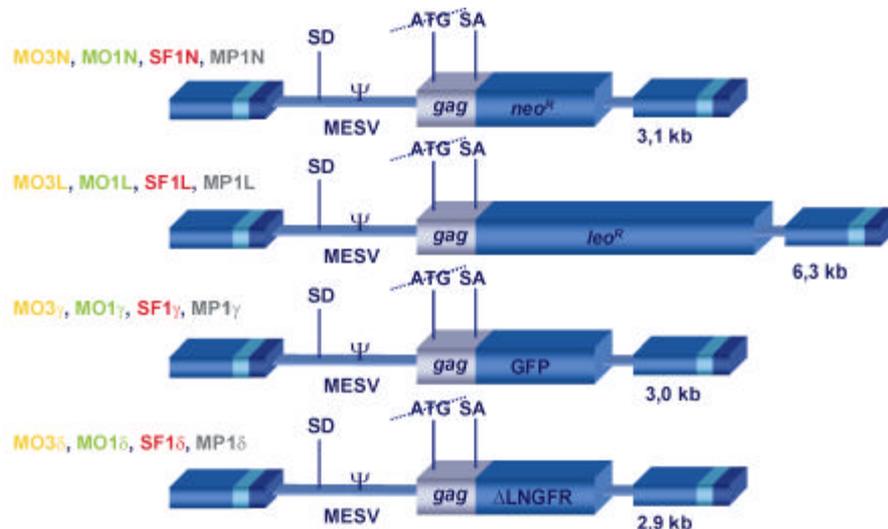


Abbildung 25: Provirale Formen der retroviralen Reportergerätenkonstrukte (Das ursprüngliche gag Startcodon wurde jeweils mutiert)

2.1.3 Die Kombination von SFFVp-LTR und MESV-Leader zeigt keine negativen Auswirkungen bzgl. des retroviralen Titers auf Fibroblasten

Um zu klären, ob die Unterschiede im *Leader* oder LTR die Verpackung beeinflussen, wurden die Titer monocistronischer Vektoren mit NPTII-cDNA in einer Endpunktverdünnung (s. 4.2.3) verglichen. Massenkulturen von GP+envAm12 Verpackungszellen wurden unter identischen Bedingungen über retrovirale Transduktion transfizierter ökotroper Verpackungszellen GP+E-86 angelegt. In einer Endpunktverdünnung zellfreier Gewebekulturüberstände ergaben die amphotropen NPTII-Vektoren **MO3N** (LX-Typ, d. h. MoMLV-LTR und MoMSV-*Leader*), **MO1N** (MoMLV-LTR und MESV-*Leader*), **MP1N** (MPEV-Vektor) und **SF1N** (FMEV-Vektor) ähnliche Titer auf Mausfibroblasten GP+E-86. Die Titer der Produzentenmassenkulturen waren in einer Größenordnung von $2 \cdot 5 \cdot 10^5$ G418 *Resistance Transfer Units* (= GTU) pro ml Überstand. Unabhängig vom Vektorrückgrat wurden routinemäßig Produzentenklone mit Titern bis zu $5 \cdot 10^6$ GTU/ml bei der Analyse von zwölf unabhängigen Klonen erhalten. Zusammenfassend lässt sich festhalten, daß weder die SFFVp-LTR noch der MESV-*Leader* den Titer negativ beeinflussen. Die Titration auf Fibroblasten wurde nicht durch die unterschiedlichen *Enhancer*-Elemente beeinflusst, da die Expression in Fibroblasten nahezu gleich ist (s. Abbildung 28).

2.1.4 Die Kombination aus SFFVp-LTR und MESV-Leader zeigt die höchste β -Galactosidase-Expression in selektierten hämatopoetischen Massenkulturen

Im Vergleich zu neo^R gestattet der leo^R -Marker neben G418-Selektion transduzierter Zellen die lineare Quantifizierung der Vektorexpression in Proteineextrakten über die β -Galactosidase-Aktivität (Abbildung 26).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus transienten Transfektionen (Baum *et al.* 1995) erwies sich der MESV-Leader (MO1L) dem MoMSV-Leader (MO3L) als überlegen. Der größte Unterschied wurde in den primitivsten hämatopoetischen Zellen, FDCP-mix, beobachtet. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß der Repressor (s. 1.3.6.3) in primitiveren hämatopoetischen Stammzellen aktiver ist. Alternativ könnte der Repressor konstitutiv wirksam sein und dominanter werden, wenn die LTR-Funktion reduziert wird, wie es in primitiveren hämatopoetischen und embryonalen Zellen der Fall ist.

Beim Vergleich der MoMLV-LTR (MO1L) mit der MPSV-LTR (MP1L) ergaben sich in murinen erythroleukämischen Friend-Zellen (F4-12-B2) und murinen myeloiden Vorläuferzellen (FDCP-1) keine signifikanten Unterschiede, während in den primitiveren hämatopoetischen Zellen FDCP-mix MO1L eine um den Faktor 2 höhere Genexpression, in den erythroleukämischen humanen K562 Zellen MP1L eine um den Faktor 2 höhere Genexpression aufwies. Dessen ungeachtet zeigte die SFFVp-LTR (SF1L) in allen analysierten Zelllinien die höchste Genexpression trotz Vorselektion, die zu einem Angleichen der Expression führen kann.

Im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen wurde nur eine geringfügige Leader-bedingte Repression in Mausfibroblasten (Sc1 Zellen) beobachtet, und in diesen Zellen erreichte die SFFVp-LTR keine Expressionssteigerung gegenüber der MoMLV- und MPSV-LTR (Daten nicht dargestellt).

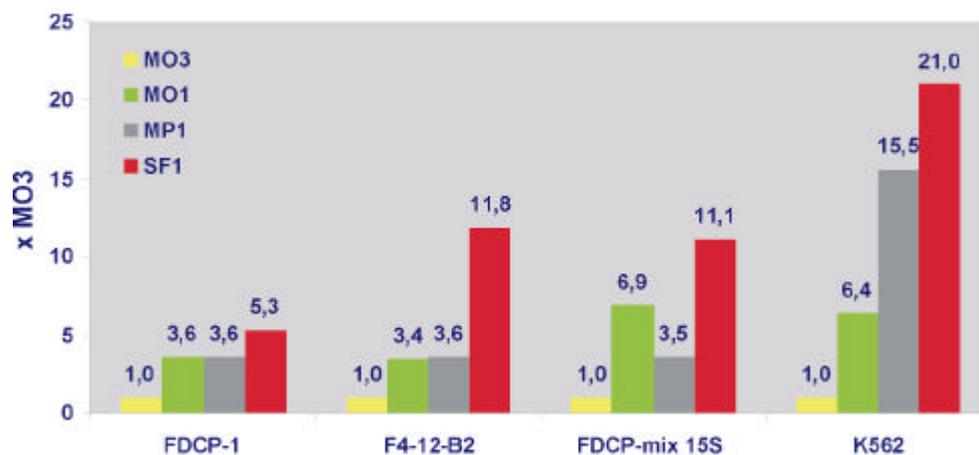


Abbildung 26: Die Kombination von SFFVp-LTR und MESV-Leader zeigt die höchste lacZ-Expression in selektierten hämatopoetischen Massenkulturen. Dargestellt ist die relative lacZ-Expression im leo^R -System.

Die β -Galactosidase-Aktivität wurde aus Zellextrakten bestimmt, die aus stabil mit den leo^R -Vektoren transduzierten Massenkulturen geerntet wurden. Die Zellen wurden 14 Tage lang in 1 mg/ml G418 selektiert. Eine Woche später wurde die β -Galactosidase-Aktivität luminometrisch (Luminiscent β -Gal Genetic Reporter System II, CLONTECH GmbH, Heidelberg) bestimmt mit einem Berthold LB 952 T/16 Luminometer (Berthold GmbH, Wildbad) und auf die Proteinkonzentration der Zellextrakte mittels Proteinbestimmung nach Lowry (Ausubel and Frederick, 1994) abgeglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier Experimente (Abweichungen unter 20%). Alle Meßwerte befanden sich im linearen Bereich des luminometrischen Assays.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß die SFFVp-LTR sich in allen analysierten myelo-erythroiden Zellen aktiver erwies als die des MoMLV und MPSV (Vergleich SF1; MO1; MP1), wobei der größte Unterschied zur MoMLV-LTR in K562 Zellen, zur MPSV-LTR in FDCCP-mix 15S auftrat. Im Vergleich zum MoMLV/MoMSV-abgeleiteten Vektor MO3L zeigte der FMEV-abgeleitete Vektor SF1L im Durchschnitt sogar ungefähr um eine Größenordnung höhere β -Galactosidase-Aktivität.

Leider gestattet der leo^R -Marker keine Analyse auf Einzelzellebene und bedingt eine G418-Vorselektion, die bereits expressionsangleichend wirken könnte. Die Expressionsangleichung kann zum einen durch den Verlust niedrig-exprimierender Zellen zustande kommen; zum anderen können bei schwach exprimierenden Vektoren Zellen mit Mehrfachintegrationen angereichert werden. Deshalb wurden weitere Analysen mit Markern durchgeführt, die Aufschluß über die Expression auf Einzelzellebene und ohne Selektion bieten.

2.1.5 Genexpression ohne Selektion auf Einzelzellebene

Für den Nachweis der Genexpression ohne Selektion auf Einzelzellebene wurde zum einen der zytoplasmatische Marker GFP verwendet, sowie der Zelloberflächenmarker Δ LNGFR. Die Expression dieser Gene gestattet das präparative Sortieren transduzierter Zellen mittels Durchflußzytometrie, und, im Falle von Δ LNGFR, auch mittels Immunoaffinität (Fehse *et al.* 1997), was für klinische Anwendungen von großer Bedeutung ist. Jedoch bedürfen Fragen hinsichtlich Immunogenität (GFP) und Interferenz mit Signalwegen oder Rezeptorabdissoziation (Δ LNGFR; Zupan *et al.* 1991) weiterer Aufklärung. In der vorliegenden Studie wurden die Gene jedoch als Werkzeuge zur Messung der Genexpression ohne Selektion auf Einzelzellebene gesehen. Die Vektorarchitektur entsprach der für den neo^R - bzw. leo^R -Transfer.

Sowohl mit Δ LNGFR als auch mit GFP war die Expression abhängig von den Kontrollelementen des jeweiligen retroviralen Vektors.

Der MoMLV/MoMSV-abgeleitete GFP-Vektor MO3 GFP vermittelte schlechte Expression in K562 Zellen, wobei keine vollständige Trennung zu untransduzierten K562 Zellen durchflußzytometrisch feststellbar war. Der MESV-*Leader* (MO1 GFP) verbesserte die Expression des MoMLV-LTR (Abbildung 27 oben).

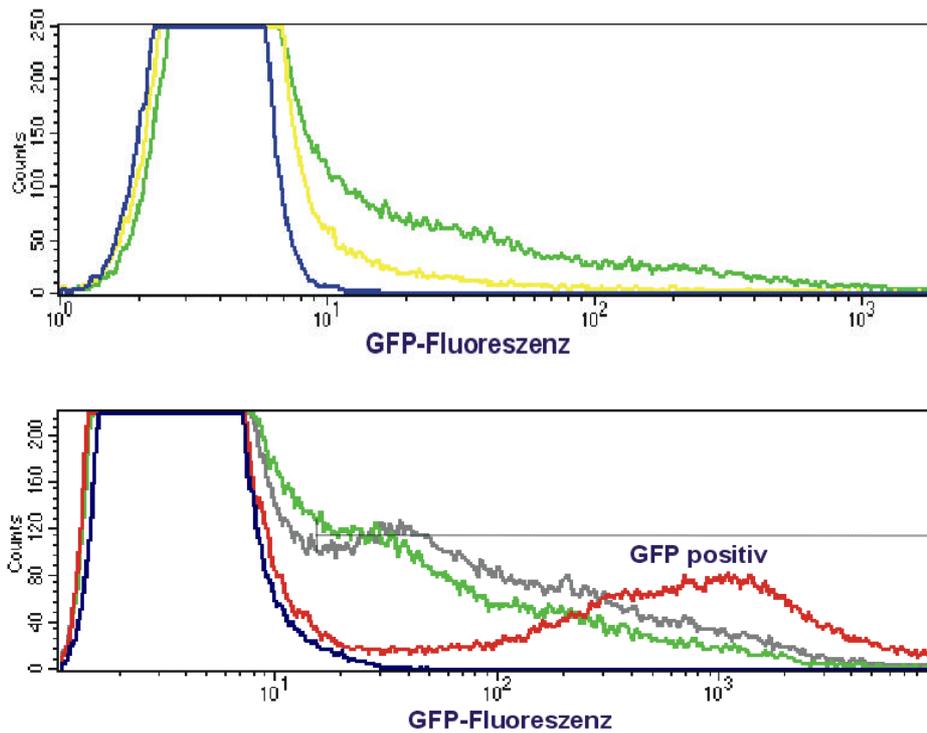


Abbildung 27: Der MESV-*Leader* vermittelt im Vergleich zum MoMSV-*Leader* erhöhte Genexpression. Die Kombination des MESV-*Leaders* mit der SFFVp-LTR ist bzgl. der Genexpression Kombinationen mit MoMLV- und MPSV-LTR überlegen. Dargestellt ist ein *Enhancer*/Promotor- und *Leader*-Vergleich im GFP-System.

oben Vergleich von K562 Zellen, die mit MO3 GFP bzw. MO1 GFP transduziert wurden
 unten Vergleich von K562 Zellen, die mit MO1 GFP, MP1 GFP bzw. SF1 GFP transduziert wurden

Untransduzierte Zellen sind dunkelblau dargestellt.

Eine eindeutige Trennung transduzierter Zellen von untransduzierten konnte jedoch auch nicht durch Verwendung der MPSV-LTR erreicht werden. Hierzu bedurfte es der stärkeren LTR des FMEV-Konstruktes (SF1 GFP) (Abbildung 27 unten).

Eine durchflußzytometrisch sehr hohe Sensitivität und Auflösung konnte mit Δ LNCFR als Oberflächenmarker erreicht werden (Abbildung 28).

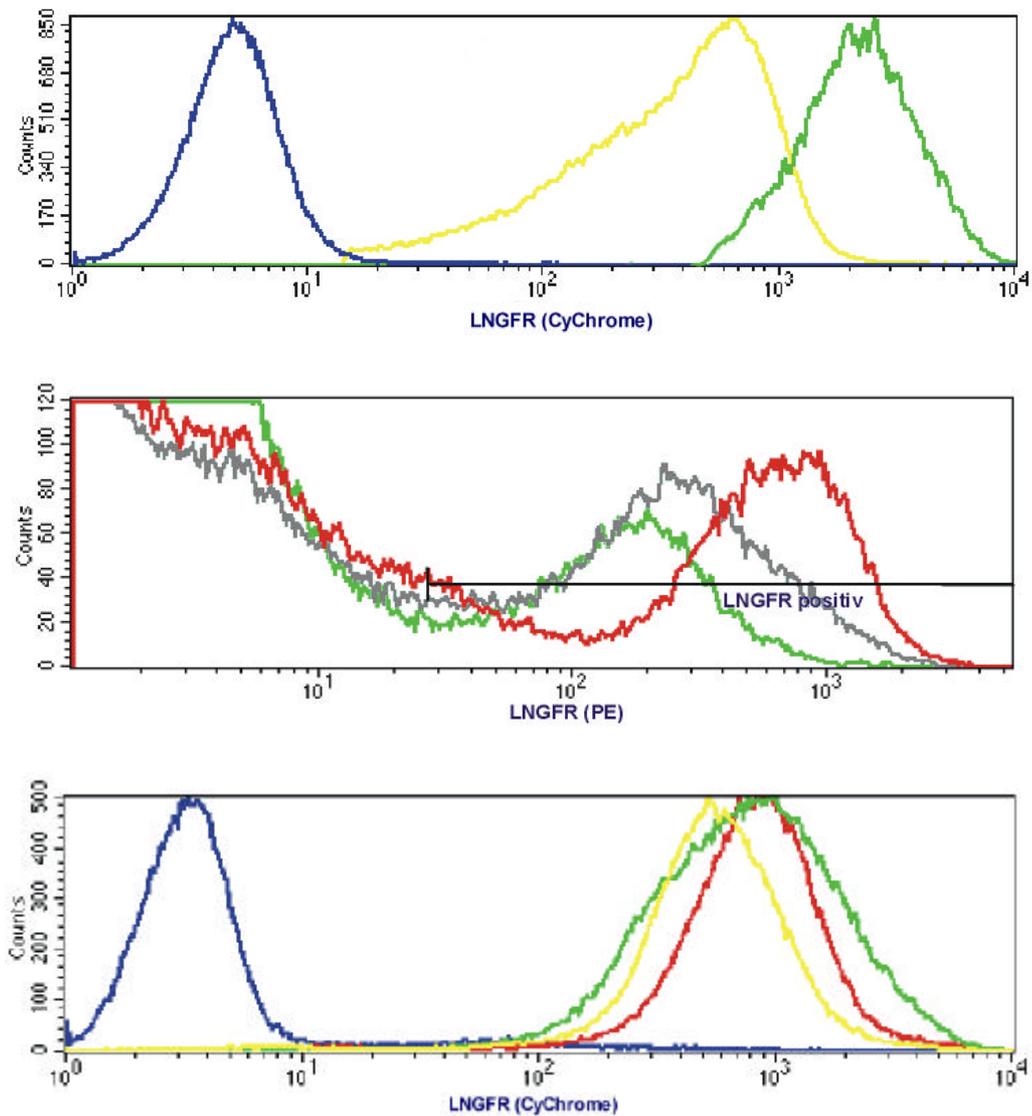


Abbildung 28: *Enhancer/Promotor- und Leader-Vergleich im Δ LNGFR-System*

- oben Vergleich von K562 Zellen, die mit **MO3 Δ LNGFR** bzw. **MO1 Δ LNGFR** transduziert wurden. 200 000 Zellen wurden analysiert und auf die exprimierenden Zellen ein *gate* gesetzt. Untransduzierte Zellen sind dunkelblau dargestellt. Die Färbung erfolgte mit einem biotinylierten Anti-LNGFR-Antikörper, wobei Streptavidin-CyChrome als Sekundärreagens verwendet wurde.
- Mitte Vergleich von K562 Zellen, die mit **MO1 Δ LNGFR**, **MP1 Δ LNGFR** bzw. **SF1 Δ LNGFR** transduziert wurden. 200 000 Zellen wurden analysiert. Die Färbung erfolgte im Gegensatz zu (oben) mit einem unmarkierten Anti-LNGFR-Antikörper, wobei ein R-Phycoerythrin-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper als Sekundärreagens verwendet wurde. Deshalb sind die beiden Abbildungen nicht direkt zu vergleichen. Da die Fluoreszenzintensität von **SF1 Δ LNGFR** zu hoch ist, um in einem Diagramm mit untransduzierten Zellen dargestellt zu werden, wurde die Sensitivität des Instrumentes reduziert.
- unten Transduktion von Mausfibroblasten mit den Vektoren **MO3 Δ LNGFR**, **MO1 Δ LNGFR** und **SF1 Δ LNGFR**. Es wurden 200 000 Zellen analysiert und auf die exprimierenden Zellen ein *gate* gesetzt. Untransduzierte Zellen sind dunkelblau dargestellt. Die Färbung erfolgte mit einem biotinylierten Anti-LNGFR-Antikörper, wobei Streptavidin-CyChrome als Sekundärreagens verwendet wurde.

Hier zeigte die Kombination der MoMLV-LTR mit dem in hämatopoetischen Zellen permissiven MESV-*Leader* eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zum Vektor mit MoMSV-*Leader* (Abbildung 28 oben). Die Verwendung der MPSV-LTR erhöhte weiterhin die Expression. Die stärkste Verschiebung der Fluoreszenzintensität gegenüber untransduzierten Zellen war bei SF1 Δ NGFR (SFFVp-LTR) zu beobachten. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen zeigte sich in Fibroblasten ein geringerer Effekt des MESV-*Leaders*, während eine Verwendung der SFFVp-LTR keinen positiven Effekt in diesen Zellen ausübte. Diese Daten stehen im Einklang mit den zuvor präsentierten Daten mit *leo*^R als Marker sowie den bereits für transiente Systeme publizierten Daten (Baum *et al.* 1995). Im Vergleich der relativen Expression der verschiedenen LTRs in K562 Zellen im GFP-, Δ NGFR- und *leo*^R-System ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 29):

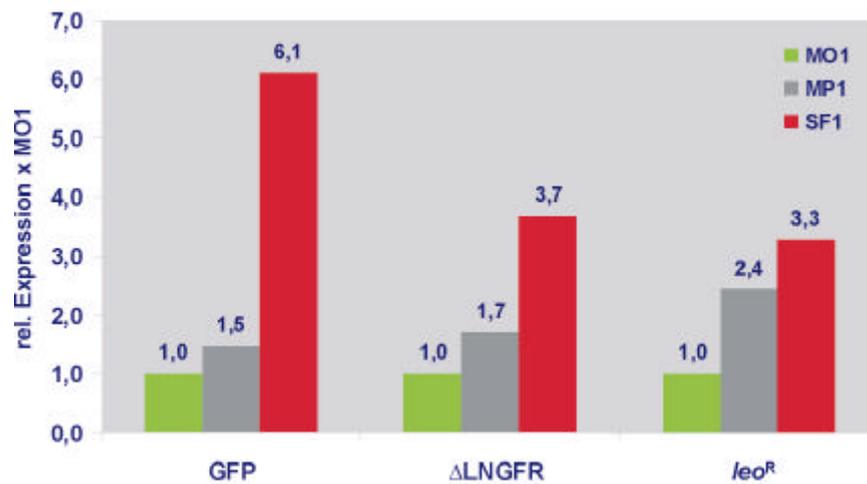


Abbildung 29: In allen analysierten Systemen vermittelte die SFFVp-LTR die höchste Expression. Dargestellt ist der Vergleich der Genexpression von MoMLV-, MPSV- und SFFVp-LTR in K562 Zellen in drei unterschiedlichen Systemen (ohne Selektion: GFP / Δ NGFR; mit Selektion: *leo*^R)

In allen analysierten Systemen zeigte die SFFVp-LTR die stärkste Expression, gefolgt von der MPSV-LTR. Allgemein erwies sich der Expressionsgewinn der SFFVp-LTR in den Systemen ohne Selektion als größer, ein Indiz dafür, daß die G418-Selektion im *leo*^R-System expressionsangleichend wirkt.

2.1.6 Zusammenfassung

Insgesamt zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse deutlich, daß FMEV-abgeleitete Vektoren unabhängig vom Transgen bis zu zwei Größenordnungen höhere Genexpression in myelo-erythroiden Vorläuferzellen vermitteln im Vergleich zu MoMLV/MoMSV-abgeleiteten Vektoren. Der äußerst signifikante Expressionsgewinn durch Kombination der LTR des FMCF-verwandten Virus SFFVp mit dem permissiven *Leader* des MESV erwies sich als spezifisch für hämatopoetische Zellen, wobei sowohl die *Long Terminal Repeat* als auch der *Leader* zur hohen Expression von FMEV in transduzierten hämatopoetischen Zellen beitrugen. Während der *Enhancer/Promotor* des SFFVp sowohl in multipotenten als auch linienspezifischen Vorläuferzellen starke Transkription vermittelt, vermeidet der MESV-*Leader* transkriptionelle Repression, da durch Punktmutationen in der Primerbindungsstelle die Bindung eines Repressors ausgeschlossen wird. Andere Vektorkomponenten (Elemente zur Kontrolle der Translationseffizienz oder RNA-Stabilität oder Polylinker-Sequenzen) können nicht für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein, da alle Sequenzen außerhalb der LTR und des *Leaders* absolut identisch waren. Somit zeigt diese Untersuchung zum ersten Mal, daß es PBS-vermittelte Repression retroviraler Aktivität in Humanzellen gibt, und daß diese Repression durch Verwenden des MESV-*Leaders* überwunden werden kann. Eine interessante Nebenbeobachtung ist die Tatsache, daß die MoMLV-LTR bei Kombination mit dem MESV-*Leader* deutlich an Expression gewinnen kann und in fast allen analysierten Zellkultursystemen (mit Ausnahme von K562 Zellen) die Expressionshöhe von MPSV/MESV-abgeleiteten Vektoren erreicht.

Hieraus läßt sich folgern, daß MoMLV/MoMSV-abgeleitete Vektoren für Anwendungen ausreichen, die nur mittelmäßige Genexpression erfordern, MoMLV/MESV- oder MPSV/MESV-Hybrid-Vektoren oder FMEV-Vektoren diesen jedoch überlegen sind, wenn stärkere Transgenexpression erforderlich ist. Man kann sogar absolute Vorteile für FMEV-Vektoren unter Bedingungen sehen, die eine starke Expression über ein Hintergrundniveau heraus erfordern. Ebenso sind FMEV-Vektoren vorteilhaft, wenn ein starker Selektionsdruck angewandt wird oder wenn ein - wie in der Einleitung bereits erläutert - koexpressionsbedingter Expressionsverlust ausgeglichen werden muß. Daher wurden MDR1-Koexpressionsvektoren auf FMEV-Basis kloniert, die zum ersten Mal eine dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen ermöglichten, was im nächsten Kapitel (2.2) ausführlicher beschrieben wird.

2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen

2.2.1 Fragestellung

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, ob FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ihre Funktionalität in frühen und primären humanen hämatopoetischen Zellen aufrechterhalten können (s. 1.6.3.2). Hierzu wurden verschiedene Koexpressionsstrategien für FMEV-MDR1-Koexpressionsvektoren analysiert: Zum einen wurde die Poliovirus-IRES für die *cap*-unabhängige Translation des 3'-positionierten Gens verwendet (Dirks *et al.* 1993), zum anderen alternatives Spleißen durch Einführen des retroviralen Spleißakzeptors des SFFVp vor das 3'-positionierte Gen (Wolff *et al.* 1985; Baum *et al.* 1998). Als Reportergene für die Koexpression mit dem 5'-positionierten und LTR-kontrollierten MDR1-Gen wurden das *neo^R*- und *leo^R*-Gen ausgewählt. Die retroviralen Vektoren wurden sowohl in humanen erythroleukämischen Vorläuferzellen (K562 Zellen) als auch in humanen primären klonogenen CD34-positiven Vorläuferzellen analysiert.

2.2.2 Vektoraufbau und Titer

Die retroviralen Vektoren **SF1 MDR1 IRES Neo^R** (= SF1 MIN), **SF1 MDR1 IRES Leo^R** (= SF1 MIL) und **SF1 MDR1 SPLEISSAKZEPTOR Neo^R** (= SF1 MSN) wurden - wie unter 4.1.2 und 4.1.3 beschrieben - kloniert (Abbildung 30) und die entsprechenden amphotropen Verpackungszelllinien angelegt.

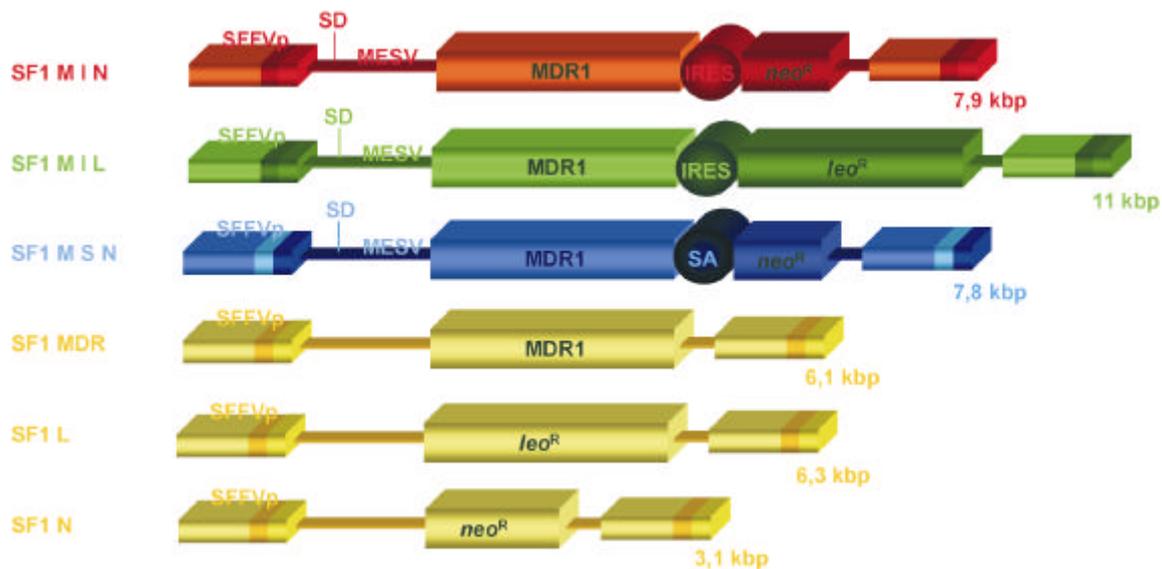


Abbildung 30: Provirale Formen der Vektoren

Es wurden Titer in der Größenordnung von $4 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^5$ GTU/ml mittels Endpunktverdünnung retroviraler Überstände auf Fibroblasten erhalten (Tabelle 4).

Vektor	GTU ⁺
SF1 MIN	$1,7 \cdot 10^5$
SF1 MIL	$7,6 \cdot 10^4$
SF1 MSN	$3,9 \cdot 10^4$
SF1 N	$1,9 \cdot 10^5$
SF1 L	$1,0 \cdot 10^5$

Tabelle 4: GTU pro ml zellfreien Retrovirusüberstands, bestimmt nach Endpunktverdünnung auf Mausfibroblasten GP+E-86 und Selektion mit 400 µg/ml G418

Bei Verknüpfung über eine IRES wurden vierfach höhere Titer erhalten als bei der Spleißstrategie. **SF1 MIN** erzielte einen doppelt so hohen Titer wie **SF1 MIL**. Wie bereits mit anderen IRES-Vektoren gezeigt, gibt es auch bei den FMEV-IRES-Vektoren keine großen Titerverluste (Adam *et al.* 1991; Ghattas *et al.* 1992; Morgan *et al.* 1992; Aran *et al.* 1994; Sugimoto *et al.* 1994, 1995; Metz *et al.* 1996; Sokolic *et al.* 1996). Die Titereinbußen beim Spleißvektor könnten endogen bedingt sein, da für die Expression des 3'-positionierten Gens eine subgenomische RNA ohne Verpackungssignal generiert wird. Der niedrigere Titer von **SF1 MIL** im Vergleich zu **SF1 MIN** könnte an verminderter NPTII-Aktivität des Fusionsproteins liegen (die Bestimmung des GTU ist ein funktioneller Versuch, da sowohl die Anzahl der infektiösen Virionen als auch die Expressionshöhe in den Zielzellen von Bedeutung ist) oder an einer Instabilität während der reversen Transkription (aufgrund der Größe und/oder Sekundärstruktur der RNA).

2.2.3 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren erlauben gleichzeitige Expression von MDR1 und eines weiteren Gens in hämatopoetischen Zellen

Eine wichtiger Punkt für die Qualität des Vektors ist die Expression des 3'-positionierten Gens nach Selektion auf die LTR-kontrollierte MDR1-Expression. Dieses Szenario ahmt die *in vivo* - Selektion transduzierter Vorläuferzellen mit zytotoxischen Agentien nach.

Selektion der retroviralen Produzentenzellen zeigte bereits Kofunktion beider selektierbarer Marker. Als nächstes wurde das Ausmaß der Koexpression des zweiten, 3'-positionierten Gens in transduzierten und MDR-selektierten hämatopoetischen Vorläuferzellen bestimmt. Hierzu wurden Massenkulturen Vektor-transduzierter K562 Zellen durch Selektion mit 20 ng/ml Colchicin angelegt. Diese Colchicin-Konzentration können untransduzierte K562 Zellen nicht überleben. Die Koexpressionsrate wurde durch Vergleich der Anzahl klonogener Zellen in semisolidem Medium (0,3% Agar) mit und ohne G418 bestimmt. Die Daten zeigen nahezu 100%ige Koexpression des Zweitgens in MDR1-vorselektierten Massenkulturen, unabhängig davon, ob die Vektoren über eine IRES oder alternatives Spleißen koexprimieren (Tabelle 5).

Vektor	Selektion	MTU (%) ^a	GTU (%) ^b	GTU/MTU ^c	MTU/GTU ^d
SF1 MIN	Col ^R	94,3	87,7	0,9	1,1
	G418 ^R	16,3	69,7	4,3	0,23
	G418 ^R → Col ^R	83,4	98,6	1,2	0,85
SF1 MIL	Col ^R	84,1	86,0	1,0	1,0
	G418 ^R	5,0	98,3	19,7	0,05
	G418 ^R → Col ^R	79,3	81,7	1,0	1,0
SF1 MSN	Col ^R	90,4	99,8	1,1	0,9
	G418 ^R	16,1	89,4	5,6	0,18
	G418 ^R → Col ^R	76,0	82,4	1,1	0,9

Tabelle 5: FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren erlauben gleichzeitige Expression von MDR1 und eines weiteren Gens in hämatopoetischen Zellen

Col^R Massenkulturen, selektiert mit 20 ng/ml Colchicin

G418^R Massenkulturen, selektiert mit 1 mg/ml G418

G418^R → Col^R Massenkulturen, selektiert mit 1 mg/ml G418 und anschließend 20 ng/ml Colchicin

^aMTU % MDR-Transduced Units (MTU) pro klonogener Zelle, die in Abwesenheit von Colchicin erhalten wurden; Mittelwert von 3 unabhängigen Bestimmungen

^bGTU % GTU pro klonogener Zelle, die in Abwesenheit von G418 erhalten wurden; Mittelwert von drei unabhängigen Bestimmungen

^cGTU/MTU Verhältnis von GTU zu MTU

^dMTU/GTU Verhältnis von MTU zu GTU

Gleichzeitige Koexpression von MDR1 und *neo*^R wurde in einem weiteren Experiment bestätigt, in dem transduzierte Zellen einer kombinierten Selektion letaler Dosen Colchicin (8 ng/ml) und G418 (1 mg/ml) unterzogen wurden. Obwohl dies eine wesentlich strengere Selektion darstellt als eine Einzelexposition, überlebten 63% bis 75% der klonogenen Zellen mit MDR1-Phänotyp die gleichzeitige Zweifachselektion.

Erstaunlicherweise erfolgte der Transfer des Vektors SF1 MIL stabil, obwohl er die Grenze retroviraler Genome (11 kb als Provirus) erreicht. Die MDR1-Expression - gemessen anhand der überlebenden klonogenen Zellen in Colchicin-haltigem Weichagar - war jedoch in den *neo*^R-kotransferierenden Vektoren höher. Intakter Transfer und Expression des β-Galactosidase-Anteils von *leo*^R in SF1 MIL-transduzierten K562-Kolonien wurde durch X-Gal-Färbung MDR-selektierter Klone nachgewiesen. Ein Drittel der Klone war X-Gal positiv, ein Hinweis auf gleichzeitige Koexpression von MDR1 und *leo*^R auf Einzelzellebene. X-Gal negative Kolonien exprimieren *leo*^R vermutlich in zu geringem Ausmaß für eine deutliche Blaufärbung, da der X-Gal-Nachweis nicht sehr sensitiv ist. Eine andere Erklärung wären interne Deletionen innerhalb des *leo*^R-Gens durch kryptische Spleißsignale oder während der reversen Transkription auftretende Rekombinationen bzw. Rearrangements.

Zusammenfassend sollte man festhalten, daß optimale Koexpressionsraten sowohl mit der IRES- als auch der Spleißstrategie erhalten wurden, sofern die Zellen auf MDR1-Funktionalität vorselektiert waren.

2.2.4 MDR-Selektion erhöht die Expression des kotransferierten Gens in IRES-Vektoren

Als nächstes wurde die Expression des 3'-positionierten Gens daraufhin untersucht, welche Strategie bei starker MDR-Selektion eine Erhöhung der Expression erlaubt. Im K562-Modell wurde die Expression der *neo^R*-kodierte NPTII über einen Enzym-gekoppelten Immunsorptions-Versuch (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) gemäß Herstellerangaben (CP laboratories, Bishop's Stortford, Herts, UK) bestimmt (Abbildung 31). NPTII war in nicht-transduzierten Zellen nicht nachweisbar. Beide Konstrukte vermittelten gleiche NPTII-Expression bei G418-Vorselektion (vermutlich aufgrund der gemeinsamen Selektionsschwelle). Bei Verwendung der IRES jedoch erhöhte sich die NPTII-Expression signifikant (um den Faktor 3) nach anschließender Colchicin-Selektion. Dies bestätigte die stabile funktionelle Verknüpfung der beiden Proteine auf transkriptioneller Ebene, da beide von einer einzigen mRNA aus translatiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten mit dem Spleißvektor-transduzierte Zellen nur einen marginalen Anstieg der NPTII-Expression nach anschließender Colchicin-Selektion, obwohl sowohl durchflußzytometrisch als auch in den Plattierungsexperimenten ein deutlicher Anstieg der MDR1-Expression nachweisbar war. Dies beruht wahrscheinlich auf einer größeren Dynamik der Spleißstrategie, die die Konzentration an genomischer RNA unabhängig von der Konzentration an subgenomischer RNA variieren lassen könnte.

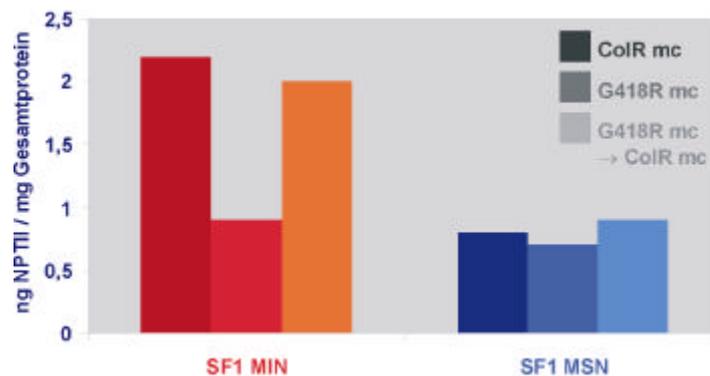


Abbildung 31: MDR-Selektion erhöht die Expression des Zweitgens bei IRES-Vektoren.

Dargestellt ist die NPTII-Expression in K562 Massenkulturen, transduziert mit SF1 MIN und SF1 MSN und vorselektiert mit Colchicin (Col^R), G418 (G418^R) oder zuerst G418 und dann Colchicin (G418^R → Col^R) (Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten)

2.2.5 Vorselektion auf das 3'-positionierte Gen zeigt partielle Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit

Die Funktionalität der MDR1-Transkriptionseinheit bei Vorselektion auf das 3'-positionierte Gen dient als Modell für den Kotransfer von zwei selektierbaren Markern im Rahmen von Chemoprotektionsprotokollen. Wurden die Zellen mit G418 vorselektiert, so waren die GTU-Werte ähnlich denen nach MDR-Selektion (s. Tabelle 5), sowohl bei den IRES-Vektoren (SF1 MIN und SF1MIL) als auch bei dem Spleißvektor (SF1 MSN). Im Gegensatz dazu koexprimierten nicht mehr als 70% der Zellen bei G418-Vorselektion MDR1, was durchflußzytometrisch sowohl mit dem monoklonalen, MDR1-spezifischen Antikörper UIC2 als auch mittels eines höchst sensitiven Rhodamin-123-Efflux-Versuches nachgewiesen werden konnte (Abbildung 32). In Klonierungsexperimenten zeigten zudem nicht mehr als ein Drittel der transduzierten, G418 resistenten Zellen einen MDR-Phänotyp.

