

**Etablierung foamyviraler Vektoren zur Transduktion
humaner hämatopoetischer Stammzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Cordula Leurs
aus Wachtendonk

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. U. Göbel
Korreferenten: Prof. Dr. C. P. Hollenberg
PD Dr. H. Hanenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2003

Herzlichen Dank

Herrn Prof. Dr. Ulrich Göbel für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Kinderklinik sowie die intensiven Bemühungen um die finanzielle Förderung des Forschungsprojektes

Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg für die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen

ganz besonders Herrn PD Dr. Helmut Hanenberg für das interessante Thema, seine Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft und viel Gelerntes

den „Foamyvirologen“ Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm, Herrn PD Dr. Dirk Lindemann und Herrn Dr. Martin Heinkelein für die gute Zusammenarbeit

Herrn Prof. Dr. David A. Williams für die Möglichkeit, in seinem Labor in Indianapolis die NOD/SCID-Maus Experimente durchführen zu dürfen und Frau Dr. Karen E. Pollok sowie Herrn Dr. Michael Jansen für die hervorragende Unterstützung dabei

Frau Rebecca Breitung und Frau Lucy Smiley für ihre Gastfreundschaft

Herrn PD Dr. Christoph von Kalle und seinen Mitarbeitern für die Kooperation bei der Integrationsstellenanalyse

Herrn Prof. Dr. Peter Wernet und Herrn PD Dr. Rüdiger Sorg für das Nabelschnurblut

allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hanenberg, insbesondere Frau Kerstin Göttsche und Frau Hildegard Schneider, für die gute Zusammenarbeit

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des KMT-Labors der Kinderklinik für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sowie ihre geistige und praktische Hilfsbereitschaft

der „Düsseldorf Entrepreneurs Foundation“, der Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V., Boehringer Ingelheim Fonds und dem Kompetenznetz Immun- und Gentherapie für die finanzielle Förderung

meinen Eltern und Schwestern sowie Herrn Peter Homberg für ihre Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen somatischer Gentherapie | 1 |
| 1.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen | 2 |
| 1.3 Retrovirale Vektoren | 3 |
| 1.3.1 Die Biologie der Retroviren | 3 |
| 1.3.2 Der Replikationszyklus eines einfachen Retrovirus | 6 |
| 1.3.3 Replikationsdefekte retrovirale Vektoren | 7 |
| 1.3.4 Pseudotypisierung | 10 |
| 1.3.5 Interaktion zwischen Vektor und Zielzelle | 11 |
| 1.3.6 Induktion von Zellproliferation | 12 |
| 1.4 Lentivirale Vektoren | 13 |
| 1.5 Foamyviren | 14 |
| 1.5.1 Genexpression und Genprodukte | 15 |
| 1.5.2 Der Replikationszyklus von Foamyviren | 16 |
| 1.5.3 Foamyvirale Vektoren | 17 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Materialien | 19 |
| 2.1.1 Chemikalien | 19 |
| 2.1.2 Plasmide | 19 |
| 2.1.2.1 Retrovirale Vektorplasmide | 19 |
| 2.1.2.2 Env-Expressionsplasmide | 19 |
| 2.1.3 Zellen | 20 |
| 2.1.3.1 Adhärent wachsende Zelllinien | 20 |
| 2.1.3.2 Hämatopoetische Zelllinien | 20 |
| 2.1.3.3 Retrovirus-Produzentenzelllinie | 21 |
| 2.1.3.4 Primäre Zellen | 21 |
| 2.1.4 Medien und Zusätze | 21 |
| 2.1.5 Tiere | 21 |
| 2.2 Methoden | 22 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Techniken | 22 |
| 2.2.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien | 22 |
| 2.2.1.2 Transformation von Bakterien | 22 |
| 2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien | 22 |
| 2.2.1.4 Isolierung von genomischer DNA | 23 |
| 2.2.1.5 „Linear amplification-mediated polymerase chain reaction“ (LAM-PCR) | 23 |
| 2.2.2 Zellkulturtechniken | 24 |
| 2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen | 24 |
| 2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen | 24 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2.3 Mykoplasmentest | 24 |
| 2.2.2.4 Neomycin-Selektion von 293T-Zellen | 24 |
| 2.2.2.5 Gewinnung primärer Zellen | 25 |
| 2.2.2.5.1 Isolierung von T-Lymphozyten aus peripherem Blut | 25 |
| 2.2.2.5.2 Isolierung von CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut | 25 |
| 2.2.2.6 Virusproduktion | 26 |
| 2.2.2.6.1 Erzeugung virushaltiger Überstände mit stabilen Produzentenzelllinien | 26 |
| 2.2.2.6.2 Transiente Erzeugung virushaltiger Überstände | 26 |
| 2.2.2.6.3 Freisetzen intrazellulärer HFV-Partikel | 27 |
| 2.2.2.6.4 Konzentrieren von virushaltigen Überständen | 27 |
| 2.2.2.6.5 Titration | 28 |
| 2.2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie | 28 |
| 2.2.2.8 Durchflusszytometrie | 28 |
| 2.2.2.8.1 Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung | 29 |
| 2.2.2.9 Transduktion hämatopoetischer Zellen | 29 |
| 2.2.2.9.1 Transduktion hämatopoetischer Zelllinien | 29 |
| 2.2.2.9.2 Transduktion von T-Zellen | 29 |
| 2.2.2.9.3 Transduktion von CD34+ Zellen | 29 |
| 2.2.2.10 Progenitorassay | 30 |
| 2.2.2.11 Transplantation von NOD/SCID Mäusen | 30 |
| 2.2.2.11.1 Transduktion der Zellen | 31 |
| 2.2.2.11.2 Transplantation der Mäuse | 31 |
| 2.2.2.11.3 Analyse des Anwachsens transduzierter humaner Zellen in NOD/SCID-Mäusen | 31 |
| 3. Ergebnisse | 33 |
| 3.1 Virusproduktion | 33 |
| 3.1.1 Verwendete retrovirale Expressionsplasmide | 33 |
| 3.1.2 Bestimmung des Virustiters | 35 |
| 3.1.3 Optimierung der Virusproduktion: Transfektion | 37 |
| 3.1.4 Optimierung der Virusproduktion: Induktion | 38 |
| 3.1.5 Optimierung der Virusproduktion: Freisetzen intrazellulärer Partikel | 39 |
| 3.1.6 Optimierung der Virusproduktion: Konzentrieren der Überstände | 40 |
| 3.2 Transduktion | 43 |
| 3.2.1 Einfluss von Protaminsulfat auf die Transduktionseffizienz | 43 |
| 3.2.2 Einfluss von Fibronectin auf die Transduktionseffizienz: Hämatopoetische Zelllinien | 44 |
| 3.2.3 Einfluss von Fibronectin auf die Transduktionseffizienz: Primäre hämatopoetische Zellen | 45 |
| 3.2.4 Zusammenfassung | 46 |
| 3.3. Transduktion von Progenitorzellen | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.4. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut | 51 |
| 3.4.1 Transduktion von SRCs mit HFV, MLV-GALV/MLV und HIV-GALV/MLV | 51 |
| 3.4.2 Transduktion von SRCs mit HFV, HIV-GALV/MLV und HIV-VSV-G | 57 |
| 3.5 Transduktion von SRCs aus humanem mobilisiertem peripheren Blut | 60 |
| 4. Diskussion | 63 |
| 5. Ausblick | 75 |
| 6. Zusammenfassung | 76 |
| 7. Literaturverzeichnis | 77 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| bp | Basenpaare |
| BFV | Bovines Foamyvirus |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Kapsid |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CFC | koloniebildende Zelle der Hämatopoese |
| CMV | Cytomegalievirus |
| DMEM | „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFP | „enhanced green fluorescent protein“ |
| Env | „envelope“, retrovirales Hüllprotein |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| et al. | et alteres (und andere) |
| etc. | etcetera |
| FACS | „fluorescence-activated cell sorting“ |
| FITC | Fluoreszein-Isothiocyanat |
| FFV | Felines Foamyvirus |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| g | Gravitationskonstante |
| Gag | „group specific antigen“, retrovirales Matrix- und Kapsidprotein |
| GALV | Gibbon Ape Leukemia Virus |
| G-CSF | Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure |
| HFV | Humanes Foamyvirus |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| IN | retrovirale Integrase |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilo-Dalton |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| LTR | lange terminale Sequenzwiederholung |
| m | milli |

| | |
|----------|---|
| M | molar |
| MA | Matrix |
| MACS | „magnetic-activated cell sorting“ |
| MLV | Murines Leukämie Virus |
| m.o.i. | „multiplicity of infection“ |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| NC | Nukleokapsid |
| NOD/SCID | „nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency“ |
| U | Einheit |
| μ | mikro |
| n | nano |
| ORF | offener Leserahmen |
| ori | Replikationsursprung |
| PBS | phosphatgepufferte Saline |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| LAM-PCR | „linear amplification-mediated“-Polymerase Kettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PI | Propidiumiodid |
| Pol | retrovirale Polymerase |
| PR | retrovirale Protease |
| Psi, ψ | Verpackungssignal |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SCF | Stammzellofaktor |
| SFV | Simian Foamyvirus |
| SFFV | Spleen Focus Forming Virus |
| SU | Oberflächendomäne des retroviralen Hüllproteins |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| TE | transduzierende Einheit |
| TM | Transmembrandomäne des retroviralen Hüllproteins |
| TPO | Trombopoetin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| tRNA | Transfer-RNA |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| VSV | Vesikuläres Stomatitis Virus |
| VSV-G | Glykoprotein des Vesiculären Stomatitis Virus |
| v/v | Volumen/Volumen |
| wt | Wildtyp |
| w/v | Gewicht/Volumen |

1. Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen somatischer Gentherapie

Zahlreiche angeborene Erkrankungen des blutbildenden Systems können durch die Transplantation von normalen hämatopoetischen Stammzellen geheilt werden (Thomas et al., 1957; To et al., 1997; Thomas, 1999). Das Anwachsen einer geringen Anzahl dieser pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen führt zu einer kontinuierlichen Produktion der verschiedenen Blut- und Immunzellen für die gesamte Lebensdauer des Patienten (Abbildung 1). Für eine allogene Stammzelltransplantation steht aber nur bei einem Teil der Patienten ein passender Spender zur Verfügung. Darüber hinaus geht eine allogene Stammzelltransplantation mit einem hohen Therapie-assoziierten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einher (Thomas, 1999). Ein alternatives Konzept ist deshalb, im Rahmen einer somatischen Gentherapie autologe Stammzellen zu gewinnen, sie *ex vivo* mit dem gewünschten Gen zu transduzieren und anschließend zu reinfundieren (Williams et al., 1984). Es gibt eine Vielzahl monogener Erkrankungen, bei denen eine solche Therapie in Frage kommt (Kohn, 1996; Williams et al., 1997; Dirksen et al., 1999). Auch Patienten mit Erbkrankheiten, die sich außerhalb der Hämatopoese manifestieren, könnten von einer Therapie mit genetisch veränderten Stammzellen profitieren, da sich deren

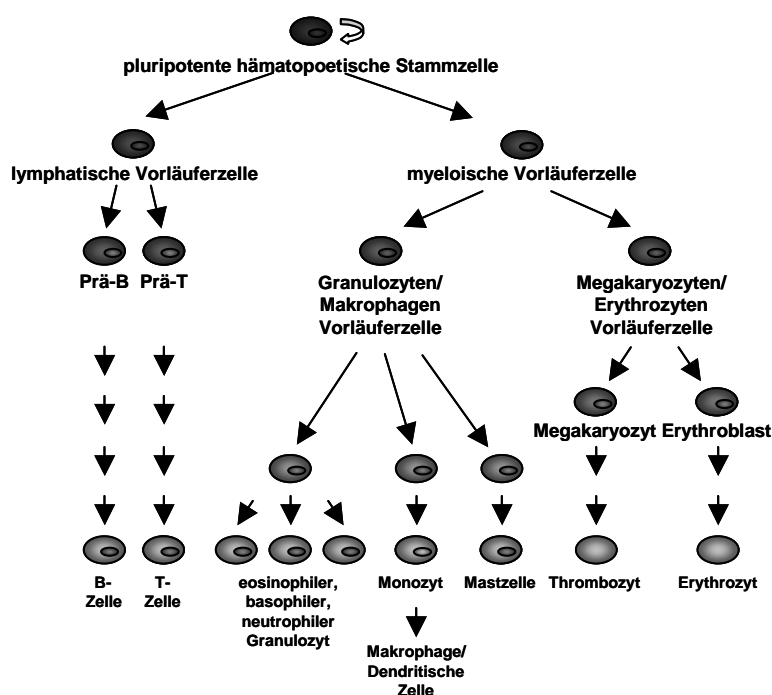


Abbildung 1: Hierarchie der Hämatopoese. Die Abbildung zeigt schematisch die Abstammung differenzierter Blutzellen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle. Das Proliferationspotential nimmt in der Abbildung von oben nach unten ab. Die terminal differenzierten Zellen am unteren Rand der Abbildung besitzen kein solches Potential mehr. Die Anordnung mehrerer Pfeile hintereinander bedeutet, dass die Differenzierung über Zwischenstufen erfolgt.

Nachkommenschaft im ganzen Körper verteilt und das korrigierte Protein, zum Beispiel bei einigen Stoffwechselerkrankungen, aus den Blutzellen freigesetzt wird (Ohashi et al., 1992; Fairbairn et al., 1996).

Weiterhin gibt es das Vorhaben, im Rahmen der somatischen Gentherapie hämatopoetische Stammzellen mit neuen biologischen Eigenschaften auszustatten. So sollen etwa Resistenzgene exprimiert werden, um das hämatopoetische System bei einer Krebsbehandlung vor den Nebenwirkungen einer Hochdosis-Chemotherapie zu schützen (Abonour et al., 2000; Hanenberg und Moritz, 2001). Auch wird versucht, bei Patienten, die mit dem Humanen Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) infiziert sind, durch das Einschleusen genetischer Elemente in autologe hämatopoetische Stammzellen die Replikation des HIV-1 in aus den modifizierten Stammzellen hervorgehenden T-Zellen zu blockieren. So wurden beispielsweise kompetitiv wirkende regulatorische Sequenzen des HIV-1 und synthetische Gene, die transdominant wirkende regulatorische Proteine oder Ribozyme kodieren, eingebracht (ASGT, 2003; Fanning et al., 2003).

Das Konzept der somatischen Gentherapie erscheint insbesondere bei hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen faszinierend einfach, da die Manipulation *ex vivo* erfolgen kann. Die Umsetzung ist es aber nicht: Die ersten klinischen Gentherapiestudien mit hämatopoetischen Stammzellen wurden 1992 angefangen. Seitdem wurden 40 Studien mit mindestens 232 Patienten durchgeführt (ASGT, 2003; Kohn et al., 2003). Von diesen haben lediglich 11 eine Heilung ihrer Erkrankung erfahren (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Aiuti et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Zwei dieser Patienten haben mehr als zweieinhalb Jahre nach der Behandlung als Folge der Gentherapie T-Zell-Leukämien entwickelt (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Marshall, 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b).

Die biologischen Probleme bei der somatischen Gentherapie hämatopoetischer Stammzellen, die eine Lösung erfordern, betreffen insbesondere die niedrigen Gentransferraten in hämatopoetische Stammzellen, die Regulation der Transgenexpression in den Zielzellen, die immunologische Reaktion des Organismus auf das Transgenprodukt und das Risiko der Mutagenese durch die Integration des Transfervektors in das Genom der Zielzelle.

1.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Humane hämatopoetische Stammzellen exprimieren das Sialomucin CD34 (Krause et al., 1996). Für eine klinische Stammzelltransplantation können CD34+ Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut von Personen, die mit Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) vorbehandelt wurden, gewonnen werden. Der Anteil der CD34+ Zellen in den drei Ausgangsmaterialien liegt bei 0,1 – 2% aller nukleären Zellen. Selbst unter zu mehr als 90% aufgereinigten CD34+ Zellen sind Stammzellen allerdings sehr selten (Wang et al., 1997). Da Stammzellen sich phänotypisch nicht von anderen primitiven hämatopoetischen Zellen unterscheiden lassen, kann ihr Nachweis nur funktionell erfolgen: Nach einer Transplantation müssen Stammzellen einen myeloablativ behandelten

Organismus in allen hämatopoetischen Zellreihen langfristig repopulieren (Morrison et al., 1995). Mit *in vitro*-Tests, die für klinische Studien zur Optimierung des Gentransfers in humane hämatopoetische Stammzellen eingesetzt wurden, wurde die Transduktionseffizienz in klonogene Zellen analysiert. Bei den ersten klinischen Studien wurde aber deutlich, dass die Ergebnisse solcher Tests keine Aussage über die Zellen erlauben, die nach einer Transplantation im Menschen anwachsen und das hämatopoetische System repopulieren (Orkin und Motulsky, 1995). Vor diesem Hintergrund wurde ein murines Xenotransplantationsmodell entwickelt, bei dem humane CD34+ Zellen in immundefiziente Mäuse, die "nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency" (NOD/SCID) Mäuse, transplantiert werden (Larochelle et al., 1996; van der Loo et al., 1998a; van der Loo et al., 1998b). Die in diesen Mäusen humane Hämatopoese initiierenden Zellen wurden als „SCID-repopulierende Zellen“ (SRCs) definiert. Wie hoch der Anteil echter hämatopoetischer Stammzellen an dieser Population ist, ist noch ungeklärt. Das murine Xenotransplantationsmodell wird derzeit verwendet, um präklinisch den Gentransfer in primitive hämatopoetische Zellen zu charakterisieren. Daneben gibt es ein Großtier-Xenotransplantationsmodell, bei dem die humanen Zellen *in utero* in prä-immune Schafföten transplantiert werden (Zanjani et al., 1996).

1.3 Retrovirale Vektoren

Die Vektoren, die für den Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen verwendet werden, basieren vornehmlich auf Retroviren. Denn Retroviren sind die einzigen Vertreter innerhalb der Tierviren, deren Replikation essentiell auf die Integration ihres Genoms in die DNA der Wirtszelle angewiesen ist und die über ein eigenes Enzym verfügen, das diese Aufgabe erfüllt. Durch die Integration wird sichergestellt, dass das Provirus auch in sich teilenden Zellen nicht verloren geht und stattdessen auf genetischem Weg bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Den evolutionären Erfolg dieser Viren versucht man heute auszunutzen, um effizient genetisches Material zu transferieren und verschiedene Zielzellen stabil genetisch zu verändern.

1.3.1 Die Biologie der Retroviren

Retroviren werden in vielen Invertebraten- und Vertebratenspezies, eingeschlossen der meisten Säuger, gefunden. Sie enthalten ein 7-12 kb langes, in diploider Form vorliegendes, unsegmentiertes +Strang RNA-Genom. Nach funktionellen Gesichtspunkten werden einfache und komplexe Retroviren unterschieden (Goff, 2001). Die einfachen Retroviren tragen lediglich die Gene für die strukturellen Komponenten der Viruspartikel (*gag*, *env*) und die viralen Enzyme (*pro*, *pol*). Die komplexen Retroviren verfügen darüber hinaus über Gene, deren Produkte regulatorische und akzessorische Funktionen erfüllen (Abbildung 2).

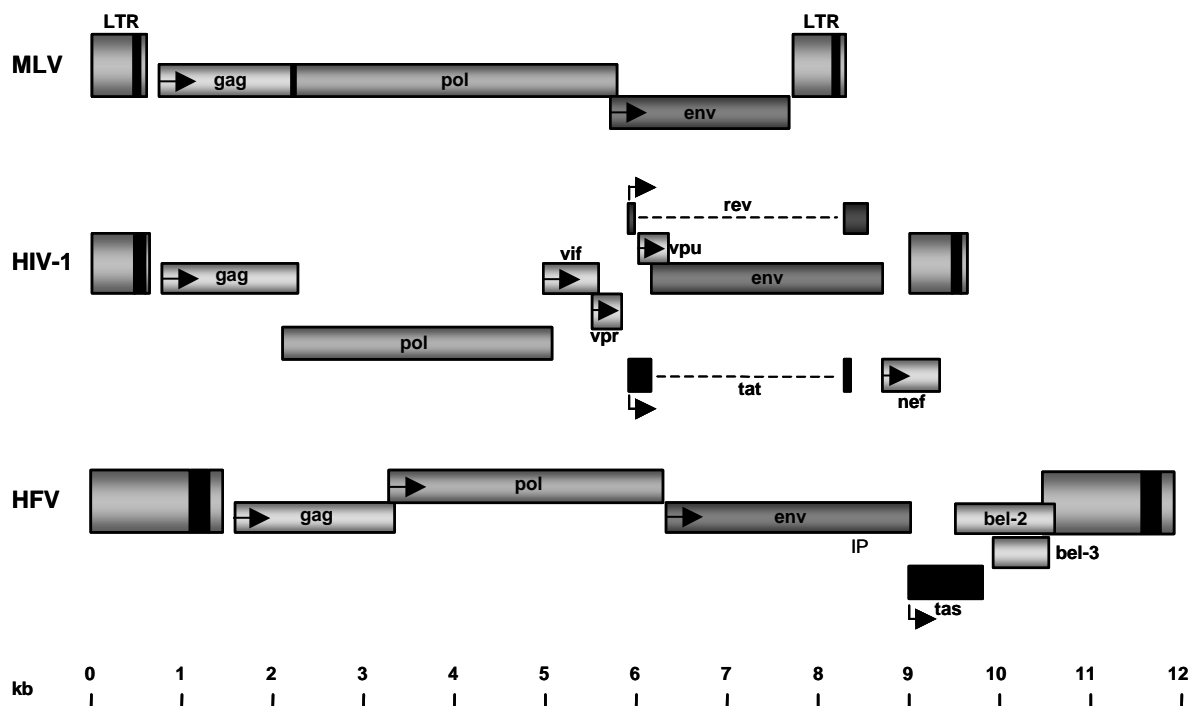


Abbildung 2: Genom verschiedener Retroviren. Die proviralen Genome werden zu beiden Seiten von den im Laufe der reversen Transkription gebildeten „long terminal repeats“ (LTRs) abgeschlossen. Neben dem LTR Promotor enthält HFV einen internen Promotor (IP) im 3' Bereich des *env* Gens. Die einzelnen Gene sind durch Rechtecke dargestellt. Offene Leseraster (ORFs) desselben Leserasters sind auf gleicher Höhe abgebildet, ORFs verschiedener Leseraster sind auf unterschiedlichen Ebenen abgebildet. Die Namen der ORFs sind kursiv geschrieben. Translationsstartpunkte sind durch kleine Pfeile angezeigt, gespleißte Introns durch gestrichelte Linien (verändert nach: Goff, 2001).

Parallel zu dieser Einteilung besteht eine auf evolutionären und morphologischen Gesichtspunkten basierende Unterteilung in sieben Genera (Tabelle 1). Die Viren der ersten fünf Genera haben ein onkogenes Potential und werden als Onkoretroviren bezeichnet.

Die charakteristische Eigenschaft der Retroviren wurde in den 1960er Jahren beobachtet, als gezeigt wurde, dass sowohl Inhibitoren der DNA Synthese als auch der DNA-abhängigen RNA Polymerase Aktivität die produktive Infektion durch diese RNA Viren blockieren konnte. Die Theorie, dass ein RNA Genom als Matrize für die DNA Synthese dienen könnte, wurde 1970 durch den Nachweis der Existenz einer viralen RNA-abhängigen DNA Polymerase, die Reverse Transkriptase (RT) genannt wurde, bestätigt (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970).

Tabelle 1. Retrovirus Genera

| Genus | Beispiel | Virusmorphologie | Genom |
|-------------------|---|--|---------|
| Alpharetroviren | „Avian Leukosis Virus“ (ALV) , „Rous Sarcoma Virus“ (RSV) | zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“ | einfach |
| Betaretroviren | „Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV), „Mason Pfitzer Monkey Virus“ (MPMV) | exzentrisch liegende, sphärische Kapside, „B-Partikel“ (MMTV) oder zylindrische Kapside „D-Partikel“ (MPMV) | einfach |
| Gammaretroviren | „Murine Leukemia Virus“ (MLV), „Gibbon Ape Leukemia Virus“ (GALV) | zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“ | einfach |
| Deltaretroviren | „Human T-Cell Leukemia Virus“ (HTLV) | zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“ | komplex |
| Epsilonretroviren | „Walleye Dermal Sarcoma Virus“ (WDSV) | zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“ | komplex |
| Lentiviren | „Human Immunodeficiency Virus- 1“ (HIV-1) | konusförmige Kapside | komplex |
| Foamyviren | „Human Foamy Virus“ (HFV) | zentral liegende, spärliche Kapside „C-Partikel“ | komplex |

Alle internen strukturellen Komponenten eines Retrovirus werden durch *gag* kodiert, das sich am 5' Ende des viralen Genoms befindet. Gag wird ausgehend von der genomischen RNA zunächst als Polyprotein synthetisiert und dann durch die virale Protease (PR) in verschiedene, im reifen Virus vorliegende Proteine prozessiert. Dabei entstehen das Matrix (MA)-, das Kapsid (CA)- und das Nukleokapsid (NC)-Protein. Das MA-Protein assoziiert während der Partikelbildung intrazellulär mit der Plasmamembran und bildet im reifen Partikel eine Proteinschicht, die eng mit der viralen Membran verbunden ist. Die Membran umgibt das durch CA-Proteine aufgebaute Kapsid. Kapside treten je nach Virusgruppe (Tabelle 1) als konusförmige (Lentiviren), zylindrische (Typ D-Partikel) oder sphärische Gebilde (Foamyviren) in Erscheinung und umschließen jeweils einen Ribonukleoproteinkomplex, der aus den basischen NC-Proteinen und der diploid vorliegenden genomischen RNA gebildet wird. Des Weiteren werden zelluläre tRNA-Moleküle, die als Primer für die reverse Transkription dienen, sowie die viralen Enzyme und bei den komplexen Retroviren zum Teil noch akzessorische Proteine mit in das Viruspartikel verpackt.