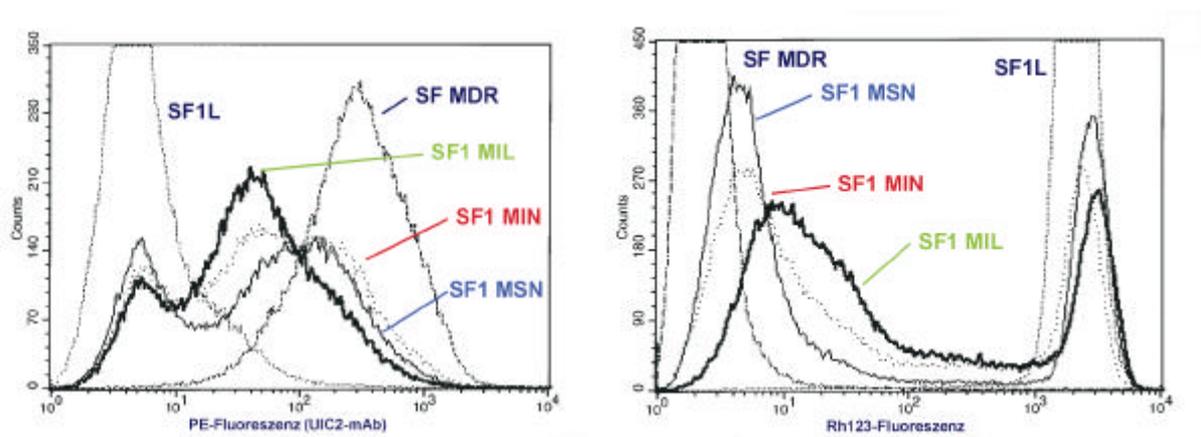


Abbildung 32: Vorselektion auf das 3'-positionierte Gen zeigt partielle Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit. Dargestellt ist die MDR1-Expression in K562 Zellen, transduziert mit den Koexpressionsvektoren und vorselektiert mit G418.

links Färbung der G418-selektierten K562 Massenkulturen mit dem monoklonalen Anti-MDR1-Antikörper UIC2. Eine Subpopulation UIC2-negativer Zellen ist deutlich zu erkennen. Mit SF MDR transduzierte und Colchicin-selektierte K562 Zellen sowie SF1L transduzierte und G418-selektierte K562 Zellen sind als Kontrollen gezeigt.

rechts Analyse derselben Kulturen wie links, jedoch im Rhodamin-123-Efflux-Versuch (2 Stunden Efflux). Eine klare Trennung MDR-negativer Zellen (hohe Fluoreszenz) von MDR-positiven Zellen (teilweise oder vollständig entfärbt) ist zu erkennen.

Der Anteil MDR-positiver Zellen ist unabhängig von der Verknüpfungsstrategie und vom Zweitgen. Außerdem zeigen die durchflußzytometrischen Analysen die schwächere MDR1-Expression von SF1 MIL (niedrigere Fluoreszenz bei der Antikörperfärbung und geringere Entfärbung beim Rhodamin-123-Efflux-Versuch), obwohl - wie bereits erwähnt - der Anteil MDR-positiver Zellen sich nicht von dem bei SF1 MIN und SF1 MSN unterscheidet.

Zwei Schlußfolgerungen lassen sich aus diesen Experimenten ziehen:

- (1) Die Daten zeigen, daß Anreicherung von Zellen mit MDR-Phänotyp über Selektion eines kotransferierten Gens möglich, jedoch unvollständig ist, unabhängig von der Verknüpfungsstrategie.
- (2) Die MDR-negativen Zellen müssen eine nicht-funktionelle MDR1-Transkriptionseinheit besitzen, vermutlich aufgrund kryptischer Spleißsignale und/oder Rekombination während der reversen Transkription.

Demzufolge klonierten in G418-vorselektierten und anschließend mit Colchicin-nachselektierten Massenkulturen mehr Zellen in Anwesenheit von Colchicin als bei alleiniger G418-Selektion (s. Tabelle 5; z. B. im Fall von SF1 MIN 83% im Vergleich zu 16%). Diese Anreicherung läßt sich auf zwei Ebenen erklären: zum einen durch klonale Deletion der Zellen mit nicht-funktioneller MDR1-Transkriptionseinheit, zum anderen durch Anreicherung einer Subgruppe von Klonen, die MDR1 in höherem Maße exprimieren.

2.2.6 Mechanismen der partiellen Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit

Um die Ursachen der Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit genauer zu untersuchen, wurden mit den Koexpressionsvektoren transduzierte K562 Massenkulturen mit G418 selektiert und anschließend MDR-negative und MDR-positive Subpopulationen über ihren Phänotyp im Rhodamin-123-Efflux-Versuch mittels FACS getrennt. Die genomische Analyse mittels PCR ließ auf interne Deletionen innerhalb des MDR1-Gens in MDR-negativen Zellen schließen, während MDR-positive Zellen intakte Vektorgenome besaßen. Die entdeckten Deletionen treten zusätzlich zu einem bereits beschriebenen kryptischen Spleiß der MDR1-RNA auf, da die ausgewählten Primer mit dem beschriebenen kryptischen Spleißdonor (MSN1942+ in PCR2) bzw. dem kryptischen Spleißakzeptor (MSN3951- in PCR1) (Sorrentino *et al.* 1995) überlappen (Abbildung 33). Die Bedeutung der kryptischen Spleißsignale sowie die Auswirkung ihrer Entfernung sind Thema des letzten Kapitels (2.5). Die Deletionen wurden auch bei sortierten, **SF1 MIN** und **SF1 MIL** transduzierten Zellen, also unabhängig vom Verknüpfungsprinzip oder der 3' positionierten cDNA, nachgewiesen.

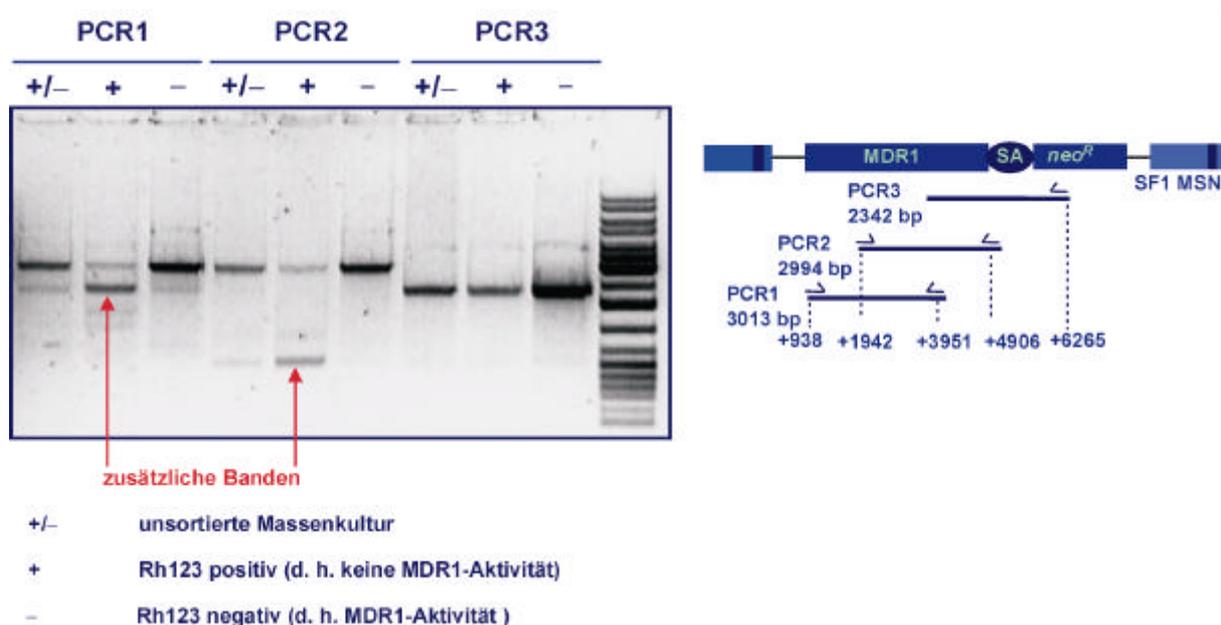


Abbildung 33: Detektion von Rearrangements in der MDR1-Transkriptionseinheit in MDR-negativen Zellen mittels PCR. Unsortierte K562 Massenkulturen, transduziert mit SF1 MSN und vorselektiert mit G418 (+/-), sortierte Rh123-negative (-), d. h. MDR-positive Zellen und sortierte Rh123-positive (+), d. h. MDR-negative Zellen wurden unterschiedlichen PCRs unterzogen. Die Sortkriterien wurden gemäß Rhodamin-123-Efflux-Versuch gesetzt. Kürzere Banden, die auf Rearrangements schließen lassen, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese Banden treten bei den unsortierten (+/-) und sortierten MDR-negativen, Rh123-positiven (+) Zellen auf, jedoch nicht - oder nur sehr schwach - bei den sortierten MDR-positiven, Rh123-negativen (-)-Zellen. Der Großteil der Rearrangements befindet sich in den ersten 3 kbp der MDR1-cDNA (PCR1 & PCR2). Genomische DNA untransduzierter K562 Zellen ergab kein Produkt (nicht gezeigt). Die Position der Primer ist in der Skizze rechts neben der Geldokumentation dargestellt. MW : Molekulargewichtsmarker *Ladder Mix* (MBI Fermentas; St.-Leon-Rot; Deutschland). Die zusätzlichen Banden wurden aus dem Agarosegel eluiert, in pKS(+) (Stratagene GmbH, Heidelberg) subkloniert und jeweils zwei Klone mit den Primern 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' bzw. 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' sequenziert, um die Identität der amplifizierten Produkte aufzuklären.

Das Fluoreszenz-aktivierte Zellsortieren fand mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. H. G. Eckert statt.

Die Sequenzierung der zusätzlichen Bande aus PCR1 läßt auf ein Spleißprodukt zurückschließen, das durch Wechselwirkung des beschriebenen, kryptischen MDR1-Spleißdonors (bp 339) mit einem bisher unbekanntem kryptischen MDR1-Spleißakzeptor (bp 1032) zustande kommt unter Herausspleißen von 692 bp (Abbildung 34).

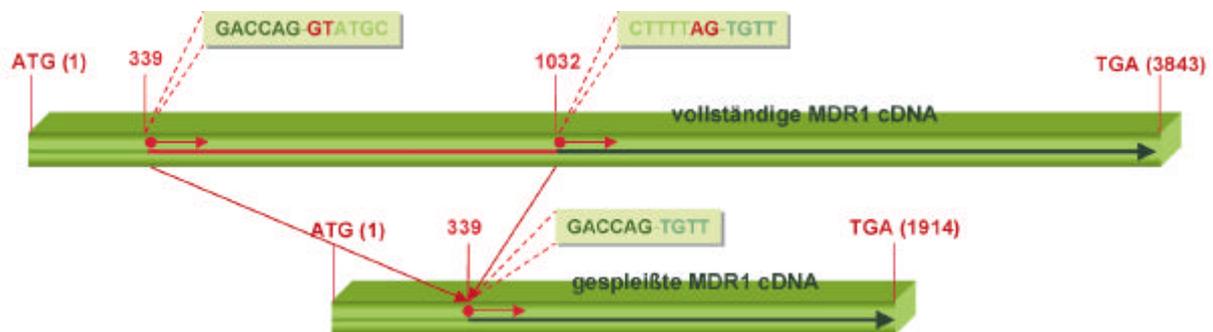


Abbildung 34: Spleiß zwischen dem kryptischen MDR1-Spleißdonor und einem bisher nicht beschriebenen MDR1-Spleißakzeptor

Die Sequenzierung der bei der PCR2 auftretenden zusätzlichen Bande gab Rückschluß auf eine 1929 Basenpaare umfassende Deletion zwischen den Nukleotiden 1284 und 3213 der MDR1-cDNA, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der homologen Rekombination zwischen zwei 22-bp langen direkten Wiederholungen während der reversen Transkription (Abbildung 35).

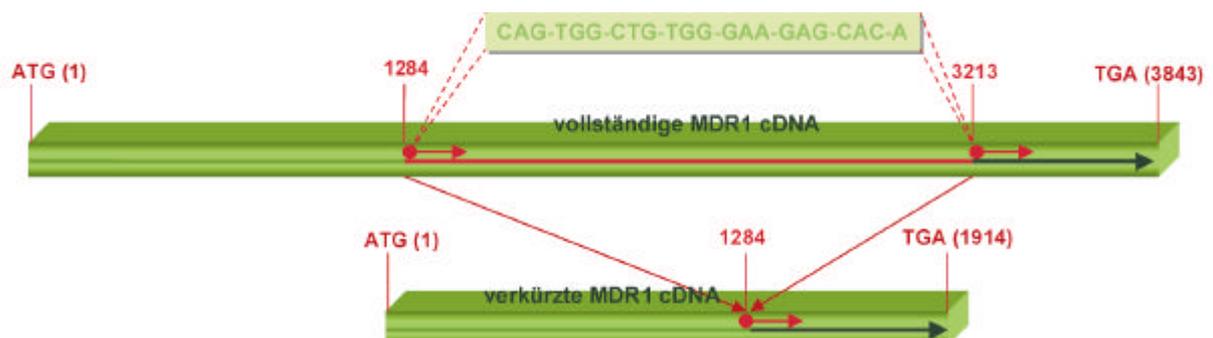


Abbildung 35: Homologe Rekombination zwischen zwei 22-bp direkten Wiederholungen führt zur Deletion von ca. 1,9 kb cDNA, wodurch die MDR1-Transkriptionseinheit funktionell zerstört wird

Über RT-PCR mit den unter 4.3.4 beschriebenen Primern, die einen größeren Bereich abdecken als die in Abbildung 33 aufgeführten Primer, konnten noch zwei weitere, bisher unbekannte Rearrangements in K562 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 36). Beim ersten Rearrangement (Abbildung 36a), einer homologen Rekombination zwischen zwei 15-bp direkten Wiederholungen, bleibt der Leserahmen unter Deletion von 2577 Basenpaaren ($\Delta 73;2649$) erhalten, wobei ein 421-Aminosäuren-Protein (ein Drittel der Größe des Wildtyp-P-Glykoproteins) entsteht. Das zweite Rearrangement (Abbildung 36b) ist wesentlich komplexer: Hier findet man zum einen den Austausch von drei Adeninen gegen Guanine (Basenpaar 34; 38; 40 des MDR1-ORF), eine Insertion von 14 Basenpaaren sowie eine Deletion von 1397 Basenpaaren ($\Delta 52;1448$).

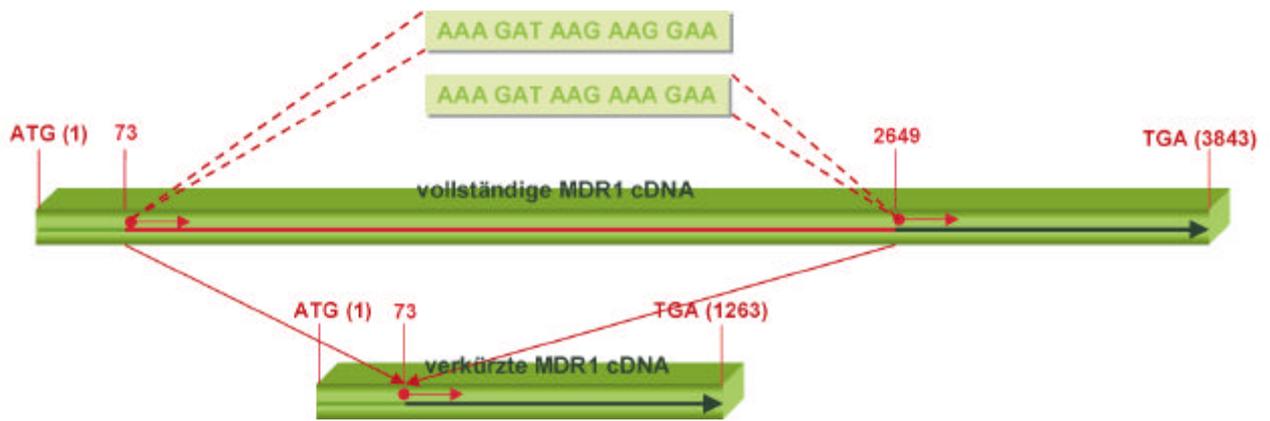


Abbildung 36a: Homologe Rekombination zwischen zwei 15-bp direkten Wiederholungen führt zur Deletion von ca. 2,6 kb cDNA unter Erhalten des Leserahmens. In der verkürzten MDR1-cDNA findet man die Sequenz AAA GAT AAG AAA GAA wieder. (Sequenzbestimmung wie in Abbildung 34 beschrieben)

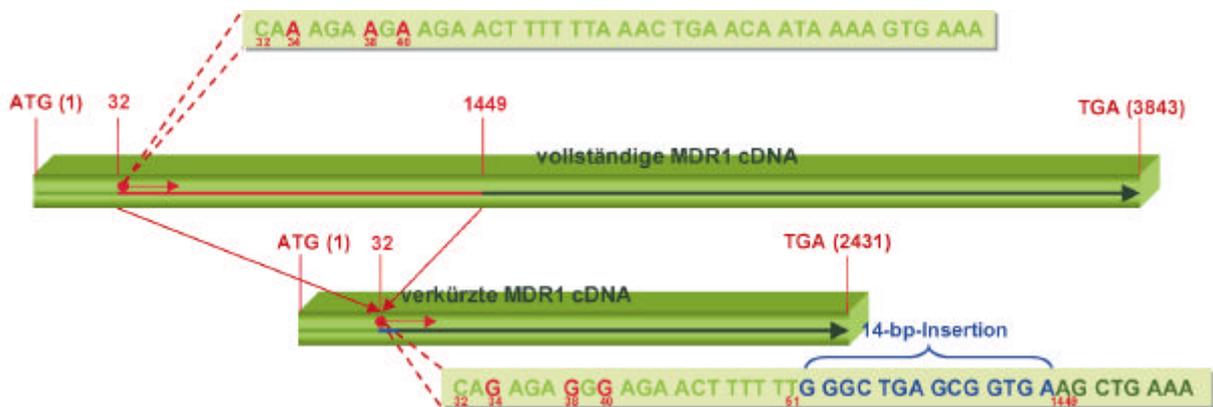


Abbildung 36b: Komplexes Rearrangement unter Substitution von 3 Adeninen gegen Guanine, Insertion von 14 Basenpaaren und Deletion von 1397 Basenpaaren. (Sequenzbestimmung wie in Abbildung 34 beschrieben)

Die Frequenz der hier beschriebenen Spleiß-, Rearrangement- und Rekombinationsereignisse läßt sich anhand der Daten aus 2.5.3 folgendermaßen abschätzen (Tabelle 6):

Ereignis	Frequenz pro Replikationsrunde
insgesamt	40% (100%)
Rekombination / Rearrangement	6% (15%)
Spleiß SD ³³⁹ mit SA ²³¹⁹	> 16% (> 40%)
Spleiß SD ³³⁹ mit SA ¹⁰³²	< 18% (< 45%)

Tabelle 6: Frequenz der Spleiß-, Rearrangement- und Rekombinationsereignisse

2.2.7 Koexpressionsvektoren vermitteln eine mäßig reduzierte MDR1-Expression

Eine Reihe von Experimenten wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Koexpression eines zweiten Gens die MDR1-Expression der transduzierten Zellen beeinflussen würde. Drei unterschiedliche Ansätze wurden verfolgt: (1) Frisch transduzierte, unselektierte K562 Zellen wurden in steigende Konzentrationen Colchicin plattiert, um die MDR1-Expression auf Ebene der klonogenen Vorläuferzellen zu bestimmen. (2) Die Effluxaktivität des MDR1-Proteins wurde durchflußzytometrisch mittels eines abgewandelten Rhodamin-123-Efflux-Versuches analysiert. (3) Die MDR1-Expression wurde durchflußzytometrisch mittels des monoklonalen Antikörpers UIC2 bestimmt.

zu (1)

In Klonierungsexperimenten wirkte sich eine Erhöhung der Colchicin-Konzentration am geringsten auf die Zellen aus, die mit **SF1 MIN** transduziert waren, gefolgt von **SF1 MSN** und **SF1 MIL** (Tabelle 7), was auf eine höhere Colchicinresistenz von **SF1 MIN** gegenüber **SF1 MSN** und **SF1 MIL** zurück-schließen läßt. Dieser Wert lag jedoch immer noch um ca. 25% unter dem des monocistronischen Vektors SF MDR.

Vektor	GTU (%)			MTU (%)		
	1 mg/ml G418	2 mg/ml G418	Ratio	12 ng/ml Col	20 ng/ml Col	Ratio
SF MDR				8,2	6,4	78%
SF1 MIN	20,8	17,1	83%	8,6	4,2	49%
SF1 MSN	21,8	18,9	87%	6,2	2,4	39%
SF1 MIL	19,8	13,9	70%	8,3	0,9	11%

Tabelle 7: Klonierung mit den entsprechenden Vektoren transduzierter, unselektierter K562 Zellen in steigende Dosen G418 und Colchicin

Untransduzierte K562 Zellen starben unter diesen Bedingungen. Mittelwerte von drei Plattierungen eines einzelnen repräsentativen Experimentes sind dargestellt.

GTU (%) : Prozent G418-resistenter Kolonien im Vergleich zur Klonierung ohne G418

MTU (%) : Prozent Colchicin-resistenter Kolonien im Vergleich zur Klonierung ohne Colchicin

Ratio : Anteil der Zellen, die bei der höheren G418- bzw. Colchicin-Konzentration im Vergleich zur niedrigeren klonieren

Hieraus läßt sich folgern, daß sowohl die Art der Verknüpfung als auch die Größe bzw. Sequenz des Zweitgens Einfluß auf die MDR1-Genexpression ausüben. Diese Daten stehen im Einklang mit den Daten der Replattierungseffizienz Colchicin-vorselektierter Massenkulturen (Tabelle 5). Sie konnten zusätzlich durch den abgewandelten Rhodamin-123-Efflux-Versuch untermauert werden.

zu (2)

Bei diesem Versuch, erstmals vorgestellt in der vorliegenden Arbeit, werden die Zellen mit Rhodamin-123 in steigenden Konzentrationen des MDR1-Protein-Inhibitors Verapamil inkubiert und die mittlere Fluoreszenz der funktionell MDR1-transduzierten Zellen bestimmt. Über lineare Regression kann gemäß Lineweaver-Burk ein Absolutwert für die Effluxaktivität errechnet werden, während der klassische Efflux-Versuch nur eine qualitative Aussage bietet. Als Referenz wurden SF MDR transduzierte, Colchicin-selektierte K562 Zellen verwendet (Abbildung 37). Abhängig vom verwendeten Konstrukt und den Selektionsbedingungen erreichte die Effluxaktivität der Koexpressionsvektoren 35% bis 85% der SF-MDR-vermittelten Aktivität.

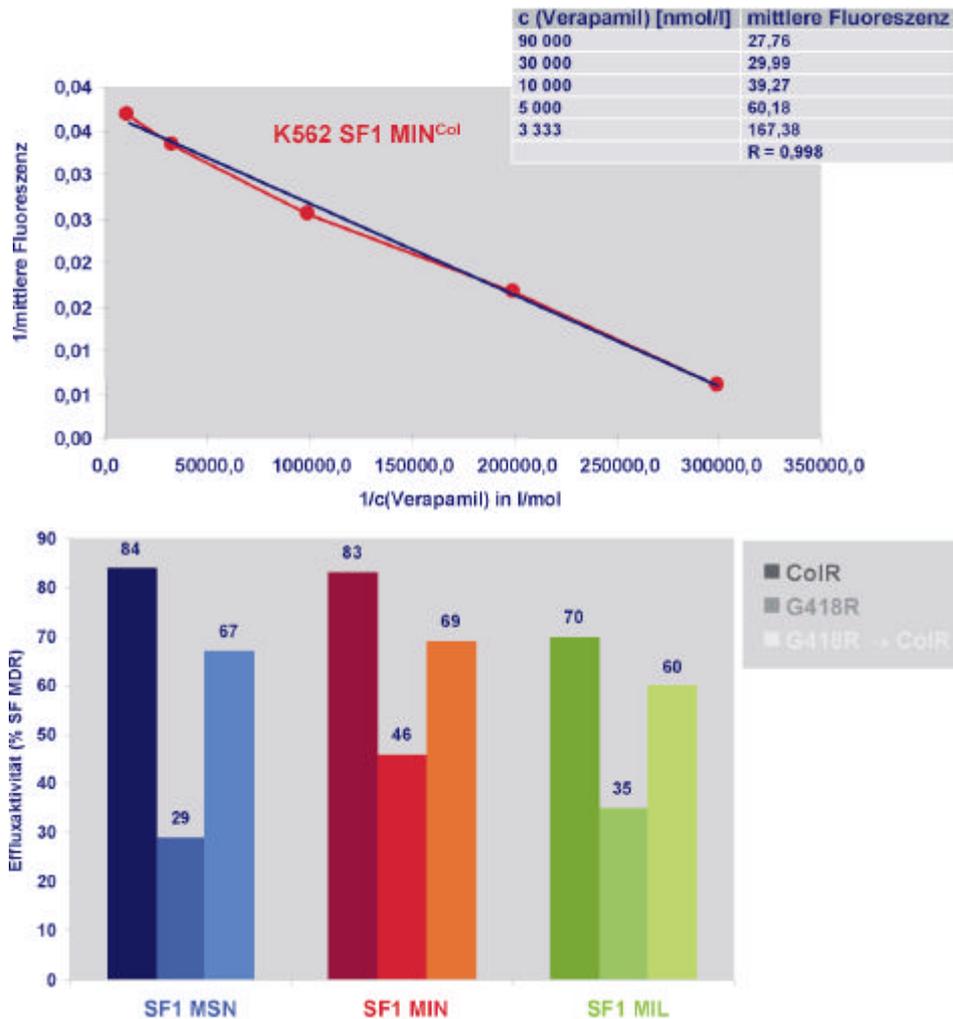


Abbildung 37: Koexpressionsvektoren vermitteln eine mäßig reduzierte MDR1-Expression. Dargestellt ist die durchflußzytometrische Bestimmung der funktionellen MDR1-Expression.

oben Der Rhodamin-123-Efflux-Versuch wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen des MDR1-Protein-Inhibitors Verapamil durchgeführt. Die hieraus resultierende mittlere Fluoreszenz wurde mit der entsprechenden Verapamil-Konzentration durch lineare Regressionsanalyse gemäß Lineweaver-Burk korreliert. Rohdaten sind in der Tabelle innerhalb des Graphen dargestellt. Der R-Wert von 0,998 zeigt die höchst lineare Auflösung dieses Ansatzes. K562 SF1 MIN^{Col} steht für eine SF1 MIN transduzierte K562 Massenkultur, die mit 20 ng/ml Colchicin selektiert wurde.

unten Rhodamin-123-Efflux-Aktivitäten von K562 Massenkulturen, transduziert mit den verschiedenen Koexpressionsvektoren und selektiert auf Colchicin-Resistenz (Col^R), G418-Resistenz (G418^R) und G418- und anschließend Colchicin-Resistenz (G418^R → Col^R). Die Analyse erfolgte wie oben dargestellt. Die Werte sind in Prozent zur Aktivität einer SF MDR transduzierten und Colchicin-selektierten K562 Massenkultur angegeben.

Bei Colchicin-Vorselektion verzeichneten die mit dem größten Konstrukt (SF1 MIL) transduzierten Zellen die stärksten Einbußen, während die beiden *neo^R*-Koexpressionsvektoren 80% bis 85% der SF MDR-Aktivität besaßen. Ein anderes Bild ergab sich bei G418-Vorselektion. Während die beiden IRES-Konstrukte ungefähr gleiche Effluxaktivität zeigten, war die des Spleißvektors etwas geringer, was durch die Natur dieses Vektors bedingt sein könnte: So werden durch G418-Selektion Zellen, die bevorzugt Spleißen, also weniger genomische RNA (die für MDR1 kodiert) synthetisieren, selektiert. Duale Selektion mit G418 und anschließend Colchicin zeigte für alle Vektoren ähnliche Werte. Diese waren allgemein niedriger als bei Monoselektion mit Colchicin, vermutlich, da der Colchicin-Selektionsdruck in G418-vorselektierten Kulturen niedriger ist. Diese Daten stehen in vollem Einklang mit den Klonierungsdaten (Tabelle 5).

zu (3)

Die FACS-Analyse mit **SF1 MIN** transduzierter, und entweder mit G418, Colchicin oder nacheinander mit beiden Substanzen vorselektierter K562 Massenkulturen ist in Abbildung 38 dargestellt. Auch hier erkennt man - in Übereinstimmung mit den beiden vorherigen Experimenten - deutlich die niedrigere MDR1-Expression bei alleiniger G418-Vorselektion. Zudem erreicht selbst bei Colchicin-Selektion der bicistronische Vektor nicht die gleiche Expression wie sein monocistronisches Gegenstück. Der Unterschied zwischen alleiniger Colchicin-Selektion und vorheriger G418-Selektion wird hier nicht so offensichtlich: Nur eine geringfügig höhere Fluoreszenz ist bei direkter Colchicin-Selektion zu verzeichnen.

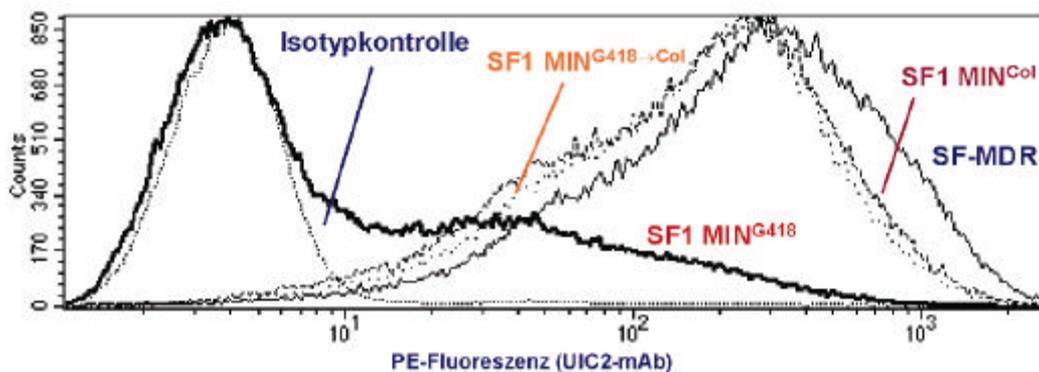


Abbildung 38: Koexpressionsvektoren vermitteln eine mäßig reduzierte MDR1-Expression. Dargestellt ist die FACS-Analyse mit **SF1 MIN** transduzierter und entweder mit G418, Colchicin oder beiden Substanzen vorselektierter K562-Massenkulturen.

Insgesamt stimmen die Daten aus allen drei Versuchssystemen (Klonierungsexperiment; Effluxversuch; Antikörperfärbung) überein und zeigen deutlich die verminderte MDR1-Expression der Koexpressionsvektoren sowie einen verringerten Anteil MDR1-positiver Zellen (Abbildung 39). Dennoch war eine hintergrundfreie Selektion transduzierter K562 Zellen bei hoher Colchicin-Konzentration (20 ng/ml; d. h. der vierfache Wert der IC_{50} , d. h. der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration) möglich. Dies unterstreicht die Stärke des Vektors auf transkriptioneller Ebene.

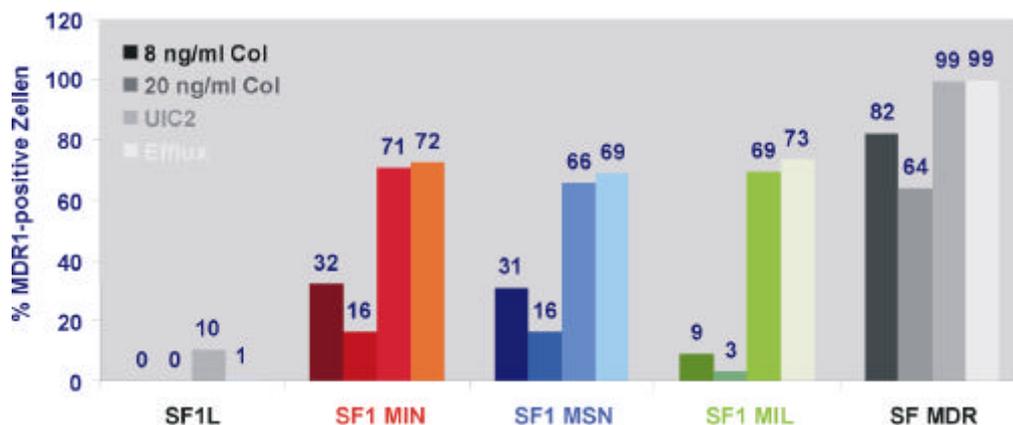


Abbildung 39: MDR1-Koexpressionsvektoren vermitteln eine mäßig reduzierte MDR1-Expression. Dargestellt ist der Anteil MDR-positiver Zellen in G418-vorselektierten Populationen, gemessen in unterschiedlichen Systemen (Zusammenfassung). Ungefähr 70% der Zellen sind MDR-positiv gemäß durchflußzytometrischer Kriterien, aber weitaus weniger Zellen sind geschützt vor mäßiger oder hoher Colchicinkonzentration im Klonierungsexperiment. Zudem vermitteln **SF1 MIN** und **SF1 MSN** bessere Chemoprotektion als **SF1 MIL**, obwohl der Anteil MDR-positiver Zellen durchflußzytometrisch gleich ist. Die 10% UIC2-positiven Zellen bei SF1L beruhen nicht zwingend auf MDR1-Expression; vielmehr beruht dieser Wert auf unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers.

2.2.8 FMEV-MDR1-Koexpressionsvektoren vermitteln Hochdosis-Zytostatikaresistenz in primären humanen CD34-positiven Vorläuferzellen

Nach Beobachtung der suboptimalen MDR1-Expression der Koexpressionsvektoren stellte sich die Frage, ob die verbleibende Expression für eine hintergrundfreie Selektion primärer hämatopoetischer Vorläuferzellen ausreichen würde. Zu diesem Zweck wurden CD34-positive Humanzellen nach Transduktion mit den Koexpressionsvektoren in steigenden Konzentrationen G418 und Colchicin kloniert (Abbildung 40). 15% bis 55% der unselektierten CFU überlebten eine Selektion mit 1 mg/ml G418; 30% bis 40% dieser Zellen wiederum überlebten auch bei 2 mg/ml G418. Zytostatika-resistente Kolonien zeigten eine normale Linienverteilung: Trotz geringerer Größe war eine intakte Morphologie der Kolonien zu erkennen, so daß IRES und Spleiß sowohl in myeloiden als auch erythroiden Kolonien funktionell sind. Alle Vektoren vermittelten Schutz bei 12 ng/ml Colchicin, eine Konzentration, die für hintergrundfreie Selektion von Vorläuferzellen *in vitro* ausreicht (Eckert *et al.* 1996). Jedoch zeigten höchstens 20% der funktionell *neo^R*-transduzierten Vorläuferzellen Colchicinresistenz, bei **SF1 MIL** sogar nur 5%.

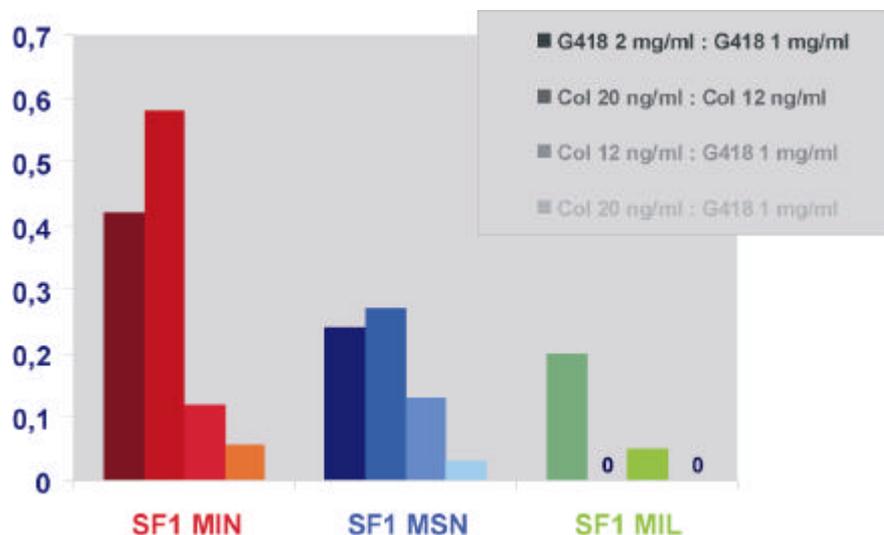


Abbildung 40: FMEV-MDR1-Koexpressionsvektoren vermitteln Hochdosis-Zytostatikaresistenz in primären humanen CD34-positiven Vorläuferzellen. Dargestellt ist die Zytostatikaresistenz, erzielt mit Koexpressionsvektoren in primären, *in vitro* klonogenen CD34-positiven humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Experimente wurden ohne Vorselektion durchgeführt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Zweifachbestimmung durchgeführt wurden. (Mit freundlicher Unterstützung von Dr. B. Fehse) Auf der Y-Achse ist die relative Klonierungseffizienz (CFU mit Selektion dividiert durch CFU ohne Selektion) aufgetragen.

40% bis 50% **SF1 MIN** und **SF1 MSN** transduzierter CFU, die bei 12 ng/ml Colchicin überlebten, klonierten auch bei 20 ng/ml Colchicin. Dies entspricht deutlich einem Hochdosis-Äquivalent (dem drei- bis vierfachen IC_{50} -Wert), analog 36 bis 40 ng/ml Paclitaxel (Eckert *et al.* 1996).

Um der Frage nachzugehen, ob beide Resistenzgene gleichzeitig in Primärzellen exprimiert werden, wurden transduzierte humane CD34-positive Zellen in Methylcellulosekulturen plattiert, die sowohl Colchicin (8 - 12 ng/ml) als auch G418 (1 mg/ml) enthielten. In zwei unabhängigen Experimenten überlebten 70% bis 90% **SF1 MIN** und **SF1 MSN** transduzierter CFU die Doppelselektion, bezogen auf den Anteil der CFU, die bei Colchicin allein ausklonierten. Dies zeigte deutlich, daß zwei unabhängige dominante Phänotypen gleichzeitig durch einen einzigen FMEV-MDR1-Koexpressionsvektor in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen induziert wurde.

2.2.9 Zusammenfassung

Retrovirale MDR1-FMEV-Vektoren vermitteln ausreichende Hochdosisresistenz für eine hintergrundfreie Selektion in primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Eckert *et al.* 1996). In diesem Kapitel wurden Strategien für die Koexpression eines zweiten Gens durch einen FMEV-MDR1-Vektor analysiert. Wenn man die cDNA über die IRES des Poliovirus oder über den retroviralen Spleißakzeptor verknüpft, exprimierten fast alle Zytostatika-resistenten hämatopoetischen Kolonien gleichzeitig das 3'-positionierte Gen (*neo^R*), das für das Enzym Neomycinphosphotransferase II kodiert. Die IRES-Strategie erlaubte auch den funktionellen Kotransfer des 4,2 kb großen *leo^R*-Gens, wobei das gesamte Provirus mit einer Größe von 11 kb die Grenzen retroviraler Vektoren tangiert. Vorselektion auf MDR erhöhte die Expression des Zweitgens der IRES-Konstrukte, nicht jedoch der Spleißvektoren. Überdies wurden drei wichtige Beobachtungen gemacht:

- (1) 30% bis 50% der Zellen, die auf funktionellen Transfer der 3'-positionierten cDNA (*neo^R*) vorselektiert waren, zeigten keinen MDR1-Phänotyp; dies ereignete sich unabhängig vom Verknüpfungsprinzip und beruhte auf der Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit (aufgrund kryptischen Spleißens und Rekombination).
- (2) Die MDR1-Expression der Koexpressionsvektoren war signifikant niedriger (15-30%) als das des monocistronischen Vektors. Dies lässt sich auf drei Ebenen erklären:
 - (a) Sequenzen im Zweitgen wirken *in cis* und reprimieren die LTR-gesteuerte Transkription. Das *neo^R*-Gen enthält ein solch inhibitorisches Element (Artelt *et al.* 1991), welches auch in anderen cDNAs vorkommen könnte.
 - (b) die RNA-Stabilität der Koexpressionsvektoren könnte verringert sein, entweder aufgrund von Degradationssignalen in den zusätzlichen Sequenzen oder kryptischem Spleißen.
 - (c) Das 3'-positionierte Gen kann auf Kosten des 5'-positionierten Gens exprimiert werden. So werden bei der Spleißstrategie die MDR1-Sequenzen bei Bildung der subgenomischen RNA herausgeschnitten. Bei IRES-Vektoren könnte vielmehr alternative als gleichzeitige Translation der bicistronischen mRNA erfolgen.
- (3) Trotz des koexpressionsbedingten Expressionsverlustes vermittelten FMEV-MDR1-Koexpressionsvektoren Hochdosisresistenz und eine hintergrundfreie Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen (einschließlich primärer CD34-positiver Kolonie-bildender Zellen), da die optimierte Kombination aus SFFV-LTR und MESV-*Leader* diesen Verlust kompensieren konnte. Somit wurden in diesem Kapitel zum ersten Mal MDR1-Koexpressionsvektoren vorgestellt, die ihre erwünschte Funktion in frühen und primären humanen hämatopoetischen Zellen aufrechterhalten. Dennoch müssen weitere Verbesserungen in Bezug auf Erhöhung des genotypischen Indexes und der Gesamtexpression durchgeführt werden, um klinisch anwendbare MDR1-Koexpressionsvektoren zu erhalten. Dies ist Thema der übernächsten Kapitel (2.4; 2.5).