Die von *pol* und *pro* kodierten Enzyme – Reverse Transkriptase mit RNase H Funktion, Integrase und Protease – werden (außer bei Foamyviren) zusammen mit Gag als Fusionsprotein von der genomischen RNA translatiert. Das Gag-Pol-Fusionsprotein wird über einen Leserasterwechsel oder eine Stopp Kodon Suppression hergestellt. Beide Mechanismen sind relativ ineffizient, so dass sich ein bestimmtes Mengenverhältnis zwischen Strukturproteinen und Enzymen einstellt. Das Polyprotein wird im Laufe der Virusreifung durch die Protease gespalten. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die

Enzyme den Ort der Partikelbildung gemeinsam mit den Strukturproteinen erreichen und so in das entstehende Virus gelangen.

Das virale Hüllprotein (Env) wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) von einer gespleißten subgenomischen mRNA gebildet und gelangt über den sekretorischen Syntheseweg der Zelle in die Plasmamembran. Die posttranslationalen Modifikationen des Proteins umfassen seine Glykosylierung und die Spaltung durch eine zelluläre Protease in die Oberflächen (SU)- und Transmembran (TM)-Untereinheiten, die je nach Virusgruppe meist nonkovalent miteinander verbunden bleiben. In oligomerer Form wird es, wenn die Kapside beim Verlassen der Wirtszelle durch die Membran knospen und ihre Hülle erhalten, mit in das Viruspartikel eingebaut.

1.3.2 Der Replikationszyklus eines einfachen Retrovirus

Der virale Lebenszyklus beginnt mit dem Kontakt zwischen Virus und Zellmembran über eine Interaktion der viralen Hüllproteine mit zellulären Molekülen, die als Rezeptor genutzt werden (Abbildung 3). Diese Interaktion ist hochspezifisch und bestimmt das Wirtsspektrum und den Gewebetropismus des Virus. Entsprechend sind Partikel ohne die Env-Glykoproteine nicht infektiös und Zellen, die nicht über den spezifischen Rezeptor verfügen, nicht infizierbar. Abhängig vom Virustyp tritt das Virion entweder durch Endozytose oder durch eine direkte Fusion der viralen mit der Zytoplasmamembran in die Zelle ein. Bei den meisten Retroviren (eine Ausnahme bilden die Foamyviren) setzt nun die reverse Transkription ein. Dabei schreibt die Reverse Transkriptase die genomische RNA in einer komplexen Reaktionsfolge in doppelsträngige DNA um. Wie viele andere zelluläre Polymerasen ist auch die Reverse Transkriptase von einem Primer abhängig. Für die Synthese des DNA Minusstrangs wird diese Aufgabe von einem zellulären tRNA-Molekül, das im Viruspartikel mitgeführt wird und an die Primer Bindungsstelle (PBS) bindet, erfüllt. Die Plusstrang Synthese wird vom so genannten Polypurintrakt gestartet. Das Endprodukt der reversen Transkription ist ein lineares doppelsträngiges DNA Molekül, das zu beiden Seiten von „long terminal repeat“ (LTR) Sequenzen abgeschlossen wird und als Nukleoproteinkomplex, dem Präintegrationskomplex, vorliegt. Dieser gelangt in den Zellkern, wo die virale Integrase die Insertion des Provirus in das zelluläre Genom katalysiert. Das Provirus ist nun als regulärer Bestandteil der zellulären DNA der Proteinexpressionsmaschine der Wirtszelle zugänglich, so dass diese zur Vermehrung des Virus ausgenutzt werden kann. Dazu sind eine Reihe cis-aktiver Sequenzen nötig, die sich vor allem in den LTR Regionen befinden, die während der reversen Transkription entstanden sind. So enthält die 5'-U3-Region Promotor und Enhancer Elemente, die die Genexpression treiben und zum Teil über ubiquitär oder konstitutiv exprimierte zelluläre Faktoren und (bei komplexen Retroviren) über virale Transaktivatoren angesteuert werden. Ferner befindet sich im 3' Bereich des Genoms (je nach Virus in der 3'-U3- oder R-Region) ein PolyA Signal, das zur Polyadenylierung der viralen RNA führt. Die RNAs werden mit einer 5'Cap Struktur versehen und in das Zytoplasma transportiert. Dort werden die Genprodukte translatiert und anschließend im Laufe eines

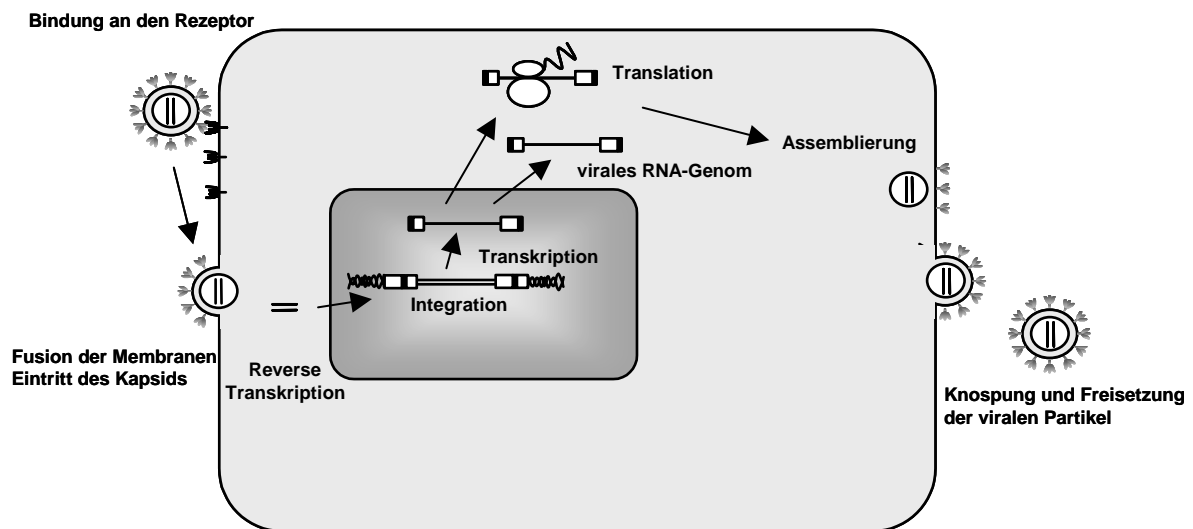


Abbildung 3: Lebenszyklus eines einfachen Retrovirus. Schematische Darstellung eines typischen retroviralen Replikationszyklus, der mit der Bindung an den zellulären Rezeptor beginnt. Nach der Fusion mit der Zellmembran gelangt das Virus in das Zytoplasma, wo die reverse Transkription erfolgt. Die provirale DNA wird nach Auflösung des Zellkerns während der Zellteilung in das zelluläre Genom integriert. Nach der Transkription und Translation werden die verschiedenen viralen Komponenten zu Partikeln zusammengefügt, die an der Plasmamembran knospen und so ihre Hülle mit den Env Proteinen erwerben.

komplexen Morphogeneseprozesses zu Viruspartikeln zusammengefügt, die dann die Zelle verlassen. Diesem Prozess, an dem die Gag, Gag-Pro-Pol und Env-Polyproteine beteiligt sind, liegt die zeitlich und räumlich genau regulierte Abfolge zahlreicher molekularer Interaktionen zugrunde, bei denen das Gag-Polyprotein eine zentrale Rolle spielt. Die besondere Rolle von Gag wird dadurch deutlich, dass es bei fast allen Retroviren (eine Ausnahme bilden die Foamyviren) unabhängig von der Expression anderer viraler Proteine in der Lage ist, nicht infektiöse Partikel, so genannte Pseudopartikel, freizusetzen. Zudem ist dieses Protein an der Verpackung der meisten anderen Komponenten des Viruspartikels direkt beteiligt. Durch das Knospen der viralen Partikel an zellulären Membranen werden umhüllte Partikel, in deren Membran die Env Proteine eingelassen sind, freigesetzt. Die Morphogenese wird durch einen Protease (PR)-vermittelten Reifungsprozess abgeschlossen, der für die Bildung infektiöser Viren unerlässlich ist.

1.3.3 Replikationsdefekte retrovirale Vektoren

Alle Retrovirusvektoren, die bislang in klinischen Studien verwendet wurden, basieren auf dem Murinen Leukämie Virus (MLV). Um replikationsdefekte Transfervektoren zu generieren, wurden alle Protein-kodierenden Sequenzen entfernt und durch das Transgen ersetzt (Abbildung 4). Der Transfervektor enthält die Ψ -Verpackungssequenz, so dass die virale mRNA von den viralen Proteinen erkannt und in Partikel inkorporiert wird. Um die reverse Transkription und die Integration in den Zielzellen sicherzustellen, enthält der

Transfervektor außerdem die LTRs, die Primer-Bindungsstelle (PBS) und den Polypurintrakt (PPT). Die Proteine, die für die Produktion der infektiösen Partikel benötigt werden, werden von Sequenzen exprimiert, die unabhängig von dem Transfervektor sind. Sie werden *in trans*

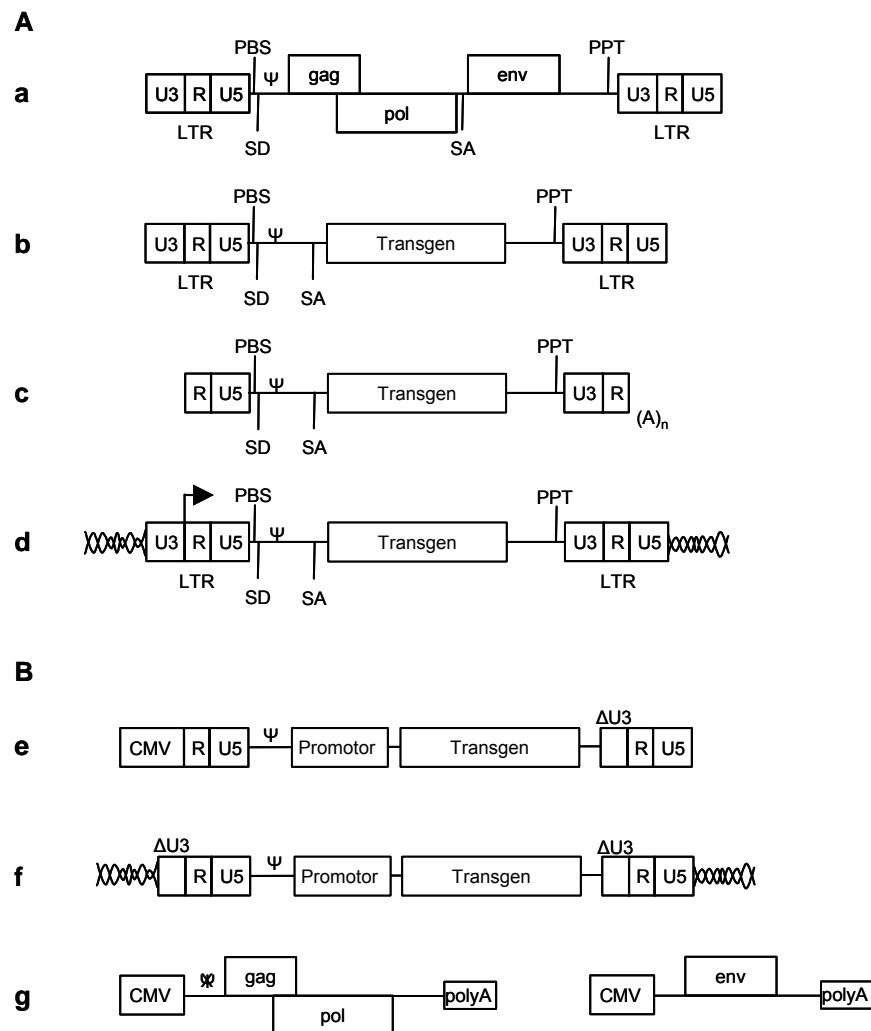


Abbildung 4A: Retrovirale Vektoren. (a) Schematische Darstellung eines retroviralen wt Provirus. PBS: Primer Bindungsstelle; SD: Spleißdonor; ψ : Verpackungssignal; SA: Spleißakzeptor; PPT: Polypurintrakt; LTR: „long terminal repeat“. (b) Retroviraler Vektor. Das Transgen ersetzt die viralen Gene und wird durch die retroviralen LTRs flankiert. (c) Vektor RNA, die in den Produzentenzellen in die Viruspartikel verpackt wird. (d) Integriertes Provirus. Das gewünschte Transgen wird durch den viralen LTR Promotor (Pfeil) transkribiert. **4B: Vektorentwicklung.** (e) Das CMV/LTR Hybridssystem erlaubt eine effiziente Vektorproduktion in 293T Zellen. Gleichzeitig sind im 3'-LTR des Vektors Deletionen in der Promotor/Enhancer Region. Im integrierten Provirus (f) wird die 5'-U3-Region von dem veränderten 3'-LTR ersetzt und ist somit inaktiv. Die Expression des gewünschten Transgens erfolgt in den so genannten retroviralen SIN (selbstinaktivierenden)-Vektoren durch einen internen heterologen Promotor. (g) Die Herstellung der viralen Vektorpartikel in Produzentenzellen erfolgt durch die Koexpression der viralen Gene *gag*, *pol* und *env* von zusätzlichen Konstrukten.

in so genannten Verpackungszellen bereitgestellt. Dabei sind *gag-pol*- und *env*-kodierende Sequenzen voneinander getrennt. Die generierten mRNAs enthalten kein Ψ -Signal. Die LTRs sind zumeist durch Promotoren und Polyadenylierungssignale nicht-retroviraler Herkunft ersetzt, so dass die Entstehung replikationsfähiger Retroviren durch Rekombination überlappender Sequenzen sehr unwahrscheinlich ist. Es wurden eine Vielzahl verschiedener Verpackungszelllinien etabliert, die alle Elemente, die für die Virusherstellung benötigt werden, stabil exprimieren und ständig Partikel in das Medium freisetzen (Markowitz et al., 1990; Miller, 1990; Nolan, 1996; Horn et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Es ist aber auch möglich, transient durch simultane Transfektion des Transfervektorplasmids mit den Helferplasmiden in Zellen, die keines der nötigen Elemente stabil tragen, effizient rekombinante Viren zu produzieren (Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995).

Um die Effizienz und die Sicherheit der Vektoren zu erhöhen wurden im Laufe der Zeit viele Veränderungen der Transfervektoren vorgenommen. Eine der wichtigsten Veränderungen, die die Effizienz der Virusproduktion betrifft, war das Ersetzen der U3-Region des 5'-LTRs mit der „immediate-early“ Region des humanen Cytomegalievirus (CMV)-Enhancer/Promotors (Abbildung 4B). Das entstandene CMV/LTR-Hybrid hat in geeigneten Produzentenzellen eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität und führt nach Kotransfektion mit ebenfalls CMV-Promotor-getriebenen Helferplasmiden zur Generierung hochtitriger Virusüberstände (Finer et al., 1994; Naviaux et al., 1996).

Bei den einfachsten Vektoren erfolgt die Expression des Transgens in den Zielzellen über den 5'-LTR des integrierten Provirus. Um höhere Expressionslevel zu erzielen oder um eine gewebespezifische Expression zu erreichen, können heterologe Promotoren für die Expression des Transgens eingesetzt werden. Da hierbei die transkriptionelle Aktivität des proviralen 5'-LTRs mit der Aktivität des internen Promotors interferieren kann, hat sich die Etablierung der so genannten selbst-inaktivierenden (SIN)-Vektoren bewährt (Yu et al., 1986). Da die U3-Promotor/Enhancer-Region des 5'-LTRs im integrierten Provirus vom 3'-LTR des Vektorkonstruktes abgeleitet ist, wird eine Deletion der essentiellen Promotorelemente im 3'-LTR bei der reversen Transkription in den Zielzellen auf den 5'-LTR übertragen (Abbildung 4B). Der provirale 5'-LTR ist nun inaktiv und die Expression des Transgens erfolgt über den internen Promotor. Da die transkriptionelle Aktivität von Wildtyp (wt)-LTRs auch die Expression von Protoonkogenen in der Wirtszelle beeinflussen kann, ist das Konzept der SIN-Vektoren eine weitere Verbesserung in Bezug auf die Sicherheit.

Die Langzeitexpression eines Transgens kann in den Zielzellen durch CpG-Methylierung stark vermindert werden. So wurde gezeigt, dass zelluläre Proteine an die methylierten viralen Sequenzen binden und die Ansammlung von Histon-Deacetylasen am Integrationsort vermitteln. Durch die Aktivität dieser Enzyme kommt es zur Kondensation des Chromatins und transkriptionellem „silencing“ (Ng und Bird, 1999; Wolffe und Matzke, 1999). Durch das Einfügen von Demethylierungsfragmenten aus dem murinen Thy-1 Gen in die U3-Region des 5'-LTRs konnte eine Verringerung der Methylierung der LTR-Sequenzen erreicht werden und die Langzeitexpression des Transgens verbessert werden (Robbins et al., 1997). Im Genom sind transkriptionell aktive und inaktive Bereiche unmittelbar benachbart. In den

Grenzbereichen wurden Barrieresequenzen identifiziert, die den Einfluss benachbarter regulatorischer Elemente verringern (Bell und Felsenfeld, 1999). Derartige Insulatorsequenzen wurden in die Vektoren integriert und damit eine geringere Methylierung der LTRs und eine Abnahme des Transgen-„silencing“ erreicht (Emery et al., 2000; Rivella et al., 2000).

Die beschriebenen Verbesserungen sind nur einige von vielen, die insgesamt vorgenommen wurden, um eine Langzeitgenexpression gewünschter Gene in verschiedenen Zielzellen zu erreichen. Aber das Vektordesign alleine ist keineswegs ausreichend, um Zellen effizient genetisch zu modifizieren. Es gibt weitere Faktoren, die entscheidend sind und auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

1.3.4 Pseudotypisierung

Die Infektion einer Zelle mit einem viralen Partikel wird durch die spezifische Wechselwirkung zwischen dem viralen Hüllprotein mit den als viralen Rezeptoren fungierenden Oberflächenmolekülen der Zelle initiiert. Bei allen Retroviren, außer bei Foamyviren, ist die Bildung nicht-infektiöser Partikel auch ohne das Env Protein möglich. Da sich diese Partikel mit Hüllproteinen anderer Viren pseudotypisieren lassen, kann ihnen, abhängig von der Rezeptorexpression auf den Zielzellen, eine effizientere Erkennung der Zellen oder gar ein anderes Wirtsspektrum verliehen werden.

In nahezu allen klinischen Studien wurden das Hüllprotein des amphotropen MLV oder des „Gibbon Ape Leukemia Virus“ (GALV) verwendet. Das Env des amphotropen Retrovirus bindet an den Natrium-abhängigen Phosphattransporter Pit-2 (van Zeijl et al., 1994; Chien et al., 1997). Pit-2 wird auf reifen hämatopoetischen Zellen zwar stark exprimiert, seine Expression auf Vorläuferzellen ist aber sehr niedrig (Orlic et al., 1996). Wahrscheinlich war deshalb eine effiziente Transduktion von Stammzellen mit amphotrop pseudotypisierten Vektoren in den ersten klinischen Studien nicht möglich. Der dem Pit-2 verwandte Phosphattransporter Pit-1 dient GALV als Rezeptor (O'Hara et al., 1990; Olah et al., 1994; Eiden et al., 1996). Pit-1 wird auf unreifen hämatopoetischen Zellen stärker als der amphotrope Rezeptor exprimiert (Lam et al., 1996). Dieser Sachverhalt korreliert mit der besseren Transduktionseffizienz, die mit GALV-pseudotypisierten Vektoren gegenüber amphotrop verpackten Partikeln auf diesen Zellen erreicht werden kann (Kiem et al., 1997; van Hennik et al., 1998).

Das G-Protein des Rhabdovirus „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV-G) kann ebenfalls verwendet werden, um onkoretrovirale Vektorpartikel zu pseudotypisieren (Emi et al., 1991; Yee et al., 1994). VSV-G bindet an Phospholipide, die ubiquitär in den Zellmembranen vorkommen und vermittelt somit ein sehr breites Wirtsspektrum. Darüber hinaus sind VSV-G-pseudotypisierte Partikel relativ stabil und anders als amphotrop- oder GALV-pseudotypisierte Partikel durch Ultrazentrifugation konzentrierbar (Burns et al., 1993). Die Transduktion hämatopoetischer Vorläuferzellen erfolgt allerdings mit ähnlicher Effizienz wie bei Verwendung des amphotropen Hüllproteins (von Laer et al., 2000). Im Zusammenhang

mit lentiviralen Vektoren ist die Verwendung des VSV-G-Pseudotyps hingegen erfolgreicher (siehe unten). Ein großes Problem ist allerdings, dass die konstitutive Expression des VSV-G zytotoxisch ist und die für einen klinischen Einsatz notwendige Etablierung von stabilen Produzentenzellen nur unter Verwendung induzierbarer Promotoren möglich ist (Yang et al., 1995; Ory et al., 1996).

Eine andere Alternative stellt das Env des feline endogenen Typ C Retrovirus RD114 dar. Der Rezeptor, den dieses Hüllprotein erkennt, ist ein Transporter für neutrale Aminosäuren (Rasko et al., 1999; Taylor et al., 1999). Das Spektrum an Zielzellen, die mit RD114-Env pseudotypisierten Vektoren transduziert werden können, umfasst neben reifen hämatopoetischen Zellen auch klonogene Vorläuferzellen und SRCs (Porter et al., 1996; Kelly et al., 2000). Besondere Attraktivität erhält dieses Env Protein zusätzlich dadurch, dass sich entsprechend pseudotypisierte Partikel ebenso wie VSV-G-pseudotypisierte Partikel durch Ultrazentrifugation konzentrieren lassen (Gatlin et al., 2001).

Die Suche nach weiteren Hüllproteinen, die eine spezifische und effiziente Erkennung von Zielzellen bei den verschiedensten *in vitro* und *in vivo* Applikationen zulassen, hat sich zu einem sehr großen Forschungsfeld ausgeweitet. Zum Beispiel wurde kürzlich gezeigt, dass das Hüllprotein des Ebola Virus zur Pseudotypisierung retroviraler Vektoren verwendet werden kann (MacKenzie et al., 2002). Neben der Pseudotypisierung werden aber auch andere Strategien verfolgt, um das Wirtsspektrum viraler Partikel zu verändern. So können zum Beispiel Env-Bindungsdomänen mit Bindungsdomänen von Liganden humaner Rezeptoren, Zytokin-domänen oder Antikörpern ausgetauscht werden (Kasahara et al., 1994; Valsesia-Wittmann et al., 1994; Han et al., 1995; Maurice et al., 1999).

1.3.5 Interaktion zwischen Vektor und Zielzelle

Die Transduktionseffizienz hängt maßgeblich von der Dichte der Rezeptormoleküle auf den Zielzellen ab (Kurre et al., 1999). Sie hängt aber ebenso von der Dichte der Viruspartikel um die Zielzellen ab. Um diese zu erhöhen haben verschiedene Verfahren Einzug in klinische Protokolle erhalten, die die Bindung von Viren an Zellen forcieren.

Die Stromazellen des Knochenmarks spielen *in vivo* eine wichtige Rolle für die hämatopoetischen Stammzellen, insofern als sie eine optimale adhäsive Matrix bieten und außerdem ein kritisches Zytokinmilieu aufrechterhalten. Um die Matrix zu imitieren hat sich bewährt, Zellkulturgefäße mit dem rekombinanten humanen Fibronectinfragment CH296 zu beschichten. Viren binden an die Heparinbindungsdomäne und Zellen über entsprechende Integrine an die VLA-4 und VLA-5 Bindungsstellen dieses Moleküls. Viren und Zellen werden so in eine räumliche Nähe gebracht und die Transduktionseffizienz wird deutlich erhöht (Hanenberg et al., 1996; Moritz et al., 1996; Hanenberg et al., 1997). Die Bindung von hämatopoetischen Stammzellen an Fibronectin hat auch weitere Auswirkungen auf die Zielzellen, etwa die Aufrechterhaltung des Repopulationspotentials der Zellen (Dao et al., 1998; Yokota et al., 1998).

Zwei weitere Strategien haben sich hinsichtlich einer Erhöhung der Transduktionseffizienz bewährt. So werden schon sehr lange Polykationen benutzt, um Virusinfektionen in Kulturen

zu verstärken. Man denkt, dass der Effekt vor allem darauf beruht, dass die elektrostatische Abstoßung der gleichermaßen negativ geladenen Membranen von Zelle und Virus aufgehoben wird (Coelen et al., 1983). Das Polykation, das die häufigste Verwendung findet, ist Protaminsulfat, da es klinisch benutzt wird, um die Effekte einer Heparinüberdosierung auszugleichen. Weiterhin wird die Interaktion von Viren mit Zielzellen durch gleichzeitiges Zentrifugieren erhöht, ein Verfahren, das „spinoculation“ genannt wird (Kotani et al., 1994; Bunnell et al., 1995). In einigen Protokollen werden die verschiedenen Verfahren auch miteinander kombiniert.

1.3.6 Induktion von Zellproliferation

Neben den Behinderungen des Eintritts viraler Vektoren in die Zielzellen gibt es, einmal in der Zelle angekommen, auf Ebene der reversen Transkription, des Kerntransports und der Integration weitere Schwierigkeiten, die überwunden werden müssen, bevor eine effiziente Transgenexpression erfolgen kann.

Onkoretroviren benötigen Zellteilung, um ihr Genom zu integrieren, da der Präintegrationskomplex die Kernmembran nicht passieren kann, ohne dass die Membran während der Mitose aufgelöst ist (Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Lewis und Emerman, 1994). Replikationsdefekte Vektoren, die von diesen Viren abgeleitet sind, teilen diesen Nachteil. Die geringe Teilungsaktivität der hämatopoetischen Stammzellen, die sich größtenteils in der G₀-Phase befinden, behindert daher eine effiziente Integration der MLV-basierten Vektoren. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, ist deshalb eine *ex vivo* Manipulation der Zielzellen mit Wachstumsfaktoren erforderlich. Dabei befindet man sich insofern auf einer Gratwanderung, als die Gabe von Wachstumsfaktoren zwar zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz, aber auch zu einer Differenzierung und damit zu einem Verlust der Repopulationskapazität der Stammzellen führen kann. In den letzten Jahren waren die Bemühungen groß, die optimalen Kulturbedingungen und Wachstumsfaktorkombinationen zu ermitteln. Das ultimative Ziel, hämatopoetische Stammzellen *ex vivo* zu expandieren und dabei den Stammzellcharakter der Zellen zu erhalten, konnte bislang aber nicht erreicht werden. Die wichtigsten Zytokine, die derzeit zur Induktion von Proliferation bei hämatopoetischen Stammzellen verwendet werden, ohne eine Differenzierung der Zellen herbeizuführen, scheinen Stammzellofaktor (SCF) und Thrombopoietin (TPO), (auch „megakaryocyte growth and development factor“, MGDF genannt), zu sein (Broudy, 1997; Eaton und de Sauvage, 1997; Kimura et al., 1998). Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer Zytokine, wie G-CSF, „fetal liver tyrosine kinase 3 ligand“ (Flt3-L), Interleukin (IL)-6 und IL-3, die erfolgreich bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen eingesetzt wurden (Luskey et al., 1992; Crooks und Kohn, 1993; Kurre et al., 2001). Flt3-L scheint wichtig zu sein, um *in vitro* eine Differenzierung der primitiven Zellen zu vermeiden und somit die Repopulationskapazität transduzierter Zellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse zu erhalten (Dao et al., 1997). Die Zugabe von IL-3 zum Zytokingemisch könnte einen gegenteiligen Effekt haben, es scheint Differenzierung zu induzieren und dadurch den Verlust der Langzeit-Repopulationskapazität

zu verursachen (van der Loo und Ploemacher, 1995; Yonemura et al., 1996; Ueda et al., 2000).

1.4 Lentivirale Vektoren

Lentiviren gehören zu den komplexen Retroviren. Neben den für die viralen Strukturproteine und Enzyme kodierenden Genen *gag*, *pol* und *env*, die auch Onkoretroviren besitzen, tragen Lentiviren zusätzliche, für regulatorische und akzessorische Proteine kodierende Sequenzen (Abbildung 2). Für den Replikationszyklus sind die regulatorischen Gene essentiell, während die akzessorischen Gene *in vitro* zumeist entbehrlich sind. Der Lebenszyklus von Lentiviren unterscheidet sich insofern von dem der einfachen Retroviren, als er in eine frühe und eine späte Phase unterteilt ist. In der frühen Phase werden mehrfach gespleißte RNAs generiert, die die regulatorischen Proteine exprimieren. Deren Akkumulation im Zellkern führt dann zu einer verstärkten Generierung ungespleißter Transkripte, die für die Struktur- und Enzymproteine kodieren.

Anders als Onkoretroviren sind Lentiviren in der Lage, ihr Genom auch in nicht teilungsaktive Zellen zu integrieren. Zwar gelangt auch bei Lentiviren der Präintegrationskomplex am effizientesten während der Mitose in den Kern, allerdings wird er auch von der zellulären Kernimportmaschinerie erkannt und aktiv durch die Kernporen einer intakten Kernmembran transportiert. Dabei werden verschiedene Nukleuslokalisierungssignale erkannt, die sich unter anderem im MA-Protein und in der Integrase befinden (Bukrinsky et al., 1993; Lewis und Emerman, 1994; Gallay et al., 1995a; Gallay et al., 1995b; Gallay et al., 1996; Gallay et al., 1997). Vor diesem Hintergrund wurden rekombinante Vektoren etabliert, die auf Lentiviren verschiedener Primaten und anderer Spezies basieren. Die größten Bemühungen galten aber der Entwicklung von Vektoren, die von HIV-1 abgeleitet sind, zum einen, weil humane Zellen die natürlichen Wirte dieses Virus sind, und zum anderen, weil über kaum ein anderes Virus so viel bekannt sein dürfte wie über dieses. Trotz der Komplexität des lentiviralen Genoms und der Pathogenität dieses Virus konnten mehrere Generationen replikationsdefekter, vermeintlich sicherer Vektoren entwickelt werden. Da das Wirtsspektrum des wt-HIV lediglich Makrophagen und Lymphozyten umfasst, werden HIV-basierte Vektoren pseudotypisiert. Insbesondere das VSV-G Protein wurde zur Verpackung der lentiviralen Vektoren verwendet. Mit diesen Vektoren konnten verschiedene terminal differenzierte, teilungsinaktive Zellen transduziert werden, wie Neurone (Naldini et al., 1996), Zellen der Retina (Miyoshi et al., 1998; Takahashi et al., 1999), Hepatozyten (Kafri et al., 1997) und Muskelzellen (Kafri et al., 1997). Miyoshi et al. waren die ersten, die gezeigt haben, dass eine effiziente *ex vivo* Transduktion von humanen SRCs aus Nabelschnurblut mit lentiviralen Vektoren möglich ist, ohne die Zellen mit Wachstumsfaktoren zu stimulieren (Miyoshi et al., 1999). Auch konnten humane SRCs aus Knochenmark (Guenechea et al., 2000) und mobilisiertem peripheren Blut (Scherr et al., 2002) effizient transduziert werden.

Lentivirale Vektoren werden zumeist transient hergestellt, da die Entwicklung stabiler Verpackungszelllinien, die eine effiziente und standardisierte Vektorproduktion erlauben,

durch die Zytotoxizität des VSV-G Proteins und einiger viraler Proteine erschwert ist. Die Expression der entsprechenden Gene muss unter die Kontrolle induzierbarer Promotoren gestellt werden (Dull et al., 1998; Kafri et al., 1999; Reiser et al., 2000; Farson et al., 2001; Sparacio et al., 2001; Xu et al., 2001). Diese Schwierigkeiten und die besonders schwere Art der Erkrankungen, die mit lentiviralen Infektionen einhergehen, haben einen Einsatz lentiviraler Vektoren in klinischen Studien mit Menschen bislang verhindert.

1.5 Foamyviren

Neben den Lentiviren bieten die weniger bekannten Foamy- oder Spumaviren ebenfalls verschiedene Aspekte, die sie für eine Vektorentwicklung interessant machen. Foamyviren werden den komplexen Retroviren zugeordnet (Abbildung 2), teilen aber einige Charakteristika mit den Hepadnaviren (Linial, 1999). 1971 wurde aus den Zellen eines kenianischen Patienten mit Nasopharynx-Karzinom (Achong et al., 1971) das erste Foamyvirus isoliert, das wegen seines Ursprungs Humanes Foamyvirus (HFV) genannt wurde. Seitdem wurden Foamyviren aus einer Vielzahl von Primatenspezies und anderen Säugetieren isoliert (Meiering und Linial, 2001). Der Mensch scheint aber kein natürlicher Wirt für Foamyviren zu sein, denn die Sequenzen von Isolaten aus Schimpansen („simian foamy virus“, SFVcpz, SFV-6 und SFV-7) sind hoch homolog zu der Sequenz des HFV (Herchenröder et al., 1994). Darüber hinaus ergaben Untersuchungen an mehr als 8.000 humanen Blutproben, dass lediglich Personen, die Kontakt zu Affen hatten und teilweise von diesen gebissen wurden, Infektionen mit Foamyviren hatten (Ali et al., 1996, Schweizer et al., 1995). Man geht deshalb heute davon aus, dass es sich bei HFV um eine Schimpansenvirusvariante handelt, die zoonotisch auf den Menschen übertragen wurde. Die Nomenklatur ist aufgrund dieses Umstandes verwirrend. Das ursprünglich als HFV bezeichnete Isolat trägt heute die korrekte Bezeichnung SFVcpz(hu). Da es das am meisten untersuchte Foamyvirusisolat ist, wurde es unlängst auch PFV für „Prototyp Foamyvirus“ genannt (Heinkelein et al., 2002a). Die Kollektivbezeichnung für alle Primaten Foamyviren ist allerdings auch PFV, so dass nach wie vor in der Literatur und auch in dieser Arbeit die Bezeichnung HFV benutzt wird.

Das aufgrund der hohen Vakuolisierung „foamy“ oder schaumige Aussehen einiger infizierter Zellen sowie die Entstehung multinukleärer Syncytien haben dem Genus seinen Namen gegeben. Angesichts dieser *in vitro* beobachteten Zytopathogenität ist überraschend, dass bislang keinerlei Erkrankung mit einer Foamyvirusinfektion in Zusammenhang gebracht werden konnte, weder bei natürlich, noch bei akzidentell infizierten Wirten (Linial, 2000). Dies ist das wichtigste Kriterium für eine Foamyvirus Vektorentwicklung. Darüber hinaus gibt es aber weitere Punkte, die eine Vektorentwicklung sinnvoll erscheinen lassen: Foamyviren haben einen breiten Wirts- und Gewebetropismus. Sie haben das größte Genom aller Retroviren und damit eine potentiell hohe Verpackungskapazität für heterologe Sequenzen. Sie werden durch menschliches Serum nicht inaktiviert und es wurde gezeigt, dass sie sich

langsam teilende Zellen effizienter transduzieren können als Onkoretroviren (Russell und Miller, 1996; Mergia et al., 2001).

1.5.1 Genexpression und Genprodukte

Generell ist die Organisation des Genoms von Foamyviren ähnlich der anderer komplexer Retroviren. Es verfügt neben den drei charakteristischen retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* über mindestens zwei weitere offene Leserahmen (ORFs, *tas* und *bet*) am 3' Ende des Genoms (Abbildung 2). Ein für Foamyviren alleiniges Charakteristikum ist das Vorhandensein eines zweiten, internen Promotors (IP) zusätzlich zur U3-Region des LTRs, der sich im 3' Bereich des *env* Gens befindet (Löchelt et al., 1993). Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator Tas reguliert. Während der LTR Promotor ohne Tas stumm ist (Baunach et al., 1993; Yu und Linial, 1993), hat der interne Promotor eine schwache basale Aktivität (Yang et al., 1997), die in der frühen Phase der Virusreplikation die Bildung von Tas und Bet ermöglicht. Ab einem gewissen Expressionsniveau wird der LTR durch Tas aktiviert, so dass in der späten Phase die Struktur- und Enzymproteine generiert werden (Rethwilm, 2003). Im Hinblick auf die Genexpression zeichnen sich Foamyviren durch eine weitere Besonderheit aus. Bei allen anderen Retrovirus Genera wird durch eine Suppressor tRNA oder ribosomalen Leserasterwechsel ein Gag-Pol Fusionsprotein gebildet. Im Gegensatz dazu synthetisieren Foamyviren Pol von einer eigenen mRNA, zu deren Expression ein Spleißakzeptor am 3'-Ende des *gag* ORFs verwendet wird (Yu et al., 1996a). Somit wird die Polymerase anders in die viralen Partikel verpackt, als es bei den übrigen Retroviren der Fall ist, wo Pol innerhalb des Gag-Pol Polyproteins mit Hilfe der Gag Assemblierungsdomänen verpackt wird. Bei Foamyviren ist offenbar die Interaktion von Pol mit der proviralen RNA nötig (Heinkelein et al., 2002b). Damit zeigen Foamyviren Ähnlichkeit zu Hepadnaviren, die ihre Reverse Transkriptase auch unabhängig von den Strukturproteinen in die viralen Partikel bringen.

Das Foamyvirus Pol Vorläuferprotein kodiert die gleichen vier enzymatischen Domänen wie andere Retroviren: PR, RT, RNase H und IN. Es erfolgt aber keine Spaltung in PR, RT/RH und IN. Stattdessen wird alleine IN vom Vorläufer abgespalten, wonach ein multifunktionelles PR-RT/RH Protein entsteht. Die aktive Protease ist essentiell für die Virusreplikation (Konvalinka et al., 1995).

Das Foamyvirus Gag Protein wird wie bei anderen Retroviren von einer ungespleißten RNA gebildet. Allerdings wird das Gag Protein in infektiösen Partikeln nicht in MA-, CA- und NC-Untereinheiten gespalten. Nur eine proteolytische Spaltung erfolgt effizient, bei der 3 kDa vom Carboxyterminus abgespalten werden. Diese Spaltung erfolgt etwa in der Hälfte der Fälle, so dass Partikel gleiche Mengen der beiden großen Gag Proteine enthalten. Die Spaltung ist essentiell für die Produktion infektiöser Viren (Enssle et al., 1997). Foamyvirus Gag fehlen zwei Merkmale anderer retroviraler Gag Proteine: Eine größere homologe Region im CA Protein und ein oder zwei Cystidin-Histidin Motive im NC Protein, die an der Erkennung des Verpackungssignals beteiligt sind. Stattdessen trägt der Carboxyterminus von Gag zwei Glycin-Arginin reiche Regionen, die GR-Boxen. Die erste davon bindet RNA

und DNA (Yu et al., 1996b), eine Fähigkeit, die auch das Core-Protein von Hepadnaviren hat (Hatton et al., 1992; Nassal, 1992). Die zweite GR-Box enthält ein Nukleuslokalisierungssignal, das eine nukleäre Lokalisation des Foamyvirus Gag Vorläuferproteins bewirkt (Schliephake und Rethwilm, 1994). Die Rolle der Kernlokalisierung von Gag im Lebenszyklus der Foamyviren ist aber unklar, da auch Mutanten, die kein Nukleuslokalisierungssignal mehr tragen, replizieren können (Yu et al., 1996b) und andere Foamyviren wie das feline Foamyvirus (FFV) kein NLS in Gag tragen und Gag nicht im Nukleus lokalisiert ist (Bodem et al., 1998).

Das Env Vorläuferprotein wird wie bei anderen Retroviren durch eine zelluläre Protease in die SU- und TM-Untereinheiten gespalten. Das HFV-Env enthält ein Trilysin Motiv am Carboxyterminus der TM-Domäne, das als ER „retrieval“ Signal wirkt - ähnlich dem des Hepadnavirus Oberflächenproteins - und den Transport des Hüllproteins an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al., 1997). Dieses Signal ist auch mitverantwortlich dafür, dass Foamyviren hauptsächlich an intrazytoplasmatischen Membranen knospen (Goepfert et al., 1999). Ein Unterschied zu allen anderen retroviralen Hüllproteinen ist, dass Foamyviren ohne die Expression von Env keine „virus like particles“ freisetzen können (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Deshalb können Foamyviren nicht mit anderen retroviralen Glykoproteinen oder dem VSV-G Protein pseudotypisiert werden (Pietschmann et al., 1999). Umgekehrt ist es aber möglich, MLV und HIV mit verschiedenen chimären Foamyvirus Env Proteinen zu pseudotypisieren (Lindemann et al., 1997 und Ergebnisteil).

1.5.2 Der Replikationszyklus von Foamyviren

Der Replikationszyklus von Foamyviren vereinigt Elemente von Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren und verleiht Foamyviren eine evolutionäre Sonderstellung innerhalb der Familie der Retroviren (Heinkelein et al., 2000; Rethwilm, 2003). Neben den Besonderheiten bezüglich ihrer Genexpression beruht dies vor allem auf dem ungewöhnlichen Zeitpunkt, zu dem die reverse Transkription im Lebenszyklus der Foamyviren erfolgt. Während bei allen anderen Retroviren die DNA-Synthese direkt nach der Infektion der Zelle erfolgt, führen die Foamyviren ihre reverse Transkription spät im Replikationszyklus durch, noch bevor die infizierte Zelle verlassen wird (Abbildung 5). Darauf deuten verschiedene experimentelle Befunde hin. So enthalten Foamyvirus-infizierte Zellen große Mengen unintegrierter viraler DNA (Mergia und Luciw, 1991; Moebes et al., 1997). Auch enthält ein großer Teil der Foamyvirus Partikel doppelsträngige DNA-Kopien der RNA (Yu et al., 1999). Schließlich zeigten Experimente, bei denen Zellen mit dem RT-Inhibitor 3'-Azido-3'-deoxythymidin (AZT) vor einer Infektion behandelt wurden, nur einen geringen Einfluss auf die virale Infektiosität. Die Behandlung der Zellen mit AZT nach erfolgter Infektion ergab hingegen eine stark niedrigere Infektiosität freigesetzter Viruspartikel, wenn diese auf unbehandelte Zellen gegeben wurden, bei unverminderter Menge an freigesetzten Partikeln (Moebes et al., 1997, Yu et al., 1999). Dadurch, dass es bereits in der infizierten Zelle ein funktionelles DNA-Genom gibt, besteht die Möglichkeit für einen internen

Replikationszyklus, bei dem das Virus, statt die Zelle zu verlassen, wieder in das Genom reintegrieren kann. Für die Gruppe der Hepadnaviren ist der Transport viraler DNA in den Zellkern bereits seit längerer Zeit bekannt (Ganem und Schneider, 2001). Durch diesen Mechanismus sind die Hepadnaviren, die nicht integrationsfähig sind, zur Persistenz in der Lage (Ganem und Schneider, 2001). Die intrazelluläre Reintegration des DNA Genoms konnte bei Foamyviren nachgewiesen werden (Heinkelein et al., 2000).

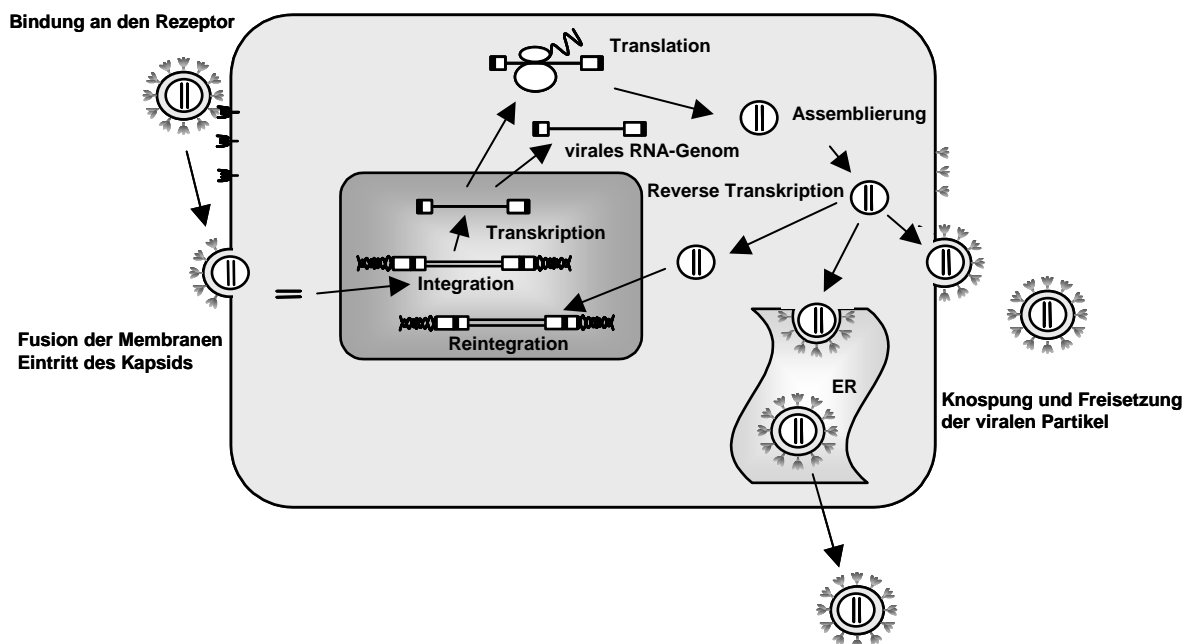


Abbildung 5: Lebenszyklus von Foamyviren. Virale Partikel enthalten bereits DNA Genome. Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle werden noch unvollständig synthetisierte Bereiche komplettiert. Das Provirus wird in das Genom der Zelle integriert und es kommt zur Transkription und Translation der verschiedenen viralen Genprodukte. Im Zytoplasma werden fertige virale Kapsidstrukturen gebildet, die an der Plasmamembran oder an intrazellulären Membranen wie denen des ER knospen. Darüber hinaus findet ein interner Replikationszyklus statt, bei dem das foamyvirale DNA Genom erneut in den Zellkern gelangt und reintegriert.

1.5.3 Foamyvirale Vektoren

Die ersten Foamyvirus-basierten Vektoren wurden von Schmidt und Rethwilm hergestellt (Schmidt und Rethwilm, 1995). Mit diesen Vektoren konnte eine kleine Transgenkassette in die transduzierten Zellen übertragen werden, sie exprimierten aber auch Gag, Pol, Env und Tas und waren stark zytotoxisch. Replikationsinkompetente Vektoren wurden von Russell und Miller etabliert, die das *env* Gen und den internen Promotor deletiert hatten (Russell und Miller, 1996). Die Vektorherstellung erfolgte durch Kotransfektion mit einem *gag-pol*-deletierten Helferkonstrukt, das Env und Tas exprimierte. Durch die Anwesenheit von Tas konnten Gag und Pol in den Produzentenzellen vom Transfervektor exprimiert werden. Mit diesen Vektoren konnte eine Vielzahl von Säugerzellen transduziert werden. Eine effiziente Transduktion von primären hämatopoetischen Zellen erfolgte allerdings nur nach

Kokultivierung der Zielzellen mit den Vektor-Produzentenzellen (Hirata et al., 1996). Durch den Austausch des Foamyvirus LTR gegen einen CMV/LTR Hybridpromotor erfolgt die Vektorherstellung in neueren Systemen Tas-unabhängig (Fischer et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Trobridge und Russell, 1998; Schenk et al., 1999; Wu und Mergia, 1999). Die Expression von Gag-Pol und Env wird auf getrennten Konstrukten ebenfalls vom CMV-Promotor getrieben. Die Transfervektoren sind weitgehend von foamyviralen Sequenzen befreit und tragen Expressionskassetten mit internen Promotoren (Heinkelein et al., 1998; Heinkelein et al., 2002a). Nach transienter Kotransfektion in geeignete Produzentenzellen werden vektorhaltige Überstände produziert, die frei von replikationsfähigen Helferviren sind (Trobridge und Russell, 1998). Durch Ultrazentrifugation können diese Überstände konzentriert werden. Ein effizientes stabiles Verpackungssystem gibt es bislang nicht. Ähnlich wie bei der HIV-Vektorherstellung müssen einige der Genprodukte bei Langzeitexpression in den Zellen unter die Kontrolle regulierbarer Promotoren gestellt werden. Die Herstellung einer solchen Foamyvirus-Produzentenzelllinie wurde zwar beschrieben, allerdings sind die Titer, die die mit den Zellen hergestellten Überstände aufweisen, sehr niedrig (Wu und Mergia, 1999).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die benigne Natur einer Foamyvirusinfektion kombiniert mit dem breiten Wirts- und Gewebetropismus dieser Viren, einer potentiell hohen Verpackungskapazität, der Resistenz gegenüber menschlichem Serum und einer verbesserten Transduktion ruhender Zellen verglichen mit Onkoretroviren machen diese Virusgruppe äußerst interessant für eine Vektorentwicklung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob foamyvirale Vektoren sich eignen, effizient hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren. Dazu sollte zunächst die Herstellung hochtitriger foamyviraler Vektorüberstände etabliert werden. Es sollte untersucht werden, ob sich unstimulierte CD34+ Zellen effizient mit diesen Überständen transduzieren lassen und dabei die Fähigkeit behalten, in NOD/SCID Mäusen zu repopulieren. Die Transduktionseffizienz in SRCs sollte mit den bestehenden onkoretroviralen und lentiviralen Vektorsystemen verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Zusammensetzung von Lösungen ist unter dem jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder entstammt andernfalls dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989). Die Herkunft verwendeter Reagenzien, Antikörper, Zytokine etc. ist ebenfalls unter dem jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben.

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg) mit dem Reinheitsgrad p.a. verwendet.

2.1.2 Plasmide

2.1.2.1 Retrovirale Vektorplasmide

pMH118 HFV-Vektor
pcAMS/U3E MLV-Vektor
pGJ3egfp HIV-Vektor

Die verwendeten Plasmide sind ähnlich konstruiert (Leurs et al., 2003) und zur Herstellung Helfervirus-freier Vektorüberstände in einem transienten Zweiplasmidsystem geeignet (vgl. 3.1.1 und Abbildung 6A). Sie wurden von Herrn PD Dr. Dirk Lindemann, Institut für Virologie der Universität Dresden, und Herrn Dr. Martin Heinkelein, Institut für Virologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

2.1.2.2 Env-Expressionsplasmide

Für die transiente Virusherstellung in 293T-Zellen wurden folgende Env-Expressionsplasmide verwendet:

| | |
|--------------------|---|
| pHIT456 | Expressionskonstrukt für das amphotrope MLV-Env (Soneoka et al., 1995). |
| pczVSV-G | Expressionskonstrukt für das Glykoprotein G von VSV (Pietschmann et al., 1999). |
| pczHFVenvEM02 | Expressionskonstrukt für das wt-HFV-Env (Lindemann und Rethwilm, 1998). |
| pczHFVenvΔMuLVEM02 | Expressionskonstrukt für ein chimäres Env, bei dem der zytoplasmatische Teil des MLV-Envs an ein trunkiertes HFV-Env fusioniert ist (Lindemann et al., 1997). |

| | |
|---------------|--|
| pczHFVenvEM65 | Expressionskonstrukt für ein chimäres Env, das das Signalpeptid des Bovinen Foamyvirus (BFV) an ein trunkiertes HFV-Env fusioniert hat (Leurs et al., 2003). |
| pczFFVenv wt | Expressionskonstrukt für das wt-Env des Felinen Foamyvirus (FFV) (Picard-Maureau et al., 2003). |
| pczSFVenv wt | Expressionskonstrukt für das wt-Env des Simian Foamyvirus (SFV) (Picard-Maureau et al., 2003). |
| pczSFVenvSM01 | Expressionskonstrukt für ein chimäres Env, bei dem das Signalpeptid von SFV gegen das von FFV ausgetauscht ist (Picard-Maureau et al., 2003). |

Alle diese Plasmide wurden von Herrn PD Dr. Dirk Lindemann, Institut für Virologie der Universität Dresden, zur Verfügung gestellt.

| | |
|---------------|--|
| pALFGALVTM | Expressionskonstrukt für ein chimäres Env, das die Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne von aMLV und die Oberflächendomäne des GALV-Envs besitzt (Stitz et al., 2000). Dieses Plasmid wurde von Prof. Dr. Klaus Cichutek, Paul-Ehrlich Institut, Langen, zur Verfügung gestellt. |
| phCMV-RD114TR | Expressionskonstrukt für ein chimäres Env, das die zytoplasmatische Domäne von aMLV und die Transmembran- und Oberflächendomäne des RD114 Envs besitzt (Sandrin et al., 2002). Dieses Plasmid wurde von Herrn Dr. Francois-Loïc Cosset, Lyon, Frankreich, zur Verfügung gestellt. |

2.1.3 Zellen

2.1.3.1 Adhärenz wachsende Zelllinien

| | |
|--------|---|
| 293T | humane embryonale Nierenzellen, die stabil das SV40 Large-T-Antigen exprimieren (DuBridge et al., 1987). Die Zellen wurden von Herrn Prof. Dr. Rethwilm, Institut für Virologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. |
| HT1080 | humane Fibrosarkomzelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) |

2.1.3.2 Hämatopoetische Zelllinien

| | |
|-------|--|
| HEL | humane Erythroleukämie Zellen, American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, U.S.A.) |
| KG-1a | humane akute myeloische Leukämie Zellen, ATCC |

| | |
|--------|---|
| HL60 | humane akute myeloische Leukämie Zellen, ATCC |
| K562 | humane chronische myeloische Leukämie Zellen, ATCC |
| Jurkat | humane T-Zell Leukämie, ATCC |
| JB198 | Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte humane B-Zelllinie einer gesunden Person (Hanenberg et al., 2002) |

2.1.3.3 Retrovirus-Produzentenzelllinie

pgMEG5AB eine auf pg13-Zellen (Miller et al., 1991) basierte Produzentenzelllinie, die GALV-pseudotypisierte EGFP-exprimierende MLV-Partikel freisetzt (Hanenberg et al., 2002).