2.3 Bicistronische retrovirale Vektoren für kombinierte Myeloprotektion und Zelloberflächenmarkierung

2.3.1 Fragestellung

Im ersten Kapitel wurde die Eignung der FMEV-Vektoren für die Expression unterschiedlichster Gene aufgezeigt, im zweiten Kapitel die Möglichkeit der dominanten Selektion von MDR1-Koexpressionsvektoren in diesem Vektorrückgrat in humanen primären hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Frage, ob die Beobachtungen aus dem MDR1-NPTII-System auch auf andere MDR1-Koexpressionssysteme übertragbar sind, soll in diesem Kapitel geklärt werden. Hierzu wurde NPTII durch Δ LNGFR ersetzt, ein, im Gegensatz zu *neo^R*, klinisch höchst relevantes Zweitgen (s. 1.7.5). Dieser Marker ermöglicht zugleich auch eine Analyse auf Einzelzebene. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die Δ LNGFR-Expression für eine Anreicherung transduzierter, CD34-positiver humaner Progenitorzellen *in vitro* mittels Immunoaffinität ausreichend ist.

2.3.2 Klonierung der Vektoren

Um Vektoren zu entwickeln, die neben Δ LNGFR auch MDR1 koexpressieren, wurden die cDNAs mittels PCR so verändert, daß sämtliche untranslatierten Regionen entfernt wurden und das Startkodon im Kontext einer Kozak-Konsensussequenz für optimale Translationsinitiation plaziert wurde (s. 4.1.2 und 4.1.4). Die MDR1-cDNA wurde in die LTR-kontrollierte 5'-Position gesetzt, um optimale Expression, die für Hochdosiszytostatikaresistenz erforderlich ist, zu gewährleisten. Die Δ LNGFR cDNA wurde 3' von der MDR1-Transkriptionseinheit plaziert. Die Verknüpfung erfolgte über drei unterschiedliche Strategien: zum einen über retrovirale Spleißsignale (1) des *pol* Pseudogens von SFFVp (SF1 mS δ ; analog SF1 MSN), um den natürlichen retroviralen Kontext nachzuahmen; daneben wurde die EMCV-IRES (2) (Ghattas *et al.* 1991), die sich schon in anderen Koexpressionsvektoren bewährt hat (Sokolic *et al.* 1996; Zhou *et al.* 1998), in den Leserahmen des Δ LNGFR-Gens kloniert, um *cap*-unabhängige Translation zu ermöglichen (SF1 mE δ); zudem wurde eine Verknüpfung über den Hühner- β -Actin-Promotor (3) (Quitschke *et al.* 1989) als internen Promotor (SF1 m $\beta\delta$) gewählt, der in myeloiden Vorläuferzellen ca. 20% der Aktivität des FMEV-LTRs besitzt (Baum, unpublizierte Daten).

Als Kontrollen wurden zwei monocistronische Vektoren verwendet: SF1m (exprimiert die MDR1-cDNA über ein FMEV-Rückgrat) und MO3 δ (exprimiert Δ LNGFR über einen MoMLV-LTR und MoMSV-*Leader*) (Abbildung 41).

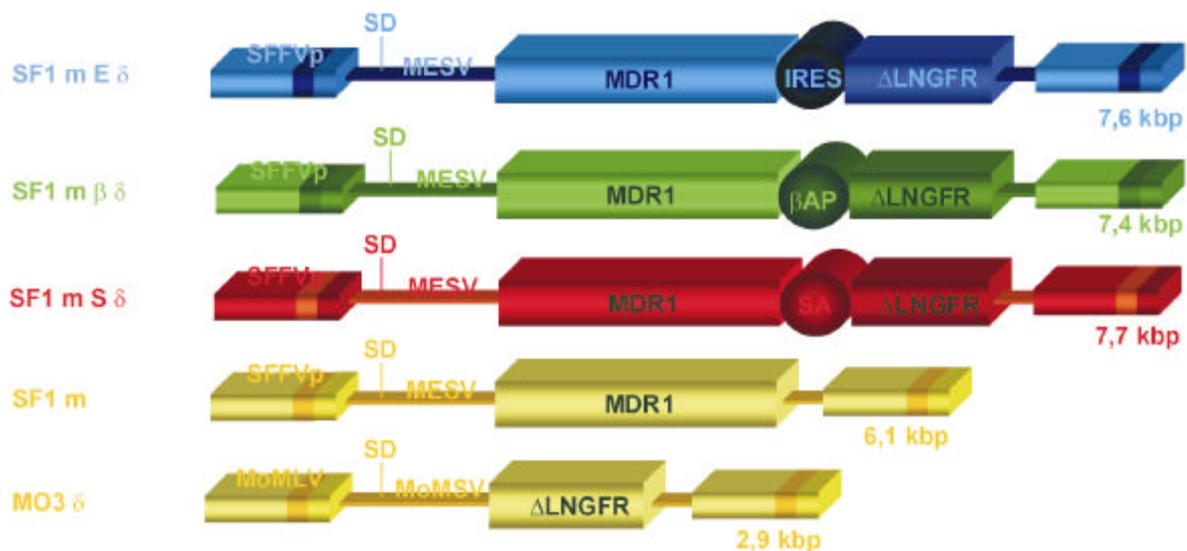


Abbildung 41: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren. Gezeigt sind die proviralen Formen nach retroviraler Replikation und Integration. βAP interner Promotor (Hühner-β-Actin-Promotor)

2.3.3 Vergleich der Verknüpfungsstrategien mittels Zweifarben-Durchfluß-Zytometrie: IRES und alternatives Spleißen zeigen eine gute Korrelation der Koexpression, jedoch nicht der interne Promotor

Die verschiedenen Vektorplasmide wurden in Sicherheits-modifizierte Verpackungszellen GP+E-86 transfiziert. Deren retrovirale Überstände wurden zur Infektion von GP+envAm12 verwendet. Diese wurden mit 40 ng/ml Colchicin selektiert, um Massenkulturen anzulegen. Mit deren amphotropen Überständen wurden dann die humanen hämatopoetischen Zellen K562 (myeloid), DAUDI (lymphatisch, B-Zell-Kompartiment) und CCRF-CEM (lymphatisch, T-Zell-Kompartiment) transduziert. Die Vektorfunktion wurde über durchflußzytometrische Analyse der MDR1- und ΔLNGFR-Expression analysiert. Doppelfärbung transduzierter und MDR-selektierter Zellen mit den monoklonalen Antikörpern UIC2 (gerichtet gegen ein extrazytoplasmatisches Epitop von Pgp) und Anti-LNGFR zeigte Koexpression beider Marker auf Einzelzellebene, jedoch mit großen Unterschieden je nach Verknüpfungsprinzip (Abbildung 42).

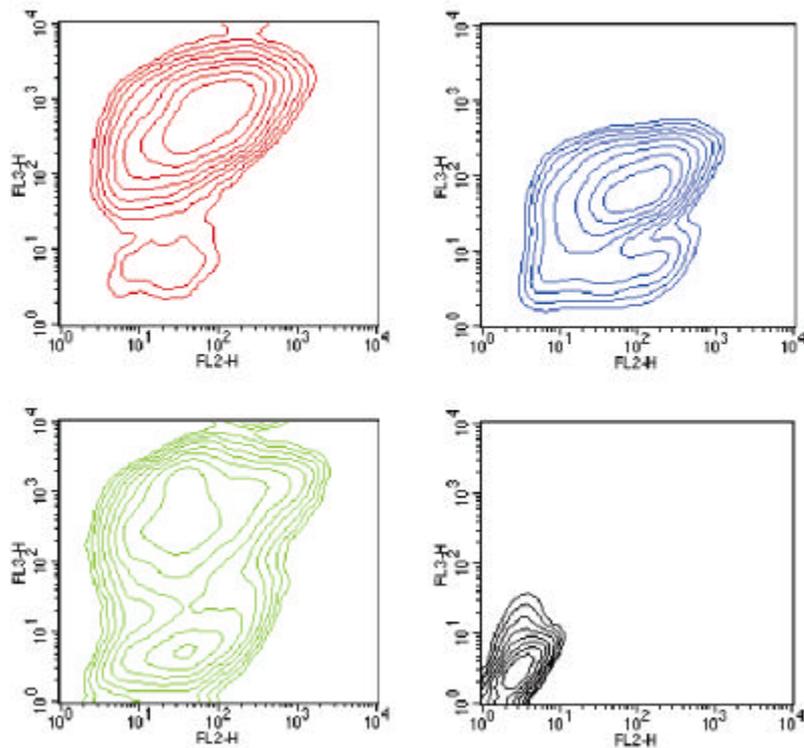


Abbildung 42: Die Verknüpfung über retrovirale Spleißsignale zeigt die beste Korrelation bezüglich MDR1- und Δ LNGFR-Koexpression.

Dargestellt ist die Zwei-Farben-Durchflußzytometrie mit den jeweiligen Vektoren transduzierter und mit 20 ng/ml Colchicin selektierter K562 Massenkulturen.

Die Zellen wurden mit R-Phycoerythrin-konjugiertem Anti-Pgp-Antikörper UIC2 (FL2-H) und biotinyliertem Anti-LNGFR-Antikörper mit Streptavidin-CyChrome als Sekundärreagens (FL3-H) gefärbt.

oben links	SF1 mS δ
oben rechts	SF1 mE δ
unten links	SF1 m $\beta\delta$
unten rechts	Negativkontrolle (untransduzierte Zellen)

Als Maßstab zur Analyse der Qualität des Verknüpfungsmoduls wurde eine hohe Expression beider Proteine mit starker positiver Korrelation angewandt. Sowohl die Spleiß- als auch die IRES-Strategie, nicht jedoch der interne Promotor, zeigten eine starke positive Korrelation der Δ LNGFR-Expression in Abhängigkeit der Pgp-Expression. Mit dem Spleißvektor SF1 mS δ transduzierte Zellen zeigten den höchsten Anteil koexprimierender Zellen (97%), gefolgt von mit dem IRES-Vektor SF1 mE δ (81%) und dem internen-Promotor-Vektor SF1 m $\beta\delta$ (78%) transduzierten Zellen. Unter den getesteten bicistronischen Vektoren vermittelte SF1 mS δ die höchste Δ LNGFR-Expression. Eine ähnlich hohe Δ LNGFR-Expression vermittelte auch SF1 m $\beta\delta$, während mit SF1 mE δ transduzierte Zellen eine um ca. eine Größenordnung niedrigere Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abbildung 43).

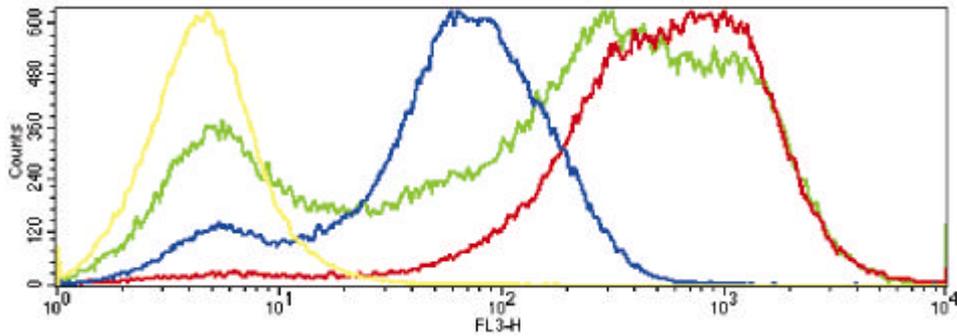


Abbildung 43: **SF1 mSδ** vermittelt die höchste Δ LNGFR-Expression und weist zugleich den geringsten Anteil nicht- Δ LNGFR-exprimierender Zellen auf.

Dargestellt ist die Δ LNGFR-Expression in Zellen, transduziert mit MDR1- Δ LNGFR-Koexpressionsvektoren.

Obwohl **SF1 mSδ** die höchste Δ LNGFR-Expression vermittelt, ist diese dennoch um zwei Größenordnungen niedriger als die des monocistronischen Gegenstücks (nicht gezeigt). Bei Transduktion mit **SF1 mEδ** sind zwar prozentual mehr Zellen Δ LNGFR positiv als bei Transduktion mit **SF1 mβδ**, jedoch ist die Gesamtausprägung niedriger. Als Kontrolle sind **SF1m** transduzierte K562 Zellen verwendet worden.

Um zu beweisen, daß die beobachtete gegenseitige Korrelation der Proteinexpression nicht auf einem Färbeartefakt oder unzureichender Kompensation bei der Zweifarben-Durchflußzytometrie beruht, wurden als Kontrolle K562 Zellen, die mit dem monocistronischen Δ LNGFR-Vektor MO3δ transduziert waren, mit dem monocistronischen Vektor SF1m superinfiziert, mit 20 ng/ml Colchicin selektiert und durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 44). Wie erwartet, war die Δ LNGFR-Expression absolut unabhängig von der Pgp-Expression, was die Anwendbarkeit durchflußzytometrischer Zwei-Farben-Analyse zur Evaluierung von Verknüpfungsstrategien bicistronischer Vektoren unterstreicht.

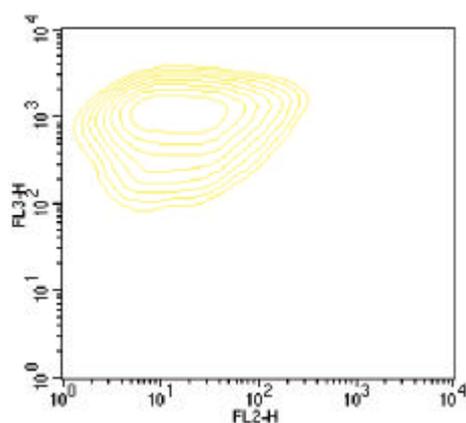


Abbildung 44: Interne Kontrolle für Zweifarben-Analyse (Superinfektion MO3δ transduzierter K562 Zellen mit SF1m)

Es besteht keine Interferenz zwischen der Färbung auf Pgp (FL2-H) und Δ LNGFR (FL3-H). Die Färbung erfolgte wie in Abbildung 42 beschrieben

Bei jedem getesteten bicistronischen Vektor war die Δ LNGFR-Expression gegenüber dem monocistronischen FMEV-Gegenstück um eine bis drei Größenordnungen erniedrigt und breiter gestreut. Jedoch reichte die Δ LNGFR-Expression des bicistronischen Vektors aus, um transduzierte Zellen von untransduzierten unterscheiden zu können.

2.3.4 Koexpressionsvektoren zeigen mäßig reduzierte MDR1-Expression

Wie auch bereits bei den MDR1-*neo*^R-Koexpressionsvektoren beobachtet, zeigten auch die MDR1- Δ LNGFR-Koexpressionsvektoren eine gegenüber dem monocistronischen MDR1-Vektor SF1m verringerte Colchicinresistenz, was die Anwendbarkeit dieser Vektoren in klinischen Studien beeinträchtigen könnte.

Gezeigt wurde dies anhand von Klonierungsexperimenten (Abbildung 45), in denen transduzierte, MDR-vorselektierte K562 Zellen in steigende Konzentrationen Colchicin plattiert wurden. Verglichen mit SF1m transduzierten Zellen zeigten SF1 mE δ und SF1 mS δ transduzierte Zellen geringere Chemoprotektion (bei 30 ng/ml Colchicin ca. die Hälfte des monocistronischen Vektors). SF1 mS δ vermittelte einen geringfügig schlechteren Schutz als SF1 mE δ , vermutlich durch den teilweisen Verlust von MDR1-kodierenden Transkripten aufgrund des alternativen Spleißens. Mit Abstand am schlechtesten klonierten mit dem interne-Promotor-Vektor SF1 m β δ transduzierte Zellen in steigenden Colchicin-Konzentrationen, was auf Promotor-Interferenz beruhen kann.

Bestätigt wurden diese Beobachtungen mittels durchflußzytometrischer Analyse der Pgp-Expression über UIC2-Antikörper-Färbung (Abbildung 45). Auch hier zeigten mit SF1 mE δ und SF1 mS δ transduzierte Zellen ein nahezu identisches Expressionsmuster, während mit SF1 m β δ transduzierte Zellen eine um ca. eine Größenordnung erniedrigte Fluoreszenz besaßen.

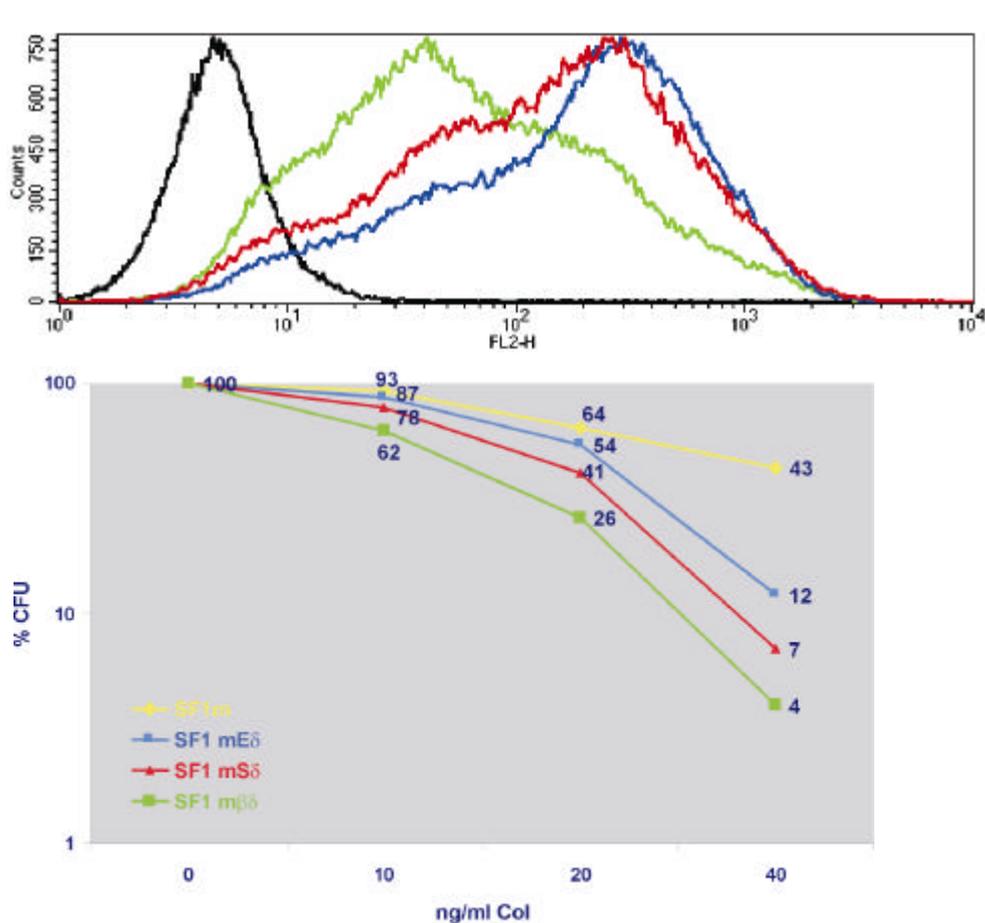


Abbildung 45: Mit MDR1-Koexpressionsvektoren transduzierte Zellen zeigen im Vergleich zu mit dem monocistronischen Vektor transduzierten Zellen eine reduzierte MDR1-Expression. Dargestellt ist die MDR1-Expression in Zellen, transduziert mit MDR1- Δ LNGFR-Koexpressionsvektoren.

SF1 mE δ vermittelt die höchste Expression, dicht gefolgt von SF1 mS δ . SF1 m β δ transduzierte Zellen waren mit Abstand am schlechtesten geschützt. Alle Koexpressionsvektoren vermitteln im Vergleich zum monocistronischen Vektor SF1m erniedrigte Genexpression.

- oben Durchflußzytometrische Analyse mit R-Phycoerythrin-konjugiertem Anti-Pgp-Antikörper UIC2 (FL2-H) (untransduzierte Zellen sind schwarz dargestellt)
- unten Klonierungseffizienz in semi-solidem Medium in steigenden Konzentrationen Colchicin (dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Plattierungen)

2.3.5 SF1 mS δ erlaubt die Gewinnung hochtitriger retroviraler Überstände

Die bisherigen Daten zeigen, daß mit **SF1 mS δ** transduzierte Zellen die beste Koexpression von MDR1 und Δ LNGFR aufweisen. Zwar ist die vermittelte Zytostatikaresistenz etwas geringer als bei Transduktion mit **SF1 mE δ** , jedoch erweist sich die Δ LNGFR-Expression um eine Größenordnung höher als beim IRES-Vektor. Zudem zeigten mit **SF1 mS δ** transduzierte Zellen den geringsten Anteil nicht-koexprimierender Zellen. Deshalb wurden alle weiteren Untersuchungen mit **SF1 mS δ** durchgeführt.

Eine GP+envAm12-Massenkultur von **SF1 mS δ** ergab einen funktionellen Titer von $5 \cdot 10^4$ infektiösen Einheiten pro ml. Dieser wurde bestimmt mittels Infektion humaner Fibrosarkomzellen HT1080 mit endpunktverdünntem zellfreiem retroviralem Überstand und Selektion MDR-positiver Klone mit 20 ng/ml Colchicin. Beim Analysieren von 24 Einzelklonen dieser Massenkultur ergab ein Produzentenklon einen Titer von $5,1 \cdot 10^5$ MDR-transduzierender Einheiten pro ml Überstand, was für einen bicistronischen MDR1-Spleißvektor ein sehr gutes Ergebnis darstellt.

2.3.6 Koexpression von MDR1 und Δ LNGFR auf SF1 mS δ transduzierten Zellen

Um die gleichzeitige Expression des MDR1 kodierten Pgp und Δ LNGFR auf Einzelzellebene visuell darzustellen, wurden **SF1 mS δ** transduzierte und mit 20 ng/ml Colchicin selektierte K562 Zellen wie oben beschrieben gefärbt, fixiert und mittels eines konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops analysiert (Abbildung 46). Querschnitte und Oberflächenabbildungen zeigten Expression von Pgp und Δ LNGFR auf der Zelloberfläche, mit einem punktartigen Färbemuster. In einigen Bereichen überlappten die Färbungen, was auf eine enge Nachbarschaft der Epitope in bestimmten Bereichen der Plasmamembran vermuten läßt, die für Nervenwachstumsfaktorrezeptoren bereits in der Literatur beschrieben ist (Venkatakrishnan *et al.* 1991).

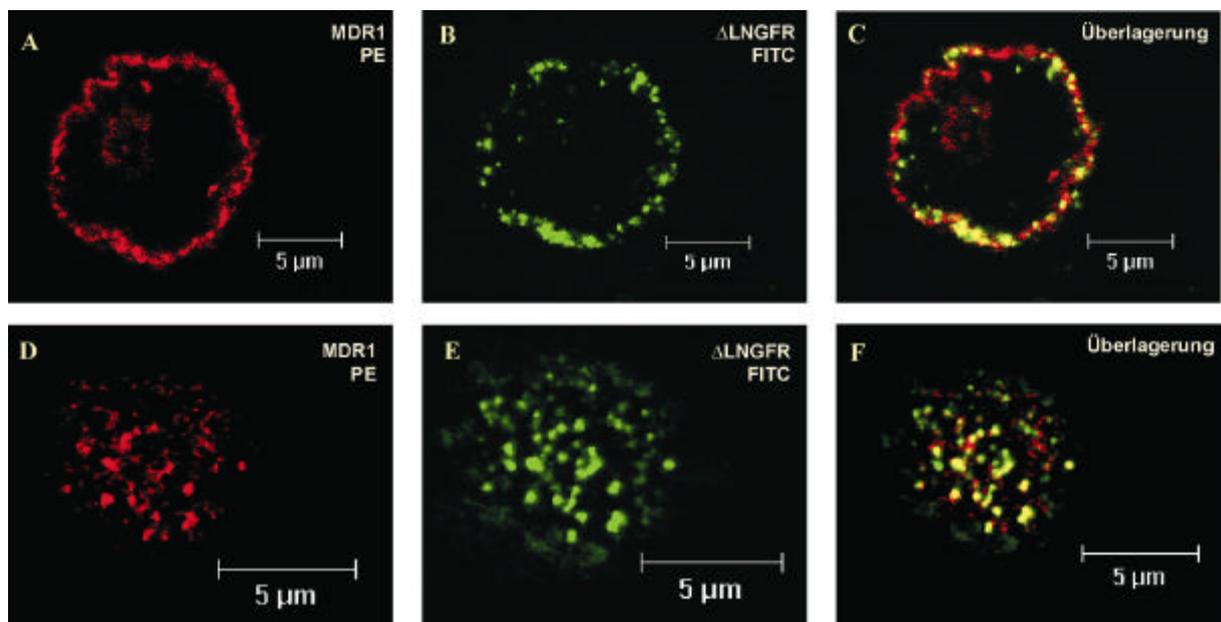


Abbildung 46: MDR1 und Δ LNGFR werden auf SF1 mS δ transduzierten K562 Zellen koexprimiert. Dargestellt ist ein konfokales Laserfluoreszenzmikroskopbild (mit freundlicher Unterstützung von Dr. W. Bohn).

- A - C Querschnitte
- D - F Oberflächenabbildung
- A, D Pgp-Expression auf der Zelloberfläche
- B, E Δ LNGFR-Expression auf der Zelloberfläche
- C, F Überlagerung der Färbungen

2.3.7 SF1 mS δ ist in myeloiden und lymphoiden Zellen aktiv

Um zu bestätigen, daß SF1 mS δ in anderen humanen Zelltypen aktiv ist, zumal alternatives Spleißen auch zelltypspezifisch reguliert wird, wurden T-Lymphoblasten (CCRF-CEM) und Burkitt-Lymphom-Zellen (DAUDI) transduziert, mit 20 ng/ml Colchicin selektiert und die Massenkulturen durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 47). Ähnlich den K562 Zellen (Abbildung 42) exprimierten alle Pgp-positiven Zellen auch Δ LNGFR. Jedoch ergaben sich - abhängig vom Zelltyp - interessante Unterschiede in der Expression von Pgp und Δ LNGFR. CCRF-CEM Zellen zeigten mittlere MDR1-Expression, jedoch starke Δ LNGFR-Expression, da in diesen Zellen vermutlich bevorzugt gespleißt wird. DAUDI Zellen glichen bezüglich der Pgp-Expression den K562 Zellen, exprimierten aber Δ LNGFR deutlich schwächer. Durchflußzytometrische Analysen ergaben immer einen fast linearen Anstieg der Δ LNGFR-Expression mit steigender Pgp-Expression, was bei den DAUDI-Zellen besonders deutlich zutage tritt. Diese Daten veranschaulichen die Funktionalität des Spleißvektors SF1 mS δ in unterschiedlichen Zelltypen, die mehrere Linien humaner myeloider und lymphoider Hämatopoese repräsentieren, wobei die zelltypspezifischen Unterschiede auf differenzierungsabhängiger Verwendung der retroviralen Spleißsignale beruhen könnten. Eine Detektion Vektor-transduzierter, MDR-positiver Zellen über die Δ LNGFR-Funktion war in allen untersuchten Zelltypen möglich.

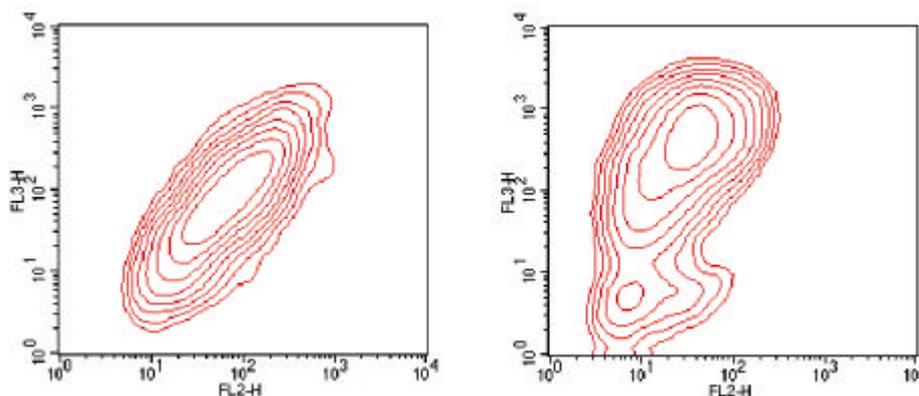


Abbildung 47: SF1 mS δ ist in myeloiden und lymphoiden Zellen aktiv. Dargestellt ist eine Korrelation von Δ LNGFR-Expression (FL3-H) und Pgp-Expression (FL2-H) in SF1 mS δ transduzierten humanen B- (DAUDI; links)- und T- (CCRF-CEM; rechts)-Zellen.

CCRF-CEM Zellen zeigen hohe Δ LNGFR-Expression, jedoch niedrige Pgp-Expression. Verglichen mit den K562 Zellen (Abbildung 42) zeigen die DAUDI Zellen mittlere Δ LNGFR-Expression und gleiche Pgp-Expression. Das Färbeprotokoll, Isotypkontrollen und Instrumenteneinstellungen des Durchflußzytometers waren die gleichen wie bei dem in Abbildung 42 dargestellten Experiment.

2.3.8 Der genotypische Index ist bei MDR1- Δ LNGFR-Koexpressionsvektoren erniedrigt

Um der Frage nachzugehen, ob der im MDR1-NPTII-System beobachtete erniedrigte genotypische Index der MDR1-cDNA auch in anderen Systemen beobachtet werden kann, wurde die Koexpression von Pgp und Δ LNGFR in **SF1 mS δ** transduzierten Zellen vor Zytostatika-Selektion analysiert (Abbildung 48). Nur ein Drittel der Δ LNGFR-positiven Zellen exprimierte auch funktionell MDR1, während alle Zellen mit Pgp-Expression zugleich auch Δ LNGFR-Expression zeigten. Somit konnten die Daten aus dem MDR1-NPTII-System bestätigt werden.

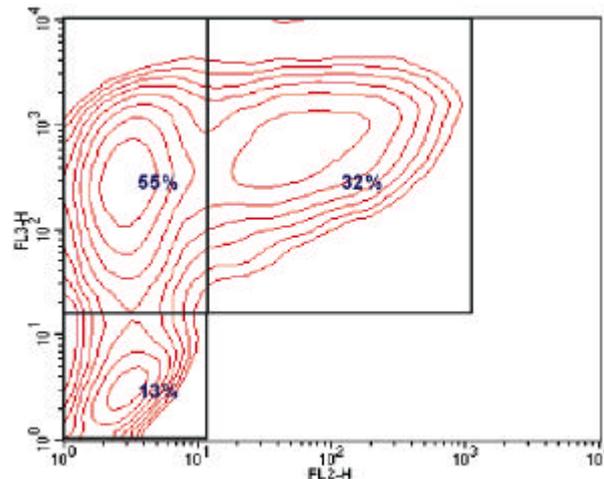


Abbildung 48: Der genotypische Index ist bei Transduktion mit MDR1- Δ LNGFR-Koexpressionsvektoren erniedrigt. Dargestellt ist die MDR1- Δ LNGFR-Koexpression von **SF1 mS δ** transduzierten, unselektierten K562 Zellen.

Ein ähnliches Bild ergab die Analyse transduzierter, unselektierter DAUDI und CCRF-CEM Zellen. Die Färbung erfolgte wie in Abbildung 42 beschrieben.

FL2-H	Pgp-Expression
FL3-H	Δ LNGFR-Expression
oben links	Zellen mit alleiniger Δ LNGFR-Expression
oben rechts	Zellen mit MDR1- und Δ LNGFR-Expression
unten links	untransduzierte Zellen

2.3.9 Δ LNGFR-Expression erlaubt die Anreicherung Vektor-transduzierter, MDR-positiver Zellen *in vitro*

Neben der Anwendung als Marker für Vektor-transduzierte Zellen gestattet die Koexpression von Δ LNGFR die Anreicherung Vektor-transduzierter Zellen *in vitro* über Δ LNGFR-Immunoaffinität. Somit stellt sich die Frage, ob eine Anreicherung transduzierter und MDR-positiver Zellen auf Basis der Δ LNGFR-Expression mit primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen möglich ist. Die Experimente wurden mit CD34-positiven Zellen aus Knochenmark durchgeführt. Die Zellen wurden mit Überstand einer mit **SF1 mS δ** transfizierten GP+EnvAm12 Zelllinie transduziert, wobei als Kontrollvektor der monocistronische Δ LNGFR-Vektor MO3 δ verwendet wurde. 24 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen einer Immunoaffinitätsäulen-beruhenden Anreicherung für Δ LNGFR-positive Zellen unterzogen. Das Ausmaß der Anreicherung Δ LNGFR-positiver Zellen wurde über durchflußzytometrische Analyse vor und nach Säule bestimmt. Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 49 dargestellt.

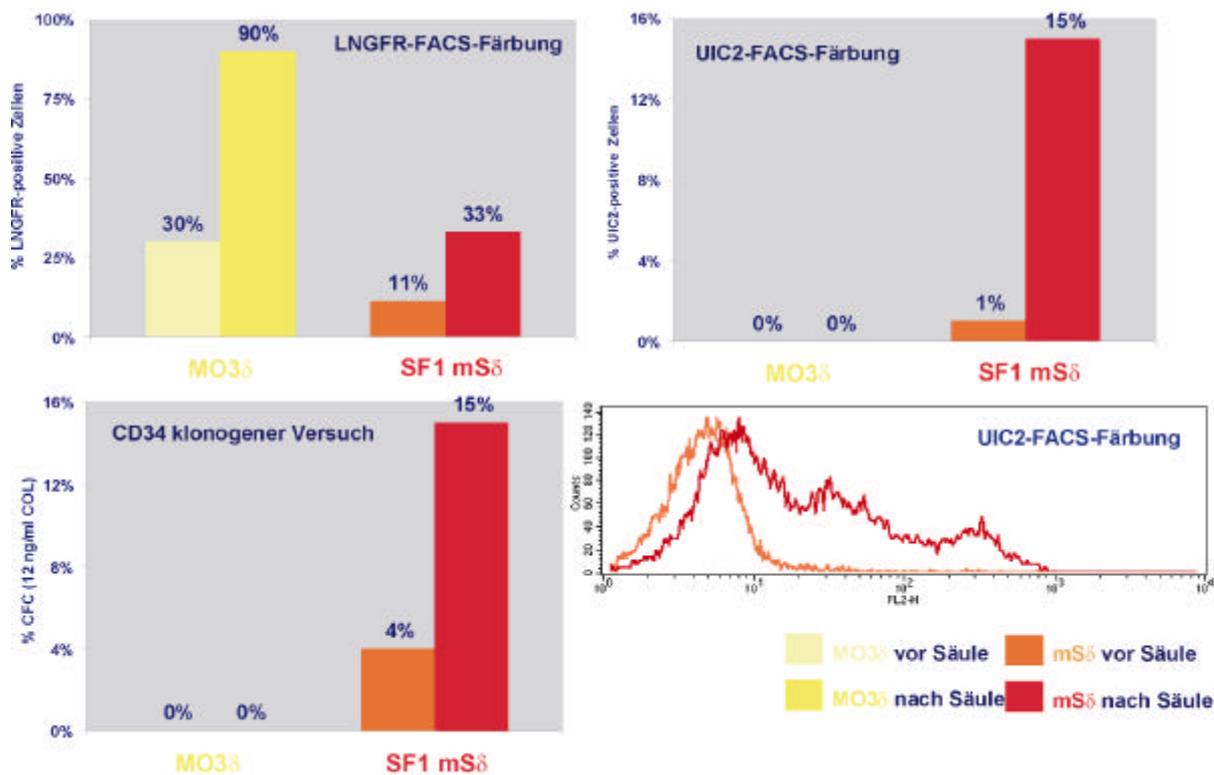


Abbildung 49: Δ LNGFR-Expression erlaubt die Anreicherung Vektor-transduzierter, MDR-positiver Zellen *in vitro*. Dargestellt ist die Anreicherung CD34-positiver Zellen, transduziert mit SF1 mS δ , über Immunoaffinität zu Δ LNGFR.

oben Nachweis der Anreicherung MDR-positiver Zellen mittels Durchflußzytometrie. Während eine Anreicherung SF1 mS δ transduzierter Zellen über Immunoaffinität zu Δ LNGFR zu einer Anreicherung MDR1-positiver Zellen führte, ergaben sich bei MO3 δ transduzierten Kontrollzellen keine Änderungen (als Pgp-positiv wurden alle Zellen mit einer Fluoreszenz > 10 gewertet). Dies konnte auch im Klonierungsexperiment bestätigt werden (unten links), wobei die Penetranz von MDR jedoch unvollständig bleibt.

Gemäß durchflußzytometrischer Analyse Δ LNGFR-positiver Zellen erreichte MO3 δ eine höhere Transduktionsrate als SF1 mS δ vor Immunoaffinitätsanreicherung (vor Säule). Ebenso wurde ein höheres Ausmaß an Reinheit mit dem monocistronischen Vektor nach Immunoaffinitätsanreicherung erlangt (nach Säule). Bei SF1 mS δ zeigte die Hälfte der Δ LNGFR-positiven Zellen nach Säule Pgp-Expression über dem Kontrollniveau (Mehr ist aufgrund der Instabilität der MDR1-Transkriptionseinheit nicht zu erwarten).

unten Dokumentation der Immunoaffinitätsanreicherung (rechts).
(Mit freundlicher Unterstützung von Dr. B. Fehse)

Beide Vektoren erlaubten eine signifikante Anreicherung Δ LNGFR-positiver Zellen (MO3 δ 30% bzw. 90% vor bzw. nach Säule; SF1 mS δ 11% bzw. 33% vor bzw. nach Säule). Interessanterweise war die Reinheit bei Verwendung des monocistronischen Vektors MO3 δ höher. Als Erklärung käme eine höhere Stärke und Uniformität in der Expression des Oberflächenmarkers durch MO3 δ in CD34-positiven Zellen in Frage.

Nichtsdestoweniger wurden MDR-positive CFU über Δ LNGFR-Immunoaffinität angereichert und in Klonierungsexperimenten nachgewiesen. Hierfür wurden SF1 mS δ transduzierte CD34-positive Zellen vor und nach magnetischer Anreicherung in Methylcellulose in Anwesenheit von 12 ng/ml Colchicin plattiert. Diese Konzentration entspricht dem zwei- bis dreifachen Wert der IC₅₀ und gestattet hintergrundfreie Selektion transduzierter Zellen. Nicht mehr als 15% MDR-positiver CFU konnten nach Anreicherung mittels Δ LNGFR-Immunoaffinität erwartet werden (bei 33% Δ LNGFR positiven Zellen), bedenkt man den erniedrigten genotypischen Index (Abbildung 48) und die unvollständige Reinheit Immunoaffinitäts-selektierter Zellen. In der Tat erhöhte sich die Anzahl Colchicin-resistenter CFU von 4% auf 15% durch Säulenaufreinigung in dem hier dargestellten Experiment. Die Verteilung von BFU-E und CFU-GM war in selektierten und unselektierten Zellen ähnlich, was eine Beeinträchtigung der hämatopoetischen Differenzierung *in vivo* durch die Vektorexpression ausschließt. Bestätigt wurden diese Daten auch durch durchflußzytometrische Analysen. Somit konnten Vektor-transduzierte MDR-

positive hämatopoetische Zellen *ex vivo* ohne Exposition mit zytostatischen Agentien angereichert werden.

2.3.10 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden retrovirale Vektoren beschrieben, die MDR1 und Δ LNGFR koexprimieren. Gezeigt wurde, daß

- (1) die Verknüpfung beider Gene über Spleißsignale, eine interne ribosomale Eintrittsstelle und den Hühner- β -Actin-Promotor zu einer Koexpression auf Einzelzellebene führt,
- (2) die Zelloberflächenmarkierung mittels Δ LNGFR eine Detektion transduzierter und chemoresistenter Zellen mit hoher Sensitivität erlaubt und
- (3) Vektor-exprimierende Zellen *in vitro* ohne Verwendung zytotoxischer Agentien angereichert werden können, insbesondere humane CD34-positive Zellen.

Die Koexpression von MDR1 und Δ LNGFR über alternatives Spleißen erwies sich als zuverlässig in verschiedenen hämatopoetischen Linien, einschließlich erythroiden, myeloiden und lymphoiden Zellen. Durch die Expression von MDR1 vermittelt dieser FMEV-abgeleitete Vektor Hochdosis-Zytostatikaresistenz in primären hämatopoetischen Zellen.