2.1.3.4 Primäre Zellen

T-Lymphozyten wurden nach unten angegebenem Protokoll aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert.

Nabelschnurblut für die Gewinnung von CD34+ Zellen wurde von Prof. Dr. Peter Wernet, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf und vom „St. Vincent Hospital and Health Care Center, Inc.“ in Indianapolis, IN, U.S.A., zur Verfügung gestellt.

CD34+ Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut stammten aus Apharesaten von Tumorpatienten oder von einem gesunden Spender.

Alle Spender bzw. deren Angehörige haben sich damit einverstanden erklärt, dass die Zellen für die Forschung verwendet werden.

2.1.4 Medien und Zusätze

Die zur Kultur der eukaryotischen Zelllinien verwendeten Medien wurden vor ihrer Verwendung mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Gibco/BRL, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/BRL) und 2 mM Glutamin (Gibco/BRL) versetzt.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (Gibco/BRL): Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

RPMI1640 (Gibco/BRL): Kultivierung der hämatopoetischen Zelllinien

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma): Kultivierung primärer Zellen und Kultivierung von 293T-Zellen und pgMEG5AB-Produzentenzellen bei der Virusproduktion

2.1.5 Tiere

NOD/LtSz-Prkdc^{scid}/Prkdc^{scid} (NOD/SCID) Mäuse entstammten einer Kolonie des „Laboratory for Animal Research Center“ der „Indiana University School of Medicine“, Indianapolis, U.S.A. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen gehalten. Mittels Durchflusszytometrie wurde das periphere Blut hinsichtlich der Abwesenheit von murinen (CD4+, CD3+) T-Zellen

untersucht. Lediglich Tiere mit weniger als 1% T-Zellen im peripheren Blut wurden für die Transplantationsexperimente verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Techniken

Alle nicht gesondert aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel, 1992) durchgeführt.

2.2.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Anreicherung von Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und TopF' verwendet. Aus einer bei -80°C gelagerten Glycerinkultur des zu verwendenden *E. coli* Stammes wurde ein Vereinzelausstrich auf einer LB-Agarplatte (Sigma) gemacht, die bei 37°C über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB-Medium (Sigma) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (A_{600}) inkubiert, anschließend für 5 Minuten auf Eis gehalten und dann zentrifugiert (10 Minuten, $750 \times g$, 4°C). Das Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl_2 , 30 mM KAc, 10 mM CaCl_2 , 15% Glycerin, pH 5,8) aufgenommen und 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien zentrifugiert und das Sediment wurde in 8 ml Transformationspuffer 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl_2 , 15% Glycerin, pH 6,8) resuspendiert und zu 100 μl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

100 μl frisch aufgetaute transformationskompetente *E. coli* wurden mit 0,1 μg Plasmid-DNA gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert, dann 90 Sekunden 42°C ausgesetzt, auf Eis abgekühlt und auf einer vorgewärmten Ampicillin-haltigen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Serva) LB-Agarplatte ausgestrichen.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Die präparative Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion wurde mit dem „Plasmid Midi/Maxi-Preparation Kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst, spektrophotometrisch quantifiziert und auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Aliquots der Plasmid-DNA wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdaus (Enzyme und Puffer von New England Biolabs, Frankfurt) und anschließender Gelelektrophorese (Agarose von Biozym, Hessisch Oldendorf, 1kb+ DNA-Längenstandard von Gibco/BRL) kontrolliert.

2.2.1 4 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus murinen peripheren Blut-, Knochenmark- und Milzzellen wurde mittels Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in 5 mM Tris-Puffer, pH 8,0, aufgenommen, spektrophotometrisch quantifiziert und auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt.

Einzelne EGFP+ Kolonien (2.2.2.10) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop „gepickt“ und in 30 µl ddH₂O überführt. Die Proben wurden nach Zugabe von 1 U Proteinase K (Sigma) zunächst für 90 Minuten bei 56°C und dann für 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

2.2.1.5 „Linear amplification-mediated polymerase chain reaction“ (LAM-PCR)

Die Analyse der proviralen Integrationsstellen in humanen Zellen, die aus den NOD/SCID-Mäusen isoliert wurden, wurde am Institut für Molekulare Medizin der Universität Freiburg von Herrn Dr. Manfred Schmidt und Frau Manuela Wissler mittels einer dort etablierten Methode, der LAM-PCR (Schmidt et al., 2002; Schmidt et al. 2003), durchgeführt. Zunächst erfolgte zur Präamplifikation der Vektor-Genom-Übergänge eine wiederholte Primerextension mit der genomischen DNA einer Kolonie, Taq Polymerase (2,5 U; Qiagen) und 0,25 pmol 5'-biotinylierten LTR-U3-spezifischen Primern (5'-GCTTTAGTAGCCCAGCGTTG-3' und 5'-ATGTCAGAGGGAGTAGCGAA-3'; Roth). Insgesamt wurden 100 Zyklen durchgeführt, mit Zugabe frischer Taq-Polymerase (2,5 U) nach 50 Zyklen (initiale Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, dann 100 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 60 Sekunden, Annealing bei 60°C für 45 Sekunden, Extension bei 72°C für 60 Sekunden, finale Extension bei 72°C für 10 Minuten). Die biotinylierten Extensionsprodukte wurden mit 200 µg „Dynal-beads“ (Dynal, Oslo, Norwegen) nach Herstellerangaben selektiert. Anschließend wurden die Proben für die Zweitstrangsynthese mit Klenow Polymerase (2 U; Roche), dNTPs (300 µM; Pharmacia, Uppsala, Schweden) und einem Hexanukleotid-Mix (Roche) in einem Volumen von 20 µl bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Dann wurden die Proben auf dem „magnetic particle concentrator“ (Dynal) gewaschen. Es folgte ein Restriktionsverdau mit Sse9I Endonukleae (4 U in 20 µl; Hybaid-AGS, Middlesex, Großbritannien) für eine Stunde bei 55°C. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 pmol einer doppelsträngigen asymmetrischen Linker Kasette in einem Volumen von 10 µl bei 16°C über Nacht mit T4 DNA Ligase (6 U, New England Biolabs) an die unbekannte DNA-Sequenz ligiert. Dann erfolgte eine nested PCR mit Linker- und Vektor-spezifischen Primern (erster LTR-spezifischer Primer: 5'-GTCTATGAGGAGCAGGAGTA-3'; zweiter LTR-spezifischer Primer: 5'-CTTCCTTCCCTGTAATACTC-3'; erster Adapter-spezifischer Primer: 5'-GACCCGGGAGATCTGAATTC-3'; zweiter Adapter-spezifischer Primer: 5'-GATCTGAATTCAGTGGCACAG-3'; Roth). Es wurden 5 U Taq-Polymerase (Qiagen) und 25 pmol der jeweiligen Primer verwendet. Die Bedingungen waren wie oben beschrieben. Die Produkte wurden auf einem hochauflösenden Spreadex Gel (Elchrom Scientific, Cham, Schweiz) aufgetrennt. Spezifische DNA Banden wurden ausgeschnitten und in einen TOPO TA Klonierungsvektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) kloniert und sequenziert.

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten primären Zellen und Zelllinien (2.1.3) wurden in Zellkulturgefäßen (Corning Costar, Bodenheim; BD Falcon, Bedford, MA, U.S.A.) mit entsprechendem Kulturmedium in dafür vorgesehenen Inkubatoren bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dazu wurde bei adhärent wachsenden Zellen das Medium entfernt, die Zellen wurden mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier Phosphat-gepufferter Saline (PBS; PAA, Cölbe) gewaschen und für 5 – 10 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% w/v; PAA) im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und 1:10 bis 1:20 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) in neue Zellkulturflaschen überführt. Bei Suspensionszellen wurden die Zellen gleichmäßig im Medium verteilt und 1:5 bis 1:20 in neues Medium umgesetzt.

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte nach Trypanblau (Sigma) Ausschlussfärbung und Auszählung lebender Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden Suspensionszellen oder mit Trypsin abgelöste adhärent wachsende Zellen zentrifugiert (200 x g, 5 Minuten, RT) und in Medium resuspendiert (1 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ Zellen/ml). Nach Zusatz von 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (Sigma) wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Corning Costar) überführt und in Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, NY, USA) zunächst bei –80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt. Die Röhrchen wurden in den Stickstofftanks nach Möglichkeit in der Gasphase gelagert. Zur Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Adhärent wachsende Zellen wurden unmittelbar nach dem Auftauen in eine Flasche oder Platte mit Kulturmedium überführt. Nach 8 – 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Suspensionszellen wurden in ein Röhrchen mit Medium überführt, zentrifugiert und dann in Kulturflaschen überführt.

2.2.2.3 Mykoplasmentest

Alle Zelllinien wurden vor der Verwendung auf mögliche Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet. Zellen, die über längere Zeiträume passagiert wurden, wurden darüber hinaus in regelmäßigen Abständen getestet. Für den Mykoplasmentest wurde ein Elisa der Firma Roche, Mannheim, benutzt, der entsprechend den Herstellerangaben angesetzt wurde.

2.2.2.4 Neomycin-Selektion von 293T-Zellen

293T-Zellen, die für die Virusproduktion verwendet wurden, sind von 293-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, abgeleitet und sehr gut transfizierbar. Sie exprimieren stabil das SV40 Large-T-Antigen (DuBridge et al., 1987). Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung (ORI) tragen, werden in diesen Zellen zusätzlich durch das T-Antigen

repliziert, was entsprechend zu einer gesteigerten Genexpression führt. Das T-Antigen wurde über eine Neomycin-Resistenz in die Zellen eingebracht. Vor ihrer Verwendung wurden die 293T-Zellen deshalb G418-selektiert (0,8 mg/ml; Gibco/BRL), expandiert und aliquotiert eingefroren. Sie wurden nach dem Auftauen maximal bis zur 50. Passage verwendet.

2.2.2.5 Gewinnung primärer Zellen

2.2.2.5.1 Isolierung von T-Lymphozyten aus peripherem Blut

Nicht für die Zellkultur vorbehandelte 6-Loch-Platten wurden mit jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Antikörper CD3 (OKT3; Ortho Biotech, Neuss) und CD28 (CD28.2; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden die Platten mit Medium gewaschen. Aus 5 ml Blut wurden die mononukleären Zellen durch Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) Dichtegradientenzentrifugation und anschließende Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,5 mM EDTA; Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf) gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden in 6 ml Medium aufgenommen und auf zwei der beschichteten Vertiefungen einer 6-Loch Platte verteilt. Nach drei bis vier Tagen waren die T-Lymphozyten ausgereift und wurden zur Transduktion verwendet.

2.2.2.5.2 Isolierung von CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut

Humanes Nabelschnurblut wurde vom Institut für Transplantationsmedizin des Universitätsklinikums in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Eine heparinisierte Probe umfasste üblicherweise 50 bis 60 ml. Daraus ließen sich mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Erythrozytenlyse 8×10^7 bis 2×10^8 mononukleäre Zellen isolieren. Aus diesen wurden die CD34+ Zellen mittels magnetischer Zellseparierung (MACS; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) isoliert. Das Prinzip der magnetischen Zellseparierung beruht darauf, dass zunächst spezifisch auf den anzureichernden Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle mit Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper werden in einem zweiten Schritt mit paramagnetischen Eisenkügelchen („microbeads“) konjugiert. Die mit den Kügelchen-Antikörper-Konjugaten markierten Zellen lassen sich über ein starkes Magnetfeld, welches durch eine Metallmatrix-Säule in einem starken Permanentmagneten erzeugt wird, effizient und schonend anreichern (Miltenyi et al., 1990). Zur Aufreinigung der CD34+ Zellen wurde der „CD34 progenitor cell isolation kit“ zusammen mit dem Zellseparator „Vario-MACS“ und „LS“-Separationssäulen nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotech) verwendet. Nach der Isolierung der ersten Positivfraktion lag die mittels Durchflusszytometrie bestimmte Reinheit der Proben meist nur bei etwa 70%. Deshalb wurden die aufgereinigten Zellen auf eine zweite Säule gegeben, gewaschen und isoliert. Nach den zwei Schritten waren die isolierten Zellen zu rund 95% CD34+. Die gewonnene Zellzahl lag zumeist zwischen 1×10^5 und 5×10^5 . Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder kryokonserviert.

2.2.2.6 Virusproduktion

2.2.2.6.1 Erzeugung virushaltiger Überstände mit stabilen Produzentenzelllinien

pgMEG5AB-Zellen wurden aufgetaut und auf gelatinierten [0,1% (w/v); Sigma] 10 cm Platten expandiert. Wenn die Zellen 80% bis 90% konfluent waren, wurde das Medium gewechselt. Anstelle von DMEM wurde zur Virusernte IMDM verwendet, da dieses HEPES-haltige Medium eine höhere Pufferkapazität hat. Dies ist insofern wichtig, als ein saurer pH-Wert zu einer Virusdegeneration führen kann. 24 Stunden nach dem Mediumwechsel wurde das virushaltige Medium abpipettiert und filtriert (Filter von Millipore, Schwalbach, oder Corning Costar, Porengröße 0,45 µm), um grobe Zelltrümmer und Zellen abzutrennen. Die zellfreien Überstände wurden entweder sofort eingesetzt, oder bis zu einer Verwendung aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt und der Vorgang wurde bis zu viermal wiederholt.

2.2.2.6.2 Transiente Erzeugung virushaltiger Überstände

Bei diesem Verfahren werden alle für die Viruspartikelbildung benötigten Gene durch Kotransfektion von mehreren Plasmiden in 293T-Zellen eingebracht. Dabei sind die Bestandteile des Systems idealerweise auf mehrere Plasmide verteilt: Einem *gag-pol*-Expressionskonstrukt, einem *env*-Expressionskonstrukt und einem retroviralen Vektor mit dem eigentlichen Ziel/Reporter gen, um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, dass sich über Rekombinationsereignisse replikationsfähige Viren bilden. Für die Gegenüberstellung der verschiedenen Vektorsysteme wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit und der Effizienz Zweiplasmidsysteme verwendet, bei denen die *gag-pol*-Sequenz auf demselben Vektor lagen wie das Zielgen, aber nach Transduktion nicht mehr exprimiert wurden (3.1.1 und Abbildung 6A). Zu diesem Vektor brauchte nur noch das Env-kodierende Plasmid (3.1.1 und Abbildung 6B) kotransfiziert werden. Die 293T-Zellen sind von 293-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, abgeleitet und exprimieren stabil das SV40 Large-T-Antigen (DuBridg et al., 1987). Die meisten der verwendeten Plasmide tragen den SV40-Replikationsursprung (ORI) und werden in diesen Zellen zusätzlich durch das T-Antigen repliziert, was entsprechend zu einer gesteigerten Genexpression führt. Initial wurden 293T Zellen nach der CaPO₄ Methode in Anlehnung an die von Pear bzw. Soneoka beschriebene Vorgehensweise transfiziert (Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995). Am Tag vor der Transfektion wurden $4,5 \times 10^6$ 293T-Zellen in einem Volumen von 10 ml in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurde direkt vor der Transfektion das Kulturmedium abgesaugt und gegen 10 ml Medium, das über Nacht im Brutschrank in Bezug auf Temperatur und pH-Wert voräquilibriert wurde, ausgetauscht. Anschließend wurde der Transfektionsmix (5 µg des jeweiligen Plasmids, 62 µl 2 M CaCl₂ ad 500 µl mit H₂O) hergestellt, mit 500 µl 2 x HBS (50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Glukose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,05) vermischt und direkt danach tropfenweise auf die Zellen gegeben. Acht bis zehn Stunden nach Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt. Nun wurde statt DMEM IMDM verwendet. Bei der Transfektion von Plasmiden mit einem CMV-Promotor

wurde die Expression durch die Induktion mit Natrium-Butyrat (NaB; Merck) zusätzlich stimuliert. Dazu wurde dem Medium NaB in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Wie unter 3.1.4 beschrieben, ist das NaB auf einigen Zielzellen zytotoxisch und wurde deshalb ggf. nach acht bis zehn Stunden durch einen Mediumwechsel entfernt. 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde das virushaltige Medium von den Platten abgenommen, filtriert und frisch verwendet oder bei -80°C gelagert. Anders als von den stabilen Produzentenzellen wurden die Überstände von transfizierten 293T-Zellen nicht mehrfach geerntet.

Zur Optimierung der Virusproduktion wurden verschiedene Transfektionsmethoden mit der CaPO_4 -Methode verglichen. Es wurden folgende Reagenzien nach Herstellerangaben verwendet: FuGENE 6, Dotap (beide Roche), Effectene, Superfect, Polyfect (alle Qiagen, Hilden), Dac30 (Eurogentec, Seraing, Belgien), Lipofectamin (Gibco/BRL). Wie unter 3.1.3 beschrieben, erwiesen sich Polyfect für die Herstellung von HFV oder foamyviral pseudotypisierten MLV oder HIV Vektoren und FuGENE 6 für die Herstellung aller anderen Viruspartikel als am besten geeignet. Diese beiden Reagenzien wurden im Weiteren wie folgt verwendet: Es wurden jeweils $4,5 \times 10^6$ 293T-Zellen am Tag vor der Transfektion ausgesät. Bei der Transfektion mit FuGENE 6 wurden 30 μl Transfektionsreagenz mit 260 μl zusatzfreiem DMEM gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde diese Mischung zu 5 μg Vektorplasmid und 5 μg Env-Expressionsplasmid gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben. Bei der Transfektion mit Polyfect wurden 220 μl zusatzfreies DMEM mit je 5 μg der Plasmid DNA und 70 μl Transfektionsreagenz gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden folgte ein Mediumwechsel und es wurde fortgefahren wie zuvor beschrieben.

2.2.2.6.3 Freisetzen intrazellulärer HFV-Partikel

Mittels mehrerer Einfrier- und Auftauzyklen können intrazelluläre Foamyvirus-Partikel aus infizierten Zellen freigesetzt werden (Yu und Linial, 1993). Für die HFV-Vektor Produktion transfizierte 293T-Zellen wurden deshalb bei einigen Experimenten vor der Ernte in den Zellkulturplatten bei -20°C für 30 Minuten eingefroren und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Überstände wurden anschließend wie bereits beschrieben geerntet.

2.2.2.6.4 Konzentrieren von virushaltigen Überständen

Zur Etablierung der Methode wurden 5 ml, 10 ml, 20 ml oder 40 ml virushaltiger Überstand in 50 ml Polypropylen Röhrchen (BD Falcon) in dem Rotor JA-12 (Beckmann-Coulter) bei 4°C und 10.000 rpm, (entspricht bei mittlerem Radius des Rotors 12062 x g) für 10 Minuten bis drei Stunden zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die nicht sichtbaren Virus Sedimente wurden in je 1 ml Medium resuspendiert. Für die Transduktion von hämatopoetischen Zellen wurden je nach Ausgangstiter 10 bis 20 ml virushaltiger Überstand 45 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das virushaltige Sediment in 0,5 bis 2 ml Medium resuspendiert.

2.2.2.6.5 Titration

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Überstand enthalten sind. Die Titer der hergestellten Überstände wurden funktionell durch die Expression des Markergens EGFP in transduzierten Zielzellen ermittelt. Als Zielzellen für die Titration wurden HT1080-Zellen verwendet (3.1.2). 35.000 HT1080-Zellen wurden je Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zielzellen mit zunehmenden Verdünnungen (unverdünnt bis 10^{-5} , 1 ml/Loch) der Überstände transduziert. 24 Stunden nach der Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel und 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (2.2.2.8) hinsichtlich des Anteils an EGFP+ Zellen analysiert. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen kann mit Hilfe der folgenden Formel auf die zum Zeitpunkt der Transduktion je ml Überstand enthaltenen transduzierenden Einheiten (TE/ml) geschlossen werden:

$$\text{TE/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion}}{100\%} \times \% \text{ EGFP+ Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei einigen Experimenten wurden während der Transduktion 10 µg/ml Protaminsulfat (Sigma) zugegeben. Protaminsulfat ist ein Polykation, von dem gezeigt wurde, dass es die Transduktionseffizienz erhöht (Cornetta und Anderson, 1989). Man nimmt an, dass die initiale unspezifische Bindung zwischen Virus und Zielzelle durch Polykationen erhöht wird, indem diese die elektrostatische Abstoßung zwischen den Membranen aufheben (Coelen et al., 1983).

2.2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob eine Transfektion oder Transduktion erfolgreich war, wurde die EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem inversen Durchlichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen), das mit einer Quecksilberlampe und einem 470 nm Filter ausgestattet war.

2.2.2.8 Durchflusszytometrie

Zur FACS („fluorescence activated cell sorting“)-Analyse wurden adhärent wachsende Zellen mit Trypsin abgelöst (2.2.2.1), in ein FACS-Röhrchen (BD Falcon) überführt, mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation wurde das Sediment in FACS-Puffer [0,5% BSA (w/v) in PBS] aufgenommen. Suspensionszellen wurden in die FACS-Röhrchen überführt, gewaschen, sedimentiert und ebenfalls in FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte mit einem FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Je nach Fragestellung wurden 10.000 bis 200.000 Ereignisse aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „CellQuest“ (Becton Dickinson).

2.2.2.8.1 Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung

Zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-, Phycoerythin (PE)-, Allophycocyanin (APC)- oder Peridinin-Chlorophyllprotein (PerCP)-markierte Antikörper gegen das nachzuweisende Molekül entsprechend der vom Hersteller angegebenen Konzentration eingesetzt. Nach Zugabe des Antikörpers zur Zellsuspension wurde der Ansatz gemischt und 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 3 ml PBS zugegeben, die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und mit dem FACS-Gerät gemessen.

Zur Anfärbung von toten Zellen wurde Propidiumiodid (PI; Sigma) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu dem FACS Puffer zugegeben. Die Färbemethode basiert darauf, dass nur die Membran toter Zellen für das PI durchlässig ist und es somit ausschließlich in die DNA toter Zellen interkaliert.

2.2.2.9 Transduktion hämatopoetischer Zellen

2.2.2.9.1 Transduktion hämatopoetischer Zelllinien

50.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einem Volumen von 50 µl zu 500 µl virushaltigem Überstand je Vertiefung einer 24-Loch Platte pipettiert. Nach etwa 16 Stunden wurden die Zellen aus den Platten in 15 ml Zentrifugenröhrchen (BD Falcon) überführt und mit 5 ml PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 500 µl Medium resuspendiert und die Zellen wurden in neue Zellkulturplatten überführt. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Transduktionseffizienz überprüft, indem der Anteil von EGFP+ Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt wurde.

Zur Optimierung der Transduktionseffizienz in hämatopoetische Zellen wurden die Transduktion auf CH296-beschichteten Plastikoberflächen durchgeführt (Hananberg et al., 1996). CH296 ist ein rekombinantes Fibronectinfragment mit virus- und zellbindenden Domänen. Zellkulturplatten, die nicht für die Gewebekultur vorbehandelt waren, wurden mit dem rekombinanten Fibronectinfragment CH296 (Takara Shuzo, Otsu, Japan) in einer Konzentration von 2 µg/cm² entweder für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C, beschichtet. Vor der Verwendung wurden die Gefäße einmal mit Medium gewaschen.

2.2.2.9.2 Transduktion von T-Zellen

Die T-Zellen wurden wie unter 2.2.2.9.1 beschrieben transduziert. Während der Transduktion und der anschließenden Kultivierung wurden dem Medium 100 U/ml Interleukin 2 (IL-2; Chiron, Marburg) zugefügt.

2.2.2.9.3 Transduktion von CD34+ Zellen

10.000 – 50.000 CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut oder mobilisiertem peripheren Blut wurden wie unter 2.2.2.9.1 beschrieben transduziert. Die Zellen wurden entweder gleich nach der Isolierung transduziert oder nach einer 48-stündigen Vorstimulation mit folgenden Zytokinen: Stammzellfaktor (SCF; Amgen Thousand Oaks, CA, U.S.A.), Trombopoietin

(TPO; Amgen oder PeproTech, Rocky Hill, NJ, U.S.A.) und Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF; Amgen), jeweils 100 ng/ml. Während der Transduktion und der anschließenden Kultivierungszeit wurden die Zytokine ebenfalls zugegeben.

2.2.2.10 Progenitorassay

Der Progenitorassay erlaubt die Detektion der klonalen Nachkommenschaft individueller Vorläuferzellen, die sich in der Gesamtheit der CD34+ Zellen befinden. Die Zellen werden dazu in einem viskosen Medium ausgesät, das Zellbewegung weitgehend verhindert. Reife hämatopoetische Zellen lysieren gewöhnlich binnen weniger Tage, nachdem sie in Kultur genommen wurden. Zellen, die hingegen als Nachkommenschaft von Vorläuferzellen neu gebildet werden, können als Kolonien in dem viskosen Medium unter dem Mikroskop leicht identifiziert werden. Verwendet wurde das von der Firma StemCell Technologies (St. Katharinen) vertriebene Medium Methocult (GF H4434), das die folgende Zusammensetzung hat: 1% Methylcellulose in IMDM, 30% FKS, 1% BSA, 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml Granulozyten/Megakaryozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), 10 ng/ml IL-3, 3 U/ml Erythropoietin (EPO).

500 oder 1.000 transduzierte CD34+ Zellen wurden mit 1 ml Methocult gemischt und in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte pipettiert. Die Platten wurden in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Brutschrank für 12 bis 14 Tage inkubiert. Die Auszählung der Kolonien (>50 Zellen) erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Bestimmt wurde der Anteil der EGFP+ Kolonien an der Gesamtzahl der angewachsenen Kolonien. Von jeder Bedingung wurden Triplikate ausgezählt.

2.2.2.11 Transplantation von NOD/SCID Mäusen

Die Tierexperimente wurden am „Wells Center for Pediatric Research“ der „Indiana University Medical School“ in Indianapolis, U.S.A., durchgeführt und erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien des „Animal Care Committee“ der Medizinischen Fakultät in Indianapolis.

Das Nabelschnurblut, das für die Transplantationsexperimente verwendet wurde, wurde wegen der größeren Menge nach der Geburt von gesunden Kindern entnommen, die per Kaiserschnitt entbunden worden waren, und vom „St. Vincent Hospital and Health Care Center, Inc.“ in Indianapolis, IN, U.S.A., zur Verfügung gestellt. Die CD34+ Zellen wurden wie unter 2.2.2.5.2 beschrieben isoliert.

Leukozyten aus mobilisiertem peripheren Blut wurden von einem gesunden Spender zur Verfügung gestellt. Die CD34+ Zellen (hier $2,8 \times 10^8$) wurden daraus mittels einer Isolex 300i Zellseparationsapparatur (Baxter Immunotherapy, Irvine, CA, U.S.A.) aufgereinigt. Der Anteil an Stammzellen innerhalb der Fraktion der CD34+ Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut ist niedriger als bei Nabelschnurblut. Dementsprechend muss eine größere Zahl Zellen transduziert und transplantiert werden. Um die Menge an transient hergestelltem konzentrierten Virus gering zu halten, wurde aus den CD34+ Zellen die Population der CD34+/CD38- Zellen isoliert. Der Anteil dieser Population an allen CD34+ Zellen beträgt

etwa 1%. Innerhalb dieser Population befinden sich die echten Stammzellen. Die CD34+/CD38- Zellen wurden nach Anfärben der Zellen mit einer Antikörper-Kombination aus humanem CD34 (hCD34)-FITC und hCD38-PE (beide von BD Biosciences Pharmingen) mittels FACS-Sortierung an einem FACS-Vantage der Firma Becton Dickinson isoliert.

2.2.2.11.1 Transduktion der Zellen

Es wurden insgesamt vier unabhängige Experimente mit NOD/SCID Mäusen durchgeführt, bei denen Zellen aus Nabelschnurblut transplantiert wurden. Bei jedem Experiment gab es 2 bis 4 Gruppen mit je 4 oder 5 Mäusen. Die Anzahl unstimulierter Zellen, die je Maus transplantiert wurde, betrug $1,75 \times 10^5$ (Experiment 1), 2×10^5 (Experiment 2), $5,7 \times 10^5$ (Experiment 3) und 4×10^5 (Experiment 4). Um ausreichend Zellen für jedes Experiment zu haben, wurden die CD34+ Fraktionen aus maximal sechs Nabelschnurblut-Produkten miteinander vereinigt. Die für ein Experiment vorhandene Zellmenge wurde zunächst geteilt. Ein Teil wurde mit SCF, G-CSF und TPO, jeweils 100 ng/ml, vorstimuliert in einer Dichte von $1,3 \times 10^5$ bis $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Der andere Teil wurde ohne Prästimulation transduziert. Dazu wurden die Zellen in einem Volumen von 500 μ l auf CH296-beschichtete 10 cm Platten mit 6 ml konzentriertem (20 ml, 45 Minuten 10.000 rpm, 4°C, Aufnahme des Sediments in 1,5 ml) virushaltigem Überstand in einer Dichte von 9.000 bis 36.000 Zellen/cm² transduziert. Zu der Transduktion wurden SCF, G-CSF und TPO, jeweils 100 ng/ml zugegeben. Nach 16 Stunden wurden die Zellen sorgfältig von den Platten abgelöst, gewaschen und in Medium aufgenommen. Die je Maus zu transplantierende Zellmenge wurde in 200 μ l aufgenommen.

2.2.2.11.2 Transplantation der Mäuse

Vor der Transplantation erhielten die NOD/SCID Mäuse eine Ganzkörperbestrahlung mit einer sublethalen Dosis von 300 cGy (Bestrahlungsquelle: ¹³⁷Cäsiumquelle, Nordion International, Ontario, Kanada). $1,75$ bis $5,7 \times 10^5$ Zellen wurden in einem Volumen von 200 μ l in die Schwanzvene eines jeden Tieres transplantiert. Von den CD34+/CD38- Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut wurden 5×10^4 Zellen zusammen mit 2×10^6 bestrahlten Trägerzellen (2.000 RAD) aus der CD34- Fraktion in einem Volumen von 200 μ l je Maus transplantiert. Als Kontrollen gab es bei jedem Experiment ein oder zwei Mäuse, denen nach der Bestrahlung keine humanen Zellen transplantiert wurden und ein oder zwei Mäuse, denen untransduzierte Zellen transplantiert wurden.

2.2.2.11.3 Analyse des Anwachsens transduzierter humaner Zellen in NOD/SCID-Mäusen

6 bis 13 Wochen nach der Transplantation wurde von jeder Maus peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dann wurden die Mäuse getötet und es wurden Femur und Tibia sowie die Milz präpariert. Aus den Knochen wurde das Knochenmark herausgespült. Aus dem Knochenmark und der Milz wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Erythrozyten wurden mit PharmLyse (BD Biosciences Pharmingen) nach Herstellerangaben entfernt. Das Anwachsen der humanen Zellen und der Anteil der angewachsenen Zellen an den verschiedenen Blutzelltypen wurde nach Antikörperfärbung durch FACS-Analyse ermittelt.

Die Zellen wurden mit hCD45-PerCP sowie mit Kombinationen aus hCD19-PE und hCD34-APC und aus hCD33-PE und hCD45-APC (alle Antikörper von BD Biosciences Pharmingen) angefärbt. Die Antikörper wurden nach den Herstellerangaben eingesetzt. Der Anteil der transduzierten Zellen wurde bei der FACS-Analyse über die EGFP-Expression ermittelt. Bei der Messung mit einem FACSCalibur wurden 50.000 bis 200.000 Ereignisse je Probe aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CellQuest Software. Dabei wurden tote und unspezifisch angefärbte Zellen durch das Setzen von Rahmen „ausgated“. Das Anwachsen humaner Zellen wurde definiert als Anteil von mindestens 0,35% nukleärer Zellen, die hCD45 über dem Hintergrund (Zellen von Mäusen, die keine humanen Zellen erhielten) exprimierten.

Genomische DNA aus peripheren Blut-, Knochenmark- und Milzzellen wurde gemäß 2.1.1.4 isoliert und hinsichtlich der Anzahl und der proviralen Integrationsstellen analysiert (2.2.1.5). Von den Knochenmarkzellen wurden je nach Engraftment der humanen Zellen 1 bis 5×10^5 Zellen mit 1 ml Methocult gemischt und gemäß 2.2.2.10 in Progenitorassays analysiert. Isoliert liegende EGFP+ Kolonien wurden für eine Integrationsstellenanalyse der proviralen DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop „gepickt“ (2.2.1.5).

3. Ergebnisse

3.1 Virusproduktion

Für die Produktion von onkoretroviralen Vektoren wurden so genannte Verpackungszellen etabliert, die stabil die viralen Proteine Gag, Pol und Env exprimieren (Miller, 1990). In diese Zellen wird der Vektor mit dem eigentlichen Zielgen transient oder stabil eingebracht und es können hochtitrige Überstände geerntet werden. Sowohl bei Lentiviren wie HIV-1 als auch bei Foamyviren ist die Herstellung solcher Produzentenzellen schwieriger, da einige der für die Herstellung von rekombinanten replikationsdefekten Viren essentiellen Genprodukte zytotoxisch sind und eine kontinuierliche Expression deshalb gar nicht oder nur ineffizient möglich ist. Um für diese Viren Produzentenzellen herzustellen, müssen die entsprechenden Gene unter die Kontrolle induzierbarer Promotoren gestellt werden (Yang et al., 1995; Kafri et al., 1999). Für Foamyviren wurde die Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren Verpackungszelllinie beschrieben (Wu und Mergia, 1999), die aber maximal $1,1 \times 10^4$ Partikel/ml freisetzt. Vor diesem Hintergrund ist derzeit die effizienteste Methode, hochtitrige Foamyvirus-haltige Überstände zu generieren, ein transientes Transfektionssystem. Die Methode wurde ursprünglich von Landau und Littman (Landau und Littman, 1992) für die Herstellung onkoretroviraler Vektoren beschrieben und später von Pear et al. (Pear et al., 1993) und Soneoka et al. (Soneoka et al., 1995) optimiert. Bei diesem Verfahren werden alle für die Viruspartikelbildung benötigten Gene durch Kotransfektion von mehreren Plasmiden in 293T-Zellen eingebracht. Die 293T-Zellen sind von 293-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, abgeleitet und exprimieren stabil das SV40 Large-T-Antigen (DuBridge et al., 1987). Die meisten verwendeten Plasmide tragen den SV40-Replikationsursprung (ORI) und werden in diesen Zellen zusätzlich durch das T-Antigen repliziert, was entsprechend zu einer gesteigerten Genexpression führt.

3.1.1 Verwendete retrovirale Expressionsplasmide

Um das Foamyvirus Vektorsystem mit MLV- und HIV-Vektoren zu vergleichen, wurden auch diese in einem transienten System hergestellt. Die Gene für die transiente Virusproduktion sind üblicherweise auf drei verschiedene Plasmide aufgeteilt, ein *gag-pol*-Expressionsplasmid, ein *env*-Expressionsplasmid und ein Plasmid, das die zu verpackende RNA mit dem eigentlichen Transgen exprimiert. Damit soll die Wahrscheinlichkeit minimiert werden, dass sich über Rekombinationsereignisse replikationsfähige Helferviren bilden. Um bei der transienten Virusproduktion alle drei Vektorsysteme möglichst effizient produzieren zu können und dabei möglichst niedrigen Qualitätsunterschieden zu unterliegen, wurde hier ein Zweiplasmidsystem gewählt. Die Expressionskassetten der verwendeten Plasmide sind in Abbildung 6 dargestellt. Es wurden selbst-inaktivierende Konstrukte verwendet, die gleich aufgebaut sind (Abbildung 6A): Der HFV-Vektor pMH118, der MLV-Vektor pcAMS/U3E und der HIV-Vektor pGJ3egfp (Leurs et al., 2003). Die 3'-Bereiche mit den *bel* Genen bei HFV

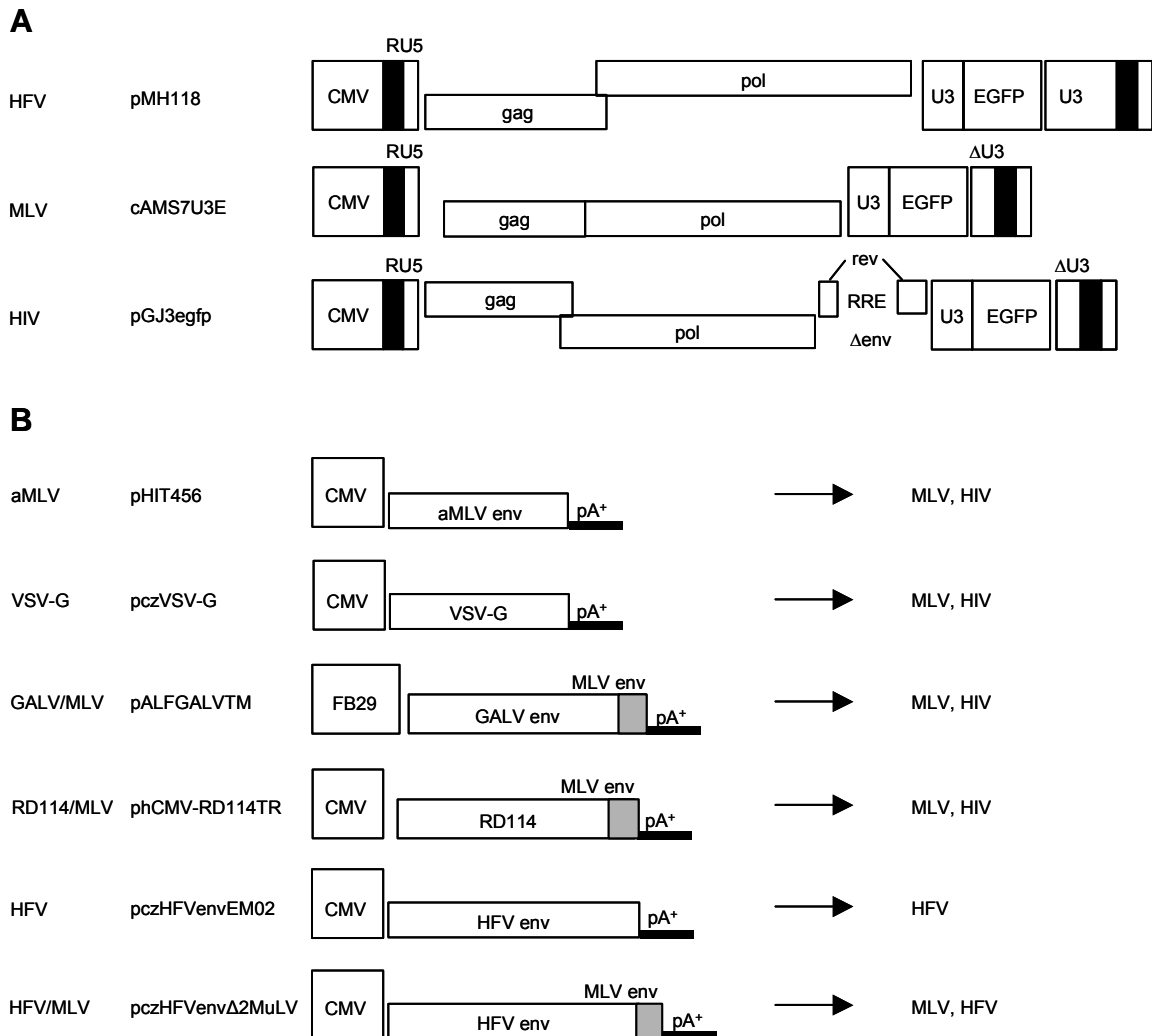


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Vektoren und Env-Expressionsplasmide. (A) Rekombinante Viren wurden durch Kotransfektion von zwei Plasmiden in 293T Zellen hergestellt. Für den Vergleich der drei Vektorsysteme wurden identisch aufgebaute, selbst-inaktivierende Vektoren verwendet. Alle drei Vektoren beinhalten die EGFP cDNA unter Kontrolle des U3 Promotors von SFFV. Für die transiente Virusproduktion wurde die Expression der viralen Strukturproteine und Enzyme sowie der zu verpackenden RNA vom CMV Promotor getrieben. Nach der Integration der proviralen DNA sind die 5'LTRs aller Konstrukte inaktiv: Der HFV LTR wegen des Fehlens von Tas und der MLV- und HIV LTR aufgrund von Deletionen in der jeweiligen U3 Region. Der HFV LTR ist eine funktionelle Deletionsvariante des Vollängen-LTRs, die spontan in der Zellkultur entstand (Schmidt et al., 1997). **(B)** Schematische Darstellung der verwendeten Env-Expressionsplasmide. Welche Partikel mit dem jeweiligen Env pseudotypisiert werden können, ist am rechten Rand angegeben. Erklärungen zu den einzelnen Envs befinden sich im Text.

und mit den verschiedenen akzessorischen Genen bis auf *rev* bei HIV wurden deletiert und es wurde in alle drei Konstrukte eine Expressionskassette mit dem „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP)-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden U3 Promotors des „spleen focus-forming virus“ (SFFV) (Baum et al., 1995) kloniert. Für die transiente Virusproduktion erfolgt die Expression der viralen Strukturproteine und Enzyme sowie der zu verpackenden RNA durch den starken Cytomegalievirus (CMV)-

Enhancer/Promotor. Der Transkriptionsstart am Anfang der R-Regionen der LTRs wurde beibehalten. Nach der Integration der proviralen DNA sind die 5'-LTRs aller Konstrukte inaktiv: Der HFV-LTR wegen des Fehlens des Transaktivators Tas, und die MLV- und HIV-LTRs aufgrund von Deletionen in den jeweiligen U3 Regionen. Die Expression des Markergens erfolgt über den internen SFFV-U3-Promotor.

Die meisten exogenen Retroviren benötigen lediglich die Expression der Gag Strukturproteine, um Kapside zu bilden und diese als membranumhüllte pseudovirale Partikel aus der Zelle zu schleusen (Boulanger und Jones, 1996; Swanstrom und Wills, 1997). Dadurch können Kapside des einen Virus beim Knospen Hüllproteine eines anderen Retrovirus oder auch Hüllproteine von Viren aus anderen Virusfamilien (zum Beispiel VSV oder Influenza) in ihre Partikel einbauen (Friedmann und Yee, 1995; Swanstrom und Wills, 1997). Dieses Phänomen macht man sich zunutze, denn abhängig von der Rezeptorexpression auf den Zielzellen kann solchen phänotypisch gemischten Viren oder so genannten Pseudotypen eine effizientere Erkennung der Zielzellen oder auch ein ganz anderes Wirtsspektrum verliehen werden. Neben dem Wirtsspektrum werden durch das Hüllprotein auch die physikochemischen Bedingungen des Vektors, wie zum Beispiel seine Stabilität, und die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts bestimmt. Um die Bedingungen für die Vektorproduktion zu optimieren, wurden für die Pseudotypisierung von MLV- und HIV-Partikeln eine Reihe derzeit etablierter Hüllproteine verwendet (Abbildung 6B). Diese Glykoproteine waren von dem Rhabdovirus VSV-G sowie folgenden Typ C Retroviren abgeleitet: amphotropes MLV (aMLV), GALV und felines endogenes Retrovirus RD114. Vom GALV-Env und vom RD114-Env wurden jeweils chimäre Varianten verwendet, die die Pseudotypisierung von Lentiviren effizienter machen. Sie enthalten die zytoplasmatische Domäne (RD114) (Sandrin et al., 2002) bzw. die Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne (GALV) (Stitz et al., 2000) von aMLV.

Anders als die meisten anderen Retroviren sind Foamyviren auf die Koexpression des viralen Hüllproteins angewiesen, um Viruspartikel freizusetzen (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Die HFV-Partikelbildung und -freisetzung ist dabei spezifisch auf HFV-Hüllproteine angewiesen. Fremde Hüllproteine sind nicht in der Lage, HFV-Kapside zu pseudotypisieren (Pietschmann et al., 1999). Umgekehrt lassen sich MLV- oder HIV-Kapside nicht effizient mit wt-HFV-Hüllproteinen pseudotypisieren. Aus diesem Grund wurden chimäre Hüllproteine etabliert, die die Pseudotypisierung anderer Viren ermöglichen. Für die initialen Experimente wurde ein chimäres HFV-Env verwendet, das den zytoplasmatischen Teil des MLV-Envs an ein trunkiertes HFV-Env fusioniert hat und so auch MLV-Partikel pseudotypisieren kann (Lindemann et al., 1997).

3.1.2 Bestimmung des Virustiters

Die Titer der hergestellten Überstände wurden funktionell durch die Expression des Markergens in transduzierten Zielzellen ermittelt. Die Zielzellen wurden mit zunehmenden Verdünnungen (unverdünnt bis 10^{-5}) der Überstände transduziert und 72 Stunden nach der

Transduktion mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich des Anteils an EGFP+ Zellen analysiert. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen kann so auf die zum Zeitpunkt der Transduktion je ml Überstand enthaltenen transduzierenden Einheiten (TE/ml) geschlossen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorexpression für das zu titrierende Virus auf verschiedenen Zelllinien ist die Wahl der Zielzellen von großer Bedeutung. Um nicht falsch niedrige Titer zu bestimmen, sollte für die Titration eine Zelllinie verwendet werden, die möglichst gut empfänglich für das zu testende Virus ist. Im Fall der Foamyviren ist dies für die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 bekannt (Hill et al., 1999). Diese Zelllinie lässt sich im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Zelllinien wie NIH/3T3 oder 293 ebenfalls sehr gut mit nicht foamyviral pseudotypisierten MLV- und HIV-Vektoren infizieren und wurde deshalb zur Bestimmung der Titer aller hergestellten Überstände verwendet.

Neben der Wahl geeigneter Zielzellen sind die Transduktionsbedingungen maßgeblich für die Titerbestimmung. Abbildung 7 zeigt die Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der Anzahl der ausgesäten Zielzellen bei HFV-Überständen (Abbildung 7A) und bei unterschiedlich pseudotypisierten MLV-Überständen (Abbildung 7B). Um funktionell annähernd die tatsächliche Anzahl an infektiösen Partikeln in einem Überstand zu bestimmen, sollte bei der Titration also eine möglichst hohe „multiplicity of infection“ (m.o.i.) gewählt werden.

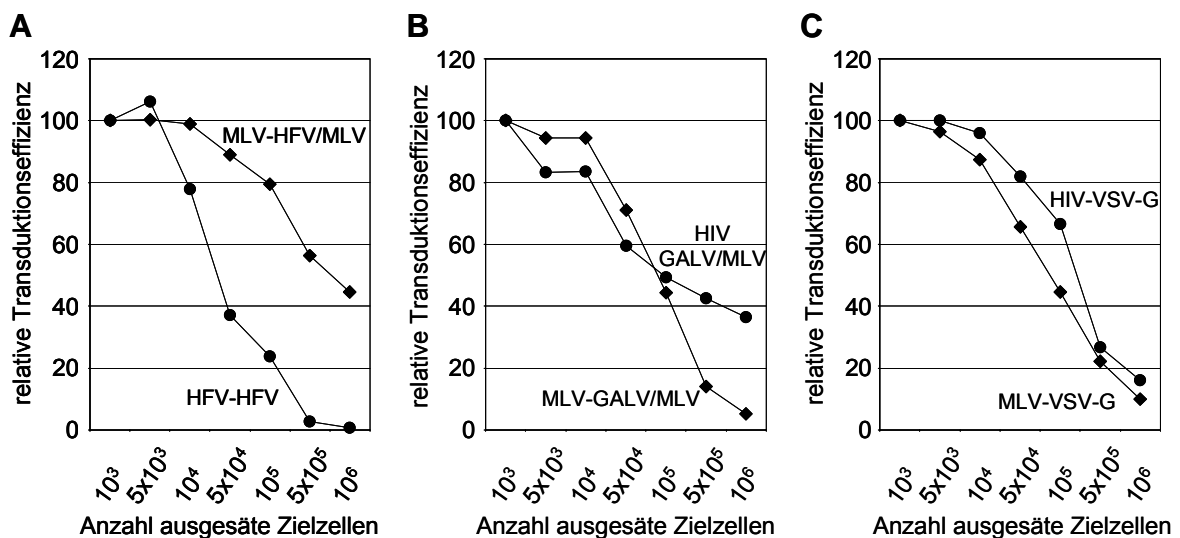


Abbildung 7. Einfluss der Zielzellzahl auf die Transduktionseffizienz. 10^3 bis 10^6 HT1080-Zellen wurden je Loch ($9,6 \text{ cm}^2$) einer 6-Loch Platte ausgesät und am folgenden Tag mit identischen Mengen an rekombinantem Virus transduziert. Drei bzw. fünf (bei 10^3 und 5×10^3 ausgesäten Zellen) Tage nach der Transduktion wurden die Zielzellen per FACS hinsichtlich des Anteils EGFP+ Zellen analysiert. Die Transduktionseffizienz bei der niedrigsten Zielzellzahl wurde gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse bei den höheren Zellmengen wurden darauf bezogen. **(A)** zeigt das Ergebnis für HFV und HFV-pseudotypisierte MLV-Partikel **(B)** für GALV-pseudotypisierte MLV- und HIV-Partikel und **(C)** für VSV-G-pseudotypisierte MLV- und HIV-Partikel. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Insgesamt muss festgestellt werden, dass dieser Weg, den Titer von Überständen zu bestimmen, lediglich eine Annäherung darstellt. Man wird niemals alle Partikel messen, die tatsächlich im Überstand befindlich sind, sondern in Abhängigkeit von den verwendeten Zielzellen und gewählten Transduktionsbedingungen immer nur eine Mindestzahl bestimmen können. Viren, die unterschiedlich pseudotypisiert sind, können hinsichtlich ihres Titers nicht verglichen werden, da die Rezeptorexpression auf den Zielzellen wahrscheinlich nicht gleich hoch ist. Andere Methoden zur Titerbestimmung wie etwa die Quantifizierung der Menge an Kapsidprotein im Überstand oder der RT-Aktivität haben den Nachteil, auch nicht infektiöse Partikel, so genannte Pseudopartikel, zu messen und stellen somit keine Alternative dar.