Somit zeigt diese Untersuchung die Anwendbarkeit einer Kombination aus myeloprotektiven Genen mit klinisch anwendbaren Zelloberflächenmarkern, die Bedeutung über die Verwendung einer Kombination aus MDR1 und Δ LNGFR hinaus besitzt.

Dennoch wurden auch in diesem System - ähnlich dem MDR1-NPTII-System - die bestehenden Limitationen deutlich:

- (1) Die Koexpressionsvektoren zeigen im Vergleich zu ihren monocistronischen Gegenstücken eine verminderte Genexpression und
- (2) ca. 50% der transduzierten, unselektierten Zellen zeigen keinen MDR1-Phänotyp.

Diese Probleme, die die Sicherheit und Anwendbarkeit von MDR1-Koexpressionsvektoren in klinischen Studien in Frage stellen, werden in den beiden folgenden Kapiteln angegangen, indem einerseits durch weitere *Leader*-Modifikationen die Expression gesteigert und gleichzeitig auch die Sicherheit des Vektors an sich verbessert wird, andererseits durch Zerstören kryptischer Spleißsignale innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit der genotypische Index und gleichzeitig auch die Zytostatikaresistenz erhöht wird.

2.4 Die Modifizierung der Leader-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

2.4.1 Fragestellung

Wie die beiden letzten Kapitel gezeigt haben, zeigen MDR1-Koexpressionsvektoren gegenüber den monocistronischen Vektoren eine verringerte Genexpression. Um diesen Expressionsverlust auszugleichen, sollte eine Expressionsoptimierung des *Leaders* auf posttranskriptioneller Ebene erfolgen durch Modifikationen, die sich auf die Effizienz des alternativen Spleißens auswirken. Hierbei sollte - im Gegensatz zum MFG-Vektor (Krall *et al.* 1996) - die Expressionssteigerung unabhängig vom verwendeten Transgen sein.

Daneben wurde parallel eine Erhöhung der Vektorsicherheit angestrebt, indem alle nicht für den retroviralen Lebenszyklus notwendigen Sequenzen aus dem FMEV-Rückgrat entfernt wurden, insbesondere die ca. 400 bp *gag*-Sequenz. Dies soll die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit endogenen retroviralen Sequenzen verringern (s. 1.4.5.1). Insbesondere wurde die Auswirkung der Deletion auf Genexpression und Virustiter untersucht (vgl. 1.4.2.1).

Um die Sicherheit vor Expression anderer Leserahmen außer dem des Transgens zu erhöhen, wurden überdies alle ATG-Leserahmen 5' des Transgens mutiert (vgl. 1.4.2.4).

Die Analyse der *Leader*-Modifikationen wurde mit 4 verschiedenen Reportergenen (MDR1, GFP, *lacZ*, *neo^R*) durchgeführt.

2.4.2 Klonierung der Vektoren

Um die *Leader*-Modifikationen im Kontext retroviraler Vektoren zu analysieren, wurden als Vergleichsvektoren die in der Einleitung beschriebenen *gag*⁺ (1.4.2.1) und MFG-Vektoren (1.4.2.2) so modifiziert, daß die MoMLV-LTR durch eine SFFVp-LTR und der MoMSV-*Leader* durch einen MESV-*Leader* ersetzt wurden. Dies ermöglicht den direkten Vergleich deren *Leader*-Architektur mit den neuartigen *Leader*-Modifikationen, da nun die Vektoren bis auf die unterschiedlichen *Leader*-Architekturen vollständig identisch sind. Im folgenden wird der SFFVp-LTR/MESV-*Leader/gag*⁺-Vektor als **G+** (*gag*⁺ Äquivalent), der SFFVp-LTR/MESV-*Leader/gag*⁺/*pol*⁺-Vektor als **G+P+** (MFG-Äquivalent) bezeichnet, wobei der **G+** Vektor mit den bisher beschriebenen SF1-Vektoren identisch ist (Abbildung 50).

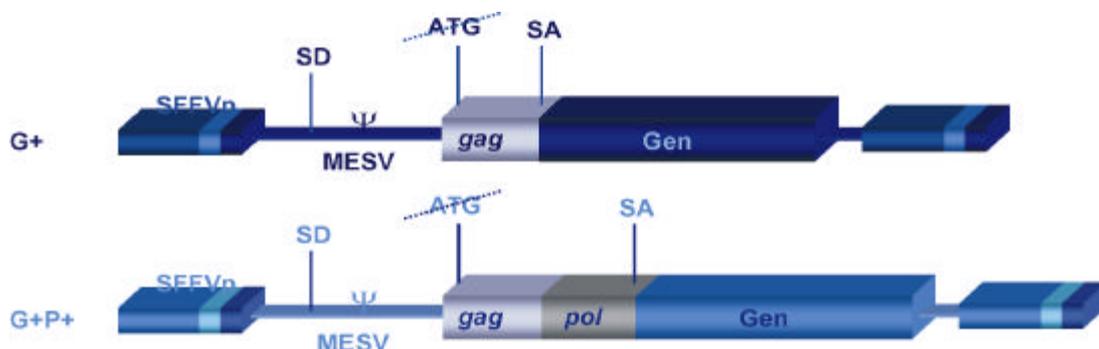


Abbildung 50: Aufbau der klassischen Vektoren G+ und G+P+
(Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde mutiert)

Diesen klassischen Vektoren stehen die hier vorgestellten, neuartigen Vektoren mit *Leader*-Modifikationen gegenüber (Abbildung 51):

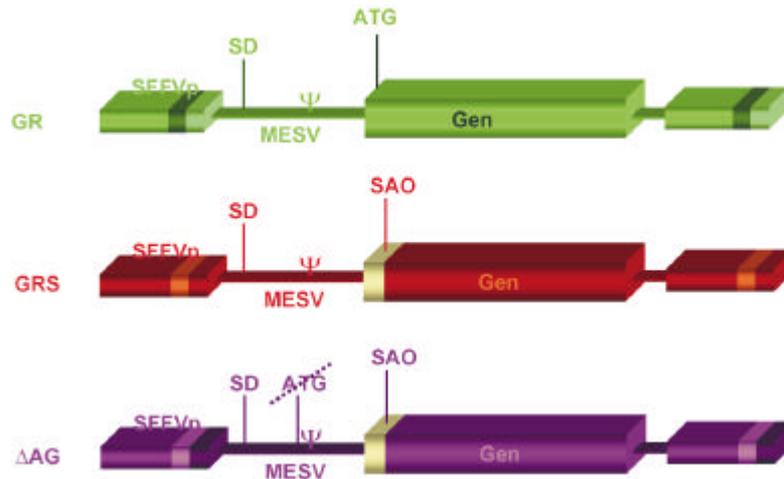


Abbildung 51: Neuartige Vektoren mit *Leader*-Modifikationen
(Das ursprüngliche *gag* Startcodon wurde mutiert)

Im **GR** Vektor (**GR**: *gag replacement*) befinden sich weder *gag*- noch *pol*-Sequenzen; vielmehr sind die *gag*-Sequenzen durch das Transgen ersetzt, dessen Leserahmen sich im ursprünglichen *gag*-Leserahmen befindet. Dies imitiert die natürliche Situation im Wildtypvirus, so daß auch eine höhere Transgenexpression denkbar wäre. Durch das Deletieren der *gag*-Sequenzen werden gleichzeitig auch mehrere offene Leserahmen entfernt, von denen einige dem Kozak-Konsensus (Kozak 1991) folgen (s. 1.4.2.4): Im **GR** Vektor existiert 5' des erwünschten offenen Leserahmens nur noch ein weiteres ATG-Startcodon, das jedoch keinen optimalen Kozak-Konsensus besitzt. Außerdem weist der **GR** Vektor gegenüber den klassischen *gag*⁺ Vektoren ein (theoretisch) vermindertes Rekombinationspotential mit endogenen Retroviren aus Verpackungszellen auf, da durch Deletion der *gag*-Sequenzen deren potentieller Homologiegrad verringert wurde. Dies beugt der Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Retroviren vor, eines der Hauptprobleme beim Einsatz retroviraler Vektoren in der Gentherapie (s. 1.3.5.2; 1.4.5.1). Durch die Deletion der *gag*-Sequenzen wird der Vektor zudem kleiner, was bei der auf ca. 10 kb limitierten Genomgröße der Retroviren ein weiterer Vorteil ist.

Der **GRS** Vektor (**GRS**: *gag replacement-splice acceptor oligo*) besitzt den gleichen Grundaufbau wie der **GR** Vektor; jedoch befindet sich direkt vor der cDNA ein 47-bp-Spleißakzeptoroligonukleotid (mit zusätzlich 4 bp 5'- und 7 bp 3'-Linkersequenz), dessen Sequenz dem retroviralen SFFVp-Spleißakzeptor entlehnt wurde (Wolff *et al.* 1985). Neben den Vorteilen des **GR** Vektors sollte der **GRS** Vektor analog dem MFG-Vektor eine erhöhte Genexpression durch vermehrtes Spleißen ermöglichen. Im Vergleich zum MFG-Vektor werden nur die absolut notwendigen Spleißakzeptor-Konsensussequenzen verwendet: Der MFG-Vektor enthält ca. 400 Basenpaare zusätzliche virale *pol*-Sequenz um den *env*-Spleißakzeptor, wodurch die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Retroviren in der Verpackungszelle theoretisch erhöht wird. Außerdem befinden sich mehrere offene Leserahmen in der inserierten *pol*-Sequenz, was zur Synthese von *nonsense*-Peptiden / Proteinen führen kann (s. 1.4.2.4).

Der letzte offene ATG-Leserahmen im **GRS** Vektor außerhalb des Transgens wurde im Δ AG-Vektor (= ATG-bereinigter **GRS** Vektor) durch eine Punktmutation zerstört. Dies dient zum einen der Sicherheit, da die mögliche Expression eines Peptids unbekannter Funktion verhindert wird; zum anderen könnte dadurch die Expression weiterhin erhöht werden, weil die mRNA-Translation nicht vorzeitig beginnen kann. Der *Leader* des Δ AG-Vektors ist in Abbildung 52 veranschaulicht:

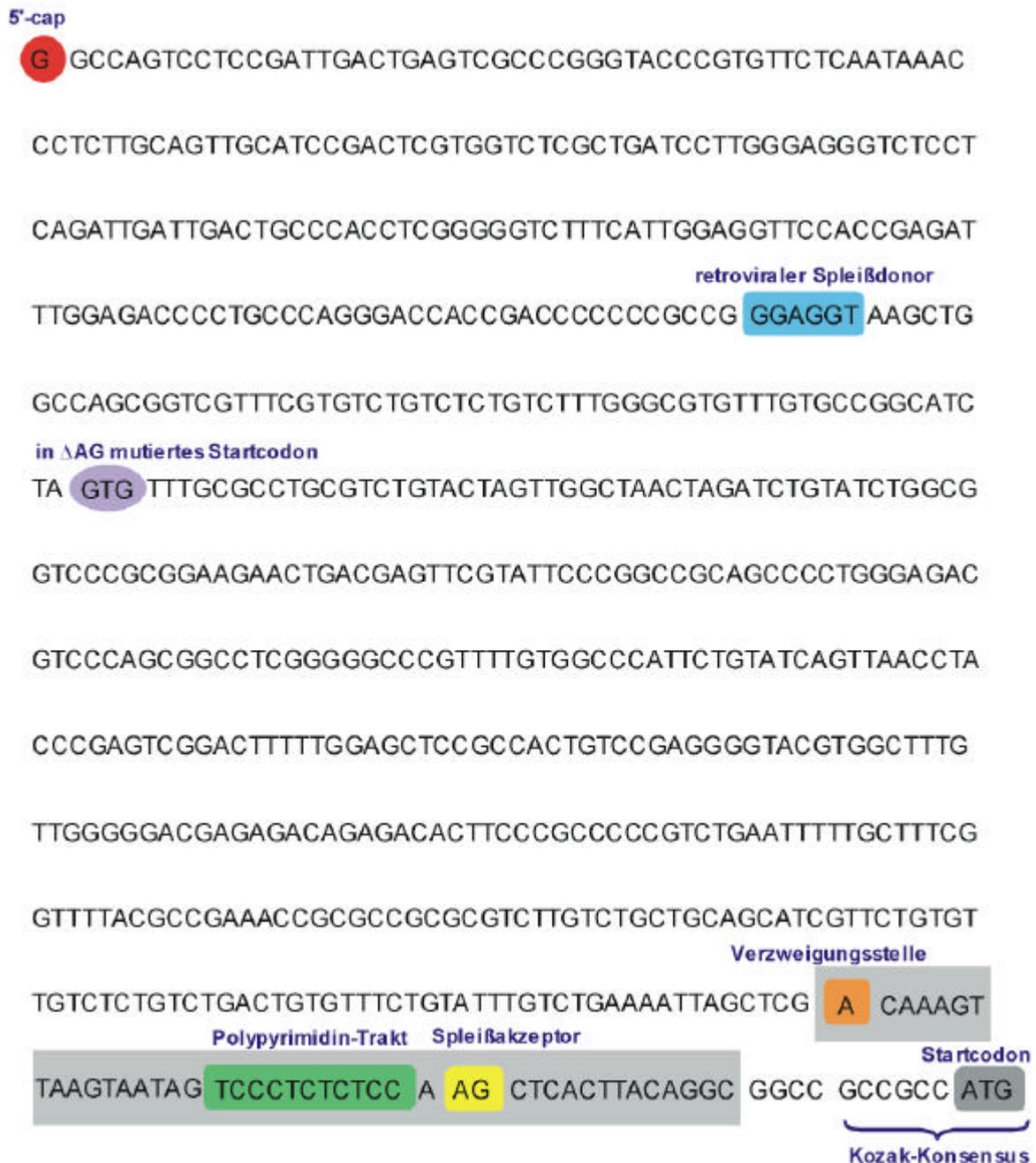


Abbildung 52: Δ AG-*Leader*

2.4.3 Die *Leader*-modifizierten Vektoren vermitteln erhöhte Colchicinresistenz

Um die Auswirkungen der *Leader*-Modifikationen zu analysieren, wurde die MDR1-cDNA in die neuartigen Vektoren **GR** und **GRS** sowie die konventionellen Vektoren **G+** und **G+P+** eingefügt. Zur Bestimmung der Expressionshöhe wurden K562 Zellen mit den entsprechenden Vektoren unter Verwendung von PG13 Verpackungszellen transduziert und Massenkulturen durch Selektion mit 20 ng/ml Colchicin angelegt. Diese wurden in semisolidem Medium in steigenden Colchicin-Konzentrationen kloniert (Abbildung 53).

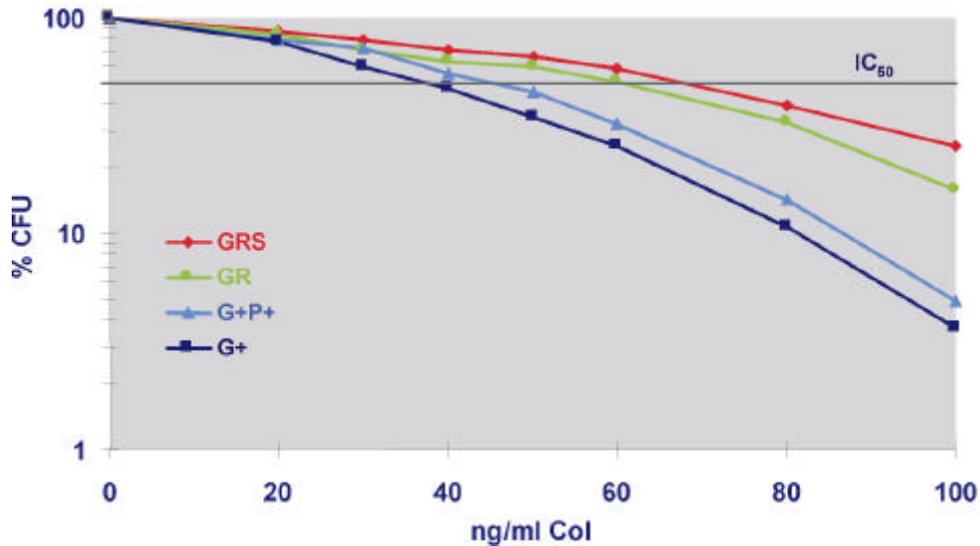


Abbildung 53: Die *Leader*-modifizierten Vektoren vermitteln erhöhte Colchicinresistenz. Dargestellt ist die Klonierungseffizienz der mit den entsprechenden Konstrukten transduzierten Zellen in steigenden Konzentrationen Colchicin.

K562 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transduziert und Massenkulturen unter Selektion mit 20 ng/ml Colchicin angelegt. Diese wurden in steigende Konzentrationen Colchicin plattiert. Die dargestellten Werte stellen den Anteil der Zellen dar, die bei einer bestimmten Colchicin-Konzentration im Vergleich zu der Anzahl von Kolonien ohne Colchicin-Zugabe klonieren.

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) beträgt für **GRS** m und **GR** m 0,99, für **G+P+** m 0,98 und für **G+** m 0,95.

Wie aus Abbildung 53 ersichtlich wird, ist die Chemoprotektion transduzierter hämatopoetischer Zellen durch MDR1-Expression bei dem ursprünglichen **G+** Konstrukt (entspricht dem bisher beschriebenen SF1m) im Hochdosisbereich (mehr als 80 ng/ml Colchicin) noch unzureichend. Der MFG-ähnliche **G+P+** Vektor vermittelte eine geringfügig bessere Zytostatikaresistenz. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die mit den neuartigen **GR** und **GRS** abgeleiteten MDR1-Vektoren transduziert wurden, um fast eine Größenordnung höhere Klonierungseffizienzen im Hochdosisbereich. Die Einführung des Spleißakzeptoroligonukleotids im **GRS** Vektor vermittelte eine Erhöhung der CFU um 60% im Hochdosisbereich, verglichen mit dem **GR** Vektor. Insgesamt konnte die IC_{50} für Colchicin durch die *Leader*-Modifikationen im Vergleich zum Ausgangsvektor **G+** nahezu verdoppelt werden (68 ng/ml für den **GRS** Vektor im Vergleich zu 36 ng/ml für den **G+** Vektor im Vergleich zu 3 ng/ml für untransduzierte Zellen).

2.4.4 Der GRS Vektor vermittelt erhöhte Genexpression unabhängig von der verwendeten cDNA

Um die Funktion der GR und GRS Vektoren mit anderen Transgenen zu analysieren, wurde eine Reihe von Vektoren mit anderen Markergenen kloniert, und zwar mit einem Kozak-Konsensus-*lacZ/neo^R*-Fusionsgen (abgekürzt: K) und dem GFP-Gen.

Der GRS Vektor vermittelte die stärkste Expression des *lacZ/neo^R*-Fusionsgens (Abbildung 54): In transduzierten und mit 0,4 mg/ml G418 vorselektierten Mausfibroblasten erwies sich die Expression fünffach (bzgl. G+) bzw. dreifach (bzgl. G+P+) höher. Der GR Vektor führte bei Verwendung dieses Markers im Vergleich zu MDR1 zu keinem Expressionsgewinn; die von ihm vermittelte Expressionshöhe lag zwischen dem des G+ und G+P+ Vektors.

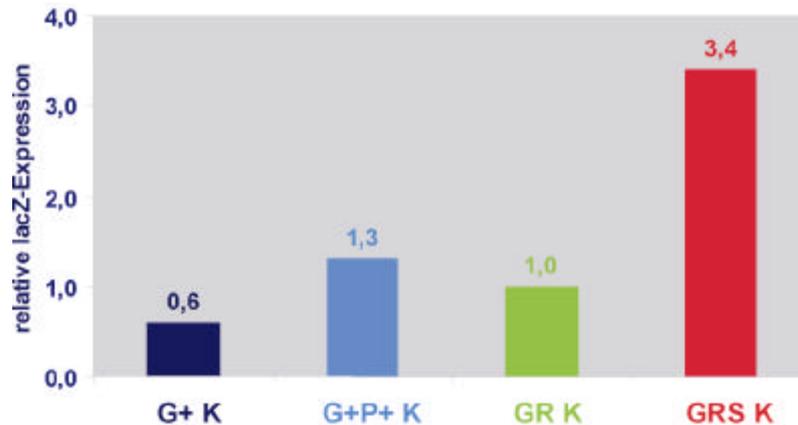


Abbildung 54: Der GRS Vektor vermittelt die höchste *lacZ*-Expression in Mausfibroblasten. Dargestellt ist die relative β -Galactosidase-Expression bzgl. GR K. Mausfibroblasten wurden mit den entsprechenden Vektoren transduziert, und Massenkulturen durch Selektion mit 0,4 mg/ml G418 angelegt. Nach Proteinextraktion wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Der GRS Vektor wird - wie bereits bei Verwendung der MDR1-cDNA - um eine halbe Größenordnung stärker exprimiert als der Ausgangsvektor G+. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten (Standardabweichung ca. 10%).

Bei Verwendung der GFP-cDNA vermittelte der GRS Vektor ebenfalls höhere Genexpression in K562 Zellen als die klassischen G+ und G+P+ Vektoren (Abbildung 55). Das GFP-System unterscheidet sich vom MDR1- und *lacZ/neo^R*-System darin, daß hier keine Vorselektion erfolgt und somit auch schwach exprimierende Zellen in die Analyse miteinbezogen werden.



Abbildung 55: Der GRS Vektor vermittelt die höchste GFP-Expression in K562 Zellen. Dargestellt ist die relative GFP-Expression in transduzierten, unselektierten K562 Zellen, gemessen in einem repräsentativen Experiment (Standardabweichung 5% bis 8%).

Interessanterweise scheint in diesem System die Einführung des Spleißakzeptoroligonukleotids sich besonders günstig auf die Expression auszuwirken (siebenfache Expressionssteigerung). Im Vergleich zu den beiden anderen beschriebenen Systemen ist hier die Expression des GR Vektors niedriger als die der klassischen Vektoren.

Durch Entfernen des letzten offenen ATG-Leserahmens im 5'-untranslatierten Bereich des GRS Vektors mittels Mutation entstand der ATG-bereinigte GRS Vektor Δ AG. Dieser zeigte in K562 Zellen im Vergleich zum GRS Vektor leicht erhöhte GFP-Expression, was auf eine Verwendung dieses ATG im GRS Vektor als Startkodon zu einem gewissen, niedrigen Anteil rückschließen läßt.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der GRS Vektor unabhängig von der verwendeten cDNA (MDR1, *lacZ/neo^R*, GFP) die höchste Genexpression vermittelte.

2.4.5 Der GRS Vektor vermittelt erhöhte Genexpression unabhängig vom Zelltyp

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob der Expressionsgewinn durch die Leader-Modifikationen im GRS Vektor auch für unterschiedliche Zelltypen zutrifft. Einen ersten Hinweis darauf lieferte der bereits beschriebene Vergleich der Expression *lacZ/neo^R*-transduzierter Mausfibroblasten. Auch hier erwies sich der GRS Vektor den klassischen Vektoren überlegen. Als nächstes wurde die Genexpression im GFP-System in den CCRF-CEM Zellen (T-Zell-Lymphoblasten) analysiert (Abbildung 56).

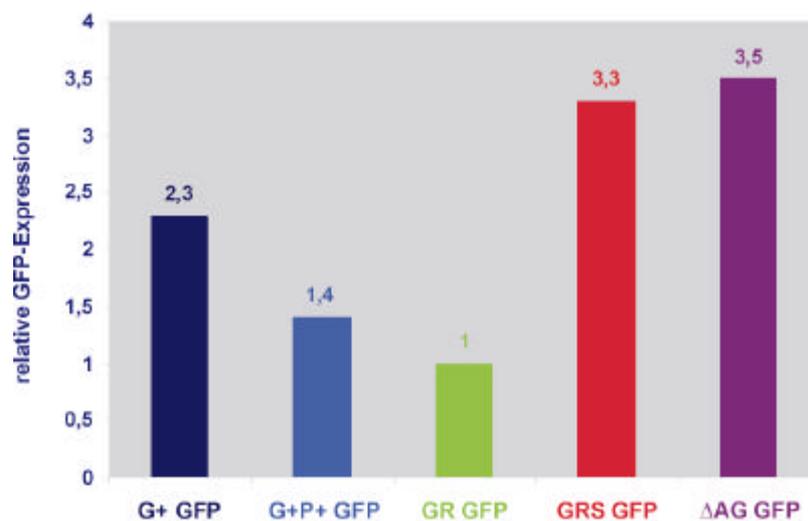


Abbildung 56: Der GRS-Vektor vermittelt erhöhte Genexpression unabhängig vom Zelltyp. Dargestellt ist die relative GFP-Expression in transduzierten, unselektierten CCRF-CEM Zellen.

Hier ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den erythroleukämischen K562 Zellen: Der GR Vektor wurde auch in CCRF-CEM Zellen schlechter exprimiert als die klassischen Vektoren, und der GRS Vektor vermittelte höhere Genexpression als die klassischen G+ und G+P+ Vektoren, wobei die Unterschiede geringer als bei den K562 Zellen waren. Durch Entfernen des letzten offenen Leserahmens im GRS Vektor wurde ebenfalls eine Expressionssteigerung vermittelt.

Diese Daten zeigen deutlich, daß der durch die GRS Architektur bedingte Expressionsgewinn nicht auf einzelne Zelltypen beschränkt ist, sondern in einem breiten Zellspektrum (Fibroblasten, myeloide und lymphoide Zellen) wirksam ist.

2.4.6 Mutation des retroviralen Spleißdonors, nicht jedoch Deletion der gag-Sequenzen, führt zu einer drastischen Verringerung des retroviralen Titers

Ein wichtiger Punkt beim Vergleich retroviraler Vektoren ist der Vektortiter. Deshalb wurde analysiert, ob die Deletion der *gag*-Sequenzen und die Insertion des Spleißakzeptoroligonukleotids den Vektortiter beeinflussen.

In sicherheitsmodifizierten, retroviralen Verpackungszellen erreicht man mit monocistronischen **G+** Vektoren mit SFFVp-LTR und MESV-*Leader* Titer zwischen 10^5 und 10^6 infektiösen Partikeln pro ml Zellkulturüberstand. Im Verlauf der Experimente mit MDR1-, GFP- und *lacZ/neo^R*-Vektoren wurden keine großen Unterschiede in der Transfereffizienz mit **G+**, **G+P+** und **GR** Vektoren beobachtet, während **GRS** Vektoren geringfügig niedrigere Titerwerte vermittelten. Dies wurde bestätigt durch Endpunktverdünnung zellfreier Überstände PG13-abgeleiteter Verpackungszellen, die über amphotrope Transduktion mit den Vektoren **G+ neo**, **GR neo**, **ΔAG neo** und dem modifizierten GR Vektor **GRΔS neo**, bei dem der retrovirale Spleißdonor deletiert wurde, angelegt wurden. Jeweils 24 Klone wurden für die Titerbestimmung herangezogen (Abbildung 57).

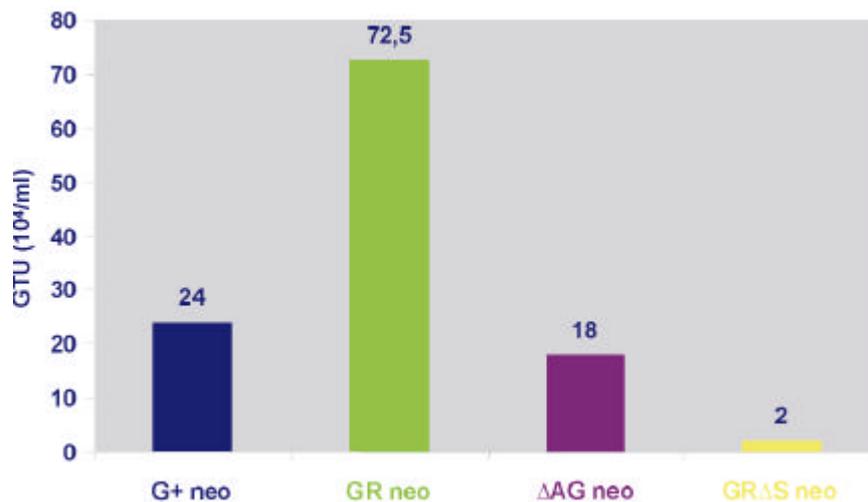


Abbildung 57: Deletion des retroviralen Spleißdonors, nicht jedoch der *gag*-Sequenzen, führt zu einer drastischen Verringerung des retroviralen Titers. Dargestellt ist die Titration PG13-abgeleiteter, zellfreier Überstände auf humane Fibrosarkomzellen HT1080. PG13 Zellen wurden amphotrop mit den entsprechenden Vektoren transduziert und mit 0,4 mg/ml G418 selektiert. Anschließend wurden jeweils 24 Klone isoliert und der Titer in Endpunktverdünnung zellfreier Überstände auf humane Fibrosarkomzellen (HT1080) bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus der Titration aller 24 Einzelklone. Die Standardabweichung für **G+ neo** betrug 7, für **GR neo** 18, für **ΔAG neo** 8 und für **GRΔS neo** 0,9.

Aus Abbildung 57 geht deutlich hervor, daß die Deletion der *gag*-Sequenzen sowie die Einführung des Spleißakzeptoroligonukleotids den Vektortiter gegenüber dem **G+** Vektor nicht deutlich verschlechtert. Vielmehr erwies sich der Titer bei Deletion der *gag*-Sequenzen in diesem System sogar um den Faktor 3 höher, da ohne Spleiß vermutlich mehr vollständige genomische RNA synthetisiert wird. Der Titer des **ΔAG** Vektors erwies sich im Durchschnitt vierfach niedriger als der des **GR** Vektors, was sich durch die verringerte Synthese ungespleißter, genomischer RNA erklären ließe. Dies deutet darauf hin, daß man mehr Klone analysieren muß, um einen hochtitrigen **ΔAG** Produzentenklon zu finden. Angesichts der wesentlich höheren Effizienz des **ΔAG** Vektors dürfte dies aber kaum ins Gewicht fallen.

Signifikante Titerverluste resultierten jedoch aus der Deletion des retroviralen Spleißdonors im **GR** Vektor (**GRΔS neo**): So sank der Titer um mehr als eine Größenordnung.

2.4.7 Die GRS-vermittelte, erhöhte Genexpression beruht auf bevorzugtem, vermehrtem Spleißen

Abschließend wurde der Mechanismus der GRS vermittelten verbesserten Genexpression analysiert.

a) **Deletion des retroviralen Spleißdonors führt zu drastischer Verminderung der Genexpression**

Zuerst wurde die Bedeutung der Spleißstellen und Intronsequenzen für die Vektorexpression betrachtet. Zerstört man den retroviralen Spleißdonor und unterbindet dadurch das Spleißen im G+ Vektor, so verringert sich die GFP-Expression auf 45% (K562) bzw. 11% (CCRF-CEM) der ursprünglichen Höhe. Vergleicht man diesen Spleiß-defekten G+ Vektor mit dem GRS Vektor, so vermittelt letzterer eine siebenfach (K562) bzw. 31-fach (CCRF-CEM) erhöhte GFP-Expression. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der Entfernung der aufwendigen Sekundärstruktur im *Leader* mittels Spleißen für effiziente Translation und somit hohe Genexpression.

b) **Die Verwendung der Minimal-Spleiß-Konsensussequenzen erhöht die Genexpression**

Interessanterweise vermittelt das minimale Spleißakzeptoroligonukleotid des GRS Vektors eine doppelt so hohe Genexpression wie das größere *pol*-Fragment, aus dem die Sequenz entlehnt wurde (Abbildung 58). Um dies zu beweisen, wurde in den GR Vektor vor die cDNA das *pol*-Fragment inseriert, wodurch der GRP+ Vektor entstand. Die Expression des GRP+ Vektors war in allen analysierten Systemen (GFP-Fluoreszenz in K562 und CCRF-CEM Zellen, *lacZ/neo^R*-Expression in Mausfibroblasten, MDR1-vermittelte Colchicinresistenz in K562 Zellen) der des minimalistischeren GRS Vektors unterlegen, was ein verbessertes Spleißen und/oder exaktere Translation (s. aberrante Leserahmen in *pol*) der ungespleißten RNA vermuten läßt. Das Spleißakzeptoroligonukleotid verbesserte auch die Expression der G+ Vektoren, wahrscheinlich durch Erhöhen der Spleißeffizienz (Daten nicht gezeigt).

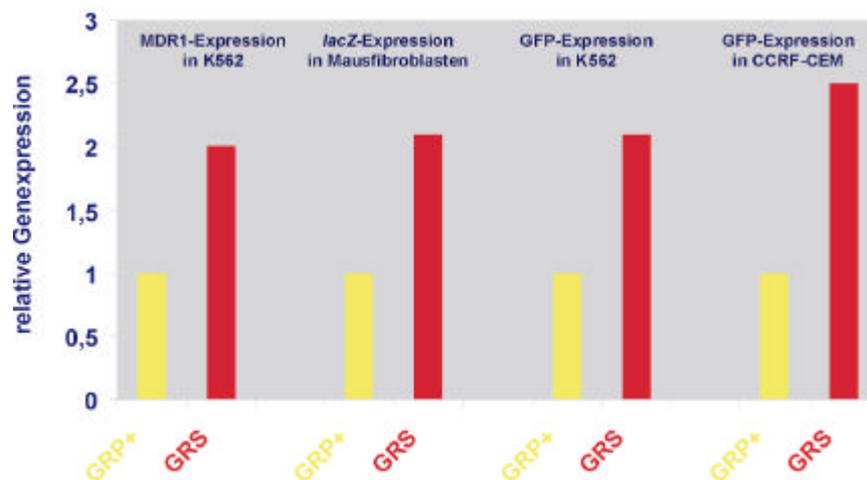


Abbildung 58: Das minimale Spleißakzeptoroligonukleotid des GRS Vektors vermittelt eine doppelt so hohe Genexpression wie das größere *pol*-Fragment, aus dem die Sequenz entlehnt wurde. Dargestellt ist ein Vergleich der relativen Genexpression des GRP+ und GRS Vektors in verschiedenen Systemen.

c) Der GRS Vektor vermittelt bevorzugtes, vermehrtes Spleißen

Das alternative Spleißen zwischen dem retroviralen Spleißdonor und dem Spleißakzeptor-oligonukleotid im GRS Vektor wurde mittels RT-PCR überprüft (Abbildung 59). RNA wurde von G+ m und GRS m transduzierten, mit 20 ng/ml Colchicin vorselektierten K562 Massenkulturen geerntet. Subgenomische und genomische Produkte der entsprechenden Größen wurden für beide Vektoren erhalten, wobei jeweils ein zusätzliches, bisher nicht beschriebenes Spleißprodukt auftrat.

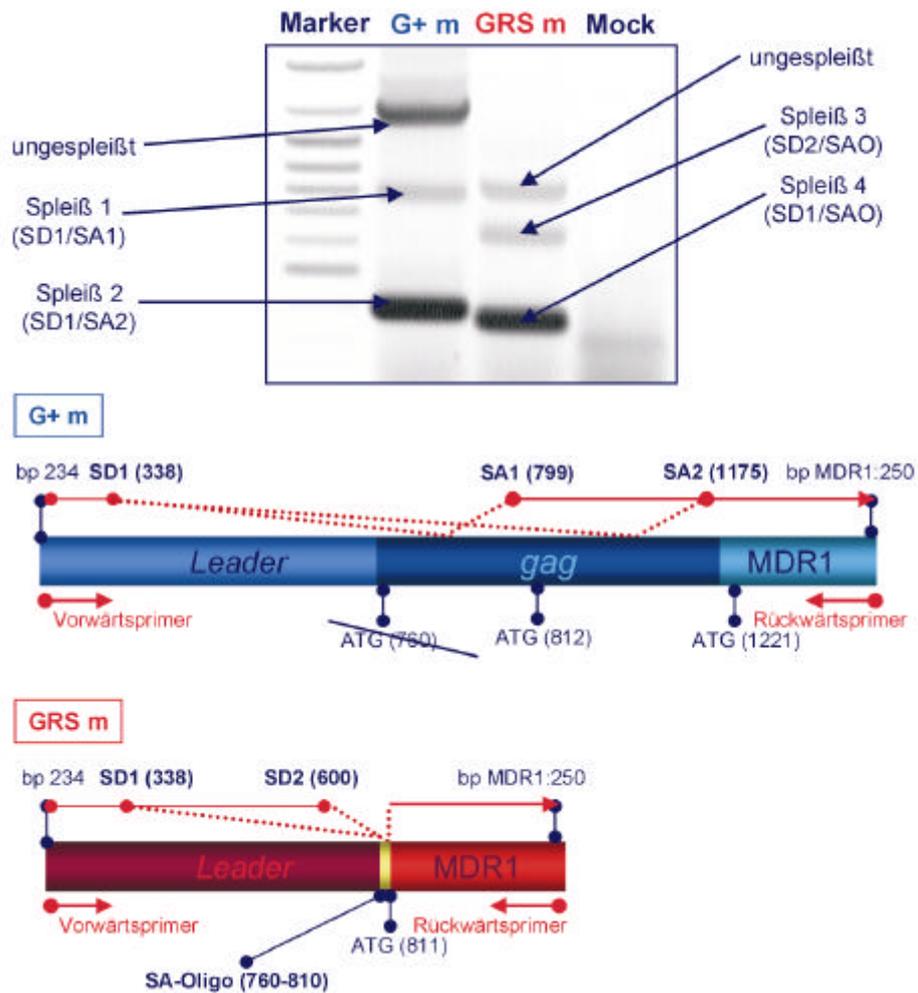


Abbildung 59: Der GRS Vektor vermittelt bevorzugtes, vermehrtes Spleißen Dargestellt ist die RT-PCR mit RNA, isoliert aus G+ m bzw. GRS m transduzierten und mit 20 ng/ml Colchicin vorselektierten K562 Massenkulturen (nicht alle in G+ m vorkommenden Startkodons sind eingezeichnet). Die Identitätsprüfung der Banden erfolgte wie in Abbildung 33 beschrieben. (Markerbanden : 1500/1200/1000/900/800/700/600/500)

Wie aus Abbildung 59 hervorgeht, überwiegt sowohl bei **G+ m** als auch bei **GRS m** das kleinste Spleißprodukt. Anteilsmäßig wird jedoch beim **G+** Vektor mehr vollständige, genomische RNA synthetisiert als beim **GRS** Vektor. Das zusätzliche Spleißprodukt bei **G+ m** (Spleiß 2) scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da es im Northern-Blot nicht nachzuweisen war (nicht gezeigt). Es entsteht durch alternatives Spleißen des retroviralen Spleißdonors (5'-**CCGGGAG|GTAAGC**-3') mit einem kryptischen Akzeptor innerhalb der *gag*-Sequenzen (5'-**GACCTTAG|ATCACTGG**-3'), wobei die Sequenzierung des Spleißproduktes 5' der Spleißakzeptorstelle ein G anstelle des in der Datenbank hinterlegten A aufwies (5'-**CCGGGAG|GTCACTGG**-3'). Wenige Basenpaare entfernt folgt ein offener Leserahmen, der für ein kleines Peptid kodiert. Es stellt sich die Frage, ob dieses bisher nicht publizierte, da nur schwierig nachzuweisende Spleißereignis im Wildtyp-Retrovirus vorkommt, der darauffolgende Leserahmen benutzt wird und das daraus resultierende Peptid eine physiologische Funktion wahrnimmt. Beim **GRS** Vektor wird nur sehr wenig vollständige, genomische RNA synthetisiert, die sogar mittels Northern-Blot nicht zu detektieren war (nicht gezeigt). Das gleiche gilt für das zusätzliche Spleißprodukt (Spleiß 3), das durch die Wechselwirkung eines weiteren Spleißdonors mit dem Spleißakzeptoroligonukleotid zustande kommt.