3.1.3 Optimierung der Virusproduktion: Transfektion

Zur Optimierung der Virusproduktion wurden zunächst verschiedene Transfektionsmethoden miteinander verglichen. Die höchsten Transfektionseffizienzen (gemessen am Anteil der EGFP+ 293T-Zellen) wurden dabei mit nicht liposomalen Lipid-Formulierungen (FuGENE 6/Roche, Effectene/Qiagen, Lipofectamin/Gibco/BRL) erreicht. Interessanterweise zeigte sich aber, dass der Titer von HFV-Überständen höher war, wenn diese mit aktivierten Dendrimern (Superfect oder Polyfect, Qiagen) hergestellt worden waren, obgleich der Anteil an EGFP+ transfizierten Zellen hierbei häufig niedriger war als bei den Lipid-Formulierungen (Abbildung 8A). Weitere Experimente zeigten, dass dieser Effekt abhängig vom verwendeten Hüllprotein war. Bei der Pseudotypisierung von MLV-Vektoren mit einem chimären

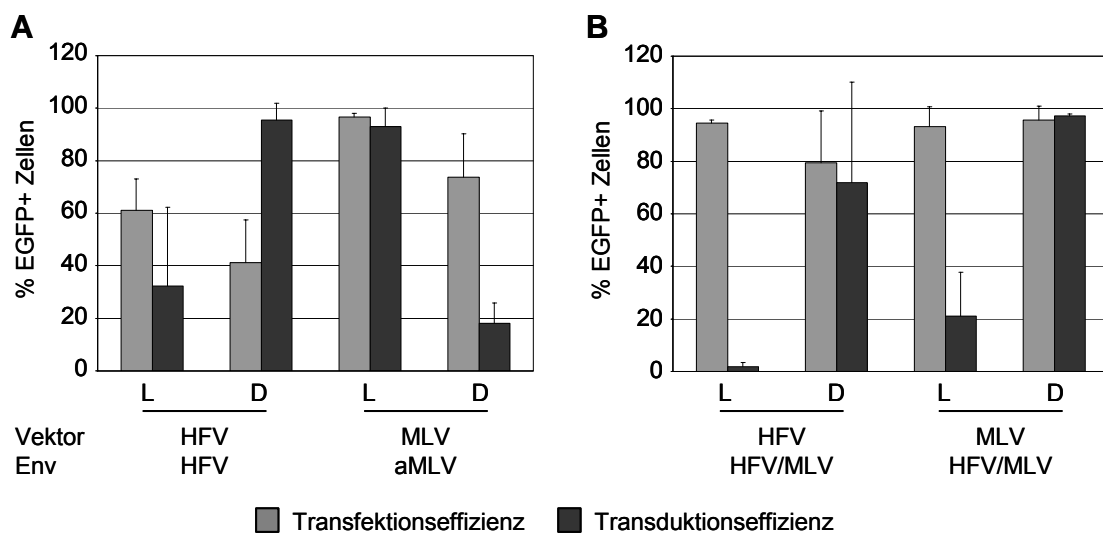


Abbildung 8. Transfektionsreagenzien. Für die transiente Transfektion zur Virusproduktion wurden nicht-liposomale Lipid-Reagenzien (L) oder aktivierte Dendrimere (D) verwendet. Die Transfektionseffizienz (helle Balken) ist als %EGFP+ Zellen 48 Stunden nach der Transfektion dargestellt. Die Transduktionseffizienz (dunkle Balken) mit 1/10-verdünnten Überständen in HT1080-Zellen ist als %EGFP+ Zellen 72 Stunden nach der Transduktion ermittelt worden. **(A)** Hergestellt wurde ein HFV-Vektor mit dem wt-HFV-Env und ein MLV-Vektor mit dem amphotropen MLV-Env. **(B)** Hergestellt wurde ein HFV-Vektor mit einem chimären HFV/MLV-Env und ein MLV-Vektor mit demselben chimären HFV/MLV-Env. Gemittelt wurden Ergebnisse aus 2 – 6 unabhängigen Experimenten.

HFV/MLV-Env konnte ebenfalls ein deutlich höherer Titer erreicht werden, wenn bei der Transfektion aktivierte Dendrimere verwendet wurden (Abbildung 8B).

Insgesamt konnte durch die veränderten Transfektionsbedingungen ein etwa um den Faktor 30 höherer Titer erreicht werden, wenn HFV-Partikel oder Foamyvirus-pseudotypisierte MLV-Partikel hergestellt wurden. Für die Herstellung von MLV- oder HIV-Partikeln, die mit anderen Hüllproteinen versehen wurden, wurden im Folgenden zur Transfektion immer Lipid-Formulierungen verwendet.

3.1.4 Optimierung der Virusproduktion: Induktion

Eine Reihe eukaryotischer Promotoren können durch Natriumbutyrat (NaB) aktiviert werden, eingeschlossen den CMV-Promotor (Radsak et al., 1989; Tanaka et al., 1991). 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf den 293T-Zellen. Dem neuen Medium wurde 10 mM NaB zugegeben. Weitere 24 Stunden später wurden die Überstände von den Zellen abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Der Effekt der Induktion der Genexpression auf den Virustiter ist in Abbildung 9A zu sehen. Der Titer wird um einen Faktor von acht bis zwölf höher. Allerdings ist das im Überstand befindliche NaB auf einigen Zielzellen zytotoxisch. In Abbildung 9B ist zu sehen, dass je nach verwendeter Zelllinie zwischen 15% und 90% der Zellen absterben, wenn der Virusüberstand NaB enthält. Dabei

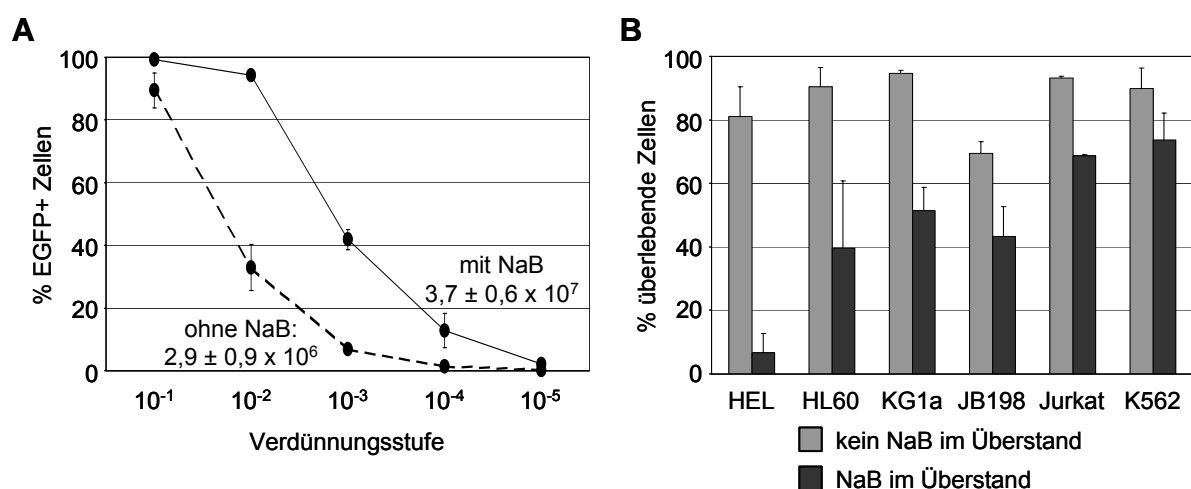


Abbildung 9. Induktion der Genexpression mit NaB. Bei der Herstellung von HFV-Überständen wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium auf den 293T-Zellen gewechselt. Zur Induktion der CMV-Promotor getriebenen Genexpression wurde dem neuen Medium 10 mM NaB zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Überstände geerntet. **(A)** Die Überstände wurden auf HT1080-Zellen titriert. Der Titer von Überständen, die mit NaB hergestellt wurden (durchgezogene Linie) waren um einen Faktor von 12 höher, als die, die ohne NaB hergestellt wurden (gestrichelte Linie). **(B)** Die Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien zeigt, dass die Verwendung NaB-haltiger Überstände (dunkle Balken) gegenüber NaB-freien Überständen (helle Balken) mit einem Verlust der Zielzellen einhergeht, der je nach Zelllinie zwischen 15% und 90% liegt. Diese Toxizität ist unabhängig von dem höheren Titer, sie tritt auch mit NaB-haltigen, virusfreien Überständen auf. Die Ergebnisse wurden aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

ist die erhöhte Toxizität nicht auf den höheren Titer zurückzuführen: Auch wenn der Überstand virusfrei ist, sterben die Zellen in dem NaB-haltigen Medium ab. Um die Toxizität zu vermeiden, kann das NaB-haltige Medium nach acht bis zehn Stunden von den 293T-Zellen entfernt werden und durch NaB-freies Medium ersetzt werden. Eine andere Möglichkeit, das NaB aus dem Überstand zu entfernen und die Toxizität zu reduzieren, ist, die Viruspartikel durch Zentrifugation zu sedimentieren (siehe unten), das NaB-haltige Medium abzusaugen und durch NaB-freies Medium zu ersetzen.

3.1.5 Optimierung der Virusproduktion: Freisetzen intrazellulärer Partikel

Das HFV-Env Protein weist ein Trilysin Motiv auf, das als „ER-retrieval“-Signal wirkt und den Transport des HFV-Hüllproteins an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al., 1997). Dieses Signal ist dafür mitverantwortlich, dass Foamyviren hauptsächlich an intrazytoplasmatischen Domänen knospen (Goepfert et al., 1999). In Foamyvirus-infizierten Zellen kommt deshalb die Mehrzahl der viralen Partikel mit intrazellulären Membranen assoziiert in intrazytoplasmatischen Vesikeln oder im Zytoplasma vor. Ein geringerer Teil der Partikel knospt an der Plasmamembran (Zemba et al., 1998). Eine Ausnahme bildet das Equine Foamyvirus (EFV), das ausschließlich von der Plasmamembran knospt (Tobaly-Tapiero et al., 2000; Lecellier et al., 2002).

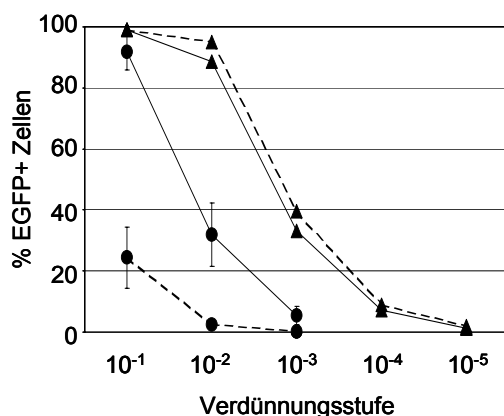


Abbildung 10. Freisetzen intrazellulärer HFV-Partikel mittels Einfrieren/Auftauen. 293T-Zellen wurden entweder mittels FuGENE 6 (●) oder Polyfect (▲) mit dem HFV Vektor- und Env-Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Genexpression mit 10 mM NaB induziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Platten entweder sofort geerntet (gestrichelte Linie) oder vor der Ernte bei -20°C eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur wieder aufgetaut (durchgezogene Linie). Die filtrierten Überstände wurden dann auf HT1080-Zellen titriert. Durch das Aufbrechen der Zellen und

Freisetzen der intrazellulären HFV-Partikel mittels Einfrieren und Wiederauftauen konnte der Titer um einen Faktor von 15 erhöht werden. Das war aber nur der Fall, wenn die Viren mit Lipid-Formulierungen, in diesem Fall FuGENE 6 hergestellt worden waren. Bei Verwendung von aktivierten Dendrimern für die Transfektion, hier Polyfect, war kein Effekt festzustellen.

Mittels mehrerer Einfrier- und Auftauzyklen können intrazelluläre Foamyvirus Partikel aus infizierten Zellen freigesetzt werden (Yu und Linial, 1993). Vor diesem Hintergrund wurden für die Foamyvirus Vektor-Produktion transfizierte 293T-Zellen vor der Ernte in den Zellkulturplatten bei -20°C für 30 Minuten eingefroren und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Überstände wurden abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter gegeben und auf HT1080-Zellen titriert. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 zu sehen. Eine Erhöhung des Titers um den Faktor 15 konnte festgestellt werden, wenn die Transfektion für die Virusproduktion mittels FuGENE 6 erfolgt war. Bei Verwendung von Polyfect erbrachte das

Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen keine Titererhöhung. Der Titer war hier immer noch um einen Faktor von knapp 20 höher als der bei Verwendung von FuGENE 6 mit anschließendem Aufbrechen der Zellen. Anscheinend werden die Viruspartikel durch die Verwendung von aktivierten Dendrimeren für die Transfektion deutlich besser in den Überstand freigesetzt und der Anteil an intrazellulären Partikeln ist nur noch gering.

3.1.6 Optimierung der Virusproduktion: Konzentrieren der Überstände

Eine weitere Erhöhung der Titer ist möglich, indem das Volumen des Retrovirus-haltigen Überstandes eingeengt wird, ohne dabei infektiöse Partikel zu verlieren. Hierfür wurden verschiedene Methoden beschrieben, so etwa die Passage durch Molekulargewicht „cut-off“ Filter (Paul et al., 1993; Kotani et al., 1994; Miller et al., 1996; Olsen, 1996; Chu und Dornburg, 1997), Lyophilisation (Kotani et al., 1994) und Ko-Präzipitation mit Calcium-Phosphat (Morling und Russell, 1995). Allerdings wird eine solche Reduktion häufig von der Aufkonzentrierung ungewünschter Komponenten begleitet, die die Infektiosität inhibieren können (Le Doux et al., 1996) oder toxisch für die Zielzellen sind (Morling und Russell, 1995). Eine vergleichsweise einfache Methode ist dagegen das Sedimentieren der Viruspartikel durch Zentrifugation. Dabei werden die Überstände vorwiegend durch Ultrazentrifugation konzentriert, in den meisten Fällen für 2-4 Stunden bei 50.000 x g und 4°C. Die starken Kräfte, die bei derart hohen Umdrehungszahlen wirken, erfordern allerdings eine hohe Stabilität der Viren bzw. ihrer Hüllproteine. Ohne einen Verlust an infektiösen Partikeln können beispielsweise HIV- oder MLV-Vektoren aufkonzentriert werden, die mit VSV-G oder dem RD114-Env pseudotypisiert sind. Andere Hüllproteine, wie zum Beispiel die MLV-Glykoproteine, sind zu fragil, da die Oberflächendomäne (SU) und die Transmembrandomäne (TM) nicht kovalent miteinander verbunden sind und bei der Hochgeschwindigkeitszentrifugation dissoziieren. Auch Foamyviren können durch Ultrazentrifugation konzentriert werden (Trobridge et al., 2002). Im Folgenden wird eine einfachere Methode beschrieben, die ebenfalls eine effiziente Aufkonzentrierung viraler Überstände erlaubt und für jedes getestete Vektorsystem anwendbar ist.

Um die Methode zu etablieren wurden große Mengen eines GALV-pseudotypierten EGFP-exprimierenden MLV-Vektors mit der stabilen Produzentenzelllinie pgMEG5AB hergestellt (Hananberg et al., 2002). 5 ml, 10 ml, 20 ml oder 40 ml vektorhaltiger Überstand wurden in 50 ml Polypropylen Röhrchen (Falcon) in dem Rotor JA-12 (Beckmann-Coulter) bei 4°C und 10.000 rpm (entspricht bei mittlerem Radius 12.062 x g), für 10 Minuten bis 3 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die nicht sichtbaren Virus Sedimente in je 1 ml Medium resuspendiert. Die Titer wurden im Vergleich zu nicht konzentriertem Überstand durch Transduktion von HT1080-Zellen mit steigenden Verdünnungen unter Zugabe von 10 µg Protamin/ml und späterer FACS-Analyse der EGFP-Expression ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 11A und 11B dargestellt. Der initiale Titer

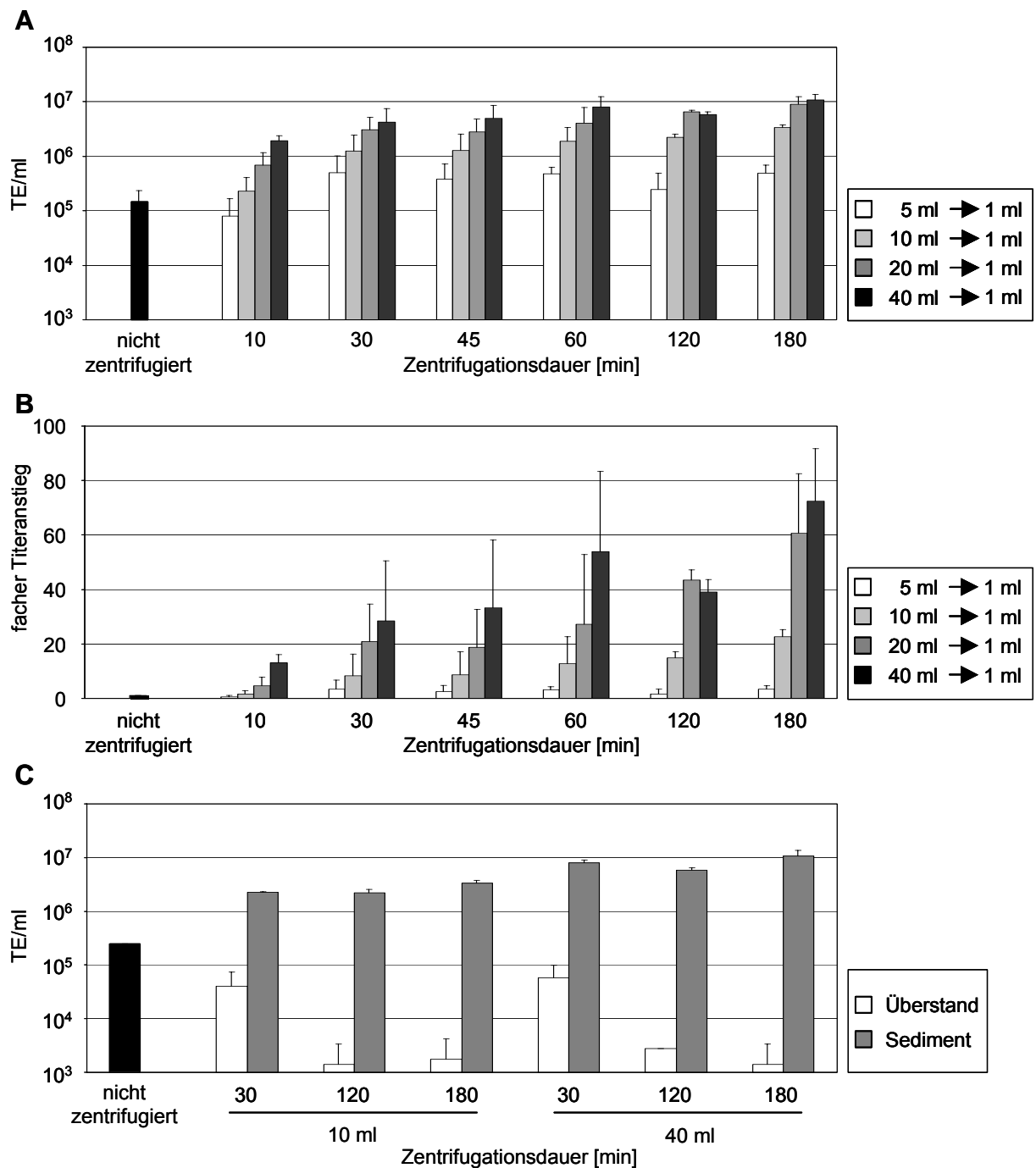


Abbildung 11. Konzentrieren retroviraler Überstände. Steigende Mengen des mit einer stabilen Produzentenzelllinie hergestellten GALV-pseudotypisierten MLV-Vektors MEG5AB wurden für unterschiedliche Zeiten bei 4°C und 10.000 rpm in dem Rotor JA-12, Beckmann Coulter, zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment wurde in 1 ml Medium resuspendiert. **(A)** zeigt die Titer der Überstände, die durch limitierende Verdünnung in Anwesenheit von 10 µg/ml Protaminsulfat auf HT1080-Zellen ermittelt wurden, im Vergleich zu unkonzentriertem Ausgangsüberstand. In **(B)** ist die Titererhöhung als Vielfaches des Ausgangstiters dargestellt. In **(C)** ist die Anzahl der nach der Zentrifugation noch im Überstand enthaltenen Viruspartikel der Anzahl der Viruspartikel im Sediment und im unzentrifugierten Überstand gegenübergestellt. Die Daten sind aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten gemittelt.

des unkonzentrierten Überstandes betrug $1,5 \times 10^5$ TE/ml. Bereits nach 30-minütiger Zentrifugation von 20 ml Überstand konnte ein 20-fach höherer Titer erreicht werden ($3,1 \times 10^6$ TE/ml). Bei 60-minütiger Zentrifugation von 40 ml Überstand wurde ein mehr als 50-fach höherer Titer erreicht ($8,0 \times 10^6$ TE/ml) und nach 3 Stunden Zentrifugation von 40 ml Überstand war der Titer sogar über 70-fach erhöht ($1,1 \times 10^7$ TE/ml). In Abbildung 11C ist zu sehen, dass nach 30-minütiger Zentrifugationsdauer der Überstände noch beträchtliche Mengen an Partikeln im zu verwerfenden Überstand verbleiben, während nach 2 Stunden nur noch sehr geringe Mengen an infektiösen Viruspartikeln in dem Überstand nachweisbar sind.

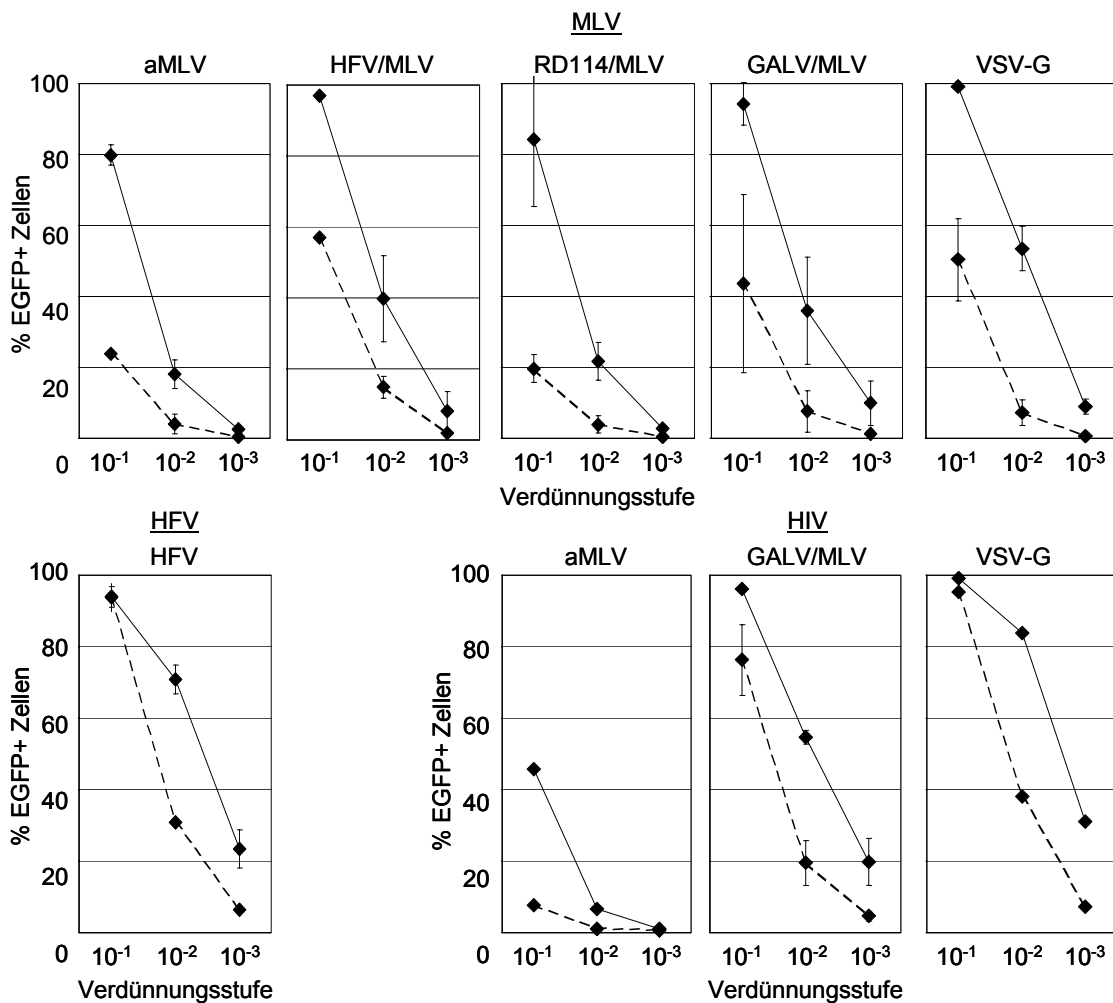


Abbildung 12. Konzentrieren verschiedener retroviraler Überstände. 10 ml der jeweiligen transient hergestellten rekombinanten Virusüberstände wurden 45 Minuten bei 4°C und 10.000 rpm im Rotor JA-12 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment wurde in 1 ml Medium resuspendiert. Die Transduktionseffizienzen steigender Verdünnungen (hier gezeigt 10^{-1} bis 10^{-3}) der unkonzentrierten (gestrichelte Linie) und konzentrierten (durchgezogene Linie) Überstände wurden auf HT1080-Zellen ohne Zugabe von Protaminsulfat ermittelt. Der mittlere Faktor für den durch die Zentrifugation erreichten Titeranstieg bei allen gezeigten Experimenten betrug $6,4 \pm 2$.

Die beschriebene sehr einfache und effiziente Methode, Viruspartikel zu konzentrieren, wurde auch für andere Vektoren getestet. In Abbildung 12 ist die mittels Zentrifugation erreichte Erhöhung der Transduktionseffizienz für transient hergestellte unterschiedlich pseudotypisierte MLV- und HIV-Vektoren und für HFV-Vektoren dargestellt.

3.2 Transduktion

Die Wahrscheinlichkeit, dass retrovirale Partikel eine Zielzelle infizieren, kann auf verschiedene Art und Weise erhöht werden. So ist eine Inkubation mit Polykationen wie Polybrene oder Protaminsulfat (Toyoshima und Vogt, 1969; Manning et al., 1971) möglich, eine Komplexbildung der retroviralen Partikel mit Liposomen oder liposomalen Lipiden (Porter et al., 1998), ein „flow-through“ des Virus-Überstandes vorbei an einer Zielzellschicht (Chuck et al., 1996), die gleichzeitige Zentrifugation der viralen Partikel mit den Zielzellen (Kotani et al., 1994; Bunnell et al. 1995) oder die Kolokalisation der Zielzellen mit den viralen Partikeln auf Fibronectin und dessen trunkierten Derivaten (Hananberg et al., 1996).

3.2.1 Einfluss von Protaminsulfat auf die Transduktionseffizienz

Protaminsulfat ist ein Polykation, von dem gezeigt wurde, dass es die Transduktionseffizienz erhöht (Cornetta und Anderson, 1989). Man nimmt an, dass die initiale unspezifische Bindung zwischen Virus und Zielzelle durch Polykationen erhöht wird, indem sie die elektrostatische Abstoßung zwischen den Membranen aufheben (Coelen et al., 1983). Bei

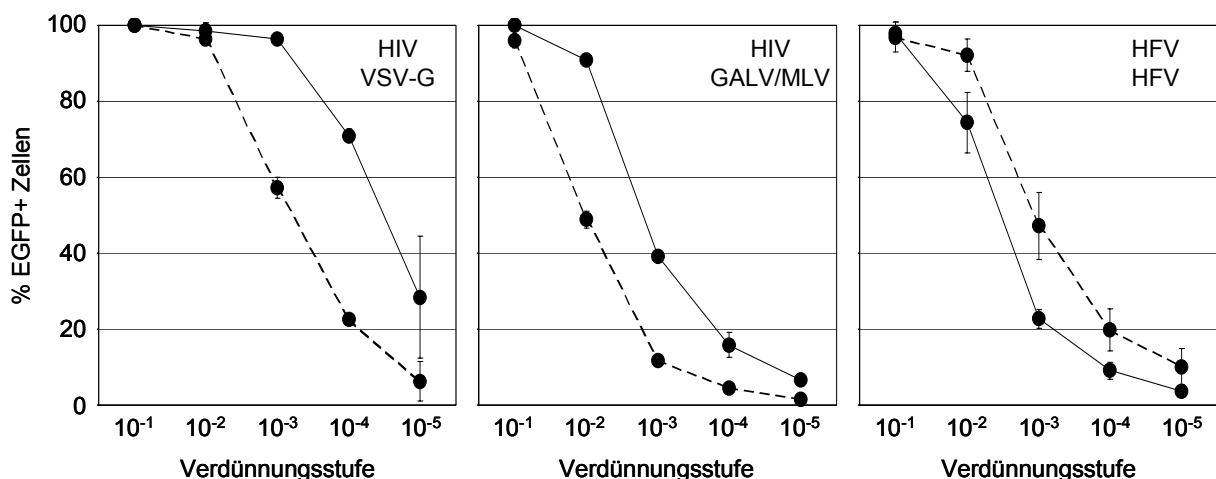


Abbildung 13. Einfluss von Protaminsulfat auf die Transduktionseffizienz von Foamyvirus Vektoren. Transient hergestellte, konzentrierte HFV, HIV-GALV/MLV und HIV-VSV-G Überstände wurden mit (durchgezogene Linie) oder ohne (gestrichelte Linie) Zugabe von 10 µg Protaminsulfat/ml auf HT1080-Zellen titriert. Während der Titer bei den GALV- bzw. VSV-G-pseudotypisierten Vektoren um einen Faktor von jeweils 4,5 zunimmt, wird bei den HFV-Partikeln nach Zugabe von Protaminsulfat ein um den Faktor 2,7 niedrigerer Titer bestimmt.

amphotrop-, GALV- oder VSV-G pseudotypisierten MLV- oder HIV-Vektoren kann durch die Zugabe von Protamin eine Titererhöhung um einen Faktor von rund vier erreicht werden (Abbildung 13 und Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von Protamin zu Foamyvirus Überständen während der Transduktion erniedrigt hingegen den Titer um einen Faktor von knapp drei (Abbildung 13). Offenbar ist die Oberflächenladung der Foamyvirus-Partikel kein limitierender Faktor während der Infektion.

3.2.2 Einfluss von Fibronektin auf die Transduktionseffizienz: Hämatopoetische Zelllinien

Die Kolokalisation von MLV-Vektoren und hämatopoetischen Zielzellen auf dem rekombinanten Fibronektin Fragment CH296 ermöglicht eine deutlich höhere Transduktion (Hananberg et al., 1996). Es wurde deshalb untersucht, ob ein derartiger Effekt auch bei HFV festzustellen ist. Verschiedene humane hämatopoetische Zelllinien wurden zu diesem Zweck auf Fibronektin-beschichteten ($2\mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder -unbeschichteten Zellkulturplatten mit konzentriertem oder unkonzentriertem HFV-Überstand transduziert. Bei den verwendeten

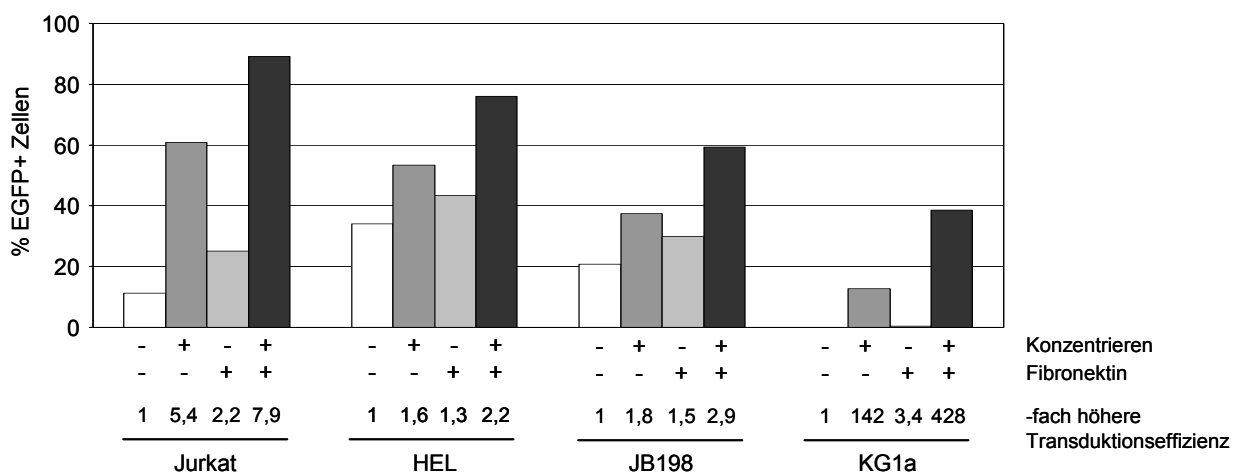


Abbildung 14. Einfluss von Fibronektin auf die Transduktionseffizienz von HFV-Vektoren. 50.000 Zellen verschiedener hämatopoetischer Zelllinien wurden je Vertiefung (2 cm^2) einer unbeschichteten oder mit $2\mu\text{g CH296}/\text{cm}^2$ beschichteten 24-Loch Platte mit unkonzentriertem oder konzentriertem HFV-Überstand über Nacht transduziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen von den Platten abgelöst, gewaschen und in neue Zellkulturplatten überführt. Nach weiteren 48 Stunden wurde der Anteil an EGFP+ Zellen per FACS analysiert. Die jeweiligen Effekte des Konzentrierens und der Verwendung von Fibronektin, die unterhalb der Graphik angegeben sind, miteinander multipliziert ergeben in etwa den erreichten Gesamteffekt bei Kombination beider Maßnahmen. Der Titer des unkonzentrierten Überstandes betrug 1×10^7 TE/ml, der des konzentrierten Überstandes 2×10^8 TE/ml. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Zelllinien handelt es sich um eine T-Zelllinie (Jurkat), eine Erythroleukämie-Zelllinie (HEL), eine B-Zelllinie (JB198) und eine frühe akute myeloische Leukämie (AML)-Zelllinie (KG1a). 50.000 Zellen wurden gleichzeitig mit dem HFV-Überstand in die Zellkulturplatten (24-Loch

Platten, 2 cm²/Loch) gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von den Platten abgelöst, gewaschen und in neue Platten überführt. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse ermittelt. Bei allen Zelllinien war sowohl eine deutliche Erhöhung der Transduktionseffizienz durch die Verwendung von Fibronectin als auch durch die Verwendung konzentrierter Überstände zu beobachten (Abbildung 14). Der Faktor, um den die Transduktionseffizienz erhöht wird, ist für das Konzentrieren höher als für die Verwendung des Fibronektins. Insbesondere die sehr unreifen KG1a Zellen sind mit unkonzentrierten HFV-Überständen auch bei Verwendung von Fibronectin kaum zu infizieren. Die Kombination beider Maßnahmen ermöglicht bei allen Zelllinien in etwa eine Erhöhung der Transduktionseffizienz um das Produkt aus den einzelnen Faktoren.

3.2.3 Einfluss von Fibronectin auf die Transduktionseffizienz: Primäre hämatopoetische Zellen

Die oben beschriebene Vorgehensweise zur Transduktion hämatopoetischer Zelllinien wurde auch mit primären hämatopoetischen Zellen durchgeführt. Zum einen wurden T-Zellen und zum anderen CD34-selektionierte primitive unstimulierte Zellen aus Nabelschnurblut mit und ohne Fibronectin mit unkonzentriertem und konzentriertem HFV-Überstand transduziert. Das

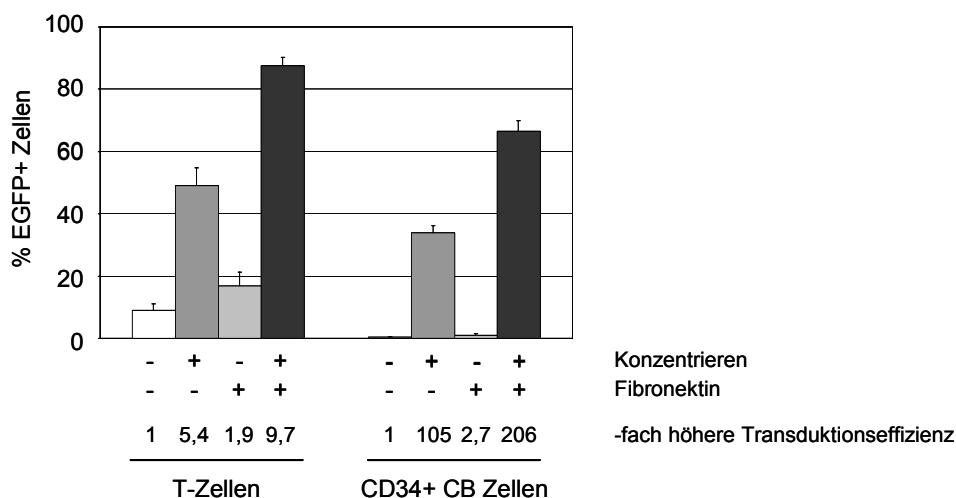


Abbildung 15. Transduktion primärer hämatopoetischer Zellen mit HFV. T-Zellen und unstimulierte CD34+ Zellen aus humanem Nabelschnurblut (CB) wurden wie unter Abbildung 14 beschrieben mit Foamyvirus Vektoren transduziert. Die jeweiligen Effekte des Konzentrierens und der Fibronectin-Verwendung miteinander multipliziert ergeben in etwa den erreichten Gesamteffekt bei Kombination beider Maßnahmen. Die Ergebnisse sind jeweils aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Der Titer des unkonzentrierten Überstandes betrug 1×10^7 TE/ml, der des konzentrierten Überstandes 2×10^8 TE/ml.

Ergebnis ist in Abbildung 15 zu sehen. Für die T-Zellen entspricht das Bild in etwa dem der Jurkat-Zellen, einer T-Zelllinie, und für die CD34+ Zellen am ehesten dem der ebenfalls

CD34+ KG1a-Zellen. Auch bei den primären Zellen ist der durch das Konzentrieren erreichte Effekt größer als der, der durch die Kolokalisation der Partikel mit den Zellen auf Fibronectin erreicht wird. Die Kombination der beiden Maßnahmen erhöht die Transduktionseffizienz um einen Gesamtfaktor, der sich in etwa aus den einzelnen Faktoren multipliziert. Insbesondere bei den CD34+ ist offenbar ein sehr hoher Titer erforderlich, um eine effiziente Transduktion zu erreichen.

3.2.4 Zusammenfassung

Alle bislang beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der Herstellung und Verwendung von Foamyvirus-Vektoren wurden für die folgenden Experimente berücksichtigt: Für die Herstellung der viralen Überstände wurde bei HFV oder Foamyvirus-pseudotypisierten Partikeln Polyfect verwendet, während zur Herstellung aller anderen Vektoren FuGENE 6 verwendet wurde. Es erfolgte eine Induktion der Genexpression mit NaB, die Zellen wurden nicht durch Einfrieren/Auftauen aufgebrochen, die Überstände wurden vor der Verwendung konzentriert und die Transduktion hämatopoetischer Zellen wurde auf Fibronectin vorgenommen.

3.3. Transduktion von Progenitorzellen

In vitro Auslesesysteme für frühe klonogene Zellen erlauben keine Aussage über Zellen, die nach einer Transplantation im Menschen alle Zellreihen des Blut- und Immunsystems hervorbringen können (Orkin und Motulsky, 1995). Diese *in vitro* Tests sind aber dennoch nützlich, initial den Gentransfer in frühe hämatopoetische Zellen zu testen, da sich innerhalb dieser Zellpopulation echte Stammzellen befinden und bei hohen Transduktionseffizienzen in Progenitorzellen zumindest die Wahrscheinlichkeit besteht, auch Stammzellen genetisch modifizieren zu können.

Die hier zunächst beschriebenen Versuche wurden mit Zellen aus humanem Nabelschnurblut durchgeführt. Die mononukleären Zellen wurden aus dem Blut aufgereinigt, dann erfolgte eine zweifache Aufreinigung der CD34+ Zellen mittels MACS. Die Reinheit der Population war in der Regel >90%.

Die Transduktionseffizienz in Progenitorzellen mit HFV-Vektoren sollte mit der von HIV-Vektoren und MLV-Vektoren verglichen werden. Da MLV-Vektoren lediglich teilungsaktive Zellen transduzieren können, wurde jeweils eine Bedingung mit unstimulierten Zellen und eine andere Bedingung mit Zellen durchgeführt, die für 48 Stunden mit einem Cocktail aus Stammzellfaktor (SCF), G-CSF und Trombopoetin (TPO), jeweils 100 ng/ml, vorstimuliert waren (Hananberg et al., 1997).

Die Produktion der Überstände erfolgte in einem transienten Zweiplasmidsystem mit den unter 3.1.1 beschriebenen Vektorkonstrukten. Für einen optimalen Vergleich der drei Vektorsysteme sollten die Bedingungen, unter denen die Vektoren mit den Zielzellen interagieren, identisch sein und unabhängig von der Rezeptorexpression auf den Zellen. Idealerweise würden also alle drei Vektorsysteme das gleiche Hüllprotein auf ihrer

Oberfläche tragen. Wie bereits erwähnt können HFV Vektoren aber nicht mit fremden Env Proteinen pseudotypisiert werden (Pietschmann et al., 1999) und MLV und HIV werden nur sehr ineffizient mit dem wt-Env von HFV verpackt (Lindemann et al., 1997). Allerdings ist die Pseudotypisierung von MLV und HIV mit dem Hüllprotein des felines Foamyvirus (FFV) und eines Affen-Foamyvirus (SFV) möglich. Durch den Austausch des FFV-Signalpeptids gegen das des HFV-Env bzw. des SFV-Signalpeptids gegen das des FFV-Envs kann die Effizienz der Pseudotypisierung gesteigert werden. Die verschiedenen Hüllproteine und die Titer, die nach transienter Herstellung der Vektoren im Zweiplasmidsystem und anschließender Konzentrierung auf HT1080-Zellen erreicht wurden, sind in Abbildung 16 aufgeführt.

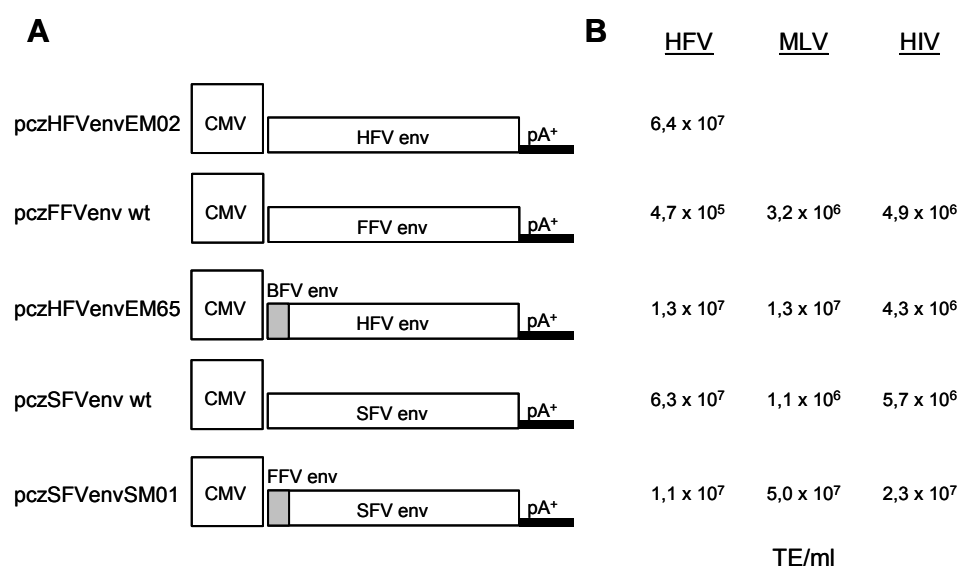


Abbildung 16. Foamyvirus Env Expressionsplasmide. (A) Das wt-HFV-Env wird vom Plasmid pczHFVenvEM02 exprimiert und kann lediglich HFV effizient pseudotypisieren. Mit dem wt-FFV-Env und dem wt-SFV-Env sowie chimären Envs aus BFV und FFV bzw. FFV und SFV können alle drei Vektortypen pseudotypisiert werden. **(B)** Die transient durch Kontransfektion mit dem HFV-, MLV- oder HIV-Plasmid hergestellten Überstände wurden konzentriert und auf HT1080-Zellen titriert. Mittlere Titer aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind angegeben.

Humane CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut wurden über Nacht in der Anwesenheit von SCF, G-CSF und TPO auf CH296-beschichteten Platten mit den gleich pseudotypisierten Vektoren transduziert, entweder unmittelbar nach der Isolierung oder nach einer 48-stündigen Vorstimulation mit den gleichen Zytokinen. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Progenitorassays ausgesät und nach 14 Tagen wurden die Kolonien mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgezählt (Abbildung 17). Die Transduktionseffizienz wurde aus dem Anteil der EGFP⁺ von allen gezählten Kolonien ermittelt.

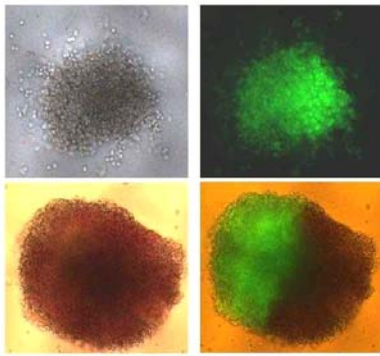


Abbildung 17. Transduktion von Progenitorzellen. Progenitorassays wurden, 12 bis 14 Tage nachdem sie ausplattiert wurden, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde der Anteil der EGFP+ Kolonien von den insgesamt gewachsenen Kolonien bestimmt. Zu sehen sind oben ein Beispiel für eine transduzierte Granulozyten/Makrophagen Vorläuferkolonie (CFU-GM) und unten für eine erythroide Vorläuferkolonie (CFU-E). Letztere fluoresziert nur zur Hälfte, was darauf zurückzuführen ist, dass die Kolonie-bildende Zelle sich während der Transduktion geteilt hat und die Integration nur in einer Tochterzelle erfolgte (Hajihosseini et al., 1993).

Mit dem wt-HFV-Vektor lassen sich unstimulierte und vorstimulierte primitive humane hämatopoetische Zellen zu rund 80% transduzieren (Abbildung 18A und 18B). Die Titer, die mit dem FFV- Env auf den drei verschiedenen Vektoren HFV, MLV und HIV erreicht werden (Abbildung 16), sind aber offenbar zu niedrig, um damit effizient Progenitorzellen zu transduzieren (Abbildung 18A). Der Gentransfer bei Verwendung des chimären BFV/HFV Envs ist besser, aber bei weitem nicht so effizient wie der mit dem wt-HFV-Env (Abbildung 18B). Mit dem HFV-Vektor konnten im Mittel 21% unstimulierter Progenitorzellen transduziert werden, während mit dem HIV-Vektor 14% erreicht wurden, allerdings bei etwa 3-fach niedrigerem Titer. Obgleich der Titer gleich hoch war, wie bei dem HFV-Vektor, waren auch nach zweitägiger Vorstimulation der Zielzellen maximal 1,4% der Progenitorzellen mit dem MLV-Vektor transduziert. Die effizienteste Pseudotypisierung der drei Vektorsysteme war mit dem SFV-Env zu erreichen. Dabei war die Verpackung von HFV mit dem wt-SFV-Env effizienter, während die Verpackung von MLV und HIV mit dem chimären FFV/SFV-Env besser erfolgte (Abbildung 16). Um festzustellen, welches Vektorsystem bei gleichem Titer effizienter die Progenitorzellen transduzieren kann, wurden unstimulierten Zielzellen mit unverdünntem, 1/2-, 1/3-, 1/5- und 1/10-verdünnten Überständen transduziert. Die Titer der Verdünnungen wurden parallel auf HT1080-Zellen ermittelt und sind in Abbildung 18C parallel zu den Transduktionseffizienzen auf den Progenitorzellen angegeben. Trotz relativ hoher Titer ist auch hier mit dem MLV-Vektor nur eine maximale Transduktionseffizienz von 2,7% zu erreichen. Die Transduktionseffizienzen, die mit SFV-pseudotypisiertem HFV und HIV erreicht werden, sind für HFV höher als für HIV, allerdings bei etwa 4,5-fach höherem Titer. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei gleichem Titer mit HIV-Vektoren eine höhere Transduktionseffizienz in frühe hämatopoetische Zellen als mit HFV-Vektoren erreicht werden kann. Allerdings sind die Transduktionseffizienzen mit deutlich weniger als 40% so niedrig, dass nicht zu erwarten war, bei *in vivo* Experimenten mit diesen Vektoren gute Resultate erzielen zu können.

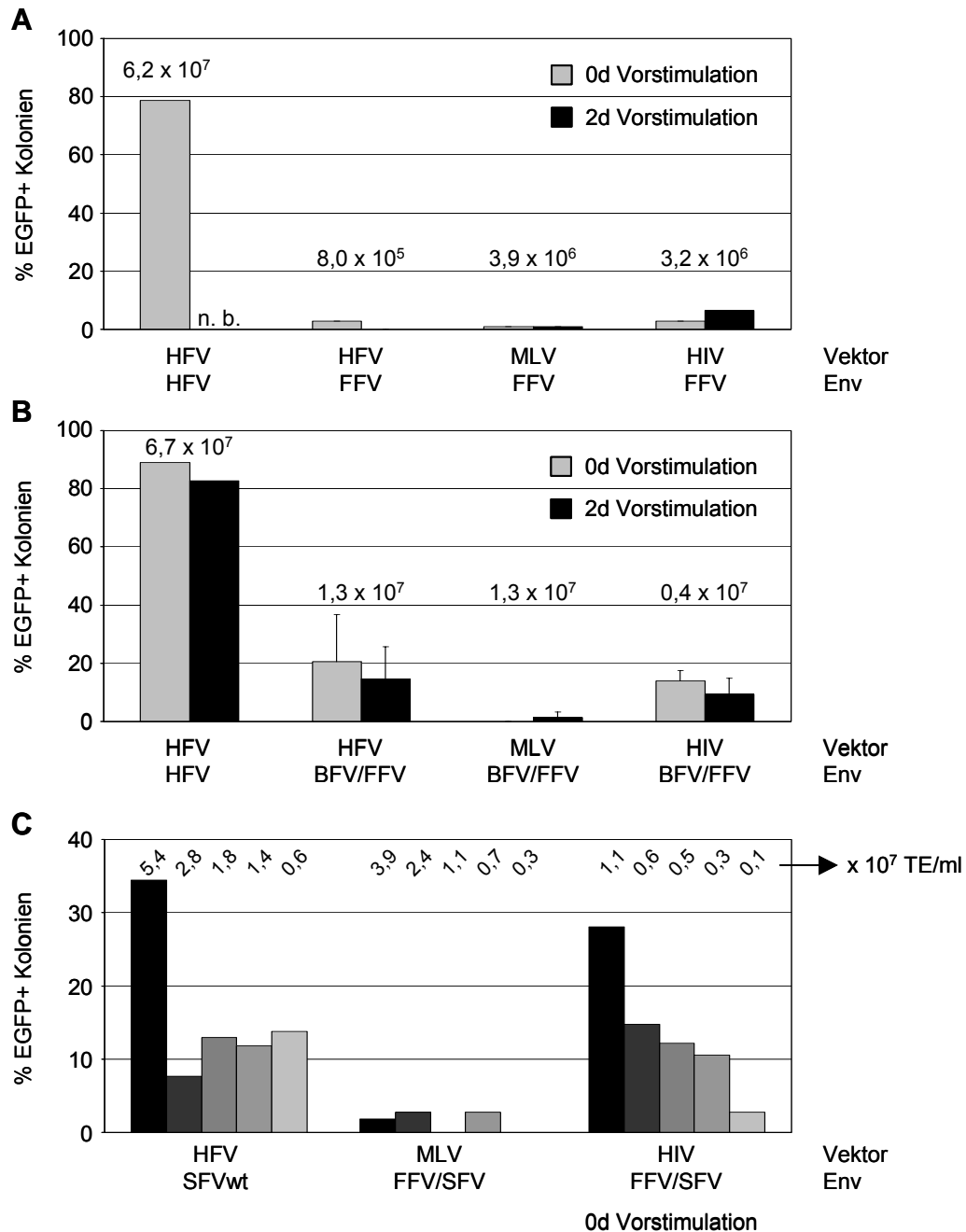


Abbildung 18. Transduktion von Progenitorzellen mit Foamyvirus-Env-pseudotypisierten Vektoren. CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut wurden entweder gleich nach der Isolierung oder nach einer 48-stündigen Zytokin-Inkubation mit den verschiedenen Vektoren über Nacht transduziert. Nach der Transduktion wurden die Zellen gewaschen und in Progenitorassays ausplattiert. Die Progenitorassays wurden 12 bis 14 Tage später fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde der Anteil der EGFP⁺ Kolonien von den insgesamt gewachsenen Kolonien bestimmt. **(A)** Verwendet wurden FFV-Env-pseudotypisierte Vektoren. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Über den jeweiligen Balken sind die Titer der verwendeten Überstände in TE/ml angegeben. **(B)** Verwendet wurden Vektoren, die mit einem chimären BFV/FFV-Env pseudotypisiert waren. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Über den jeweiligen Balken sind die gemittelten Titer der verwendeten Vektoren in TE/ml angegeben. **(C)** SFV-Env-pseudotypisierte Vektoren wurden unverdünnt, 1/2-, 1/3-, 1/5- und 1/10- verdünnt auf unstimulierte CD34⁺ Zellen gegeben. Die parallel dazu auf HT1080-Zellen bestimmten Titer der verdünnten Überstände sind jeweils angezeigt. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Vor diesem Hintergrund wurden für die weiteren Experimente HFV-Vektoren mit dem wt-HFV-Env verpackt und HIV- und MLV-Vektoren mit dem bereits unter 3.1.1 beschriebenen chimären GALV/MLV-Env (Stitz et al., 2000). Dieses Hüllprotein erlaubt eine effiziente Pseudotypisierung sowohl von MLV als auch von HIV. Es schien auch deshalb eine gute Alternative zu dem bislang hauptsächlich zur Pseudotypisierung von HIV-Vektoren verwendeten VSV-G Protein zu sein, da letzteres bei konstitutiver Expression in Zellen zytotoxisch ist (Ory et al., 1996) und in Produzentenzellen unter die Kontrolle regulierbarer Promotoren gestellt werden muss, was zu Lasten des Titors geht. GALV-Env-exprimierende Produzentenzelllinien sind hingegen gut etabliert (Reeves et al., 2000). Darüber hinaus wird das GALV-Env im Zusammenhang mit MLV-Vektoren bereits klinisch erprobt (ASGT, 2003). Wie schon eingangs beschrieben, ist es unmöglich, den funktionell bestimmten Titer unterschiedlich pseudotypisierter Vektoren zu vergleichen. Insofern ist es sinnlos, bei der Transduktion von Zielzellen die m.o.i.s anzugleichen. Deshalb wurde jeder Vektor unter den eingangs beschriebenen Bedingungen möglichst effizient hergestellt und mit maximalem Titer verwendet. Die Titer, die auf HT1080-Zellen ermittelt wurden, waren für HFV $1-5 \times 10^7$, für MLV-GALV_{TM} $1-4 \times 10^7$ und für HIV-GALV_{TM} $0,5-2 \times 10^7$ TE/ml. Da bei der Titration keine Polykationen verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass die Titer bei den GALV-pseudotypisierten Viren um einen Faktor von etwa 4 höher sind als hier angegeben (vgl. 3.2.1).