2.4.8 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine neue Generation retroviraler Vektoren vorgestellt, die weder virale kodierende Sequenzen noch überflüssige ATG-Startkodons für die Translationsinitiation enthält. Drei wichtige Gründe sprechen für die hier vorgestellten *Leader*-Modifikationen im **GRS** Vektor im Vergleich zu den konventionellen Vektoren mit zusätzlichen *gag*-Sequenzen (**G+** Vektor bzw. LX-Äquivalent), mit *gag*- und *pol*-Sequenzen (**G+P+** Vektor bzw. MFG-Äquivalent) oder nur *pol*-Sequenzen (**GRP+** bzw. Äquivalent zu 1998 von Kim *et al.* beschriebenen MFG-Varianten):

- 1) Die hier vorgestellten **GR**, **GRS** und **ΔAG** Vektoren sind die ersten retroviralen Vektoren, bei denen die Möglichkeit der Expression aberranter Proteine oder Peptide, die toxisch oder immunogen sein könnten, eliminiert wurde. Sechs in den restlichen *gag*-Sequenzen befindliche ATG-Startkodons wurden durch Ersetzen der *gag*-Sequenzen mit dem Transgen eliminiert (**GR** Vektor). Das indirekte Einführen von drei weiteren ATG-Startkodons wurde durch Verwenden des Spleißakzeptoroligonukleotids im Vergleich zur *pol*-Sequenz vermieden (**GRS** Vektor). Die Mutagenese des letzten ATG 5' vom Transgen im *Leader* verbesserte nicht nur die Sicherheit, sondern erhöhte auch leicht die Transgenexpression. Anzumerken wäre, daß neben AUG auch noch GUG, UUG, CUG, ACG, AUA, AUC und AUU (jeweils mit extrem geringer Wahrscheinlichkeit) als Startkodons in Frage kommen, demzufolge die Expression weiterer Leserahmen nicht 100%ig ausgeschlossen werden kann (Peabody 1989).
- 2) Die Deletion der *gag*-Sequenzen und das Verwenden des minimalen Spleißakzeptoroligonukleotids im Vergleich zum *pol*-Fragment reduziert die Möglichkeit der Rekombination mit natürlich vorkommenden endogenen Retroviren, die ein hohes Ausmaß an Sequenzkonservierung im *pol*-Bereich aufweisen. Die Homologie zwischen dem Spleißakzeptoroligonukleotid und dem MoMLV-*pol*-Gen beschränkt sich auf lediglich 26 Basenpaare, wobei in zukünftigen Vektorgenerationen auch nicht-virale Spleißakzeptorsequenzen vorstellbar wären.

3) **GRS** Vektoren vermittelten die höchste Genexpression unabhängig von der verwendeten cDNA (MDR1, *lacZ/neo^R*, GFP) und unabhängig vom analysierten Zellhintergrund (Mausfibroblasten, humane myeloide und lymphoide Zellen). Die Ergebnisse für **G+**, **G+P+**, **GR** und **GRP+** Vektoren waren je nach verwendeter cDNA unterschiedlich. Die post-transkriptionell bedingte, erhöhte Genexpression ist dann besonders wichtig, wenn die LTR-gesteuerte Transkription limitierend wirkt, wie es in primitiven hämatopoetischen Zellen oder bei Koexpressionsvektoren der Fall ist. Beim Transfer von Genen wie MDR1, die Zytostatikaresistenz für *in vivo* Selektion primitiver hämatopoetischer Zellen vermitteln, wird eine optimierte Vektorexpression nicht nur die Polyklonalität der geschützten Zellen erhöhen, da mehr Zellen die Selektion überleben, sondern auch die Anhäufung subletaler Schäden in den überlebenden Zellen vermindern und somit ihr proliferatives und Differenzierungspotential verbessern. Verbesserte Vektorexpression wird auch die Sicherheit und Effizienz anderer Gentherapie-strategien positiv beeinflussen. Hier wäre z. B. der Transfer von Suizidgenen für die Negativselektion transduzierter Zellen (Bonini *et al.* 1997) zu erwähnen

Außerdem wurde durch die in diesem Kapitel dargestellten Versuche gezeigt, daß eine Deletion der *gag*-Sequenzen den Vektortiter nicht nachteilig beeinflusst. Signifikante Titerverluste resultierten jedoch aus der Deletion des retroviralen Spleißdonors im **GR** Vektor. Diese Daten stehen im Einklang mit von Kim *et al.* 1998 publizierten Ergebnissen und widersprechen auch nicht den ursprünglich von Bender *et al.* 1987 publizierten. In deren Studie wurde ein **G+ neo** verwandter Vektor (bezeichnet als N2, bestehend aus MoMLV-LTR, MoMSV-*Leader* und *gag*-Sequenzen) mit einem **GRΔS neo** verwandten Vektor (bezeichnet als LNL2, bestehend aus MoMLV-LTR, MoMSV-*Leader* und deletiertem retroviralem Spleißdonor, ohne *gag*-Sequenzen) verglichen und festgestellt, daß der N2 Vektor einen höheren Titer besaß als der LNL2 Vektor. Dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Interpretation von Bender *et al.*, daß die im N2 Vektor im Vergleich zum LNL2 Vektor vorhandenen *gag*-Sequenzen für die Titerunterschiede verantwortlich seien, läßt sich jedoch anhand der hier erhobenen Daten nicht bestätigen: Deletiert man nämlich lediglich die *gag*-Sequenzen, nicht jedoch den retroviralen Spleißdonor (wie im **GR** Vektor verwirklicht), so wird der Titer nicht beeinträchtigt, liegt sogar im vorliegenden System leicht höher. Die Ursache des Titerverlustes ist eher in der Deletion des retroviralen Spleißdonors zu sehen. Dieser Befund ist ebenso neu wie unerwartet. Eine mögliche Erklärung wäre eine RNA-Kernexportfunktion des retroviralen Spleißdonors, der in seiner ungespleißten Form als zytoplasmatisches Transportelement (CTE) fungieren könnte (vgl. 1.3.5.3).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eines der in den beiden vorherigen Kapiteln (2.2; 2.3) aufgezeigten Probleme bei Koexpressionsvektoren (insbesondere MDR1-Koexpressionsvektoren), nämlich eine im Vergleich zum monocistronischen Vektor verminderte Genexpression, überwunden wurde: Über die Verwendung der optimierten Kombination aus SFFVp-LTR und MESV-*Leader* hinaus kann durch Verwendung der GRS-Architektur die Expression um fast eine Größenordnung gesteigert werden, wobei der Virustiter kaum sinkt. Das zweite Problem, die Erhöhung des genotypischen Indexes retroviraler MDR1-Vektoren, ist Thema des nächsten Kapitels (2.5).

2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes, der Expression und Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

2.5.1 Fragestellung

In den Kapiteln 2.2 und 2.3 wurden zwei Probleme bei MDR1-Koexpressionsvektoren deutlich: Eine im Vergleich zum monocistronischen Vektor erniedrigte Genexpression und der erniedrigte genotypische Index der MDR1-cDNA, der bei Vorselektion auf das andere Gen (s. 2.2) bzw. Zweifarbenanalyse ohne vorherige Selektion (s. 2.3) zu erkennen ist. Nachdem im vorangegangenen Kapitel ein Lösungsansatz für das erste Problem aufgezeigt wurde, ist die Erhöhung des genotypischen Indexes der MDR1-cDNA ohne Genexpressionsverlust Gegenstand dieses Kapitels.

In der Literatur wurde bereits die Lage eines kryptischen Spleißdonors und -akzeptors innerhalb der MDR1-cDNA beschrieben (Sorrentino *et al.* 1995; Abbildung 60). Jedoch wurde bisher noch nicht aufgezeigt, wie sich die Mutation dieser Spleißsignale auf die qualitative Genexpression (s. 1.4.5.2) auswirkt; ebenso existieren noch keine Daten darüber, ob die Mutation dieser beiden beschriebenen Spleißsignale für einen hohen genotypischen Index (s. 1.4.5.2) ausreichend ist, zumal in der vorliegenden Arbeit bereits ein weiterer kryptischer MDR1-Spleißakzeptor (s. 2.2.6) entdeckt wurde.



Abbildung 60: Lage kryptischer Spleißsignale innerhalb der MDR1-cDNA
(SD: Spleißdonor; SA: Spleißakzeptor)

Die Auswirkung der konservativen Mutation der von Sorrentino *et al.* 1995 beschriebenen kryptischen Spleißsignale auf den genotypischen Index und die qualitative Genexpression ist Gegenstand dieses Kapitels.

2.5.2 Konstruktion retroviraler MDR1-Vektoren mit Mutation kryptischer MDR1-Spleißsignale

Um die Auswirkung der funktionellen Deletion der Spleißstellen durch konservative ortsspezifische Mutagenese auf den genotypischen Index zu analysieren, wurden bicistronische G⁺ Vektoren kloniert, die die jeweilige MDR1-cDNA-Mutante über den SFFVp-Spleißakzeptor mit *neo^R* koexprimieren (Abbildung 61; s. 4.1.6). Über Selektion mit G418 kann man die transduzierten Zellen selektieren und anschließend im bereits beschriebenen Rhodamin-123-Efflux-Versuch den Anteil der Zellen mit intakter MDR1-cDNA bestimmen. Dies liefert in erster Näherung Rückschluß auf den genotypischen Index. Der genotypische Index an sich ließe sich nur aufwendig durch Sequenzierung vieler unselektierter Einzelklone bestimmen. Deshalb wurde hier der Anteil der Zellen, die im hochsensitiven Rhodamin-123-Efflux-Versuch MDR-positiv sind, als Maß für den Anteil der transduzierten Zellen, die eine intakte MDR1-Transkriptionseinheit besitzen, verwendet.

Spleißvorgänge zwischen dem retroviralen Spleißdonor und der MDR1-cDNA können mit diesem Versuch jedoch nicht nachgewiesen werden, da durch einen derartigen Spleißvorgang das Verpackungssignal entfernt wird und die entstehenden RNAs demzufolge nicht mehr verpackt werden. Eine

Koexpression über den SFFVp-Spleißakzeptor wurde bewußt gewählt, um mit diesem möglicherweise wechselwirkende kryptische Spleißdonoren innerhalb der MDR1-cDNA nachzuweisen.

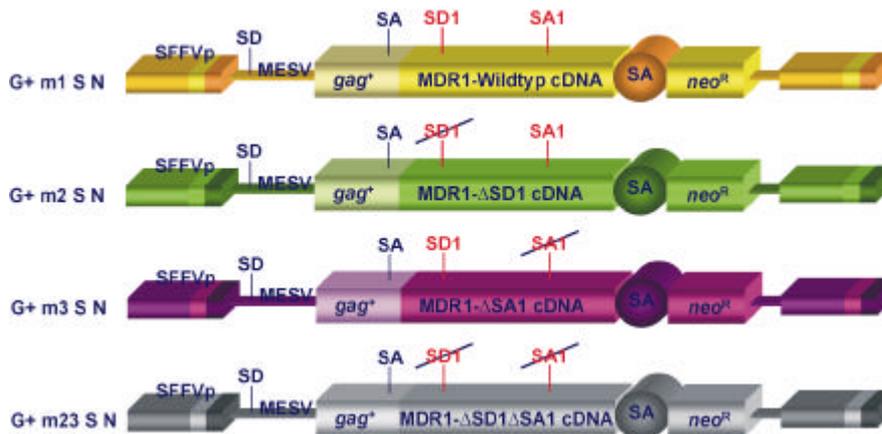


Abbildung 61: MDR1-*neo^R*-Koexpressionsvektoren mit Deletion kryptischer MDR1-Spleißsignale (s. 4.1.6)

Ferner wurde auch der Einfluß der *Leader*-Modifikationen im GRS Vektor im Vergleich zum G+ Vektor auf den genotypischen Index näher analysiert. Zu diesem Zweck wurden bicistronische GRS und G+ Vektoren konstruiert, die die MDR1-Wildtyp-cDNA über die IRES des Poliovirus mit *neo^R* koexprimieren (Abbildung 62; s. 4.1.6).

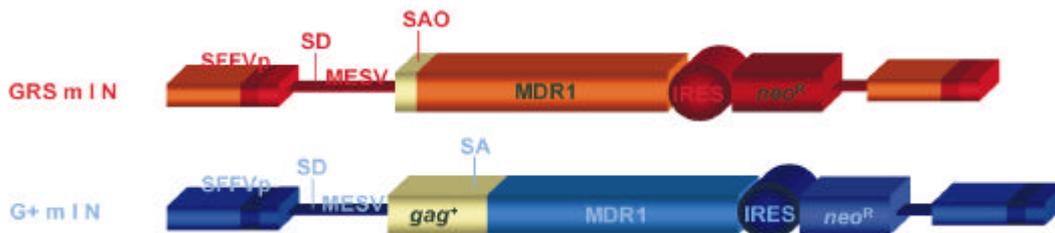


Abbildung 62: GRS und G+ Vektoren, die die MDR1-Wildtyp-cDNA über die Polio-IRES mit *neo^R* koexprimieren
SD retroviraler Spleißdonor
SAO Spleißakzeptoroligonukleotid
SA Spleißakzeptor

Neben der Auswirkung der Mutationen auf den genotypischen Index wurde auch der Einfluß der Mutationen auf die qualitative Genexpression untersucht. Hierzu wurden monocistronische MDR1-Vektoren mit den jeweiligen Mutationen sowohl im G+ als auch im GRS Kontext analysiert (Abbildung 63; s. 4.1.6).

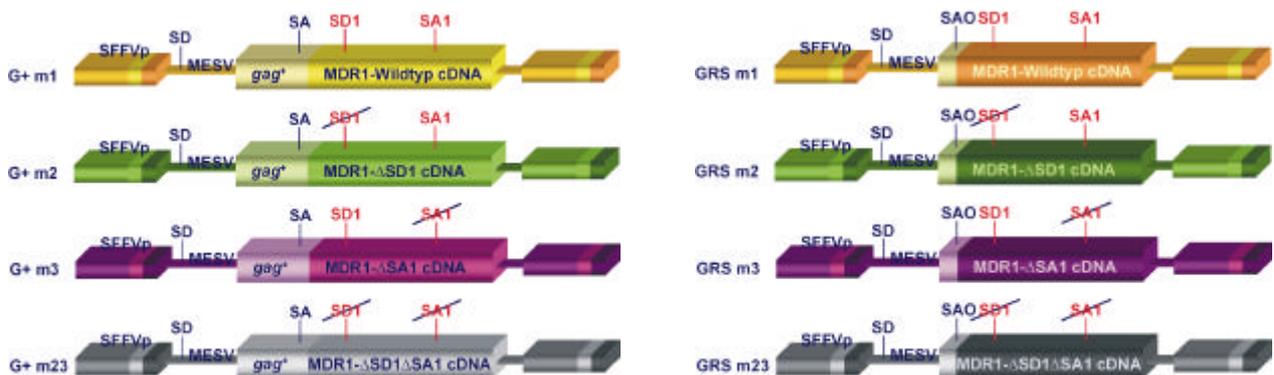


Abbildung 63: monocistronische MDR1-Vektoren mit Deletion kryptischer Spleißsignale im G+ und GRS-Kontext (s. 4.1.6)

2.5.3 Mutation der kryptischen Spleißsignale erhöht den genotypischen Index bei Verwendung von GP+envAm12 als Verpackungszelllinie

Um die Auswirkung der Deletion der kryptischen Spleißsignale auf den genotypischen Index zu analysieren, wurden GP+envAm12-abgeleitete Verpackungszellen mit den Vektoren **G+ m1SN**, **G+ m2SN**, **G+ m3SN** und **G+ m23SN** transfiziert und K562 Zellen transduziert. Durch Inkubation mit G418 (1mg/ml) wurden die erfolgreich infizierten Zellen selektiert. Rearrangements innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit werden durch die G418-Selektion nicht beeinflusst. Um den Anteil MDR-positiver Zellen in den vorselektierten Massenkulturen zu bestimmen, wurden die Zellen durchflußzytometrisch im Rhodamin-123-Efflux-Versuch und über Färbung mit dem PE-konjugierten monoklonalen Anti-MDR1-Antikörper UIC2 analysiert (Abbildung 64), wobei der Efflux-Versuch sowohl sensitiver als auch ein funktioneller MDR1-Nachweis ist (der Rhodamin-123-Farbstoff muß aktiv aus den Zellen ausgeschleust werden). Die UIC2-Antikörperfärbung weist lediglich ein Epitop auf der Oberfläche nach (Deletionen, die das entsprechende Epitop nicht betreffen, können mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden).

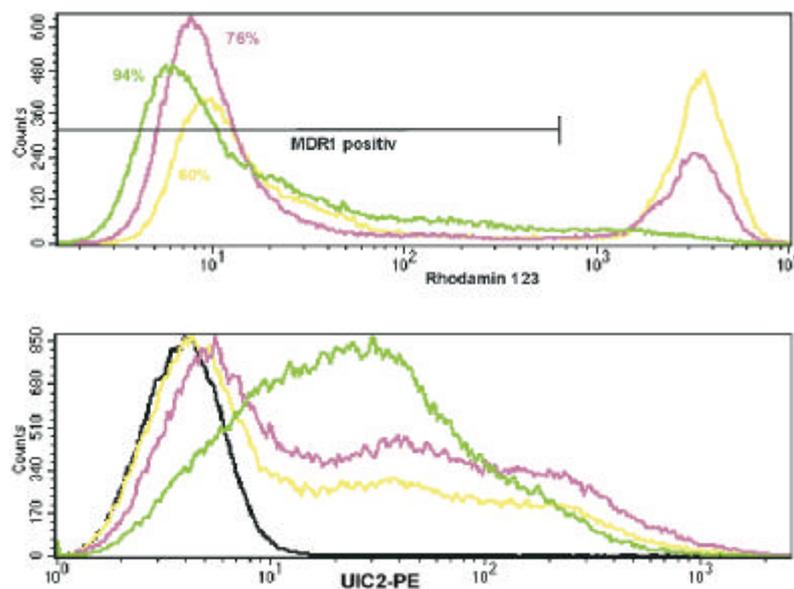


Abbildung 64: Mutation der kryptischen Spleißsignale erhöht den genotypischen Index.

Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse über GP+envAm12 **G+ m1SN**, **G+ m2SN** und **G+ m3SN** transduzierter und G418 vorselektierter K562 Massenkulturen.

oben : Rhodamin-123-Efflux-Versuch

unten : Analyse mit dem monoklonalen PE-konjugierten Anti-Pgp-Antikörper UIC2 (schwarz : untransduzierte K562 Zellen)

Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (Beide Versuche wurde insgesamt zweimal durchgeführt und ergaben Abweichungen von weniger als 5%).

Wie aus Abbildung 64 hervorgeht, weisen im Efflux-Versuch - wie bereits gezeigt (vgl. 2.2.5) - nur ca. 60% der mit der Wildtyp MDR1-cDNA (**m1**) transduzierten Zellen den MDR-Phänotyp auf; demnach haben wahrscheinlich ca. 60% der Zellen eine korrekte Provirusintegration, woraus in erster Näherung ein genotypischer Index von ca. 0,6 resultiert.

Mutiert man den Spleißdonor (**m2**), zeigen ca. 94% der Zellen funktionelles MDR1 (genotypischer Index von 0,94). Dies entspricht dem Optimum, das man mit retroviralen Vektoren erreichen kann, da die in 2.2.6 beschriebenen Rekombinationsereignisse immer noch stattfinden können. Diese dürften also insgesamt eine Frequenz von ca. 6% pro Replikationsrunde besitzen. Interessanterweise läßt die

UIC2-Antikörperfärbung jedoch auf eine verringerte qualitative MDR1-Genexpression schließen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß zwar einerseits bei Beseitigung des Spleißdonors in den Verpackungszellen kein anderer Donor innerhalb der MDR1-cDNA mit potentiellen Spleißakzeptoren wechselwirkt, wodurch die MDR1-Transkriptionseinheit intakt transduziert werden kann; andererseits jedoch können Spleißereignisse zwischen dem retroviralen Spleißdonor und den kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren, die zu keiner Veränderung des genotypischen Indexes führen, da durch dieses Spleißereignis das Verpackungssignal entfernt wird, die MDR1-Genexpression qualitativ verringern. Auf die Genexpression an sich wird später (2.5.6) genauer eingegangen.

Wird der Spleißakzeptor (m3) mutiert, so erhöht sich der genotypische Index auf 0,76. Dies beruht zum einen auf der Anwesenheit eines weiteren, in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Spleißakzeptors innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit, der mit dem kryptischen MDR1-Spleißdonor wechselwirkt (2.2.6); zum anderen wurde der in der Literatur beschriebene Spleißakzeptor nur partiell zerstört. Um letzteres zu beweisen, wurde genomische DNA aus G+ m1SN und G+ m3SN transduzierten und G418 vorselektierten K562 Zellen isoliert und mittels PCR analysiert (Abbildung 65), da sich Spleißereignisse 3' vom Verpackungssignal und 5' vom Polypurintrakt innerhalb der Verpackungszelle in den Zielzellen auf DNA-Ebene manifestieren.

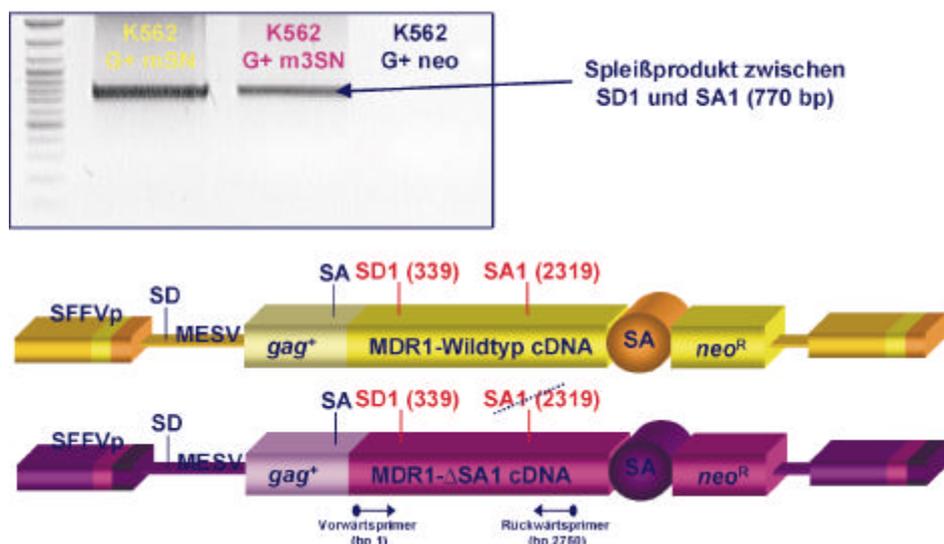


Abbildung 65: Die konservative Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors führt nicht zum vollständigen Unterdrücken des Spleißens. Dargestellt ist eine PCR aus genomischer DNA G+ m1SN bzw. G+ m3SN transduzierter und G418 vorselektierter K562 Zellen. Das vollständige genomische Produkt (2750 bp) ist nicht mitabgebildet. (Markerbanden: 2000/1500/1200/1031/900/800/700/600/500(fett)/400/300/200/100)

Wie aus Abbildung 65 hervorgeht, tritt das kryptische Spleißen innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit sowohl bei Verwendung der Wildtyp-cDNA als auch bei Verwendung der Spleißakzeptor-Mutante auf, wobei eine exakte Quantifizierung der Spleißhäufigkeit über diese PCR nicht möglich ist. Die Sequenzierung der obigen Bande (durchgeführt wie in Abbildung 33 beschrieben) untermauert die Beobachtungen: So lautete die Wildtypsequenz CAG GGT, die konservativ zu CAA GGT mutiert wurde. Die Sequenzierung ergab als Übergang GACCAG|GT (beim Wildtyp: GACCAG|GGT), was auf die Benutzung von CAA GGT als Spleißakzeptor rückschließen läßt.

Die durchflußzytometrisch erhobenen Daten ließen sich durch Ausklonierung der Massenkulturen in Colchicin-haltigem, semisolidem Medium bestätigen (Abbildung 66):



Abbildung 66: Mutation der kryptischen Spleißsignale erhöht den genotypischen Index. Dargestellt ist der Anteil der Kolonien, die bei 10 ng/ml Colchicin klonieren, bezogen auf die Anzahl der Kolonien, die bei 1 mg/ml G418 klonieren.

Nur die Hälfte der Zellen mit der Wildtyp-MDR1-cDNA zeigt Colchicinresistenz. Dagegen weisen 70% der Zellen mit Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors und über 90% der Zellen mit Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors einen MDR-Phänotyp auf. Die Werte sind etwas niedriger als bei der durchflußzytometrischen Analyse. Dies läßt sich jedoch mit der erhöhten Sensitivität letzterer Methode erklären: Bei Colchicin-Selektion sterben schwach exprimierende Zellen, die durchflußzytometrisch noch detektierbar sind.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß sich bei Verwendung der amphotropen Verpackungszelllinie GP+envAm12 der genotypische Index retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors auf nahezu 1,0, durch Mutation des Spleißakzeptors entgegen den Erwartungen jedoch nur auf ca. 0,8 erhöhen läßt.

2.5.4 Der genotypische Index wird von der verwendeten Verpackungszelllinie bestimmt

Wie in der Einleitung erwähnt, bestimmen Spleißereignisse in der Verpackungszelllinie das Ausmaß des genotypischen Indexes (s 1.4.5.2). Ob die mit der amphotropen Verpackungszelllinie GP+envAm12 erhobenen Daten auch auf andere Verpackungszelllinien übertragbar sind, ist Gegenstand dieses Abschnittes. Zu diesem Zweck wurden PG13-abgeleitete Verpackungszellen mit den Vektoren G+ m1SN, G+ m2SN, G+ m3SN und G+ m23SN angelegt und K562 Zellen transduziert. Die anschließende Selektion mit G418 (1mg/ml) überlebten nur erfolgreich infizierte K562 Zellen. Um den Anteil MDR-positiver Zellen in den vorselektierten Massenkulturen zu bestimmen, wurden die Zellen durchflußzytometrisch im Rhodamin-123-Efflux-Versuch analysiert (Abbildung 67).

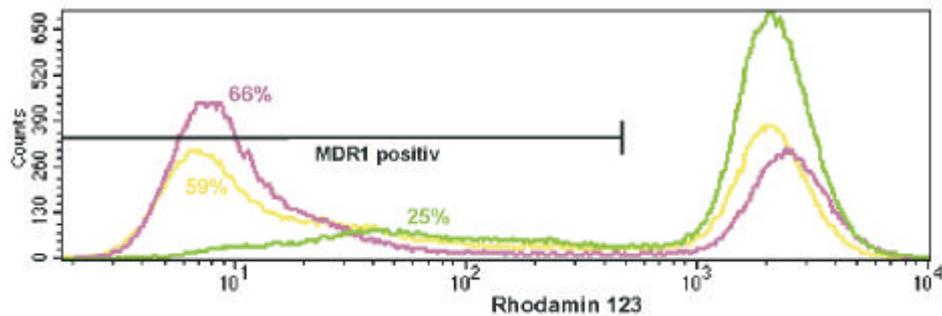


Abbildung 67: Die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors verringert den genotypischen Index bei Verwendung von PG13 als Verpackungszelllinie. Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse über PG13 G+ m1SN, G+ m2SN und G+ m3SN transduzierter und G418 vorselektierter K562 Massenkulturen im Rhodamin-123-Efflux-Versuch. Hierbei handelt es sich um ein repräsentatives Experiment (Der Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt und ergab Abweichungen von weniger als 5%).

Es fällt auf, daß sich bei Verwendung von PG13 als Verpackungszelllinie im Vergleich zu GP+envAm12 ein anderes Bild der Spleißmutanten ergibt (Abbildung 68):

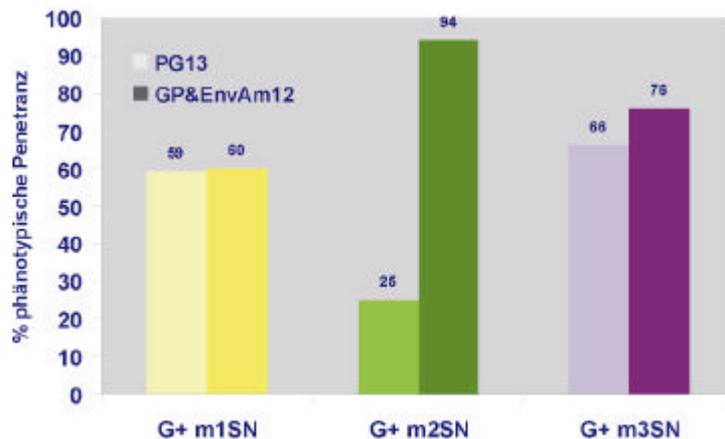


Abbildung 68: Der genotypische Index ist abhängig von der verwendeten Verpackungszelllinie. Dargestellt ist ein Vergleich des Anteils MDR-positiver Zellen (% phänotypische Penetranz) bei Verwendung von PG13 bzw. GP+envAm12 als Verpackungszelllinie, gemessen im Rhodamin-123-Efflux-Versuch. Es handelt sich jeweils um ein repräsentatives Experiment (Abweichungen < 5%).

Während bei Verwendung von PG13 und GP+envAm12 als Verpackungszelllinien der Vektor mit der Wildtyp-MDR1-cDNA den gleichen genotypischen Index im Rhodamin-123-Efflux-Versuch vermittelt, lassen die Zellen, die mit G+ m3SN (MDR1-Spleißakzeptormutante) transduziert wurden, bei Verwendung von PG13 auf einen niedrigeren genotypischen Index zurückschließen. Am deutlichsten ist jedoch der Unterschied bei G+ m2SN (MDR1-Spleißdonormutante): Hier sind bei Verwendung von PG13 als Verpackungszelllinie nur 25% intakte MDR1-Transkriptionseinheiten in den K562 Zellen nachweisbar im Vergleich zu nahezu 100% bei GP+envAm12.

Erklären lassen sich diese Unterschiede mit der Zelltypabhängigkeit des Spleißens: So müssen in PG13 Zellen weitere Spleißdonoren und/ oder -akzeptoren innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit aktiv sein, die in GP+envAm12 Zellen nicht rekrutiert werden. Tatsächlich konnte über RT-PCR nachgewiesen werden, daß bei Deletion des bereits publizierten Spleißdonors in PG13 Zellen ein anderer, weiter 5' gelegener Spleißdonor in Funktion tritt, der mit dem kryptischen MDR1-Spleißakzeptor interagiert (Abbildung 69).

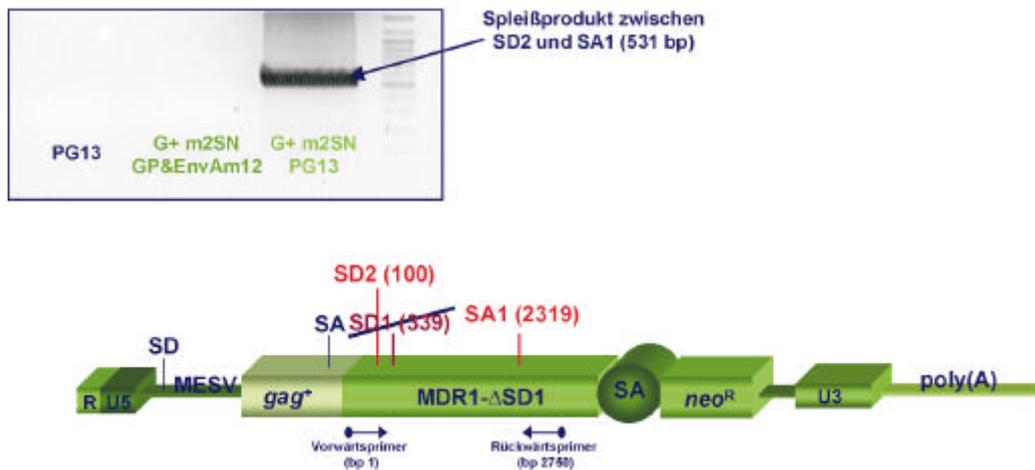


Abbildung 69: In PG13 Zellen ist ein bisher nicht beschriebener, weiterer kryptischer Spleißdonor aktiv, der in GP+envAm12 Zellen nicht in Funktion tritt. Dargestellt ist eine RT-PCR mit RNA, isoliert aus G+ m2SN transfizierten GP+envAm12 bzw. PG13. Das Virus ist in seiner genomischen RNA-Form abgebildet. Die Identifizierung der Bande erfolgte wie in Abbildung 33 beschrieben. (Markerbanden: 1500/1200/1031/900/800/700/600/500(fett)/400/300/200/100)

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß aufgrund der Zelltypabhängigkeit und Dynamik des Spleißens Daten, erhoben unter Verwendung einer Verpackungszelllinie, nicht generell auf andere Verpackungszelllinien übertragbar sind. Ferner könnten sich mit zunehmender Passagenanzahl auch innerhalb einer Verpackungszelllinie Subpopulationen mit unterschiedlichen Spleißmustern durchsetzen, was eine allgemeine Reproduzierbarkeit und Aussage erschwert.

Dennoch führte die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors unter Verwendung beider Verpackungszelllinien zu einem erhöhten genotypischen Index, während dies im Falle der Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors nur auf GP+envAm12 zutrifft.

2.5.5 Die Leader-Architektur beeinflusst den genotypischen Index

Nachdem gezeigt wurde, daß Spleißereignisse in der Verpackungszelllinie die Höhe des genotypischen Indexes in den Zielzellen bestimmen, soll nun in diesem Abschnitt der Einfluß des *Leaders*, G+ *Leader* gegen GRS *Leader*, auf den genotypischen Index analysiert werden. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, besitzt der GRS *Leader* ein Spleißakzeptoroligonukleotid direkt vor der Transgen-cDNA, das mit dem retroviralen Spleißdonor in Wechselwirkung tritt und zu gesteigerter Genexpression über vermehrtes Spleißen führt. Um zu überprüfen, ob die Einführung dieses Spleißakzeptors vor die MDR1-cDNA sich auf den genotypischen Index auswirkt, wurden PG13-abgeleitete Verpackungszelllinien mit den Vektorkonstrukten G+ m1IN und GRS m1IN angelegt und K562 Zellen transduziert. Über Selektion mit G418 (1mg/ml) wurden die erfolgreich infizierten Zellen selektiert. Um den Anteil MDR-positiver Zellen in den vorselektierten Massenkulturen zu bestimmen, wurden die Zellen durchflußzytometrisch im Rhodamin-123-Efflux-Versuch analysiert (Abbildung 70).

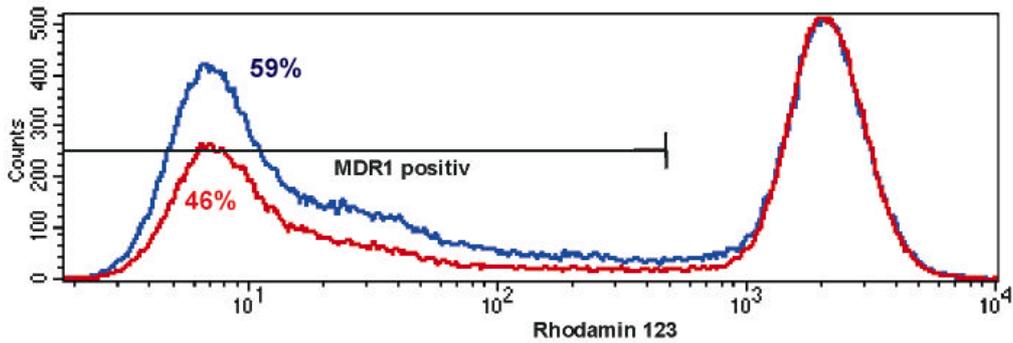
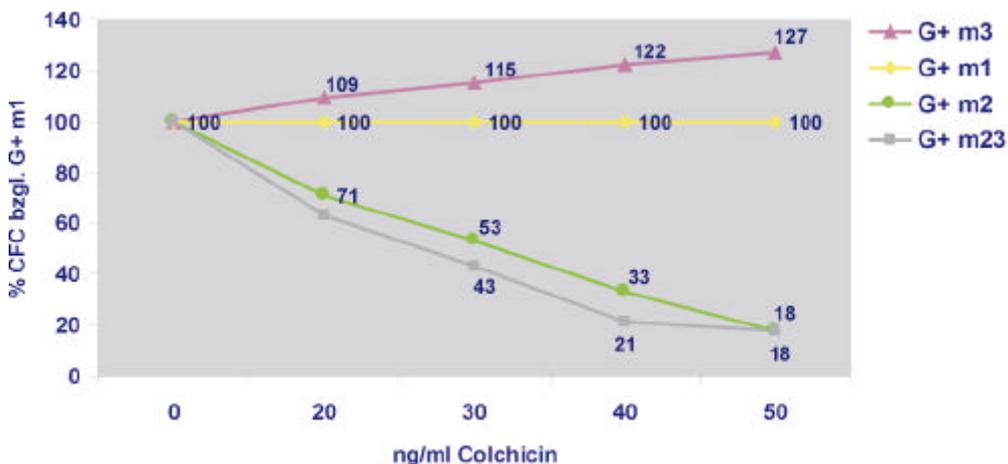


Abbildung 70: Die *Leader*-Architektur beeinflusst den genotypischen Index
 Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse über PG13 G+ m1IN und GRS m1IN transduzierter und G418 vorselektierter K562 Massenkulturen im Rhodamin-123-Efflux-Versuch. Es handelt sich hierbei um ein repräsentatives Experiment (Der Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt und ergab Abweichungen von weniger als 5%).

Wie aus Abbildung 70 hervorgeht, ist der genotypische Index bei Verwendung der GRS Architektur um ca. 25% niedriger als bei Verwendung der G+ Architektur. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, daß das Spleißakzeptoroligonukleotid durch seine Wechselwirkung mit dem retroviralen Spleißdonor die MDR1-cDNA vor Spleißereignissen zwischen dem retroviralen Spleißdonor und kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren schützt, was zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen erhöhten Genexpression beitragen könnte. Wenn jedoch der retrovirale Spleißdonor nicht mehr mit kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren wechselwirkt, könnten nun vermehrt kryptische MDR1-Spleißdonoren mit den vorher andersweitig rekrutierten MDR1-Spleißakzeptoren in Wechselwirkung treten und somit zu vermehrtem Spleißen innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit führen, was in einem verringerten genotypischen Index zum Ausdruck käme.

2.5.6 Die Mutation des kryptischen Spleißdonors führt zu verringerter Genexpression in monocistronischer MDR1-Vektoren

Während in den vorherigen Abschnitten die Analyse des genotypischen Indexes im Mittelpunkt stand, soll in diesem Abschnitt geklärt werden, inwiefern sich die Mutation der kryptischen Spleißsignale auf die Expression monocistronischer MDR1-Vektoren auswirkt. Hierzu wurden die entsprechenden MDR1-cDNAs in den G+ bzw. GRS Basisvektor inseriert, PG13-Verpackungszellen angelegt und K562 Zellen transduziert. Nach Selektion mit 20 ng/ml Colchicin wurden die Massenkulturen in steigende Konzentrationen Colchicin in semisolidem Medium auskloniert (Abbildung 71).



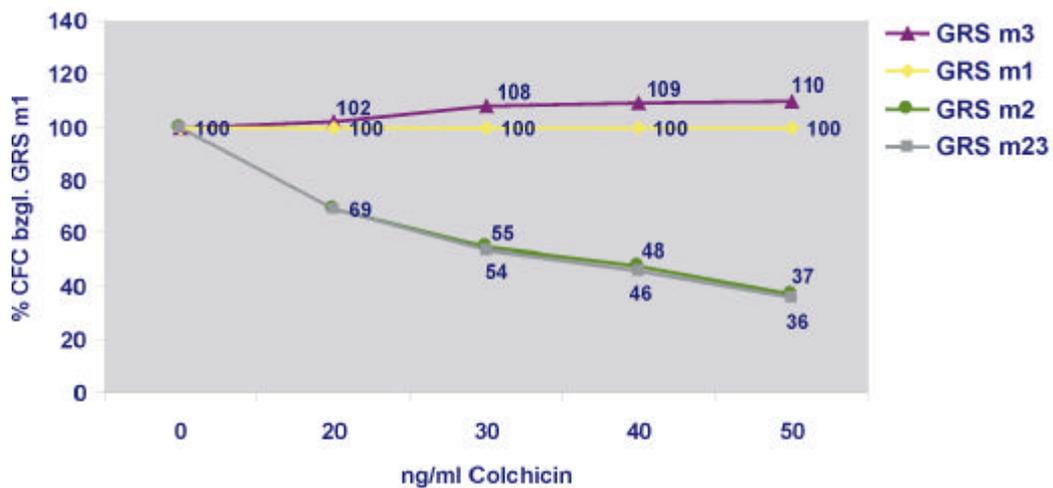


Abbildung 71: Die Mutation des kryptischen Spleißdonors führt zu verringerter Genexpression. Dargestellt sind die Klonierungsdaten mit den monocistronischen MDR1-Vektoren transduzierter K562 Zellen in steigenden Konzentrationen Colchicin. Die Daten sind als % der Expression bezüglich der mit der Wildtyp-MDR1-cDNA transduzierten Zellen wiedergegeben (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten).

Wie aus Abbildung 71 hervorgeht, sind die grundlegenden Tendenzen unabhängig vom verwendeten Vektorrückgrat: Zerstörung des Spleißdonors (in G+ m2 und G+ m23 bzw. GRS m2 und GRS m23) führte zu einer drastischen Verringerung der Colchicinresistenz im Vergleich zum Wildtyp (G+ m1 bzw. GRS m1) (Reduktion der IC_{50} um 1/3), was sich bereits bei der Analyse der bicistronischen Vektoren abzeichnete. Die Mutation des Spleißakzeptors (in G+ m3 bzw. GRS m3) hingegen bewirkte eine mäßige Steigerung der MDR1-Expression (Erhöhung der IC_{50} um ca. 10%).

Folgende Erklärung bietet sich an: Der genotypische Index wird durch zelltypspezifische Spleißereignisse innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit bestimmt, die in der Verpackungszelle stattfinden (s. 1.4.5.2; 2.5.4; ohne Berücksichtigung von Rekombinationsereignissen). Demgegenüber wird die qualitative Genexpression in den Zielzellen zusätzlich durch zelltypspezifische Spleißereignisse zwischen dem retroviralen Spleißdonor und kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren gesteuert. Diese beeinflussen nicht den genotypischen Index, da durch derartige Spleißereignisse das Verpackungssignal entfernt wird (vgl. 1.4.5.2). Sie können jedoch in den Zielzellen die Menge an intakt transkribierten RNAs und somit die Genexpression verringern. Demzufolge lassen sich die beobachteten Expressionsunterschiede folgendermaßen erklären:

- Die Spleißdonor-Mutation führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer deutlichen Verringerung der qualitativen MDR1-Genexpression, da durch Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors nun vermehrt der retrovirale Spleißdonor mit dem kryptischen MDR1-Spleißakzeptor wechselwirken könnte (vgl. Transkript 3 in Abb. 11). Ein derartiges Spleißereignis übt jedoch keinen Einfluß auf den genotypischen Index aus, da derartig gespleißte Transkripte nicht verpackt werden können (kein Verpackungssignal).
- Die Spleißakzeptor-Mutation führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer mäßigen Erhöhung der MDR1-Genexpression, da durch Mutation der Akzeptorstelle dem retroviralen und kryptischen MDR1-Spleißdonor der Partner teilweise (s. Abbildung 65) entzogen wurde. Interessanterweise ergab die Plattierung der G+ m1SN und G+ m3SN amphotrop transduzierten, G418 vorselektierten K562 Massenkulturen einen deutlich höheren Expressionsgewinn bei Verwendung der Spleißakzeptor-Mutante: So klonierten bei 30 ng/ml Colchicin bei G+ m3SN transduzierten Zellen noch 42% der Zellen im Vergleich zu 10 ng/ml Colchicin, bei G+ m1SN transduzierten

Zellen jedoch nur 8% (Tabelle 8). Diese Diskrepanz könnte an der expressionsangleichenden Wirkung der Colchicin-Selektion im Falle der monocistronischen Vektoren liegen sowie an der geringeren Expression im bicistronischen Vektor.

Vektor	% CFU [10 ng/ml Col]	% CFU [30 ng/ml Col]	ratio 30/10 in %
G+ m3SN	70%	29%	42%
G+ m1SN	50%	4%	8%
G+ m3	85%	72%	85%
G+ m1	88%	83%	94%

Tabelle 8: Im bicistronischen Kontext führt die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors zu einer deutlichen Erhöhung der Colchicin-Resistenz.

Dargestellt sind die Klonierungsdaten mit den entsprechenden Vektoren transduzierter K562 Zellen in 10 ng/ml bzw. 30 ng/ml Colchicin. Die Spleißvektoren wurden mit 1 mg/ml G418 vorselektiert, die monocistronischen Vektoren mit 10 ng/ml Colchicin.

- c) Die Expressionsunterschiede sind bei GRS Vektor transduzierten Zellen deutlich geringer als bei G+ Vektor transduzierten Zellen; eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, daß das Spleißakzeptoroligonukleotid im GRS Vektor den retroviralen Spleißdonor rekrutiert und somit dessen Wechselwirkung mit kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren verringert (vgl. 2.5.5).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors zu einer Erhöhung der qualitativen MDR1-Genexpression im Vergleich zur Wildtyp-MDR1-cDNA führte, während die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißdonors die qualitative MDR1-Genexpression negativ beeinflusste (Reduktion der IC_{50} um 1/3).

2.5.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Auswirkung kryptischen Spleißens innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit auf den genotypischen Index und die qualitative Genexpression retroviraler MDR1-Vektoren analysiert. Folgende Aussagen können getroffen werden:

- a) **Der genotypische Index ist abhängig von der verwendeten Verpackungszelllinie**

Da der genotypische Index von Spleißereignissen innerhalb der Transgen-cDNA abhängt, die in der Verpackungszelllinie stattfinden, und Spleißen zelltypspezifisch reguliert wird, können verschiedene Verpackungszelllinien zu unterschiedlichen genotypischen Indexen führen. So zeigt die amphotrope Verpackungszelllinie GP+envAm12 bei Verwendung von Vektoren mit deletiertem kryptischem MDR1-Spleißdonor einen genotypischen Index von nahezu 1,0, die GALV-Verpackungszelllinie PG13 nur von 0,25. In beiden Fällen führte jedoch die Verwendung von Vektoren mit Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors zu einer Erhöhung des genotypischen Indexes.

- b) **Der genotypische Index ist abhängig von der Leader-Architektur**

Bicistronische GRS MDR1-Vektoren führen zu einem um ca. 0,25 niedrigeren genotypischen Index als die entsprechenden G+ abgeleiteten Vektoren. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, daß das Spleißakzeptoroligonukleotid im GRS Vektor durch seine Wechselwirkung mit dem retroviralen Spleißdonor die MDR1-cDNA vor Spleißereignissen zwischen dem retroviralen Spleißdonor und kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren schützt, was zu der erhöhten Genexpression GRS abgeleiteter Vektoren beitragen könnte. Wenn jedoch der retrovirale Spleißdonor nicht mehr mit kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren wechselwirkt, könnten nun vermehrt kryptische MDR1-Spleißdonoren mit den vorher andersweitig rekrutierten MDR1-

Spleißakzeptoren in Wechselwirkung treten und somit zu vermehrtem Spleißen innerhalb der MDR1-Transkriptionseinheit führen, was in einem verringerten genotypischen Index zum Ausdruck käme.

c) **Deletion des kryptischen MDR1-Spleißdonors führt zu einer Verringerung, Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors führt zu einer Erhöhung der Genexpression**

Deletiert man den kryptischen MDR1-Spleißdonor, kommt es vermutlich zu einer verstärkten Wechselwirkung des retroviralen Spleißdonors mit dem kryptischen MDR1-Spleißakzeptor, was zu einer verringerten Synthese intakter MDR1-Transkripte führen könnte. Im Vergleich dazu resultierte die Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors in erhöhter MDR1-Genexpression, da durch Mutation der Akzeptorstelle den Spleißdonoren großteils (jedoch nicht vollständig) der Partner entzogen wurde. Am signifikantesten erwies sich der Expressionsgewinn im bicistronischen System bei Vorselektion auf das Zweitgen, wo im Hochdosisbereich die Colchicin-Resistenz um fast eine Größenordnung erhöht wurde.

Dennoch müssen weitere Modifikationen innerhalb der MDR1-cDNA vorgenommen werden, um einen theoretisch erreichbaren genotypischen Index von 1,0 ohne Einbußen bezüglich der Genexpression zu gewährleisten: Hier wäre eine vollständige funktionelle Zerstörung der beschriebenen kryptischen MDR1-Spleißakzeptoren (Sorrentino *et al.* 1995; 2.2.6) am sinnvollsten. Dies könnte jedoch nicht mehr durch stille Mutagenese geschehen: Man müßte die Aminosäuresequenz an insgesamt zwei Stellen verändern, könnte jedoch konservative Aminosäuresubstitutionen vornehmen. Eine Stabilisierung der cDNA über Verhindern der internen homologen Rekombination wäre weniger sinnvoll, da sich dieses Vorhaben sehr aufwendig gestaltet und den genotypischen Index lediglich um 0,06 erhöhen würde (s. 2.5.3). Außerdem treten die Rekombinationsereignisse im Gegensatz zu den Spleißereignissen nicht in Zellen auf, die ein intaktes Provirus besitzen. Die Zerstörung des retroviralen Spleißdonors stellt keine Lösung dar, da dies zu dramatischen Titer- und Expressionsverlusten führt (s. 2.4.6).

3. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

3.1 Zusammenfassung

Welche Eigenschaften kennzeichnen einen optimierten retroviralen Vektor für den Einsatz in der Gentherapie im hämatopoetischen System?

Er sollte (I) hohe, vom Transgen unabhängige Genexpression in hämatopoetischen Zellen vermitteln, sowohl im monocistronischen als auch im bicistronischen Kontext. Dies ist Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Stammzellselektion und somit Stammzellexpansion, denkt man an den Einsatz eines (II) Resistenzgens (MDR1) oder (III) Oberflächenmarkers (Δ LNGFR) für die Koexpression mit anderen Resistenzgenen (wie Alkyltransferase oder Aldehyddehydrogenase) oder therapeutischen Genen. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist zudem die (IV) Vektorsicherheit von großer Bedeutung: Diese kann auf mehreren Ebenen verbessert werden: zum einen auf der Ebene des Vektorrückgrates, indem die Entstehung replikationskompetenter Retroviren oder die Synthese von Peptiden/ Proteinen unbekannter Funktion (durch Expression weiterer Leserahmen 5' des Transgens) vermieden wird; zum anderen auf der Ebene der verwendeten cDNA, wo kryptische Spleißstellen, die auch in mit einer vollständigen Transkriptionseinheit transduzierten Zielzellen aktiv sind, zur Entstehung von *nonsense* Proteinen mit unbekannter Funktion und/ oder immunogenem Potential führen können. Als letzter Punkt (V) bleibt ein hoher genotypischer Index des Transgens zu erwähnen: Ziel ist es, daß alle transduzierten Zellen eine intaktes Transgen aufweisen, Grundvoraussetzung für die Expression des gewünschten Phänotyps.

Lösungsansätze zur Erfüllung dieser fünf Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt.

(I) FMEV-Vektoren vermitteln hohe, vom Transgen unabhängige Genexpression in hämatopoetischen Zellen

Für viele Anwendungen im Bereich des somatischen Gentransfers ist eine hohe Genexpression in den entsprechenden Zielzellen wünschenswert. Je nach Anwendung ist eine Expression in Stammzellen unerlässlich (z. B. zur dauerhaften Korrektur von Erbkrankheiten). Manchmal reicht jedoch auch eine Expression in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen (z. B. im Rahmen einer Chemoprotektion) oder sogar reifen Zellen (z. B. T-Zellen im Rahmen der HIV-Gentherapie) aus. In der in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich angesprochenen Chemoprotektion durch MDR1-Gentransfer sollte die Expression in den frühen Vorläuferzellen ein Überleben der Zellen gewährleisten. Ansonsten scheitert die Ausführung. Ebenso sollte beim Transfer zweier Gene - zum Beispiel eines *in vivo* Selektionsmarkergens und eines therapeutischen Gens - die Expression des Resistenzgens die Selektion ermöglichen, während die des therapeutischen Zweitgens einen kurativen Effekt bewirkt.

Bisher publizierte Daten sprachen für eine Verwendung von FMEV-Vektoren für den retroviralen MDR1-Gentransfer (Baum *et al.* 1995, 1996b, 1996c; Eckert *et al.* 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß sich diese Ergebnisse auch auf andere Systeme (*lacZ*, *neo^R*, GFP, Δ LNGFR) übertragen lassen. Demzufolge gewährleisten FMEV-Vektoren eine vom Transgen unabhängige, hohe Genexpression in frühen und späten hämatopoetischen Zellen.

2.1 Die hohe Expression der FMEV-Vektoren in hämatopoetischen Zellen ist unabhängig vom übertragenen Gen

In bicistronischen Vektoren bedarf es jedoch einer weiteren Expressionssteigerung für eine funktionelle Expression, um den koexpressionsbedingten Expressionsverlust zu kompensieren. Deshalb wurden weitere Modifikationen in die *Leader*-Region des FMEV-Vektors eingeführt, durch die die Transgenexpression auf posttranskriptioneller Ebene erhöht werden konnte. So wurde das Transgen in seine ursprüngliche Stelle im *gag*-Leserahmen kloniert und 5' mit einer Spleißakzeptor-Konsensussequenz versehen. Durch vermehrtes Spleißen mit dem retroviralen Spleißdonor konnte somit die Genexpression unabhängig vom Transgen erhöht werden, da (a) die komplexe *Leader*-Sekundärstruktur herausgespleißt wird, (b) Introns 5' der cDNA in vielen Fällen die Transgenexpression erhöhen (Matsumoto *et al.* 1998) und (c) aberrante Leserahmen in dem gespleißten Transkript fehlen.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

(II) FMEV-Vektoren ermöglichen die Selektion hämatopoetischer Zellen über Koexpression mit einem Resistenzgen (MDR1)

Transfer und Expression von Resistenzgenen wie MDR1 in hämatopoetischen Zellen ist ein effizientes Mittel, um genetisch modifizierte Zellen über Selektion anzureichern. Durch diese Strategie der dominanten Selektion hämatopoetischer Zellen sollte es möglich sein, das Ausmaß des genetischen Chimärismus im Patienten (d. h. den Anteil genetisch modifizierter Zellen, die zur aktuellen Hämatopoese beitragen) zu erhöhen: Transduzierte Zellen, die durch das Resistenzgen geschützt sind, erfahren gegenüber den untransduzierten Zellen einen Selektionsvorteil, indem sie die Selektion überleben und sich weiter teilen können. Diese Zellen nehmen somit im Laufe der Zeit einen größeren Anteil an der Gesamthämatopoese ein. Durch Koexpression von MDR1 mit anderen Resistenzgenen oder therapeutischen Genen wird das Anwendungsspektrum dieser Strategie immens erweitert. Jedoch war die Expression bisher vorgestellter retroviraler MDR1-Koexpressionsvektoren zu gering, um eine dominante Selektion auf Ebene früher, primärer humaner Vorläuferzellen zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung von FMEV-Vektoren zum ersten Mal eine erfolgreiche Selektion auf Ebene CD34-positiver humaner Progenitorzellen mit MDR1-Koexpressionsvektoren gezeigt werden.

2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen

(III) **FMEV-Vektoren ermöglichen die Anreicherung hämatopoetischer Zellen über Koexpression mit einem Zelloberflächenmarker (Δ LNGFR)**

Neben einer pharmakologischen Selektion hämatopoetischer Zellen ist auch die Selektion über einen Zelloberflächenmarker wie Δ LNGFR *in vitro* möglich (Ruggieri *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997). So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein FMEV-MDR1-Koexpressionsvektor vorgestellt, der neben MDR1 Δ LNGFR als klinisch relevantes Zweitgen koexprimiert. Dieser Vektor verleiht über MDR1 Zytostatikaresistenz und gestattet gleichzeitig mittels Δ LNGFR eine Zelloberflächenmarkierung und Selektion transduzierter Zellen, einschließlich humaner CD34 positiver Primärzellen. Dies ermöglicht die Anreicherung und Expansion Zytostatika-resistenter Zellen vor Reinfusion in Krebspatienten im Rahmen einer intensivierten Chemotherapie. Außerdem können MDR-positive humane Zellen über Δ LNGFR-Koexpression detektiert werden. Hierdurch wird das Überwachen der Selektion transduzierter Zellen *in vivo* und die Analyse ihrer biologischen Eigenschaften erleichtert. Die Bedeutung der Δ LNGFR-Koexpression beschränkt sich jedoch nicht nur auf MDR1. Auch andere chemoprotektive oder therapeutische Gene bieten sich an, vor allem wenn sie keiner direkten durchflußzytometrischen Analyse zugänglich sind

2.3 Bicstronische retrovirale Vektoren für kombinierte Myeloprotektion und Zelloberflächenmarkierung

Dennoch zeigten sowohl das MDR1/NPTII- als auch das MDR1/ Δ LNGFR-System zwei Probleme der Koexpression: Zum einen wurde der erniedrigte genotypische Index der MDR1-Transkriptionseinheit deutlich, d. h. nicht alle transduzierten Zellen zeigten einen funktionellen MDR1-Phänotyp; zum anderen blieb in beiden Systemen die Expression des bicstronischen Vektors unter der des monocistronischen Gegenstückes, weshalb - wie bereits erwähnt - weitere Modifikationen im *Leader*-Bereich der FMEV-Vektoren eingeführt wurden.

(IV) **erhöhte Vektorsicherheit**

Die Entstehung replikationskompetenter Retroviren stellt ein großes Gefahrenpotential bei der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren im Rahmen einer Gentherapie dar (s.1.4.5.2). Da die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit endogenen Retroviren umso höher ist, je mehr Sequenzhomologie mit dem retroviralen Vektor besteht, ist es sinnvoll, soviel virale Sequenz wie möglich aus retroviralen Vektoren zu entfernen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit neuartige retrovirale Vektoren vorgestellt, bei denen alle nicht unmittelbar notwendigen viralen Sequenzen deletiert wurden. So wurden *gag*-Sequenzen, die in den weit verbreiteten *gag*⁺ Vektoren vorhanden sind, entfernt bzw. durch ein minimales Spleißakzeptoroligonukleotid ersetzt. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich außerdem, daß im Gegensatz zu den zusätzlichen *gag*-Sequenzen der retrovirale Spleißdonor für einen hohen Vektortiter verantwortlich ist. Ferner konnte - wie bereits erwähnt - durch Einführen des Spleißakzeptoroligonukleotids die Genexpression unabhängig vom verwendeten Transgen signifikant erhöht werden. Neben der Deletion nicht unmittelbar notwendiger viraler Sequenzen wurden auch alle ATG-Leserahmen 5' des Transgens mutiert, um die Expression un-

gewollter Peptide, die immunogen oder andersweitig für die Zelle nachteilig sein könnten, zu unterbinden.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

Neben der Erhöhung der Sicherheit des Vektorrückgrates wurde auch die verwendete MDR1-cDNA sicherheitsoptimiert. So existieren in der MDR1-cDNA kryptische Spleißstellen, die auch in mit einer vollständigen Transkriptionseinheit transduzierten Zielzellen aktiv sind und zur Entstehung von *nonsense* Proteinen mit unbekannter Funktion oder immunogenem Potential führen können. Tatsächlich ist ungefähr die Hälfte aller entstehenden Transkripte intern gespleißt. Durch Mutation des kryptischen Spleißdonors konnte das interne, kryptische Spleißen nahezu vollständig unterbunden werden.

2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes, der Expression und Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

(V) Der genotypische Index von MDR1 wurde erhöht

Im Rahmen einer Gentherapie ist es wünschenswert, daß alle transduzierten Zellen auch den gewünschten Phänotyp zeigen. Ist dies nicht der Fall, so kann es zum einen auf mangelnder Genexpression beruhen, zum anderen auf einer Instabilität der Transkriptionseinheit, so daß nicht alle transduzierten Zellen eine intakte Provirusintegration aufweisen. Letzteres käme in einem niedrigen genotypischen Index zum Ausdruck. Um diesen beiden Punkten (mangelnder Genexpression bzw. niedrigem genotypischem Index) zu begegnen, wurde einerseits die Transgenexpression auf posttranskriptioneller Ebene verbessert.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

Andererseits wurden die Ursachen für den niedrigen genotypischen Index retroviraler MDR1-Vektoren, bestehend aus Fehlern im Rahmen der reversen Transkription in den Zielzellen und kryptischen Spleißereignissen in den Verpackungszellen aufgezeigt.

2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen

Durch Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors wurde der genotypische Index auf ca. 0,8 erhöht und gleichzeitig die funktionelle MDR1-Expression gesteigert.

2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes und der Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

Somit können die in der vorliegenden Arbeit präsentierten, bezüglich Sicherheit und Expression optimierten Vektoren einen neuen Standard im Bereich der somatischen Gentherapie setzen.

3.2 Summary

Which features characterize an optimized retroviral vector for gene therapy in the hematopoietic system?

It should mediate (I) high transgene expression in hematopoietic cells, both in a monocistronic and in a bicistronic context. This is a prerequisite for successful stem cell selection and therefore stem cell expansion using either (II) resistance genes (as MDR1) or (III) cell surface markers (as Δ LNGFR) co-expressed with other resistance genes (as alkyltransferase or aldehyde dehydrogenase) or therapeutic genes. For clinical applications (IV) vector safety also is a major point: Vector safety can be increased at the level of the vector backbone by avoiding the generation of replication competent retrovirus or the synthesis of peptides of unknown function (via expression of open reading frames 5' of the transgene), as well as at the level of the cDNA used, where cryptic splice sites, which are also active in target cells transduced with an intact transcription unit, can lead to the synthesis of nonsense proteins with unknown function and immunogenic potential. Last but not least, one should consider (V) the genotypic index: It is the primary aim, that all transduced cells possess the correct genotype, a prerequisite if all transduced cells are to show the desired phenotype (if there is sufficient gene expression). Events resulting in the wrong genotype are cryptic splicing in the packaging cells or mistakes (especially recombination) during reverse transcription in the target cells. Eliminating the causes for these events would also further improve vector safety.

Solutions for the five criteria mentioned above have been presented in this work.

(I) [FMEV vectors mediate high, transgene independent expression in early and late hematopoietic cells](#)

For many gene therapy applications, high gene expression in the appropriate target cells is desirable. Depending on the applications, transduction and expression is required in stem cells (e. g. for the long-term correction of inherited diseases), in early hematopoietic precursor cells (e. g. for chemoprotection purposes), or only in mature cells (e. g. T cells for HIV gene therapy). Chemoprotection via MDR1 gene transfer against side effects of chemotherapy is primarily discussed in this work; the expression level in early progenitor cells should guarantee the survival of these cells. In addition, for the transfer of two genes (e. g. an *in vivo* selectable marker gene together with a therapeutic gene), the expression level of the resistance gene should allow selection, whereas the therapeutic second gene should mediate curative effects.

Previous data supported the use of FMEV vectors for efficient retroviral MDR1 gene transfer (Baum *et al.* 1995, 1996b, 1996c; Eckert *et al.* 1996). The work presented here demonstrated that these results could be transferred to other systems (*lacZ*, *neo^R*, GFP, Δ LNGFR), too. In all cases tested, FMEV vectors have guaranteed high, transgene independent gene expression in early and late hematopoietic cells.

[2.1 The high expression of FMEV vectors in hematopoietic cells is independent of the gene transferred](#)

In the bicistronic context, further increase in transgene expression is required for functional expression levels to compensate the decrease in expression caused by coexpression. Therefore, additional modifications were introduced into the leader region of the FMEV vector resulting in increased transgene expression: The transgene was cloned in the normal *gag* reading frame, and a splice acceptor consensus sequence was introduced 5' of its start codon. By increased splicing with the retroviral splice donor, expression could be elevated because (a) the complex secondary structure of the leader is removed by splicing, (b) introns 5' of the cDNA increase transgene expression in general (Matsumoto *et al.* 1998) and (c) aberrant reading frames are absent in the spliced message

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: High and transgene independent expression with minimal potential for viral recombination

(II) FMEV vectors allow selection of hematopoietic cells by coexpression with a resistance gene (MDR1)

Transfer and expression of resistance genes, such as MDR1, in hematopoietic cells actually represents an efficient means to enrich selectively for genetically modified cells. Using this strategy of dominant selection of hematopoietic cells, it should be feasible to alter the amount of genetic chimerism (i. e. the percentage of genetically modified cells participating in actual hematopoiesis). Transduced cells, which are protected by the resistance gene, are - compared to untransduced cells - at a selective advantage because they can survive the selection process and continue to divide. Coexpression of MDR1 with other resistance or therapeutic genes increases the spectrum of possible applications of this strategy. However, the coexpression of two genes to date has been too weak to allow dominant selection at the level of early, primary human progenitor and stem cells. The work presented here demonstrated for the first time that FMEV coexpression vectors may allow the successful selection of CD34 positive human progenitor cells with MDR1.

2.2 FMEV-based MDR1 coexpression vectors allow dominant selection of hematopoietic precursor cells

(III) FMEV vectors allow enrichment of hematopoietic cells by coexpression with a cell surface marker (Δ LNGFR)

Apart from pharmacological selection of hematopoietic cells, selection via a cell surface marker such as Δ LNGFR *in vitro* is also possible (Ruggieri *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997). Therefore - as part of this work - an FMEV-MDR1 coexpression vector was developed that coexpressed MDR1 together with a clinically relevant second gene encoding Δ LNGFR. This vector mediates drug resistance (via MDR1) and, at the same time, cell surface marking and selection of transduced cells (via Δ LNGFR), including human CD34 positive primary cells. This makes enrichment and expansion of drug resistant cells feasible before reinfusion in cancer patients as part of an intensified chemotherapy. In addition, multidrug resistant cells can be detected by Δ LNGFR coexpression. This may facilitate both the follow-up of selection of transduced cells *in vivo* and the analysis of their biological features. The importance of Δ LNGFR coexpression

is not limited to MDR1. Other chemoprotective or therapeutic genes can also be combined with Δ LNGFR and improve the effectiveness of monitoring gene transfer, especially if their gene products cannot be directly monitored by cytometric analysis

2.3 Bicistronic retroviral vectors for combined myeloprotection and cell surface marking

Nevertheless, both systems (MDR1/NPTII and MDR1/ Δ LNGFR) revealed two limitations of coexpression: on the one hand, the genotypic index of the MDR1 transcription unit is reduced, i. e. not all transduced cells showed a functional MDR1 phenotype; on the other hand, the expression level of the bicistronic vectors was lower than that of the monocistronic counterparts. Therefore - as mentioned before - additional modifications were introduced into the leader region of the FMEV vector and into the MDR1 cDNA.

(IV) increased vector safety

The generation of replication competent retrovirus comprises a great risk in the clinical applications of retroviral vectors in gene therapy trials are concerned. As the probability of recombination increases with the extent of homology between endogenous retroviruses and the retroviral vector, it is useful to eliminate as much viral sequence from the retroviral vector as possible to increase its safety. For that reason novel retroviral vectors were presented in this work, in which all non essential viral sequences were deleted. Especially, the *gag* sequences, present in the commonly used *gag*⁺ vectors and said to be important for high virus titer and gene expression, were replaced by a minimal splice acceptor consensus oligonucleotide. In the course of this work, it became evident that the retroviral splice donor was essential for high vector titer, while the additional *gag* sequences were not. Moreover, introduction of the splice acceptor consensus yielded a significant increase in gene expression. In addition, apart from the deletion of non-essential viral sequences, all ATG reading frames 5' of the transgene were mutated to suppress the expression of unwanted peptides that could be immunogenic or disadvantageous for the cell in another way.

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: high and transgene independent expression with minimal risk for viral recombination

Besides increasing vector backbone safety, the MDR1 cDNA used was also safety optimized. Within the MDR1 cDNA there are cryptic splice sites that are also active in cells transduced with a complete transcription unit and could give rise to *nonsense* proteins with unknown function or immunogenic potential. About half of the transcripts is internally spliced. By mutation of the cryptic splice donor, internal, cryptic splicing could be nearly completely abolished

2.5 Increasing genotypic index, expression and safety of retroviral MDR1 vectors by mutation of cryptic splice sites

(V) high genotypic index of the transgene

For gene therapy applications it is desirable that all transduced cells show the desired phenotype. This requires sufficient gene expression and stability of the transcription

unit. To counteract these two points (insufficient gene expression and low genotypic index), transgene expression was optimized on the posttranscriptional level.

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: high and transgene independent expression with minimal risk for viral recombination

In addition, the causes for the low genotypic index of retroviral MDR1 vectors were elucidated, which consist of mistakes during reverse transcription in the target cells and cryptic splicing events in the packaging cells.

2.2 FMEV-based MDR1 coexpression vectors allow dominant selection of hematopoietic precursor cells

By mutating the cryptic splice signals within the MDR1 cDNA, the genotypic index could be increased to nearly 0.8 without loss of gene expression.

2.5 Increasing genotypic index, expression and safety of retroviral MDR1 vectors by mutation of cryptic splice sites

Taken together, the safety- and expression-optimized vectors presented in this work should impose a new standard for vectors used in somatic gene therapy.

3.3 Kurzzusammenfassung

Retrovirale Vektoren auf der Basis von Mausleukämieviren stellen gegenwärtig das am meisten verwendete und am besten charakterisierte System für den stabilen Gentransfer in somatische Zellen dar und sind somit bevorzugtes Werkzeug der Gentherapie.

Aufgrund der Natur der Retroviren mit bevorzugtem Tropismus in hämatopoetischen Zellen und stabiler Integration des Genoms in die Wirts-DNA bildet das hämatopoetische System ein optimales Anwendungsfeld für eine Gentherapie mit retroviralen Vektoren: Das gesamte hämatopoetische System leitet sich von wenigen, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Infiziert man eine solche Stammzelle, tragen alle davon abgeleiteten Zellen den retroviralen Vektor stabil in ihr eigenes Genom integriert und können das gewünschte Transgen exprimieren. Letztendlich können so aus einer einzigen transduzierten Stammzelle Millionen reifer Zellen hervorgehen, wodurch die Anzahl der Vektor-tragenden Zellen amplifiziert wird. Da sich frühe hämatopoetische Vorläuferzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut isolieren lassen, kann die Transduktion mit retroviralen Vektoren *in vitro* erfolgen. Anschließend werden die transduzierten Zellen dem Patienten reinfundiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden optimierte retrovirale Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie entwickelt, die

- I) hohe, vom Transgen unabhängige Expression in hämatopoetischen Zellen vermitteln. Bisher publizierte Daten sprachen für eine Verwendung von FMEV-Vektoren für den retroviralen MDR1-Gentransfer. In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß sich diese Ergebnisse auch auf andere Systeme übertragen lassen. Zudem wurden weitere Modifikationen in die *Leader*-Region des FMEV-Vektors eingeführt, durch die die Transgenexpression auf posttranskriptioneller Ebene erhöht werden konnte. So wurde das Transgen in seine ursprüngliche Stelle im *gag*-Leserahmen kloniert und 5' mit einer Spleißakzeptor-Konsensussequenz versehen. Durch vermehrtes Spleißen mit dem retroviralen Spleißdonor konnte somit die Genexpression unabhängig vom Transgen erhöht werden.
- II) eine Stammzelleselektion und somit Stammzellexpansion ermöglichen durch den Einsatz eines Resistenzgens (MDR1) oder Oberflächenmarkers (Δ LNGFR).
- III) einen hohen genotypischen Index bezüglich der MDR1-cDNA besitzen. So weisen manche cDNAs im retroviralen Kontext Rearrangements auf, die zum vollständigen Verlust der entsprechenden Genaktivität führen können. Die Ursachen dieser Rearrangements wurden für das MDR1-Gen aufgeklärt und soweit möglich korrigiert.
- IV) erhöhte Sicherheit vor Entstehung replikationskompetenter Retroviren (durch Entfernen nicht-essentieller viraler Sequenzen) oder Synthese von Peptiden/Proteinen unbekannter Funktion (durch Verhindern der Expression weiterer Leserahmen außer dem des Transgens und Unterbinden kryptischen Spleißens der cDNA) bieten.

3.4 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden retrovirale Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie im hämatopoetischen System vorgestellt. Diese Vektoren zeichnen sich durch erhöhte Sicherheit und hohe, vom Transgen unabhängige Genexpression aus. Dies ermöglichte die dominante Selektion von Zellen über MDR1-Gentransfer unter Koexpression eines weiteren Gens.

Einer kritischen Abwägung bedarf hierbei sowohl der MDR1-Resistenzgentransfer und die damit bedingte *in vivo* Selektion, die Koexpression mehrerer Gene sowie der Einsatz von Retroviren in der Gentherapie an sich.

3.4.1 MDR1-Resistenzgentransfer

Im Vergleich zu Resistenzgenen wie Aldehyddehydrogenase, Alkyltransferase und Glutathion-S-Transferase detoxifiziert MDR1 ein breites Spektrum nicht-mutagener Substanzen. Bei Verwendung mutagener Zytostatika können in nicht transduzierten oder nur partiell geschützten Zellen Mutationen akkumulieren, was im schlimmsten Fall sogar zur Onkogenese führen kann. Das einzige andere Resistenzgen mit nicht-mutagenem Substrat ist Dihydrofolatreduktase (DHFR). Jedoch wirken die DHFR- bzw. MDR1-spezifischen Zytostatika nur in sich teilenden Zellen, während die hämatopoetische Stammzelle als potentieller Angriffspunkt hauptsächlich in der G₀-Phase verharrt. Außerdem exprimieren die hämatopoetische Stammzelle und frühe, humane hämatopoetische Vorläuferzellen schon endogen das P-Glykoprotein, so daß die Selektion gegen eine Hintergrundexpression stattfinden muß.

Diesem Problem könnte jedoch auf mehreren Ebenen entgegengewirkt werden: Zum einen könnte man - wie schon für andere Resistenzgene wie Alkyltransferase und DHFR gezeigt (Hickson *et al.* 1996; Zhao *et al.* 1997) - Mutationen in die MDR1-cDNA einführen, die die Aktivität gegenüber allen oder einem bestimmten Substrat im Vergleich zum Wildtyp erhöhen. In der Literatur sind bereits ein Austausch von Glycin gegen Valin an Position 185 (Choi *et al.* 1988) beschrieben, der eine höhere Resistenz gegenüber Colchicin und Etoposiden zur Folge hat; den gleichen Effekt bewirkt die Mutation des Histidin 61 in der ersten Transmembranregion (Taguchi *et al.* 1997). Zum anderen wäre auch eine Insensitivierung gegenüber Inhibitoren wie Cyclosporin A oder Verapamil vorstellbar, so daß man das Wildtyp-P-Glykoprotein inhibieren kann, während gleichzeitig die insensitive P-Glykoprotein-Mutante weiterhin detoxifiziert, ein Prinzip, das im Falle von Cyclosporin A durch Deletion des Phenylalanin 335 in der sechsten Transmembranregion bereits verwirklicht ist (Chen *et al.* 1997; zum Vergleich: Hickson *et al.* 1996 und Encell *et al.* 1998 bzgl. Alkyltransferase).

MDR1-Mutanten, die gegenüber einem Inhibitor insensitive ($\Delta F335$) und/oder gegenüber einem Zytostatikum affiner sind (H61W; V185G), besäßen großes klinisches Potential:

So würde im Rahmen der Chemotherapie bei Verwendung einer für ein Zytostatikum höher affinen MDR1-Mutante eine geringere MDR1-Expression ausreichen, um hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zu schützen. Ebenso könnte man im Rahmen der Hochdosistherapie höhere Zytostatikakonzentrationen applizieren. Der Ansatz einer gegenüber einem Inhibitor insensitive Mutante scheint hier (abgesehen von *Purging*-Verfahren) weniger sinnvoll, da die MDR1-Hintergrundexpression in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit zur Zytostatikaresistenz beiträgt.

Noch größere Bedeutung gewinnt der Einsatz von MDR1-Mutanten bei der Koexpression mit einem therapeutischen Gen zur Korrektur monogener Erbkrankheiten. Da eine Hochdosischemotherapie mit vielen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden ist, wäre bei der Behandlung von Erbkrankheiten eine längerfristige Therapie mit niedrigen Zytostatikakonzentrationen im möglichst nebenwirkungsfreien Bereich zu bevorzugen. Außerdem müßte bei vielen Erbkrankheiten mit der Therapie schon in jungen Jahren begonnen werden, so daß sich allzu hohe Zytostatikakonzentrationen zusätzlich negativ auf die körperliche und geistige Entwicklung des Patienten auswirken könnten. Bei einer niedrig dosierten Chemotherapie fände eine Anreicherung transduzierter Zellen über einen größeren Zeitraum (mehrere Jahre) unter Ausnutzung eines relativen Selektionsvorteils gegenüber nicht-transduzierten Zellen statt. Durch den Einsatz höher affiner MDR1-Mutanten wäre eine geringere Zytostatikumkonzentration für eine effiziente Selektion ausreichend. Die Verwendung einer gegenüber einem Inhibitor unempfindlichen Mutante würde zusätzlich die für eine erfolgreiche Selektion notwendige Zytostatikumkonzentration senken, da dieser das Wildtyp-MDR1 inhibiert. Dies würde eine hintergrundfreie Selektion erleichtern. Hierbei wäre zudem von Vorteil, daß die MDR1-Substrate nicht mutagen sind, da eine längerfristige Applikation von Mutagenen zur Anreicherung transduzierter Zellen *in vivo* bei der Behandlung von Erbkrankheiten große ethische Bedenken aufwirft. Hier bedarf es einer Abwägung der Toxizität / Mutagenität der Konditionierung bei einer allogenen bzw. autologen Knochenmarktransplantation mit Gentransfer ohne Resistenzgen.

Jedoch muß man beim Gentransfer von Proteinmutanten eine eventuelle Immunogenität abklären, die durch Verändern der Aminosäuresequenz zustande kommen könnte. Ebenfalls müßte man bedenken, inwiefern die Applikation der Modulatoren an sich Nebenwirkungen bedingt und inwiefern ungeschützte, gesunde Gewebe auf eine höhere Zytostatikaapplikation reagieren.

In jüngster Zeit wurde jedoch die Rolle von MDR1 als Resistenzgen kritischer betrachtet: So wird von manchen Arbeitsgruppen die Bedeutung von MDR1 mehr als Tumormarker und nicht als Ursache von Zytostatikaresistenz gesehen (Dicato *et al.* 1997) sowie eine Beteiligung von MDR1 bei der Leukämogenese diskutiert (Bunting *et al.* 1998). Diese Punkte - sowie die Instabilität der MDR1-cDNA, die jedoch (wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt) überwunden werden kann - legen die Verwendung von Dihydrofolatreduktase als Resistenzgen nahe: Wie bei MDR1 werden auch bei DHFR nicht-mutagene, zellzyklusabhängige Zytostatika eingesetzt. DHFR bietet jedoch den Vorteil, daß bereits höher affine Mutanten existieren, das Transgen retroviral stabil transferiert wird und eine eventuelle Beteiligung an der Krebsentstehung nicht diskutiert wird.

Unabhängig vom Einsatz von Resistenzgenen ergibt sich bei der Behandlung monogener Erbkrankheiten auch ein immunologisches Problem: Wird das entsprechende Genprodukt vom Patienten gar nicht synthetisiert, so wird es vom Immunsystem meist als körperfremd erkannt. Demzufolge werden die transduzierten Zellen, die das fehlende Genprodukt synthetisieren, vom Immunsystem angegriffen. Letztendlich werden die transduzierten Zellen abgetötet, und das Therapiekonzept scheitert (Lutzko *et al.* 1998). Hier wäre hauptsächlich eine genterapeutische Strategie gefragt, die Immuntoleranz gegenüber einem bestimmten Protein induziert. Ein solcher Ansatz hätte auch großes Potential über die Behandlung monogener Erbkrankheiten hinaus, denkt man zum Beispiel an Autoimmunerkrankungen, Allergien oder Gewebetransplantationen.

3.4.2 Koexpression mehrerer Gene

Bei der Analyse der Koexpression mehrerer Gene muß die Funktionalität einer jeden Koexpressionsstrategie für jede Kombination von cDNAs neu analysiert werden, da die Auswirkungen einer in der Natur nicht vorkommenden Genverknüpfung nur schwer vorhersehbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Koexpressionsstrategien vorgestellt: Koexpression über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), Koexpression durch alternatives Spleißen, Koexpression durch Verwendung eines internen Promotors und Koexpression als Fusionsprotein. Am vielversprechendsten erwies sich Koexpression über eine IRES und alternatives Spleißen.

Die IRES-vermittelte Translation wird von der RNA-Sekundärstruktur und der Positionierung des Startkodons beeinflusst. Im Falle der Spleißstrategie ist neben der RNA-Sekundärstruktur die An- bzw. Abwesenheit kryptischer Spleißsignale in den cDNAs für das Verhältnis genomischer zu subgenomischer RNA von Bedeutung. Zudem sind sowohl beim alternativen Spleißen als auch an der IRES-gesteuerten Translation zelluläre Faktoren beteiligt, so daß beide Koexpressionsarten zelltypabhängig reguliert werden. Ebenfalls war jeweils die Genexpression im Vergleich zu den monocistronischen Gegenstücken verringert. Zudem bedeutet in beiden Fällen eine funktionelle Expression des einen Gens nicht unausweichlich eine funktionelle Expression des anderen Gens. Dies ist besonders bei der Koexpression von Suizidgenen relevant. Werden zum Beispiel Thymidinkinase und Δ LNGFR über alternatives Spleißen oder eine IRES koexprimiert und transduzierte Zellen über funktionelle Δ LNGFR-Expression angereichert, so werden Zellen mit nicht-funktionaler Thymidinkinase-Transkriptionseinheit ebenfalls angereichert. Möchte man dann die transduzierten Zellen durch Gancyclovir-Applikation eliminieren, so werden alle Δ LNGFR-positiven Zellen mit rearrangierter Thymidinkinase-Transkriptionseinheit überleben.

Ein möglicher Lösungsansatz für dieses Problem, der auch die Zelltypabhängigkeit des Spleißens und der IRES überwinden kann, wäre eine proteolytische Koexpression. Hierbei werden die zu koexprimierenden Proteine als Fusionsprotein synthetisiert und proteolytisch getrennt. Neben einer exakten Koexpression (beide Proteine werden im gleichen molaren Verhältnis synthetisiert) würde ein Rearrangement in der ersten Transkriptionseinheit, das zum Verlust des exakten Leserahmens führt, auch eine Expression des Zweitgens unterbinden. Realisiert wurde dieses Konzept in retroviralen Vektoren bereits unter Verwendung der 17-Aminosäuren umfassenden V2A-Protease des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus (de Felipe *et al.* 1999): Die zu koexprimierenden Gene werden über das V2A-Gen verknüpft. Nach Translation bewirkt die V2A-Protease eine autoproteolytische Spaltung des Fusionsproteins. Alternativ wäre auch eine Fusion der zu koexprimierenden Proteine über Ubiquitin vorstellbar. Ubiquitin kommt - wie der Name verrät - in allen Zellen ubiquitär vor, wird als Polyprotein oder Fusionsprotein mit ribosomalen Proteinen synthetisiert und kotranslational C-terminal gespalten, wobei die exakte Sequenz des nachfolgenden Proteins ohne Bedeutung ist (Bachmair *et al.* 1986). Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von Teilen von Intein-Sequenzen, die am Selbstspleißen von Proteinen beteiligt sind. Man müßte das Intein so modifizieren, daß proteolytisch gespalten, die Proteinfragmente jedoch anschließend nicht ligiert werden (Xu *et al.* 1996).

3.4.3 Bedeutung des genotypischen Indexes

Um die Bedeutung des genotypischen Indexes im Rahmen der retroviralen Gentherapie zu evaluieren, muß man hauptsächlich drei Anwendungsfelder unterscheiden: Selektion, Koexpression und Onkogenese.

Was die Selektion anbetrifft, so muß man hier zwischen positiver Selektion (d. h. Selektion auf / Anreicherung von Zellen mit einem bestimmten Phänotyp; z. B. MDR1-Expression) und negativer Selektion (d. h. Selektion / Eliminierung von Zellen mit einem bestimmten Phänotyp; z. B. Zellen mit Thymidinkinase-Expression) unterscheiden. Im Fall der Positivselektion wirkt sich ein erniedrigter genotypischer Index derart aus, daß der funktionelle Virustiter verringert ist (s. 1.4.4.2). Somit herrscht eine geringere Polyklonalität: Zellen mit fehlerhafter Transkriptionseinheit sind nicht geschützt und sterben im Rahmen der Selektion. Dies muß jedoch nicht ein Scheitern des Ansatzes bedeuten, sofern dennoch genügend Zellen mit einer intakten Transkriptionseinheit transduziert wurden. Anders sieht dies im Fall der Negativselektion aus: Während bei der Positivselektion die Anzahl der intakt transduzierten Zellen ausschlaggebend ist, ist hier die Anzahl der mit einer fehlerhaften Transkriptionseinheit transduzierten Zellen entscheidend, da diese Zellen die Selektion überleben können, obwohl sie eigentlich hätten eliminiert werden sollen. Dies kann z. B. im Rahmen der adoptiven Immuntherapie (s. 1.2.2) zum Scheitern des Ansatzes führen.

Noch offensichtlicher ist die Bedeutung eines hohen genotypischen Indexes bei der Koexpression zweier Gene. Wird hier auf die Expression eines Genes selektiert, so muß dies nicht zwingend zur Folge haben, daß auch das andere Gen funktionell exprimiert wird. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit mehrfach (2.2; 2.3) gezeigt. Im Rahmen der Selektion könnte dies vor allem bei Koexpression eines Negativ- mit einem Positivselektionsmarker (z. B. Thymidinkinase und NPTII) zum Tragen kommen: Wenn man transduzierte Zellen durch Selektion auf Expression des Positivselektionsmarkers anreichert, gewährleistet dies nicht, daß alle angereicherten Zellen auch funktionell den Negativselektionsmarker exprimieren.

Schließlich kann eine Fehlprozessierung retroviraler Vektoren zur Onkogenese beitragen. So könnten beim Transfer von Rezeptorgenen (bzw. allgemein Protoonkogenen) durch kryptisches Spleißen für Kontrollregionen kodierende Bereiche entfernt werden. Dies könnte theoretisch zu einer dauerhaften Aktivierung des trunktierten Rezeptors und somit zur Onkogenese führen.

3.4.4 Einsatz von Retroviren in der Stammzellgentherapie

Abschließend bleibt noch die Frage offen, inwiefern man retrovirale Vektoren weiter optimieren kann und inwiefern alternative Systeme in Betracht kommen.

Die größten Nachteile retroviraler Vektoren sind geringe Verpackungskapazität, hohes Rekombinationspotential und hohe Fehlinkorporationsrate der reversen Transkriptase, und - im Falle Mausleukämievirus-abgeleiteter Vektoren - keine Integration in ruhenden Zellen (Coffin 1996). Dennoch stellen sie derzeit das einzige System mit stabiler genomischer Integration (mit der potentiellen Gefahr einer Insertionsmutagenese; Gray 1991) dar: Da alle hämatopoetischen Zellen aus pluripotenten Stammzellen hervorgehen, wäre ohne genomische Integration (z. B. bei Verwendung adenoviraler Vektoren) keine Weitergabe an alle Tochterzellen gewährleistet. Parvovirale Vektoren, die auch genomisch integrieren können, stellen keine Alternative gegenüber retroviralen Vektoren dar, da hier nicht jede Infek-

tion auch zur Integration führt. Außerdem ist die Verpackungskapazität dieser Vektoren deutlich geringer als bei Retroviren.

Um eine Integration retroviraler Vektoren auch in ruhenden Zellen zu gewährleisten, bieten sich zwei Möglichkeiten an: Die Verwendung lentiviraler Vektoren (Naldini 1998) oder der Einsatz retroviraler Hybride, die Eigenschaften der Mausleukämieviren mit Lentiviren kombinieren. Vielversprechend erscheint hier zum einen die Entwicklung lentiviraler Vektoren auf der Basis tierischer Lentiviren (Olsen 1998). Im Vergleich zu HIV-basierten Vektoren ist hier die Gefahr einer Rekombination mit endogenen Retroviren des Menschen und somit der Entstehung replikationskompetenter Viren geringer. Attraktiv wären auch Mausleukämievirus-abgeleitete Vektoren, die lentiviral pseudotypisiert werden könnten. Hierfür müßten jedoch zuerst die notwendigen *cis*-aktiven Sequenzen der Lentiviren vollends charakterisiert werden.

Eine weitere Verbesserung retroviraler Vektoren wäre in einer ortsspezifische Integration zu sehen. Dies würde zum einen die Gefahr einer Insertionsmutagenese verringern; zum anderen wäre auch die Integrationsortabhängigkeit der Expression überwunden. Vorstellbar wären Hybride, die Eigenschaften der Mausleukämieviren mit R2-Elementen aus *Bombyx mori* (Luan *et al.* 1995) kombinieren. Die R2-Elemente integrieren ortsspezifisch in die rRNA-Gene von *Bombyx mori*. Um diesen Mechanismus auf das menschliche System zu übertragen, müßte die Spezifität der R2-Endonuklease an die menschliche rDNA-Sequenz angepaßt werden. Ebenso müßte eine Verpackungszelllinie hergestellt werden, die den retroviralen Vektor in Virionen zusammen mit der "humanisierten" R2-Endonuklease verpackt.

Abgesehen von retroviral abgeleiteten Vektoren kann auch die Verwendung alternativer Vektorsysteme in der Stammzellgentherapie diskutiert werden. Zwei Möglichkeiten, deren Realisierung noch in ferner Zukunft liegt, sind im folgenden erwähnt.

Theoretisch wären nicht-retrovirale Vektoren mit stabiler Genomintegration auf der Basis von Transposons vorstellbar. Für eine gentherapeutische Anwendung am Menschen kämen zum Beispiel Transposons aus der *Mariner* Familie in Frage (wie *Himar1* aus *Haematobia irritans*, einer Fliegenart; Robertson 1993). Diese funktionieren nach dem sogenannten *cut-and-paste* Mechanismus (integrieren also ohne vorherige Replikation), wobei die Transposase unabhängig von Wirtsfaktoren funktionell ist (Lampe *et al.* 1996). Eine Integration in humane Zellen konnte für diese Transposonfamilie bereits gezeigt werden, wobei euchromatische Bereiche bevorzugt werden (Schouten *et al.* 1998). Vorstellbar wäre folgender Vektor (Abbildung 72):



Abbildung 72: *HIMAR1*-Transposon-abgeleiteter Vektor

SD : Spleißdonor
SA : Spleißakzeptor
IR : *inverted repeat*

In diesem Vektor wird die Transposase-mRNA unter Herausspleißen des eigentlichen Transposons, flankiert durch für die Transposition notwendige *inverted repeats*, generiert. Im Rahmen der Transposition zerfällt das Konstrukt, wobei der für die Expression der Transposase verantwortliche Promotor von der *HIMAR1*-Transposase-cDNA getrennt wird. Hierdurch werden eine weitere Expression der Transposase und somit weitere Transpositionsergebnisse verhindert. Limitationen dieses Systems

wären die Verpackung in Virionen, die Steuerung der *multiplicity of infections* (= Anzahl der Infektionen pro Zelle) und eine eventuelle erneute Mobilisierung des Transposons nach erfolgreicher Integration, was zu Insertionsmutagenese führen könnte.

Doch neben stabiler genomischer Integration wäre auch eine episomale Persistenz im Nukleus vorstellbar, wie sie für episomal persistierende und replizierende Vektoren charakteristisch ist. Hier wäre auch die Gefahr einer Insertionsmutagenese gemindert. Im Vergleich zu retroviralen Vektoren sind episomale Vektoren in geringerem Maße größenlimitiert, bieten Platz für Gene einschließlich Introns und eventueller *locus control regions* sowie ein geringeres Rekombinationspotential. Publiziert sind bereits episomale Vektoren beruhend auf dem Epstein-Barr-Virus (Banerjee *et al.* 1995). Vorstellbar wären jedoch auch auf dem mitochondrialen Genom beruhende Vektoren, die jedoch im Zellkern replizieren und alle für die Replikation notwendigen *cis*-aktiven Sequenzen und Proteine mit Kernkodierungssequenz anstelle mitochondrialer Präsequenz selbst kodieren. Diese böten gegenüber anderen episomalen Vektoren den Vorteil, daß sie keine viralen Proteine kodieren. Limitationen episomaler Vektorsysteme sind hauptsächlich in der Frage der Dauer und Zelltypabhängigkeit der episomalen Persistenz zu sehen, ebenso wie in die Frage der Kopienanzahl pro Zelle und somit der Höhe der Genexpression, die wahrscheinlich nur schwierig zu regulieren wäre.

Zudem müßte man im Falle der Mitochondriom abgeleiteten Vektoren (ebenso wie im Falle der Transposon abgeleiteten Vektoren) die Einschleusung der Vektor-DNA in die entsprechenden Zielzellen gewährleisten. Wichtige virale Funktionen müßten ersetzt werden: Komplexieren der genetischen Information, Einschleusen der genetischen Information in die Zielzelle und Transport der genetischen Information in den Nukleus. Im Rahmen einer *ex vivo* Gentherapie bietet sich folgender Ansatz an: Man komplexiert die Vektor-DNA über rekombinante, modifizierte Protamine, die natürlicherweise die Histone in Spermien ersetzen. Damit die Protamine mit der komplexierten DNA die Plasmamembran passieren können, werden sie mit Membran-translozierenden Sequenzen (MTS; Rojas *et al.* 1998) fusioniert und, um die genetische Information anschließend effizient in den Nukleus zu transportieren, mit einer Kernlokalisierungssequenz versehen. Da die Synthese aller für einen derartigen Vektor notwendigen Komponenten (Vektor-DNA; rekombinante, modifizierte Protamine) sowie deren Zusammenbau ohne Verwendung von Verpackungszellen, Helferviren o.ä. stattfinden kann, würden diese Vektoren höchsten Sicherheitskriterien entsprechen und in beliebiger Menge herzustellen sein, böten jedoch keinen spezifischen Zelltropismus. Alternativ wäre auch eine Verpackung in SV40 Pseudovirionen vorstellbar, zumal SV40 mit hoher Effizienz primäre Knochenmarkzellen infizieren kann (Sandalon *et al.* 1997). Hierbei gestaltet sich jedoch die Inkorporation größerer DNA-Moleküle (größer 10 kb) als äußerst ineffizient.

3.4.5 Ausblick

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß es wahrscheinlich niemals einen einzigen optimalen Vektor für jede erdenkliche Gentherapie geben wird; vielmehr werden die Vektoren jeweils für die spezifische Anwendung maßgeschneidert sein. Die am Ende erfolgreichen Vektoren werden jedoch sicher Hybridvektoren sein, die die Vorteile verschiedener Systeme miteinander kombinieren. Außerdem wird sich bestimmt eine *in vitro* Vektor-assembly (ohne Verwendung zellulären Materials) durchsetzen, um eine sichere, kontaminationsfreie und reproduzierbare Vektorproduktion in großem Maßstab zu gewährleisten. Die Frage, wie die Gentherapie-Vektorsysteme der Zukunft letztendlich exakt aussehen werden, ist schwierig zu beantworten, da die Vektorentwicklung einer ähnlich rasanten Entwicklung unterworfen ist wie die Software- oder Chipentwicklung.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten retroviralen Vektoren spiegeln den gegenwärtigen Stand der Technik wieder und stellen bezüglich Sicherheit und Genexpression einen deutlichen Fortschritt gegenüber den bisher publizierten, konventionellen Vektoren dar. Somit sind sie aus heutiger Sicht ein attraktives Werkzeug für die Gentherapie.

4. Material und Methoden

4.1 Vektorklonierung

Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden den *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.* 1994) entnommen.

4.1.1 Klonierung der Basisvektoren pSF1, pMO1, pMO3 und pMP1

Die Basisvektoren pSF1, pMO1, pMO3 und pMP1 wurden von Dr. C. Baum kloniert (Baum *et al.* 1996d) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Konstruktion von pSF1 wurde eine *Nhe* I-Schnittstelle 5' von der *Enhancer*-Sequenz im LTR von SFFVp(LS) cl5.7 über PCR-gesteuerte Mutagenese eingeführt (Baum *et al.* 1997a). Das entstehende *Nhe* I-*Kpn* I-LTR-Fragment von SFFVp(LS) cl5.7 wurde isoliert und zusammen mit dem *Bam*H I-*Nhe* I-Fragment des LX-abgeleiteten Vektors V-MDR (Hanania *et al.* 1995), der den Polypurin-Trakt und die ersten 31 Basenpaare der 3'-LTR enthält, in den MESV-Vektor p5O-M-neo (zur Verfügung gestellt von Dr. C. Stocking) inseriert, in dem die Sequenzen zwischen *Bam*H I des Polylinkers und *Kpn* I der 3'-LTRs entfernt wurden. Die genaue Sequenz von pSF1 ist in den Nukleotidsequenzdatenbanken unter der Nummer AJ224005 hinterlegt.

Die 3'-LTR von pMO1 und pMO3 stammen aus der LTR von pMO-CAT (Baum *et al.* 1995), herausgeschnitten über die Restriktionsenzyme *Nhe* I und *Kpn* I. Der MESV-Leader zwischen der *Kpn* I- und *Pst* I-Schnittstelle in pMO1 wurde durch das entsprechende Fragment aus V-MDR (LX-abgeleitet) ersetzt, um pMO3 zu generieren.

Die 3'-LTR von pMP1 stammt aus der LTR von pMP-CAT (Baum *et al.* 1995), herausgeschnitten über die Restriktionsenzyme *Nhe* I und *Kpn* I.

4.1.2 Klonierung von Vektoren mit *neo*^R-, *leo*^R-, GFP- und Δ LNGFR-cDNA

Die *neo*^R-cDNA stammt aus p5O-M-neo und wurde über die *Not* I- und *Bam*H I-Schnittstelle in die entsprechenden Vektoren inseriert.

Die *leo*^R-cDNA wurde freundlicherweise von Dr. C. Baum zur Verfügung gestellt. Sie entstand durch Modifikation einer *lacZ-neo*^R-Fusions-cDNA (zur Verfügung gestellt von A. Gossler), indem die Sequenzen 5' der *Sac* I-Schnittstelle von *lacZ* durch die entsprechende Region von pNASS β (CLONTECH, Heidelberg) und 3' der *Sph* I-Schnittstelle von *neo*^R durch die entsprechende Region von *neo*^R aus p5O-M-neo ersetzt wurden. Die Insertion in die entsprechenden Vektoren erfolgte über die *Not* I- und *Bam*H I-Schnittstelle.

Die *kleo^R*-cDNA wurde mittels Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) ausgehend von dem Plasmid SF1 L mit der *leo^R*-cDNA (zur Verfügung gestellt von Dr. C. Baum) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCATGGCGTTTACTTTGACCAACAAG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CCCCAGCGACCAGATGATCACACTCGGG-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 40 s 58°C, 3 min 72°C; 10 min 72°C.

Anschließend erfolgte eine 3-Fragment-Ligation des *Not* I und *Bcl* I verdauten PCR-Produktes zusammen mit einem *Bcl* I-*Hind* III-*leo^R*-Fragment aus SF1 L in den über *Not* I und *Hind* III geöffneten Vektor pSF1, woraus der Vektor pSF1 K resultierte.

Die *GFP*-cDNA wurde mittels Pfu-Polymerase ausgehend von dem Plasmid pEGFP-C1 (CLONTECH, Heidelberg) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-GCGGCCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CTCGATTATCGAGATCTGAGTCCGGACTTGTAC-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 40 s 55°C, 2 min 72°C; 10 min 72°C

und über die *Not* I- und *Hind* III-Schnittstelle in die entsprechenden Vektoren inseriert. Die Sequenzierung ergab eine Abweichung in einer Aminosäure von der in den Datenbanken hinterlegten Sequenz (TTC²⁵⁵_{Phe} → TTA²⁵⁵_{Lys}; neben stummer Mutation C²⁹⁷ → A²⁹⁷). Diese Aminosäuresubstitution wirkte sich negativ auf die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp aus (nicht gezeigt).

Die *ΔLNGFR*-cDNA wurde mittels Pfu-Polymerase ausgehend von dem Plasmid R250-MESV-*ΔLNGFR*-SA-MNEO (zur Verfügung gestellt von Boehringer Mannheim, Mannheim) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-GCGGCCGCATGGGGGCAGGTGCCACCGGCC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CGCGCGAACAGAAGCGAGAAG-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 40 s 55°C, 2 min 72°C; 10 min 72°C

und über die *Not* I- und *Hind* III-Schnittstelle in die entsprechenden Vektoren inseriert.

4.1.3 Klonierung der Vektoren pSF1 MSN, pSF1 MIN und pSF1 MIL

Zur Konstruktion des Spleißvektors *pSF1 MSN* wurde der retrovirale Spleißakzeptor einschließlich flankierender retroviraler Sequenzen von SFFVpLS aus dem Plasmid pSF5+3 (Ahlers *et al.* 1994; Baum *et al.* 1995) als 600-bp-Fragment über die Schnittstellen *Sal* I und *Not* I herausgeschnitten und zusammen mit der 4,1-kbp-MDR1-cDNA, isoliert über die Schnittstellen *Not* I und *Sal* I aus dem Plasmid pMP-MDR (Baum *et al.* 1995) in das über *Not* I 5' der *neo^R*-cDNA geöffnete Plasmid pSF1N inseriert.

Eine ähnliche Strategie führte zu dem IRES-Vektor *pSF1 MIN* unter Verwendung der 640-bp-Poliiovirus-IRES, herausgeschnitten über *Sal* I und *Not* I aus pSBC-1 (Dirks *et al.* 1993).

Das MDR1 *Not* I-*Sal* I-Fragment zusammen mit dem IRES-*Sal* I-*Not* I-Fragment wurden auch in das über *Not* I geöffnete Plasmid pSF1L inseriert, wodurch *pSF1 MIL* entstand.

4.1.4 Klonierung der Vektoren pSF1 mS δ , pSF1 mE δ und pSF1 m β δ

Diese MDR1-Koexpressionsvektoren unterscheiden sich von den MDR1-*neo*^R-Koexpressionsvektoren darin, daß sämtliche untranslatierten Bereiche aus der MDR1-cDNA entfernt wurden und das Startcodon mit einer optimalen Kozak-Konsensussequenz im Kontext des Restriktionsenzym *Not* I versehen wurde. Realisiert wurde dies mittels PCR mit Pfu Polymerase mit pSF-MDR als Matrize unter folgenden Bedingungen:

Vorwärtsprimer: 5'-GCGGCCGCCATGGATCTTGAAGGGGACCGC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-TACCGTCGACGTATCGATAAG-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 30 s 50°C, 10 min 72°C; 30 min 72°C

Zwecks Konstruktion des Spleißvektors **pSF1 mS δ** wurde der zuvor beschriebene Vektor pSF1 Δ LNFR über *Not* I 5' der Δ LNFR-cDNA geöffnet und die *Not* I-*Sal* I-geschnittene 3,9-kbp-MDR1-cDNA, deren untranslatierte 5'- und 3'-Bereiche entfernt wurden, zusammen mit dem oben beschriebenen *Sal* I-*Not* I-SFFVp-Spleißakzeptor-Fragment in den Vektor inseriert.

Eine ähnliche Strategie führte zu dem EMCV-IRES-Koexpressionsvektor **pSF1 mE δ** , wobei ein *Xho* I-*Not* I-EMCV-IRES-Fragment über PCR mit Pfu Polymerase - ausgehend von pBS-ECAT (zur Verfügung gestellt von Dr. C. Stocking) - unter folgenden Bedingungen generiert wurde:

Vorwärtsprimer: 5'-CCGGCTCGAGGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGATTATCATCGTGTTTTTCAAAGG-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 50 s 55°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C

Für die Klonierung des β -Actin-internen-Promotor-Vektors **pSF1 m β δ** wurde der β -Actin-Promotor (Quitschke *et al.* 1989) als *Sal* I-*Not* I-Fragment zusammen mit der *Not* I-*Sal* I-geschnittenen 3,9-kbp-MDR1-cDNA in den über *Not* I geschnittenen Vektor pSF1 Δ LNFR inseriert.

4.1.5 Klonierung der Leader-Varianten

Für die Klonierung des **GR** Vektors wurde die *Leader*-Region des Basisvektors pSF1 unter folgenden Bedingungen mittels PCR mit Pfu Polymerase amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-GTGCCGGCATCTAATGTTTGCGCCTGCG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTAATTTTCAGACAAATACAGAAACACAGTC-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 30 s 50°C, 10 min 72°C; 30 min 72°C

Das entstehende Produkt wurde in das Plasmid Bluescript pKS(+) subkloniert. Anschließend wurde wieder ein Teil des Produktes über *Bgl* II und *Not* I aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten und in den über *Bgl* II und *Not* I geöffneten Basisvektor pSF1 inseriert. Hieraus resultierte der GR Basisvektor. In diesen wurden über *Not* I und *Hind* III die GFP cDNA (GR GFP; s. 4.1.2) und über *Not* I und *Bam*H I die NPTII-cDNA (GR neo; s. 4.1.2), die MDR1-cDNA (GR m; s. 4.1.4) und die *kleo*^R-cDNA (GR K; s. 4.1.2) inseriert.

Zwecks Konstruktion des **GRS** Vektors wurde die *Leader*-Region des Basisvektors pSF1 unter folgenden Bedingungen mittels PCR mit Pfu Polymerase amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-GTGCCGGCATCTAATGTTTGCGCCTGCG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GTCCGGTCGACCTAATTTTCAGACAAATACAGAAACACAGTC3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 30 s 50°C, 10 min 72°C; 30 min 72°C

Das entstehende Produkt wurde in das Plasmid Bluescript pKS(+) subkloniert. Anschließend wurde wieder ein Teil des Produktes über *Bgl* II und *Sal* I aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten.

Die Sequenz des Spleißakzeptorsignales wurde dem SFFVp entlehnt, wobei die Consensus-Sequenz der sogenannten *branch site* leicht modifiziert wurde (C→G-Substitution). Es wurden 2 komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, flankiert von einer *Sal* I- (5') und *Not* I- (3') -Schnittstelle, mit folgenden Sequenzen (vgl. Abbildung 52):

SA-Oligo(+) : 5'-TCGACAAAGTTAA**G**TAATAGTCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGC-3'

SA-Oligo(-) : 5'-GGCCGCCTGTAAGTGAGCTTGGAGAGAGGGACTATTAC**T**TTAACTTTG-3'

Es erfolgte ein *annealing* der beiden Oligonukleotide unter folgenden Bedingungen:

20 µl SA-Oligo(+) (50 pmol/µl)

20 µl SA-Oligo(-) (50 pmol/µl)

2,5 µl 4 mol/l NaCl

ad 100 µl TE (pH 8,0)

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte eine 3-Fragment-Ligation des *Bgl* II und *Sal* I verdauten PCR-Produktes mit dem annealten, doppelsträngigen Spleißakzeptoroligonukleotid (mit den Schnittstellen *Sal* I und *Not* I) in den über *Bgl* II und *Not* I geöffneten Vektor pSF1 N. Hieraus resultierte der GRS neo Vektor. Über *Not* I und *Hind* III erfolgte anschließend ein Austausch der NPTII-cDNA gegen die GFP cDNA (GRS GFP; s. 4.1.2), und über *Not* I und *Bam*H I ein Austausch der NPTII-cDNA gegen die MDR1-cDNA (GRS m; s. 4.1.4) und die *kleo*^R-cDNA (GRS K; s. 4.1.2).

Um den Basisvektor **ΔAG** zu konstruieren, wurde das letzte im 5'-untranslatierten Bereich des GRS neo Vektors befindliche ATG-Startkodon mutiert. Dies geschah unter Verwendung einer PCR-gestützten ortsspezifischen Mutagenese (QuikChange *site-directed mutagenesis* Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg). Zu diesem Zweck wurde eine PCR gemäß Herstellerangaben mit GRS neo als Matrize unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Vorwärtsprimer: 5'-GTGCCGGCATCTA**G**TGTTTGCGCCTGCG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CGCAGGCGCAAACA**C**TAGATGCCGGCAC-3'

Matrize: GRS neo

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 60 s 55°C, 10 min 68°C; 10 min 72°C

Hieraus resultierte der Vektor ΔAG neo. Über *Not* I und *Hind* III erfolgte anschließend ein Austausch der NPTII-cDNA gegen die GFP-cDNA (GRS GFP; s. 4.1.2).

Zur Konstruktion des MFG-analogen Vektors **G+P+** wurde eine PCR mit der MoMLV cDNA (zur Verfügung gestellt von Dr. C. Stocking) als Matrize unter Verwendung von Pfu Polymerase unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Vorwärtsprimer: 5'-CCGCTCGAGCATATGAGATCTTATATGGGGCACC-3'

Rückwärtsprimer 5'-ATAGTTTTAGCGCCGCAGTCTAGAGGATGGTCCACCCCGG-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 40 s 95°C, 50 s 55°C, 1 min 72°C; 5 min 72°C

Das PCR-Produkt wurde mit *Xho* I and *Not* I verdaut und in den über *Sal* I und *Not* I geöffneten Basisvektor pSF1 inseriert. Hieraus resultierte der G+P+ Basisvektor. In diesen wurden über *Not* I und *Hind* III die GFP cDNA (GR GFP; s. 4.1.2) und über *Not* I und *Bam*H I die MDR1-cDNA (GR m; s. 4.1.4) und die *kleo*^R-cDNA (GR K; s. 4.1.2) inseriert.

Um den Vektor **GRP+** zu klonieren, wurde die *Leader*-Region des Basisvektors pSF1 unter folgenden Bedingungen mittels PCR mit Pfu Polymerase amplifiziert:

Vorwärtsprimer: 5'-GTGCCGGGCATCTAATGTTTGCGCCTGCG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GTCCGCTCGAGCTAATTTTCAGACAAATACAGAAACACAGTC3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 30 s 95°C, 30 s 50°C, 10 min 72°C; 30 min 72°C

Das entstehende Produkt wurde in das Plasmid Bluescript pKS(+) subkloniert. Anschließend wurde wieder ein Teil des Produktes über *Bgl* II und *Xho* I aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten und zusammen mit dem gleichen *Xho* I und *Not* I verdauten *pol*-PCR-Produkt, das für die Konstruktion des Vektors G+P+ verwendet wurde, in den über *Bgl* II und *Xho* I verdauten Vektor G+P+ inseriert. In den hieraus resultierenden Basisvektor GRP+ wurden über *Not* I und *Hind* III die GFP cDNA (GR GFP; s. 4.1.2) und über *Not* I und *Bam*H I die MDR1-cDNA (GR m; s. 4.1.4) und die *kleo*^R-cDNA (GR K; s. 4.1.2) inseriert.

Für die Klonierung des Vektors **GRΔS** mit Mutation des retroviralen Spleißdonors wurde eine PCR-gestützte ortsspezifische Mutagenese (QuikChange *site-directed mutagenesis* Kit) gemäß Herstellerangaben unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Matrize G+ neo bzw. GR neo

Vorwärtsprimer 5'-ACCGACCCCCCGCCGGGA**ACT**AAGCTGGCCAGCGGTTCGTT-3'

Rückwärtsprimer 5'-AACGACCGCTGGCCAGCTTA**GTT**CCCGCGGGGGGGTTCGGT-3'

5 min 95°C; 30 Zyklen 40 s 95°C, 50 s 55°C, 1 min 72°C; 5 min 72°C Über *Not* I und *Hind* III erfolgte anschließend ein Austausch der NPTII-cDNA gegen die GFP-cDNA (GRS GFP; s. 4.1.2).

4.1.6 Klonierung der MDR-Spleiß-Varianten

Alle Mutagenesen wurden (abgesehen von den jeweils eingesetzten Primerpaaren) unter identischen Bedingungen gemäß den Herstellerangaben (QuikChange *site-directed mutagenesis* Kit) durchgeführt:

100 ng pKS m1	95°C	5 min
10 pmol Vorwärtsprimer	30 Cyclen mit	
10 pmol Rückwärtsprimer	95°C	30 s
80 µmol/l dNTP	55°C	60 s
5 µl 10x Pfu-PCR-Puffer	68°C	10 min
1 µl native Pfu-DNA-Polymerase	68°C	20 min
ad 50 µl H ₂ O		

Folgende Primerpaare wurden für die Mutagenese verwendet:

Mutagenese von **SD1**

MUT/MDR1/SD1+ (Primer A) : 5'-GAA GAC ATG ACC AGA TAT GCC TAT TAT TAC-3'

MUT/MDR1/SD1- (Primer B) : 5'-GTA ATA ATA GGC ATA TCT GGT CAT GTC TTC-3'

Mutagenese von **SA1**

MUT/MDR1/SA1+ (Primer A) : 5'-CA TTT TTC CTT CAA GGT TTC ACA TTT GGC-3'

MUT/MDR1/SA1- (Primer B) : 5'-GCC AAA TGT GAA ACC TTG AAG GAA AAA TG-3'

Das Plasmid pKS m1 enthält die Wildtyp-MDR1-cDNA, pKS m2 die SD1-Mutation, pKS m3 die SA1-Mutation und pKS m23 die SD1- und SA1-Mutation. Zur Klonierung der monocistronischen G+ und GRS MDR1-Vektoren wurden anschließend die entsprechenden MDR1-cDNA-Varianten über *Not* I und *Bam*H I in die entsprechend geöffneten G+ und GRS Vektoren inseriert; die Klonierung der bicistronischen MDR1-*neo*^R-Koexpressionsvektoren erfolgte analog 4.1.4 unter Verwendung der entsprechenden MDR1-cDNA-Varianten.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Zellkultivierung

Kultivierung und Klonierung der permanenten Zellen sowie Quellen, Anreicherung und Klonierung der Primärzellen erfolgte wie beschrieben (Baum *et al.* 1995; Eckert *et al.* 1996; Fehse *et al.* 1997).

4.2.2 Anlegen von Verpackungszelllinien

Insgesamt fanden drei retrovirale Verpackungszelllinien Verwendung: GP+E-86 (ökotropes Hüllprotein), GP+envAm12 (amphotropes Hüllprotein) und PG13 (GALV-Hüllprotein). Um amphotrope bzw. GALV-abgeleitete Verpackungszelllinien anzulegen, wurden 10 µg retroviraler Vektorplasmid-DNA in GP+E-86 Zellen elektroporiert (Baum *et al.* 1994) und der Überstand zur Transduktion von GP+envAm12 bzw. PG13 Zellen eingesetzt. Selektiert wurde für *neo*^R-Produzenten mit 0,4 mg/ml G418 (GIBCO-BRL) bzw. 20 ng/ml Colchicin (Sigma) für MDR1-Produzenten.

Alternativ wurden Verpackungszelllinien auch mittels Calciumphosphat gemäß Ausubel *et al.* 1994 oder dem Transfektionsreagens DAC-30 (Eurogentec, Belgien) gemäß Herstellerangaben transfiziert, wobei für GP+envAm12 bzw. PG13 Zellen die gleichen Bedingungen verwendet wurden.

4.2.3 Vektortitrierung in Endpunktverdünnung zellfreier Zellkulturmediumüberstände

Am Vortag der Titrierung wurde eine konfluente 9-cm-Schale des Virusproduzenten mit 5 ml frischem Medium (IMDM + 10% hitzeinaktiviertes FCS) gefüttert. Parallel wurden 10 000 Zielzellen in jeweils eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte eingesät. Am nächsten Tag wurde der virushaltige Überstand durch ein 1,2 µm-Filter sterilfiltriert und serielle 1:5-Verdünnungen in IMDM + 10% hitzeinaktiviertem FCS + 4 µg/ml Polybrene angesetzt. Daraufhin wurde das Medium der 24-Loch-Platte entfernt und in Dreifachbestimmung 1 ml virushaltiger Überstand der entsprechenden Verdünnungsstufe aufgelegt gemäß folgendem Schema:

1:125	1:125	1:125	1:78125	1:78125	1:78125
1:625	1:625	1:625	1:309625	1:309625	1:309625
1:3125	1:3125	1:3125	1:1953125	1:1953125	1:1953125
1:15625	1:15625	1:15625	kein Virus	kein Virus	kein Virus

Am folgenden Tag wurde das Medium der 24-Loch-Platte entfernt und die Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium (0,4 mg/ml G418 bei der Bestimmung von GTU, 20 ng/ml Colchicin bei der Bestimmung von MTU) gefüttert. Dies wurde alle 2 Tage wiederholt, bis sich keine lebenden Zellen in den Vertiefungen ohne Virusüberstand mehr befanden.

Überlebende Klone wurden als G418-Resistenz-Transfer-Einheiten (GTU) bzw. MDR-Transfer-Einheiten (MTU) 10 bis 14 Tage nach Transduktion ausgezählt, wobei sich der Titer durch Multiplikation der Anzahl der Klone in einer bestimmten Vertiefung mit der entsprechenden Verdünnungsstufe ergibt. Befindet sich zum Beispiel bei der 1:78125-Verdünnung im Durchschnitt ein Klon in jeder Vertiefung, so betrüge der Gesamttiter 78125 ($\approx 8 \cdot 10^4$).

4.2.4 Infektion von Zielzellen

Hämatopoetische Zielzellen wurden entweder in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ /ml ohne Polybrene mit den entsprechenden retroviralen Überständen bei einer MOI (*multiplicity of infection*) < 1 infiziert oder für zwei Tage mit letal (15 min; Cobalt-Strahlenquelle) bestrahlten Produzentenzellen ebenfalls bei einer MOI < 1 kokultiviert.

4.2.5 Durchflußzytometrie / fluorometrische Analysen

Durchflußzytometrische Analysen wurden mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) unter Verwendung der Software CellQuest (Becton Dickinson) ausgeführt. Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (FACS) fand mittels eines MoFlo-Sortierers (Cytomation Inc., Fort Collins, Colorado) statt. Beide Geräte waren mit einem 488-nm Argon-Ionen-Laser ausgestattet.

Die konfokalen lasermikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leica-Konfokal-Lasermikroskop (Leica GmbH, Bensheim) durchgeführt, das mit einem Argon/Krypton-Laser und einem $63 \times 1,4$ N. A. Objektiv ausgestattet war.

Der unmarkierte sowie R-Phycoerythrin-konjugierte UIC2-Antikörper wurde von Coulter Immunotech GmbH, Hamburg bezogen, ebenso wie der verwendete R-Phycoerythrin-konjugierte Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper. Der biotinylierte monoklonale Anti-LNGFR-Antikörper wurde freundlicherweise von B. Koch (Boehringer Mannheim) zur Verfügung gestellt. Das verwendete FITC- und CyChromegekoppelte Streptavidin stammte von PharMingen GmbH, Hamburg.

Für den Rhodamin-123-Efflux-Versuch wurden 10^6 K562 in 2 ml Medium mit 10 µg/ml Rh123 (Sigma) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 5 ml PBS wurden die Zellen für weitere 2 Stunden in 2 ml Medium bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte das Ausschleusen von Rh123 aus den Zellen. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und an dem FACSCalibur analysiert, wobei die Rh123-Fluoreszenz auf dem Fluoreszenz-Kanal 1 gemessen wurde. Sofern die Zellen MDR1 exprimieren, wird Rh123 aus den Zellen ausgeschleust, die Fluoreszenz der Zellen ist dementsprechend geringer.

4.3 diagnostische PCRs

4.3.1 Nachweis von MDR1-Rearrangements bzw. kryptischem Spleißen in SF1 MSN transduzierten und G418 vorselektierten K562 Zellen

Unter Verwendung des *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim) wurde genomische DNA aus den entsprechenden Zellen gemäß Herstellerangaben isoliert und 200 ng über PCR (Qiagen *PCR Core Kit*, Qiagen GmbH, Hilden) unter folgenden Bedingungen analysiert:

- a) PCR1
Vorwärtsprimer MSN 938+ 5'-GTCTGCTGCAGCATCGTTC-3'
Rückwärtsprimer MSN 3951- 5'-GCCAAATGTGAAACCTTGAAGGAAAAATG-3'
- b) PCR2
Vorwärtsprimer MSN 1942+ 5'-GTAATAATAGGCATATCTGGTCATGTCTTC-3'
Rückwärtsprimer MSN 4936- 5'-G AACATTCAGTCGCTTAATTTCTTTGCCATC-3'
- c) PCR3
Vorwärtsprimer MSN 3923+ 5'-CATTTTTCTTCAAGGTTTCACATTTGGC-3'
Rückwärtsprimer MSN 6273- 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTTC-3'

5 min 95°C; 35 Cyclen 40 s 94°C, 40 s 58°C, 5 min 72°C; 10 min 72°C

4.3.2 Nachweis der Leader-Spleißprodukte von G+ m und GRS m

RNA wurde mittels *High Pure RNA Isolation Kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim) gemäß Herstellerangaben isoliert aus untransduzierten K562 Zellen sowie aus G+ m bzw. GRS m transduzierten und 20 ng/ml Colchicin selektierten K562 Zellen. Anschließend wurde eine RT-PCR mit dem *Titan[®] One Tube RT-PCR-Kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim) gemäß Herstellerangaben durchgeführt mit folgenden Primern:

Vorwärtsprimer: 5'-TCTCCTCAGATTGATTGACTGC-3' (annealt bei bp 234 von pSF1)
Rückwärtsprimer: 5'-TTCCTGCATTTGCAAAGATATC-3' (annealt bei bp 250 des MDR1-ORF)

4.3.3 Nachweis der partiellen Deletion des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors

Unter Verwendung des *High Pure PCR Template Preparation Kit* wurde genomische DNA aus über GP+envAm12 mit G+ mSN bzw. G+ m3SN transduzierten, G418 vorselektierten K562 Zellen gemäß Herstellerangaben isoliert und 100 ng über PCR unter folgenden Bedingungen analysiert:

Vorwärtsprimer: 5'-ATGGATCTTGAAGGGGACCGC-3' (annealt bei bp 1 des MDR1-ORF)
Rückwärtsprimer: 5'-TCAAACCTTCTGCTCCTGAGTC-3' (annealt bei bp 2750 des MDR1-ORF)

5 min 95°C; 35 Cyclen 40 s 94°C, 40 s 55°C, 5 min 72°C; 10 min 72°C

4.3.4 Nachweis zusätzlicher Spleißstellen in G+ m2SN transfizierten PG13 Zellen mittels RT-PCR

RNA wurde mittels *High Pure RNA Isolation Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert aus untransfizierten PG13 Zellen und G+ m2SN transfizierten PG13 und GP+envAm12 Zellen. Anschließend wurde eine RT-PCR mit dem *TitanÔ One Tube RT-PCR-Kit* gemäß Herstellerangaben durchgeführt mit folgenden Primern:

Vorwärtsprimer: 5'-ATGGATCTTGAAGGGGACCGC-3' (annealt bei bp 1 des MDR1-ORF)

Rückwärtsprimer: 5'-TCAAACCTTCTGCTCCTGAGTC-3' (annealt bei bp 2750 des MDR1-ORF)

5. Literaturübersicht

M. A. ADAM, N. RAMESH, A. D. MILLER, W. R. A. OSBORNE (1991). Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions. *J. Virol.* 65, 4985-4990.

N. AHLERS, N. HUNT, U. JUST, C. LAKER, W. OSTERTAG, J. NOWOCK (1994). Selectable retrovirus vectors encoding Friend virus gp55 or erythropoietin induce polycythemia with different phenotypic expression and disease progression. *J. Virol.* 68, 7235-7243

E. AKGÜN, M. ZIEGLER, M. GREZ (1991). Determinants of retrovirus gene expression in embryonal carcinoma cells. *J. Virol.* 65, 382-388

B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York.

E. W. ALTON, D. M. GEDDES (1995). Gene therapy for cystic fibrosis: a clinical perspective. *Gene Ther.* 2, 88-95

W. F. ANDERSON, G. J. MCGARRITY, R. C. MOEN (1993). Report to the NIH recombinant DNA advisory committee on murine replication competent retrovirus (RCR) assay. *Hum. Gene Ther.* 4, 311-321

J. M. ARAN, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1994). Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3176-3180.

D. ARMENTANO, S. F. YU, P. W. KANTOFF, T. VON RÜDEN, W. F. ANDERSON, E. GILBOA (1987). Effect of internal viral sequences on the utility of retroviral vectors. *J. Virol.* 61, 1647-1650

P. ARTELT, R. GRANNEMANN, C. STOCKING, J. FRIEL, J. BARTSCH, H. HAUSER (1991). The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene* 99, 249-254.

I. AUSUBEL, M. FREDERICK (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York

G. BACH, R. FRIEDMAN, B. WEISSMANN, E. F. NEUFELD (1972). The defect in the Hurler and Scheie syndromes: deficiency of α -L-iduronidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2048-2051

A. BACHMAIR, D. FINLEY, A. VARSHAVSKY (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186

- S. BANERJEE, E. LIVANOS, J. M. H. VOS (1995). [Therapeutic gene delivery in human B-lymphocytes with engineered Epstein-Barr virus](#). *Nature Med.* 1, 1303-1308
- C. BAUM, P. FORSTER, S. HEGEWISCH-BECKER, K. HARBERS (1994). [An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines](#). *BioTechniques* 17, 1058-1062
- C. BAUM, S. HEGEWISCH-BECKER, H. G. ECKERT, C. STOCKING, W. OSTERTAG (1995). [Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance \(MDR1\) gene in early hematopoietic cells](#). *J. Virol.* 69, 7541-754
- C. BAUM, G. P. MARGISON, H. G. ECKERT, L. J. FAIRBAIRN, W. OSTERTAG, J. A. RAFFERTY (1996a). [Gene transfer to augment the therapeutic index of anticancer chemotherapy \(editorial\)](#). *Gene Ther.* 3, 1-3.
- C. BAUM, H. G. ECKERT, M. STOCKSCHLÄDER, U. JUST, S. HEGEWISCH-BECKER, M. HILDINGER, A. UHDE, J. JOHN, W. OSTERTAG (1996b). [Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection](#). *J. Hematother.* 5, 323-329.
- C. BAUM, H. G. ECKERT, C. STOCKING, W. OSTERTAG (1996c). [Activity of Friend mink cell focus-forming retroviruses during myelo-erythroid hematopoiesis](#). *Exp. Hematol.* 24, 364-370.
- C. BAUM, H. G. ECKERT, W. OSTERTAG (1996d). [Contribution of the retroviral leader to gene transfer and expression in packaging cells and myeloid stem and progenitor cells](#). In *Gene Technology*. A. Zander, W. Ostertag, B. V. Afanasiev, F. Grosveld, eds. NATO ASI Series, Vol H 94. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg) pp. 219-228.
- C. BAUM, W. OSTERTAG (1996e). [Somatischer Gentransfer in der Onkologie](#). In: *Onkologie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen*. Zeller, zur Hausen (eds.). ecomed Verlag, Landsberg
- C. BAUM (1997a). [The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is goverend by aq binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF](#). *J. Virol.* 71, 6323-6331
- C. BAUM, C. STOCKING, T. WAGENER, H. G. ECKERT, W. OSTERTAG (1997b). [Gene transfer and transgene expression in hematopoietic cells](#). In: *Concepts in Gene Therapy*, M. Strauss. & J. A. Barranger (eds.), DeGruyter, Berlin
- C. BAUM, N. HUNT, M. HILDINGER, H. G. ECKERT, H. ZAEHRES, A. RICHTERS, W. OSTERTAG (1998). [Cis-elements of Friend-SFFVp: role in disease induction and utility in retroviral vectors](#). *Acta Haem.* 99, 156-164

G. BECK-ENGESER, C. STOCKING, U. JUST, L. ALBRITTON, M. DEXTER, E. SPOONCER, W. OSTERTAG (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.](#) Hum. Gene Ther. 2, 61-70

M. A. BENDER, T. D. PALMER, R. E. GELINAS, A. D. MILLER (1987). [Evidence that the Packaging Signal of Moloney Murine Leukemia Virus Extends into the gag region.](#) J. Virol. 61, 1639-1646

R. BERKOWITZ, J. FISHER, S. P. GOFF (1996). [RNA packaging.](#) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214, 177-218

C. BERLIOZ, J. L. DARLIX (1995). [An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors.](#) J. Virol. 69, 2214-2222

R. K. BESTWICK, S. L. KOZAK, D. KABAT (1988). [Overcoming interference to retroviral superinfection results in amplified expression and transmission of cloned genes.](#) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5404-5408

J. BILELLO, G. COLLETTA, G. WARNECKE, G. KOCH, D. FRISBY, I. B. PRAGNELL, W. OSTERTAG (1980). [Analysis of the expression of spleen focus-forming virus \(SFFV\)-related RNA and gp55, a Friend and Rauscher virus-specific protein.](#) Virology 107, 331-334.

C. BONINI, G. FERRARI, S. VERZELETTI, P. SERVIDA, E. ZAPPONE, L. RUGGIERI, M. PONZONI, S. ROSSINI, F. MAVILIO, C. TRAVERSARI, C. BORDIGNON (1997). [HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia.](#) Science 276, 1719-1724 (1997).

A. M. BORMAN, P. Le MERCIER, M. GIRARD, K. M. LEAN (1997). [Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins.](#) Nucleic Acid Research 25, 925-932

S. E. BRAUN, K. CHEN, M. BATTIWALLA, K. CORNETTA (1997). [Gene therapy strategies for leukemia.](#) Mol. Med. Today 3, 39-46

G. BREWER (1993). [Post-transcriptional considerations of gene expression: translation, mRNA stability and poly\(A\) processing.](#) In: Gene therapeutics, Jon A. Wolff (ed.), Birkhäuser Verlag, Boston

K. BUNTING, J. GALIPEAU, D. TOPHAM, E. BENAÏM, B. SORRENTINO (1998). [Transduction with an MDR-1 retrovirus enables dramatic expansion of murine repopulating cells *in vitro*, but results in abnormal myeloproliferation in some transplanted mice.](#) 1st Annual Meeting ASGT, 186a

A. J. CANN (1993). [Principles of molecular virology.](#) Academic Press, London

- P. M. CHALLITA, D. SKELTON, A. EL-KHOUEIRY, X. J. YU, K. WEINBERG, D. B. KOHN (1995). Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased methylation in embryonic carcinoma cells. *J. Virol.* 69, 748-755
- G. CHEN, G. E. DURAN, K. A. STEGER, N. J. LACAYO, J. P. JAFFREZOU, C. DUMONTET, B. I. SIKIC (1997). Multidrug-resistant human sarcoma cells with a mutant P-glycoprotein, altered phenotype, and resistance to cyclosporins. *J. Biol. Chem.* 272, 5974-5982
- K. H. CHOI, C. J. CHEN, M. KRIEGLER, I. B. RONINSON (1988). An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529
- H. CHONG, W. STARKEY, R. G. VILE (1998). A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences. *J. Virol.* 72, 2663-2670
- M. CIANFRIGLIA, F. POLONI, C. SIGNORETTI, G. ROMAGNOLI, M. TOMBESI, F. FELICI (1996). Topology of MDR1-P-glycoprotein as indicated by epitope mapping of monoclonal antibodies to human MDR cells. *Cytotechnology* 19, 247-251
- J. M. COFFIN (1996). *Retroviridae: the viruses and their replication*. In: *Fundamental Virology*, Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 763-844
- J. COLICELLI, S. P. GOFF (1987). Isolation of a recombinant murine leukemia virus utilizing a new primer tRNA. *J. Virol.* 64, 369-379
- E. CONNEALLY, J. CASHMAN, A. PETZER, C. EAVES (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9836-9841
- E. CONNEALLY, C. J. EAVES, R. K. HUMPHRIES (1998). Efficient retroviral-mediated gene transfer to human cord blood stem cells with in vivo repopulating potential. *Blood* 91, 3487-3493
- B. J. CULLITON (1989). *Gore Tex organoids and genetic drugs*. *Science* 246, 747-749
- G. U. DACHS, G. J. DOUGHERTY, I. J. STRATFORD, D. J. CHAPLIN (1997). Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol. Res.* 9, 313-325
- B. M. DAVIS, O. N. KOC, K. LEE, S. L. GERSON (1996). Current progress in the gene therapy of cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 8, 499-508

- A. B. DEISSEROTH, J. KAVANAGH, R. CHAMPLIN (1994). [Clinical protocol: Use of safety-modified retroviruses to introduce chemotherapy resistance sequences into normal hematopoietic cells for chemoprotection during the therapy of ovarian cancer: a pilot trial.](#) *Hum. Gene Ther.* 5, 1507-1522
- A. B. DEISSEROTH, F. HOLMES, G. HORTOBAGYI, R. CHAMPLIN (1996). [Clinical protocol: Use of safety-modified retroviruses to introduce chemotherapy resistance sequences into normal hematopoietic cells for chemoprotection during the therapy of breast cancer: a pilot trial.](#) *Hum. Gene Ther.* 7, 401-416
- S. DEVEREUX, C. CORNEY, C. MACDONALD, M. WATTS, A. SULLIVAN, A. H. GOLDSTONE, M. WARD, A. BANK, D. C. LINCH (1998). [Feasibility of multidrug resistance \(MDR-1\) gene transfer in patients undergoing high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma.](#) *Gene Therapy* 5, 403-408
- P. DE FELIPE, V. MARTÌN, M. L. CORTÈS, M. RYAN, M. IZQUIERDO (1999). [Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy.](#) *Gene Therapy* 6, 198-208
- T. M. DEXTER (1979). [Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review.](#) *Acta Haematol.* 62, 299-305
- T. M. DEXTER, E. SPOONER (1987). [Growth and differentiation in the hemopoietic system.](#) *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 423-441
- M. DICATO, C. DUHEM, M. PAULY, F. RIES (1997). [Multidrug resistance: molecular and clinical aspects.](#) *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 3, 91-99
- J. E. DICK (1996). [Human stem cells assays in immune-deficient mice.](#) *Curr. Opin. Hematol.* 3, 405-409
- L. DING, S. LU, N. C. MUNSHI (1997). [In vitro packaging of an infectious recombinant adeno-associated virus 2.](#) *Gene Ther.* 4, 1167-1172
- W. DIRKS, M. WIRTH, H. HAUSER (1993). [Discistronic transcription units for gene expression in mammalian cells.](#) *Gene* 128, 247-249
- M. DIXON, E. C. WEBB (1979). [Enzymes](#) (Academic Press).
- D. C. DOOLEY, P. LAW (1992). [Detection and quantitation of long-term culture-initiating cells in normal peripheral blood.](#) *Exp. Hematol.* 20, 156-160

- J. H. DOROSHOW, M. Z. METZ, L. MATSUMOTO, K. A. WINTERS, M. SAKAI, M. MURAMATSU, S. E. KANE (1995). Transduction of NIH 3T3 cells with a retrovirus carrying both human MDR1 and glutathione S-transferase π produces a broad-range multidrug resistance. *Cancer Res.* 55, 4073-4078
- M. L. DRUMM, H. A. POPE, W. H. CLIFF, J. M. ROMMENS, S. A. MARVIN, L. C. TSUI, F. S. COLLINS, R. A. FRIZZELL, J. M. WILSON (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus mediated gene transfer. *Cell* 62, 1227-1233
- C. J. EAVES, H. J. SUTHERLAND, J. D. CASHMAN, T. OTSUKA, P. M. LANSDORP, R. K. HUMPHRIES, A. C. EAVES, D. E. HOGGE (1991). Regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term marrow culture. *Semin. Hematol.* 28, 126-131
- C. EAVES, C. MILLER, J. CASHMAN, E. CONNEALLY, A. PETZER, P. ZANDSTRA, A. EAVES (1997). Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem Cells* 15 Suppl 1, 1-5
- H. G. ECKERT, M. STOCKSCHLÄDER, U. JUST, S. HEGEWISCH-BECKER, M. GREZ, A. R. ZANDER, W. OSTERTAG, C. BAUM (1996). High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood* 88, 3407-3415
- M. EMERMAN, H. M. TEMIN (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* 39, 449-467.
- L. P. ENCELL, M. M. COATES, L. A. LOEB (1998). Engineering human DNA alkyltransferase for gene therapy using random sequence mutagenesis. *Cancer Res.* 58, 1013-1020
- B. FEHSE, A. UHDE, N. FEHSE, H. G. ECKERT, J. CLAUSEN, R. RÜGER, S. KOCH, W. OSTERTAG, A. R. ZANDER, M. STOCKSCHLÄDER (1997). Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (Δ LNGFR) gene. *Hum. Gene Ther.* 8, 1815-1824
- J. K. FINK, P. H. CORRELL, L. K. PERRY, R. O. BRADY, S. KARLSSON (1990). Correction of glucocerebrosidase deficiency after retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells from patients with Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2334-2338
- M. E. FOX, M. J. LEMMON, M. L. MAUCLINE, T. O. DAVIS, A. J. GIACCIA, N. P. MINTON, J. M. BROWN (1996). Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther.* 3, 173-178
- T. FRIEDMANN, R. ROBLIN (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949-955

J. FRIEL, C. STOCKING, A. STACEY, W. OSTERTAG (1987). A temperature-sensitive mutant of the myeloproliferative sarcoma virus, altered by a point mutation in the mos oncogene, has been modified as a selectable retroviral vector. *J. Virol.* 61, 889-897

J. FRIEL, D. HUGHES, I. PRAGNELL, C. STOCKING, C. LAKER, J. NOWOCK, W. OSTERTAG, R. A. PADUA (1990). The malignant histiocytosis sarcoma virus, a recombinant of Harvey murine sarcoma virus and Friend mink cell focus-forming virus, has acquired myeloid transformation specificity by alterations in the long terminal repeat. *J. Virol.* 64, 369-378

I. R. GHATTAS, J. R. SANES, J. E. MAJORS (1991). The encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5848-5859.

D. W. GOLDE (1991). The stem cell. *Sci. Am.* 265, 86-93

M. A. GOODELL, M. ROSENZWEIG, H. KIM, D. F. MARKS, M. DEMARIA, G. PARADIS, S. A. GRUPP, C. A. SIEFF, R. C. MULLIGAN, R. P. JOHNSON (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.* 3, 1337-1345

M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.

B. R. GRAVELEY, K. J. HERTEL, T. MANIATIS (1998). A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *EMBO J.* 17, 6747-6756

D. A. GRAY (1991). Insertional mutagenesis: neoplasia arising from retroviral integration. *Cancer Invest.* 9, 295-304

M. GREENBAUM, S. LETOURNEAU, H. ASSAR, R. L. SCHECTER, G. BATIST, D. COURNOYER (1994). Retrovirus-mediated gene transfer of rat glutathione S-transferase Yc confers alkylating drug resistance in NIH 3T3 mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 54, 4442-4447

M. GREZ, E. AKGÜN, F. HILBERG, W. OSTERTAG (1990). Embryonic stem cell virus, a recombinant retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, 9202-9206

C. GRILLOT-COURVALIN, S. GOUSSARD, F. HUETZ, D. M. OJCIUS, P. COURVALIN (1998). Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 9, 862-866

W. H. GÜNZBURG, B. SALMONS (1997). *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

- E. G. HANANIA, S. FU, I. B. RONINSON, Z. ZU, M. M. GOTTESMAN, A. B. DEISSEROTH (1995a). Resistance to taxol chemotherapy produced in mouse marrow cells by safety-modified retroviruses containing a human MDR1-transcription unit. *Gene Ther.* 2, 279-284.
- E. G. HANANIA, S. FU, Z. ZU, S. HEGEWISCH-BECKER, M. KORBLING, J. HESTER, A. DURETT, M. ANDREEF, E. MECHETNER, T. HOLZMEYER, I. B. RONINSON, R. E. GILES, R. BERENSON, S. HEIMFELD, A. B. DEISSEROTH (1995b). Chemotherapy resistance to taxol in clonogenic progenitor cells following transduction of CD34 selected marrow and peripheral blood cells with a retrovirus that contains the MDR-1 chemotherapy resistance gene. *Gene Ther.* 2, 285-194.
- E. G. HANANIA, R. E. GILES, J. KAVANAGH, S. Q. FU, D. ELLERSON, Z. ZU, T. WANG, Y. SU, A. KUDELKA, Z. RAHMAN, F. HOLMES, G. HORTOBAGYI, D. CLAXTON, C. BACHIER, P. THALL, S. CHENG, J. HESTER, J. M. OSTROVE, R. E. BIRD, A. CHANG, M. KORBLING, D. SEONG, R. CO-TE, T. HOLZMAYER, A. B. DEISSEROTH (1996). Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplant hematopoietic recovery following intensive systemic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15346-15351.
- R. G. HAWLEY, A. Z. FONG, B. F. BURNS, T. S. HAWLEY (1992). Transplantable myeloproliferative disease induced in mice by an interleukin 6 retrovirus. *J. Exp. Med.* 176, 1149-1163
- S. HEGEWISCH-BECKER, D. K. HOSSFELD (1996). *Multidrug-Resistenz: Klinische Bedeutung und therapeutische Ansätze*. In: *Onkologie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen*. Zeller, zur Hausen (eds.). ecomed Verlag, Landsberg
- C. HESDORFFER, J. AYELLO, M. WARD, A. KAUBISCH, L. VAHDAT, C. BALMACEDA, T. GARRETT, M. FETELL, R. REISS, A. BANK, K. ANTMAN (1998). Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 16, 165-172
- I. HICKSON, L. J. FAIRBAIRN, N. CHINNASAMY, T. M. DEXTER, G. P. MARGISON, J. RAFFERTY (1996). Protection of mammalian cells against chloroethylating agent toxicity by an O6-benzylguanine-resistant mutant of human O6-alkylguanine-DNAalkyltransferase. *Gene Ther.* 3, 868-877
- F. HILBERG, C. STOCKING, W. OSTERTAG, M. GREZ (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
- M. HILDINGER, H. G. ECKERT, A. J. SCHILZ, J. JOHN, W. OSTERTAG, C. BAUM (1998b). FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Therapy* 5: 1575-1579

- L. H. HWANG, E. GILBOA (1984). Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection. *J. Virol.* 50, 417-424
- P. O. ILYINSKII, R. C. DESROSIERS (1998). Identification of a sequence element immediately upstream of the polypurine tract that is essential for replication of simian immunodeficiency virus. *EMBO J.* 17, 3766-3774
- G. INCHAUSPE (1997). *Gene vaccination for hepatitis C*. Springer Semin. Immunopathol. 19, 211-221
- J. JELINÉK, L. J. FAIRBAIRN, M. DEXTER, J. A. RAFFERTY, C. STOCKING, W. OSTERTAG, G. P. MARGISON (1996). Long-term protection of hematopoiesis against cytotoxic side effects of multiple doses of nitrosoureas by retrovirus-mediated expression of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Blood* 87, 1957-1961
- G. KEMPLER, B. FREITAG, B. BERWIN, O. NANASSY, E. BARKLIS (1993). Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology.* 193, 690-699
- P. W. KANTOFF, D. B. KOHN, H. MITSUYA, D. ARMENTANO, M. SIEBERG, J. A. ZWIEBEL, M. A. EGLITIS, J. R. McLACHLIN, D. A. WIGINTON, J. J. HUTTON *et al.* (1986). Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83, 6563-6567
- M. P. KAVANAUGH, D. G. MILLER, W. ZHANG, W. LAW, S. L. KOZAK, D. KABAT, A. D. MILLER (1994). Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7071-7075
- M. A. KAY, D. LIU, P. M. HOOGERBRUGGE (1997). *Gene therapy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12744-12746
- S. H. KIM, S. S. YU, J. S. PARK, P. D. ROBBINS, C. S. AN, S. KIM (1998). Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J. Virol.* 72, 994-1004
- E. KLEIN, H. BEN-BASSAT, H. NEUMANN, P. RALPH, J. ZEUTHEN, A. POLLIACK, F. VANKY (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int. J. Cancer* 18, 421-431
- R. KNIPPERS (1995). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- S. KOCHANEK, P. R. CLEMENS, K. MITANI, H. H. CHEN, S. CHAN, C. T. CASKEY (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5731-5736

- M. KOZAK (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870
- W. J. KRALL, D. C. SKELTON, X. J. YU, I. RIVIÉRE, P. LEHN, R. C. MULLIGAN, D. B. KOHN (1996). Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells. *Gene Ther.* 3, 37-48
- B. T. KREN, P. BANDYOPADHYAY, C. J. STEER (1998). In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimäríc RNA/DNA oligonucleotides. *Nat. Med.* 4, 285-290
- D. J. LAMPE, M. E. CHURCHILL, H. M. ROBERTSON (1996). A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J.* 15, 5470-5479
- M. J. LEMMON, P. VAN ZIJL, M. E. FOX, M. L. MAUCLINE, A. J. GIACCIA, N. P. MINTON, J. M. BROWN (1997). Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor micro-environment. *Gene Ther.* 4, 791-796
- M. G. LEE, E. J. KREMER, M. PERRICAUDET (1995). Adenoviral vectors. *Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser.* 5, 20-32
- S. W. LEE, E. GILBOA (1998). High level accumulation of an aberrantly spliced human DHFR RNA species. *Mol. Cells* 8, 189-200
- M. LI, P. A. HANTZOPOULOS, S. C. BANERJEE, S. C. ZHAO, B. I. SCHWEITZER, E. GILBOA, J. R. BERTINO (1992). Comparison of the expression of a mutant dihydrofolate reductase under control of different internal promoters in retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 3, 381-390
- T. LICHT, F. HERRMANN, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1997). In vivo drug-selectable genes: a new concept in gene therapy. *Stem Cells* 15, 104-111
- V. LING (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40, 3-8
- D. D. LUAN, T. H. EICKBUSH (1995). RNA template requirements for target DNA-primed reverse transcription by the R2 retrotransposable element. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3882-3891
- C. LUTZKO, S. KRUTH, A. C. G. ABRAMS-OGG, R. SHULL, I. D. DUBÉ (1998). Anti α -L-Iduridase immune responses in α -L-Iduronidase deficient dogs engrafted with genetically corrected stem cells. American Society of Gene Therapy, 1st Annual Meeting, Program & Abstracts 115a (459)
- M. C. MAGLIE, N. N. ISCOVE, N. ODARTCHENKO (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature* 295, 527-529

- M. MAGNI, S. SHAMMAH, R. SCHIRO, W. MELLADO, R. DALLA-FAVERA, A. M. GIANNI (1996). Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* 87, 1097-1103
- R. MANN, R. MULLIGAN, D. BALTIMORE (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, 153-159
- L. M. MANSKY (1998). Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J. Gen. Virol.* 79, 1337-1345
- K. MATSUMOTO, K. MONTZKA WASSARMAN, A. P. WOLFFE (1998). Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. *EMBO J.* 17, 2107-2121
- D. MARKOWITZ, S. GOFF, A. BANK (1988a). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 62, 1120-1124
- D. MARKOWITZ, S. GOFF, A. BANK (1988b). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-406
- R. S. McIVOR (1990). Deletion in a recombinant retroviral vector resulting from a cryptic splice donor signal in the Moloney leukemia virus envelope gene. *Virology* 176, 652-655
- J. R. McLACHLIN, M. A. EGLITIS, K UEDA (1990). Expression of a human complementary DNA for the multidrug resistance gene in murine hematopoietic precursor cells with the use of retroviral gene transfer. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1260-1263
- D. METCALF (1984). *The hematopoietic colony-stimulating factors*. Elsevier, Amsterdam
- M. Z. METZ, L. MATSUMOTO, K. A. WINTERS, J. H. DOROSHOW, S. KANE (1996). Bicistronic and two-gene retroviral vectors for using MDR1 as a selectable marker and a therapeutic gene. *Virology* 217, 230-241
- G. H. MICKISCH, I. AKSENTIJEVICH, P. V. SCHOENLEIN, L. J. GOLDSTEIN, H. GALSKE, C. STAHL, D. H. SACHS, I. PASTAN, M. M. GOTTESMAN (1991). Transplantation of bone marrow cells from transgenic mice expressing the human MDR1 gene results in long-term protection against the myelo-suppressive effect of chemotherapy in mice. *Blood* 79, 1087-1093.
- J. G. MIKKELSEN, A. H. LUND, M. DUCH, F. S. PEDERSEN (1998). Recombination in the 5' leader of murine leukemia virus is accurate and influenced by sequence identity with a strong bias toward the kissing-loop dimerization region. *J. Virol.* 72, 6967-6978.

- A. D. MILLER, G. J. ROSMAN (1989). [Improved retroviral vectors for gene transfer and expression](#). *BioTechniques* 7, 980-990
- A. D. MILLER, J. V. GARCIA, N. VON SUHR, C. M. LYNCH, C. WILSON, M. V. EIDEN (1991). [Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus](#). *J. Virol.* 65, 2220-2224
- A. D. MILLER, D. G. MILLER, J. V. GARCIA, C. M. LYNCH (1993). [Use of retroviral vectors for gene transfer and expression](#). *Methods Enzymol.* 217, 581-599
- N. P. MINTON, M. L. MAUCLINE, M. J. LEMMON, J. K. BREHM, M. FOX, N. P. MICHAEL, A. J. GIACCIA, J. M. BROWN (1995). [Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores](#). *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 357-364
- R. A. MORGAN, L. COUTURE, O. ELROY-STEIN, J. RAGHEB, B. MOSS, W. F. ANDERSON (1992). [Retroviral vectors containing putative internal ribosomal entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy](#). *Nucl. Acids Res.* 20, 1293-1299
- T. MORITZ, P. DUTT, X. XIAO, D. CARSTANJEN, T. VIK, H. HANENBERG, D. A. WILLIAMS (1996). [Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments](#). *Blood* 88, 855-862
- C. R. MULLIGAN (1993). [The basic science of gene therapy](#). *Science* 260, 926-932
- C. MUENK, J. LOEHLER, V. PRASSOLOV, U. JUST, M. STOCKSCHLADER, C. STOCKING (1997). [Amphotropic murine leukemia viruses induce spongiform encephalomyelopathy](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 5837-5842
- L. NALDINI (1998). [Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells](#). *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 457-463
- M. OGAWA (1993). [Differentiation and proliferation of haematopoietic stem cells](#). *Blood* 81, 2844-2854
- J. C. OLSEN (1998). [Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus](#). *Gene Ther.* 5, 1481-1487
- W. OSTERTAG, K. VEHMEYER, B. FAGG, I. B. PRAGNELL, W. PAETZ, M. C. LE BOUSSE, F. SMADJA-JOFFE, B. KLEIN, C. JASMIN, H. EISEN (1980). [Myeloproliferative virus, a cloned murine sarcoma virus with spleen focus-forming properties in adult mice](#). *J. Virol.* 33, 573-582
- W. OSTERTAG, I. B. PRAGNELL (1981). [Differentiation and viral involvement in differentiation of transformed mouse and rat erythroid cells](#). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 94-95, 143-208

- W. OSTERTAG, B. SELIGER, R. KOLLEK, C. STOCKING, U. BERGHOLZ, F. SMADJA-JOFFE (1986). [The myeloproliferative sarcoma virus retains transforming functions after introduction of a dominant selectable marker gene.](#) J. Gen. Virol. 67, 1361-1371
- W. OSTERTAG, C. STOCKING, G. R. JOHNSON, N. KLUGE, R. KOLLEK, T. FRANZ, N. HESS (1987). [Transforming genes and target cells of murine spleen focus-forming viruses.](#) Adv. Cancer Res. 48, 193-355
- S. PARTHASARATHI, A. VARELA-ECHAVARRIA, Y. RON, B. D. PRESTON, J. P. DOUGHERTY (1995). [Genetic rearrangements occurring during a single cycle of murine leukemia virus vector replication: characterization and implications.](#) J. Virol. 69, 7991-8000
- T. A. PARTRIDGE (1991). [Gene therapy. Muscle transfection made easy.](#) Nature 352, 757-758
- C. PATIENCE, Y. TAKEUCHI, F. L. COSSET, R. A. WEISS (1998). [Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells.](#) J. Virol. 72, 2671-2676
- R. PAWLIUK, C. J. EAVES, R. K. HUMPHRIES (1997). [Sustained high-level reconstitution of the hematopoietic system by preselected hematopoietic cells expressing a transduced cell-surface antigen.](#) Hum. Gene Ther. 8, 1595-1604
- R. PAWLIUK, T. BACHELOT, H. RAFTOPOULOS, C. KALBERER, R. K. HUMPHRIES, A. BANK, P. LEBOULCH (1998). [Retroviral vectors aimed at the gene therapy of human \$\beta\$ -globin gene disorders.](#) Ann. N. Y. Acad. Sci. 850, 151-162
- D. S. PEABODY (1989). [Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells.](#) J. Biol. Chem. 264, 5031-5035
- K. PHILLIPS, T. GENTRY, G. McCOWAGE, E. GILBOA, C. SMITH (1996). [Cell-surface markers for assessing gene transfer into human hematopoietic cells.](#) Nat. Med. 2, 1154-1156
- S. PODDA, M. WARD, A. HIMELSTEIN, C. RICHARDSON, E. DELAFLOR-WEISS, L. SMITH, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN, A. BANK (1992). [Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice.](#) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9676-9680.
- V. S. PRASOLOV (1989). [Retroviral vectors - an effective system for transfer and expression of foreign genes in mammalian cells.](#) Mol. Biol. 23, 348-355
- W. W. QUITSCHKE, Z. Y. LIN, L. DEPONTI-ZILLI, B. M. PATERSON (1989). [\$\beta\$ -actin promoter. High levels of transcription depend upon a CCAAT binding factor.](#) J Biol Chem 264, 9539-9546

- A. J. RAMSAY, I. A. RAMSHAW, G. L. ADA (1997). [DNA immunization](#). *Immunol. Cell. Biol.* 75, 360-363
- G. RAPPÀ, A. LORICO, R. A. FLAVELL, A. C. SARTORELLI (1997). [Evidence that the multidrug resistance protein \(MRP\) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins](#). *Cancer Res.* 57, 5232-5237
- S. REES, J. COOKE, J. STABES, S. GOODSON, S. HARRIS, M. G. LEE (1996). [Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein](#). *Biotechniques* 20,102-104
- I. RIVIÈRE, K. BROSE, R. C. MULLIGAN (1995). [Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6733-6737
- H. M. ROBERTSON (1993). [The mariner transposable element is widespread in insects](#). *Nature* 362, 241-245
- M. ROJAS, J. P. DONAHUE, Z. TAN, Y. Z. LIN (1998). [Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability](#). *Nature Biotech.* 16, 370-375
- I. B. RONINSON, J. E. CHIN, K. G. CHOI, P. GROS, D. E. HOUSMAN, A. FOJO, D. W. SHEN, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1986). [Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4538-4542
- L. RUGGIERI, A. AIUTI, M. SALOMONI, E. ZAPPONE, G. FERRARI, C. BORDIGNON (1997). [Cell-surface marking of CD\(34+\)-restricted phenotypes of human hematopoietic progenitor cells by retrovirus-mediated gene transfer](#). *Hum. Gene Ther.* 8, 1611-1623
- Z. SANDALON, N. DALYOT-HERMAN, A. B. OPPENHEIM, A. OPPENHEIM (1997). [In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy](#). *Hum. Gen. Ther.* 8, 843-849
- D. O. SCHACHTSCHABEL, H. LAZARUS, S. FARBER, G. E. FOLEY (1966). [Sensitivity of cultured human lymphoblasts \(CCRF-CEM cells\) to inhibition by thymidine](#). *Exp. Cell. Res.* 43, 512-514
- G. L. SCHEFFER, P. L. WIJNGAARD, M. J. FLENS, M. A. IZQUIERDO, M. L. SLOVAK, H. M. PINEDO, C. J. MEIJER, C. H. CLEVERS, R. J. SCHEPER (1995). [The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein](#). *Nat. Med.* 1, 578-582
- G. J. SCHOUTEN, H. G. VAN LUENEN, N. C. VERRA, D. VALERIO, R. H. PLASTERK (1998). [Transposon Tc1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* jumps in human cells](#). *Nucleic Acids Res.* 26, 3013-3017

- D. R. SIZEMORE, A. A. BRANSTROM, J. C. SADOFF (1995). [Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization](#). *Science* 270, 299-302
- R. A. SOKOLIC, S. SEKHSARIA, Y. SUGIMOTO, N. WHITING-THEOBALD, G. F. LINTON, F. LI, M. M. GOTTESMAN, H. L. MALECH (1996). [A bicistronic retrovirus vector containing a picornavirus internal ribosomal entry site allows for correction of X-linked CGD by selection for MDR1 expression](#). *Blood* 87, 42-50
- B. P. SORRENTINO, S. J. BRANDT, D. BODINE, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN, A. CLINE, A. W. NIENHUIS, (1992). [Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1](#). *Science* 257, 99-103
- B. P. SORRENTINO, K. T. McDONAGH, D. WOODS, D. ORLIC (1995). [Expression of retroviral vectors containing the human multidrug resistance 1 cDNA in hematopoietic cells of transplanted mice](#). *Blood* 86, 491-501
- G. J. SPANGRUDE, S. HEIMFELD, I. L. WEISSMAN (1988). [Purification and characterization of hematopoietic stem cells](#). *Science* 241, 58-62
- G. J. SPANGRUDE, D. M. BROOKS, D. B. TUMAS (1995). [Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function](#). *Blood* 85, 1006-1016
- E. SPOONCER, C. M. HEYWORTH, A. DUNN, T. M. DEXTER (1986). [Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors](#). *Differentiation* 31, 111-118
- C. STOCKING, R. KOLLEK, U. BERGHOLZ, W. OSTERTAG (1986). [Point mutations in the U3 region of the long terminal repeat of Moloney murine leukemia virus determine disease specificity of the myeloproliferative sarcoma virus](#). *Virology* 153, 145-149
- L. STRYER (1991). [Biochemie](#). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- F. STUTZ, M. ROSBASH (1998). [Nuclear RNA export](#). *Genes Dev.* 12, 3303-3319
- Y. SUGIMOTO, I. AKSENTIJEVICH, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1994). [Efficient expression of drug-selectable genes in retroviral vectors under control of an internal ribosomal entry site](#). *Biotechnology* 12, 694-698
- Y. SUGIMOTO, I. AKSENTIJEVICH, G. J. MURRAY, R. O. BRADY, I. PASTAN, M. M. GOTTESMAN (1995). [Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene \(MDR1\) and human \$\alpha\$ -galactosidase A for gene therapy of Fabry disease](#). *Hum. Gene Ther.* 6, 905-915

- P. SWETLY, W. OSTERTAG (1974). Friend virus release and induction of haemoglobin synthesis in erythroleukaemic cells respond differently to interferon. *Nature* 251, 642-644
- C. J. TABIN, J. W. HOFFMANN, S. P. GOFF, R. A. WEINBERG (1982). Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2, 426-436
- Y. TAGUCHI, K. KINO, M. MORISHIMA, T. KOMANO, S. E. KANE, K UEDA (1997). Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry* 36, 8883-8889
- J. E. TILL, E. A. McCULLOCH (1972). The 'f-factor' of the spleen-colony assay for hemopoietic stem cells. *Ser. Haematol.* 5, 15-21
- T. TUTING, W. J. STORKUS, M. T. LOTZE (1997). Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J. Mol. Med.* 75, 478-491
- D. VON LAER, S. THOMSEN, B. VOGT, M. DONATH, J. KRUPPA, A. REIN, W. OSTERTAG, C. STOCKING (1988). Entry of amphotropic and 10A1 pseudotyped murine retroviruses is restricted in hematopoietic stem cell lines. *J. Virol.* 72, 1424-1430
- G. VENKATAKRISHNAN, C. A. MCKINNON, C. G. PILAPIL, D. E. WOLF, A. H. ROSS (1991). Nerve growth factor receptors are preaggregated and immobile on responsive cells. *Biochemistry* 30, 2748-2753
- H. WANG, M. P. KAVANAUGH, R. A. NORTH, D. KABAT (1991). Cell-surface receptor for ökotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352, 729-731
- M. WARD, C. RICHARDSON, P. PIOLI, L. SMITH, S. PODDA, S. GOFF, C. HESDORFFER, A. BANK (1994). Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in human CD34+ cells. *Blood* 84, 1408-1414
- C. M. WEI, M. GIBSON, P. G. SPEAR, E. M. SCOLNICK (1981). Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 39, 935-944
- N. A. WIVEL, L. WALTERS (1993). Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262, 533-538
- L. WOLFF, J. KAMINCHICK, W. D. HANKINS, S. RUSCETTI (1985). Sequence comparison of the anemia- and polycythemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus. *J. Virol.* 53, 570-578

- X. WU, J. HOLSCHEN, S. C. KENNEDY, K. PARKER-PONDER (1996). [Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression.](#) Hum. Gene Ther. 7, 159-171
- M. Q. XU, F. B. PERLER (1996). [The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation.](#) EMBO J. 15, 5146-5153
- Y. YANG, F. A. NUNES, K. BERENCSI, E. E. FURTH, E. GONCZOL, J. M. WILSON (1991). [Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.](#) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4407-4411
- N. YU, A. POESCHLA , F. WONG-STAAAL (1994). [Progress towards gene therapy for HIV infection.](#) Gene Ther. 1, 13-26
- S. C. ZHAO, D. BANERJEE, S. MINEISHI, J. R. BERTINO (1997). [Post-transplant methotrexate administration leads to improved curability of mice bearing a mammary tumor transplanted with marrow transduced with a mutant human dihydrofolate reductase cDNA.](#) Hum. Gene Ther. 8, 903-909
- Y. ZHOU, J. ARAN, M. M. GOTTESMAN, I. PASTAN (1998). [Coexpression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector.](#) Hum. Gene Ther. 9, 287-293
- A. A. ZUPAN, E. M. JOHNSON JR. (1991). [Evidence for endocytosis-dependent proteolysis in the generation of soluble truncated nerve growth factor receptors by A875 human melanoma cells.](#) J. Biol. Chem. 266, 15384-15390

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die am Zustandekommen dieser Arbeit Anteil haben. Insbesondere gilt mein Dank

Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst und Herrn Prof. Dr. Wolfram Ostertag für die Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Ostertag und Herrn Dr. Christopher Baum für die Ausgabe des interessanten Arbeitsthemas.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Ostertag, Herrn Dr. Christopher Baum, Frau Dr. Carol Stocking und Frau Kristin Abel für die Durchsicht der Arbeit.

meiner Familie und der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung für die finanzielle Unterstützung, sowie Herrn Prof. Dr. Zander und Herrn Dr. Boris Fehse, die mir bei der Erlangung des Stipendiums hilfreich zur Seite standen.

der Abteilung Zell- und Virusgenetik des Heinrich-Pette-Institutes, insbesondere Frau Kristin Abel, Herrn Dr. Wolfgang Bohn, Herrn Dr. Hans-Georg Eckert, Herrn Dr. Boris Fehse und Frau Judith John für ihre aktive, praktische Unterstützung.