Die auf den Progenitorzellen erreichten Transduktionseffizienzen waren mit dem HFV-Vektor - unabhängig davon, ob die Zellen vorstimuliert waren oder nicht - höher als 70%. Mit dem GALV-pseudotypisierten HIV-Vektor wurden auf unstimulierten Zellen 50% und auf vorstimulierten Zellen über 80% Transduktionseffizienz erreicht. Mit dem MLV-Vektor konnten unstimulierte Zellen zu maximal 6% transduziert werden, während vorstimulierte Zellen zu über 70% transduziert wurden (Abbildung 19). Diese Transduktionseffizienzen erschienen ausreichend hoch, um die Vektorsysteme *in vivo* miteinander zu vergleichen.

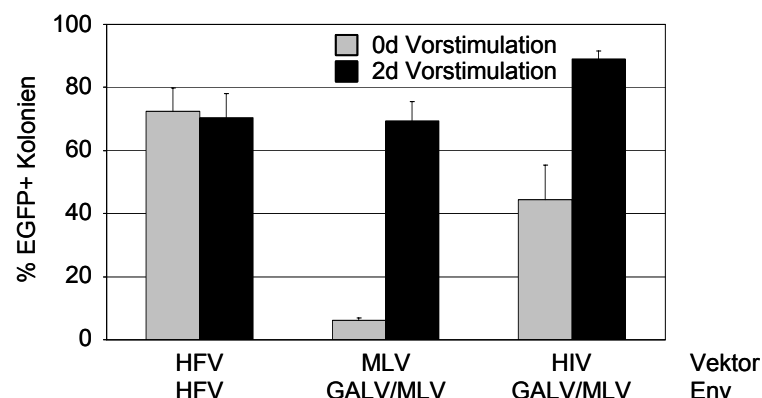


Abbildung 19. Transduktion von Progenitorzellen. Unstimulierte und vorstimulierte CD34⁺ Zellen wurden mit HFV, MLV-GALV/MLV und HIV-GALV/MLV transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde in Progenitorassays fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Dabei wurde der Anteil der EGFP⁺ Kolonien von den insgesamt gewachsenen Kolonien bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut

Wie bereits erwähnt lassen die Ergebnisse zur Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektorsysteme in klonogene Zellen keine Aussage darüber zu, ob die transduzierten Zellen *in vivo* nach einer Transplantation im Menschen anwachsen und das hämatopoetische System repopulieren können, also echte hämatopoetische Stammzellen sind (Orkin und Motulsky, 1995). Deshalb wurde ein murines Xenotransplantationsmodell entwickelt, bei dem humane CD34+ Zellen in immundefiziente Mäuse, die „nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency“ (NOD/SCID)-Mäuse, transplantiert werden (Larochelle et al., 1996; van der Loo et al., 1998b). Die in diesen Mäusen Hämatopoese initiiierenden humanen Zellen werden als SCID-repopulierende Zellen (SRCs) bezeichnet. Bislang ist unklar, wie hoch der Anteil echter hämatopoetischer Stammzellen an dieser Population ist. Das murine Xenotransplantationsmodell wird derzeit verwendet, um präklinisch den Gentransfer in primitive hämatopoetische Zellen zu charakterisieren.

3.4.1 Transduktion von SRCs mit HFV, MLV-GALV/MLV und HIV-GALV/MLV

Für die *in vivo* Experimente mussten CD34+ Zellen aus mehreren Nabelschnurproben miteinander kombiniert werden (Tabelle 2). Die Zellen wurden wie bei den Vorversuchen mit oder ohne Vorstimulation über Nacht auf CH296-beschichteten Platten in Anwesenheit von

Tabelle 2. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut: Übersicht

| Exp | Anzahl CB Proben | Reinheit %CD34+ | Transplantierte Zellen/Maus d0 | Transplantierte Zellen/Maus d2 | Mäuse/Gruppe | Gruppen d0 | Gruppen d2 | Wochen bis Analyse |
|-----|-------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1 | 3 aufgetaut 2 frisch | 97 | $1,7 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^5$ | 4 | HFV, MLV-GALVTM HIV-GALVTM | HFV, MLV-GALVTM HIV-GALVTM | 6 |
| 2 | 6 aufgetaut | 98 | 2×10^5 | $5,5 \times 10^5$ | 4 | HFV, MLV-GALVTM HIV-GALVTM | HFV, MLV-GALVTM HIV-GALVTM | 6 |
| 3 | 3 aufgetaut 1 frisch | 80 | $5,4 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^6$ | 4 | HFV, HIV-GALVTM HIV-VSV-G | HFV HIV-GALVTM | 10 |
| 4 | 2 aufgetaut | 82 | 4×10^5 | | 5 | HFV, HIV-VSV-G | | 13 |

CD34+ Zellen wurden aus humanem Nabelschnurblut isoliert und teilweise bis zur Verwendung eingefroren. Um für die verschiedenen Gruppen ausreichendes Zellmaterial zu haben, wurden bis zu sechs Produkte miteinander vermengt. Das Zellmaterial wurde zunächst in gleiche Teile für die d0- und die d2-Gruppen aufgeteilt. Der eine Teil der Zellen wurde ohne Vorstimulation transduziert, während der andere Teil für 48 Stunden mit einem Zytokingemisch inkubiert wurde. Während dieser Zeit proliferierten die Zellen und dementsprechend war die zu transplantierende Anzahl an Zellen nach zwei Tagen höher. Die Ergebnisse aus den ersten beiden und den letzten beiden Experimenten wurden jeweils gemittelt.

SCF, G-CSF und TPO mit den verschiedenen Vektoren transduziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen von den Platten abgelöst, gewaschen und in die Schwanzvene zuvor sublethal bestrahlter NOD/SCID-Mäuse injiziert (Larochelle et al., 1996; Pollok et al., 2001). Um die Transduktionseffizienz zu bestimmen, wurden parallel zu der Transplantation Aliquots der Zellen in Progenitorassays ausgesät.

Den Mäusen wurde nach sechs bis dreizehn Wochen Blut abgenommen. Dann wurden die Mäuse getötet und Milz und Knochen präpariert. Aus Blut, Milz und Knochenmark wurden die nukleären Zellen isoliert, mit humanen Antikörpern für die verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen angefärbt und mittels FACS-Analyse auf den Anteil an transduzierten, angewachsenen humanen Zellen und Zelltypen untersucht.

Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (Experimente 1 und 2) mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe sind in Tabelle 3 und Abbildung 20 dargestellt. Alle Mäuse, die HFV-transduzierte Zellen injiziert bekamen - ob vorstimuliert oder nicht - zeigten eine Rekonstitution mit transduzierten humanen (hCD45+) Zellen (Tabelle 3 und Abbildung 20B). Das Engraftment in Mäusen, die HFV-transduzierte Zellen erhielten, war insgesamt niedriger

Tabelle 3. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut: Experimente 1 und 2

| Vektor | Vorstimulation. ^a | Anzahl Mäuse transplantiert | Anzahl Mäuse verstorben | Anzahl Mäuse mit Engraftment <0,35% ^b | Humanes Engraftment in KM ^b | EGFP+/hCD45+ (%) ^c | | |
|------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--|--|-------------------------------|--------------|--------------|
| | | | | | | BM | SPL | PB |
| HFV | 0d | 8 | 0 | 3 | 6±5 | 72±8 (5) | 33±15 (5) | 32±39 (4) |
| HFV | 2d | 8 | 0 | 1 | 4±5 | 42±33 (7) | 41±40 (4) | 39±30 (4) |
| MLV-GALVTM | 0d | 8 | 3 | 0 | 26±28 | 0±0 (5) | 0±0 (5) | 0 (1) |
| MLV-GALVTM | 2d | 8 | 3 | 1 | 15±25 | 1±1 (4) | 1±2 (3) | 1±2 (3) |
| HIV-GALVTM | 0d | 8 | 0 | 1 | 9±8 | 1±3 (7) | 7±8 (7) | 2±4 (4) |
| HIV-GALVTM | 2d | 8 | 0 | 3 | 28±33 | 11±5 (5) | 26±6 (3) | 24±4 (3) |

^a CD34+ Zellen wurden entweder ohne Stimulation oder nach zweitägiger Inkubation mit SCF, G-CSF und TPO, jeweils 100 ng/ml, transduziert. ^b Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe sind gezeigt. Nur Ergebnisse von Mäusen, die mehr als 0,35% hCD45+ Zellen im Knochenmark aufwiesen, wurden ausgewertet. ^c Bei Mäusen mit sehr niedrigem Engraftment konnte teilweise keine auswertbare Messung mit Zellen aus Milz und PB vorgenommen werden. In Klammern angegeben ist deshalb die Anzahl der Mäuse, aus denen die Ergebnisse gemittelt wurden.

Die Gentransfereffizienz unterschied sich sehr stark in den verschiedenen Gruppen. Die humanen Zellen im Knochenmark von Mäusen, denen HFV-transduzierte Zellen transplantiert wurden (n=5), waren im Mittel zu 72% (62,3% - 83,6%) EGFP+. Die EGFP-Expression in den Zellen war sehr hoch (Abbildung 21). Die Transduktionseffizienzen in der Gruppe, die vorstimulierte HFV-transduzierte Zellen erhielt (n=7), variierten stark. Die mittlere Markierungsmarkie betrug 42% (3,9% - 78%). Diese niedrigere Markierungsrate in vorstimulierten Zellen spiegelt die Ergebnisse der Vorexperimente (Abbildung 19) und den initial bestimmten Gentransfer in Progenitorzellen (Abbildung 20A) wieder: Der Gentransfer in vorstimulierte Zellen ist mit HFV stets niedriger als in unstimulierte Zellen. EGFP wurde sowohl in Vorläuferzellen (hCD34+) als auch in lymphoiden (hCD19+) und in myeloiden (hCD33+) Zellen exprimiert (Abbildung 20C). Progenitorassays, die mit Knochenmarkzellen von Mäusen mit mehr als 3% humanen Zellen angesetzt wurden, zeigten 41% EGFP+ humane Kolonien für die unstimulierten HFV-transduzierten Zellen (Abbildung 20C). EGFP+ Zellen aller Reihen wurden ebenso in der Milz und im Blut hoch „engrafteter“ Tiere gemessen (Tabelle 3 und Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Mäuse, die mit MLV-GALVTM-transduzierte Zellen erhielten, keine oder nur eine sehr niedrige Markierungsrate (Tabelle 3 und Abbildungen 20 und 21). Anders als bei den Vorexperimenten war hier der parallel zu der Transplantation bestimmte Gentransfer in Vorläuferzellen nach zweitägiger Vorstimulation bei beiden Experimenten deutlich erniedrigt (Abbildung 19 und Abbildung 20A). Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte darin liegen, dass ein Teil der Zellen aufgetaut und über Nacht mit 10 ng/ml SCF inkubiert wurde und nicht frisch wie bei den Vorexperimenten war. Der Titer der MLV-Überstände war nicht niedriger als bei den Vorexperimenten.

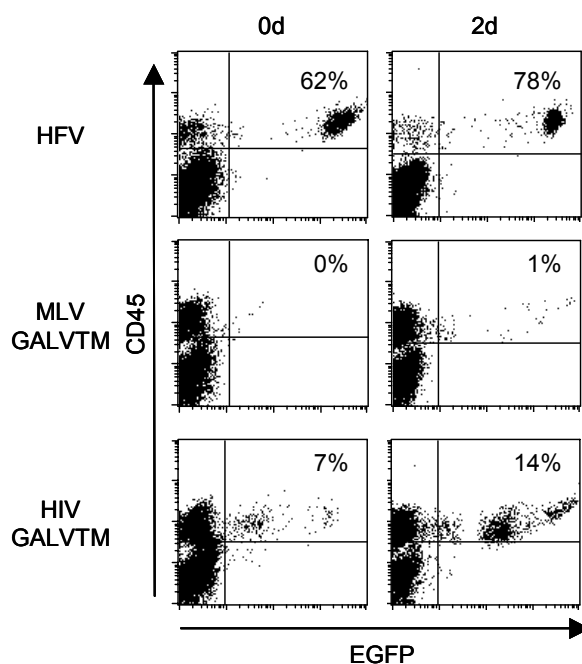


Abbildung 21. Markierung humaner SRCs. Jeweils ein repräsentatives Punktdiagramm zur Analyse von markierten humanen Zellen aus dem Knochenmark der NOD/SCID-Mäuse ist für jede Gruppe dargestellt. Die Prozentangabe im oberen rechten Quadranten repräsentiert den Anteil EGFP-exprimierender von den angewachsenen humanen Zellen (hCD45).

Mäuse, die unstimulierte, mit HIV-GALVTM-transduzierte Zellen erhielten, zeigten keine (n=2 von 7) oder wenige EGFP+ Zellen (0,45% – 7,2%) (Abbildung 20B). Durch die zweitägige Vorstimulation der Zellen konnte die Transduktionseffizienz mit HIV-GALVTM auf 11% (6,8% - 17%) erhöht werden.

Diese Daten zeigen, dass HFV-basierte Vektoren innerhalb eines kurzen Protokolls mehr als 50% der unstimulierten SRCs genetisch modifizieren können. Dieser hohe Gentransfer ist ähnlich den Effizienzen, die in SRCs mit hoch konzentrierten VSV-G-pseudotypisierten HIV-Vektoren erreicht werden (Miyoshi et al., 1999; Guenechea et al. 2000; Woods et al. 2000). Die Verwendung von GALV-pseudotypisierten HIV-Vektoren hingegen ist auch nach zweitägiger Vorstimulation unerwarteterweise relativ ineffizient. Um dieses Ergebnis erklären zu können folgten weitere Untersuchungen, die später beschrieben werden.

Bei je zwei Mäusen mit dem höchsten Engraftment aus der Gruppe wurde mittels „linear amplification mediated“ (LAM)-PCR (Schmidt et al., 2002) die Anzahl der proviralen Integrationsstellen im Gesamtknochenmark und in daraus angewachsenen Vorläufer-Kolonien untersucht. Die Methode ist schematisch in Abbildung 22 dargestellt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 23 zu sehen.

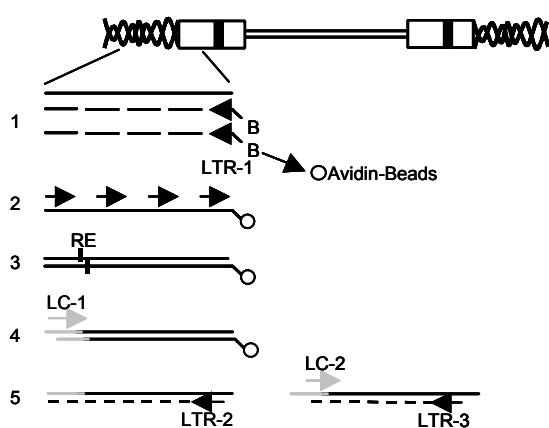


Abbildung 22. Linear amplification-mediated (LAM)-PCR. Um zu ermitteln, ob das Engraftment mit markierten humanen Zellen auf einen oder mehrere Klone zurückzuführen ist, und um festzustellen, wie viele provirale Integrationsstellen je Klon vorhanden sind, wurden mit DNA aus dem Knochenmark und aus einzelnen daraus gewachsenen Kolonien LAM-PCRs durchgeführt. Dabei erfolgt zunächst durch wiederholte Primer-Extension eine lineare PCR mit LTR-spezifischen, biotinylierten Primern. Die Ziel-DNA wird dann durch magnetische Selektion angereichert (1). Die Zweitstrangsynthese erfolgt durch „random-

hexanucleotide-priming“ (2). Bei dem anschließenden Restriktionsverdau ist die Länge der entstehenden Fragmente abhängig von der Distanz der Integrationsstelle zur Schnittstelle (3). Es folgt die Ligation einer asymmetrischen Oligonukleotid-Kassette (4). Mittels für diese Kassette und die LTRs spezifischen Primern und damit durchgeführter Nested-PCR können die für die verschiedenen Integrationsstellen unterschiedlich langen Fragmente amplifiziert werden und auf einem hochauflösenden Gel aufgetrennt werden (Abbildung nach Schmidt et al., 2002).

Die Anzahl der Integrationsstellen im Gesamtknochenmark der Mäuse ist sowohl bei HFV- als auch bei HIV-transduzierten Zellen deutlich höher als bei MLV-transduzierten Zellen (Abbildung 23A). Die Analyse von EGFP+ Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark derselben Mäuse angewachsen sind, zeigten eine bis mehr als zehn provirale

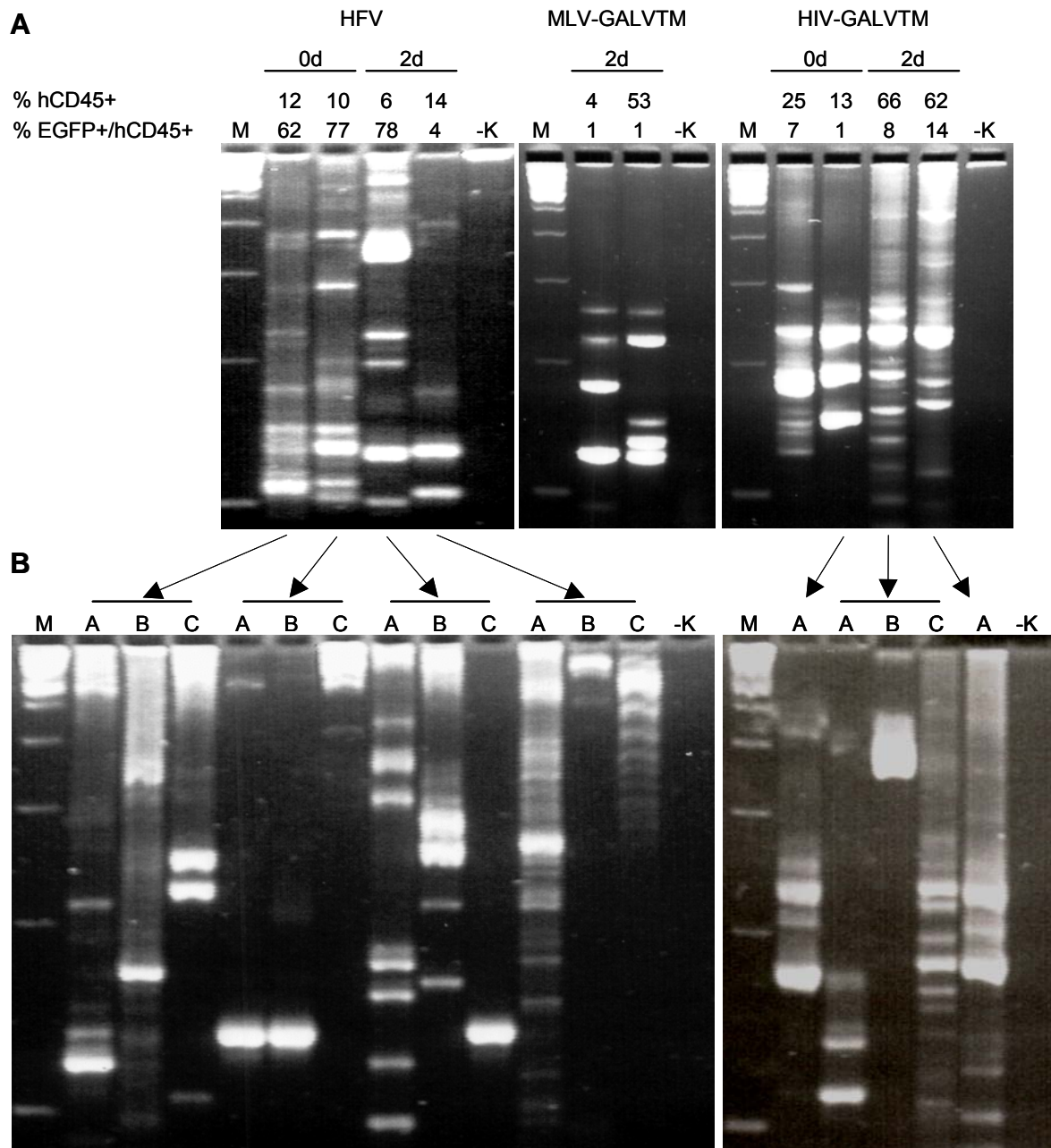


Abbildung 23. *In vivo* Vektor-Integrationsstellen Analyse von Knochenmark Proben. (A) Knochenmark DNA der beiden höchst-engrafteten Tiere je Gruppe, die EGFP+ Zellen zeigten, wurden mittels LAM-PCR hinsichtlich der Anzahl an Vektor-Integrationsstellen untersucht. Die Analyse zeigt deutlich mehr Integrationsstellen für HFV- und HIV-transduzierte Transplantate verglichen mit MLV-transduzierten Transplantaten. Zufällig ausgewählte Banden wurden ausgeschnitten und sequenziert. –K: Negativkontrolle, Analyse von 1 µg Knochenmark-DNA einer Maus, der untransduzierte humane Zellen transplantiert worden waren. %hCD45+: Engraftment mit humanen Zellen im Knochenmark der untersuchten Maus. %EGFP+/hCD45+: Anteil der EGFP+ humanen Zellpopulation im Knochenmark der untersuchten Maus. M: 100bp DNA-Marker **(B)** Eine bis drei aus dem murinen Knochenmark angesetzten EGFP+ hCFCs wurden mittels LAM-PCR hinsichtlich des klonalen Integrationsmusters analysiert. Die unterschiedliche Anzahl und Größe der Banden zeigt die Repopulation mit mehreren genetisch modifizierten humanen Zellklonen für HFV- und HIV-transduzierte CD34+ Zellen an. –K: Negativkontrolle, Analyse untransduzierter hCFCs. M: 100bp DNA-Marker.

Integrationsstellen für HFV und HIV Vektoren. Die unterschiedlichen Bandenmuster zeigen, dass jeweils mehrere genetisch modifizierte humane stammzellnahe Zellen je Maus angewachsen sind (Abbildung 23B).

3.4.2 Transduktion von SRCs mit HFV, HIV-GALV/MLV und HIV-VSV-G

Wie bereits erwähnt war die niedrige Transduktionseffizienz, die mit den GALV-pseudotypisierten HIV-Vektoren in den SRCs erreicht wurde, nicht erwartet worden. Angesichts des Potentials VSV-G-pseudotypisierter HIV-Vektoren (Miyoshi et al., 1999, Guenechea et al. 2000; Woods et al. 2000) und der Ergebnisse in den Progenitorassays (Abbildungen 19 und 20A) war sowohl bei den unstimulierten als auch bei den vorstimulierten Zellen mit deutlich höheren Gentransferraten in SRCs gerechnet worden als sie bei den unter 3.4.1 beschriebenen Experimenten erreicht wurden. Um funktionell zu ermitteln, ob der Grund dafür eine zu geringe Rezeptorexpression auf den Zielzellen sein könnte, wurden die Transduktionseffizienzen des HIV-Vektors, der zum einen GALV- und zum anderen VSV-G-pseudotypisiert wurde, in CD34+ SRCs aus humanem Nabelschnurblut verglichen. Parallel dazu wurden auch wieder HFV-Vektoren verwendet. Die HIV-VSV-G Überstände wurden genau wie die übrigen Überstände transient durch Kotransfektion eines VSV-G Expressionsplasmids (Abbildung 6) hergestellt und auf HT1080-Zellen titriert. Die Titer der verwendeten konzentrierten Überstände, die ohne Zusatz von Polykationen ermittelt

Tabelle 4. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut: Experimente 3 und 4

| Vektor | Vorstimulation. ^a | Anzahl Mäuse transplantiert | Anzahl Mäuse verstorben | Anzahl Mäuse mit Engraftment <0,35% ^b | Humanes Engraftment in KM ^b | EGFP+/hCD45+ (%) ^c | | |
|------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--|--|-------------------------------|-------|-------|
| | | | | | | BM | SPL | PB |
| HFV | 0d | 4+5 | 1 | 0 | 24±32 | 24±31 | 13±13 | 13±14 |
| HFV | 2d | 4 | 0 | 1 | 48±18 | 5±1 | 14±12 | 5±3 |
| HIV-GALVTM | 0d | 4 | 0 | 0 | 82±6 | 1±2 | 1±1 | 3±2 |
| HIV-GALVTM | 2d | 4 | 0 | 0 | 33±33 | 24±22 | 33±23 | 21±12 |
| HIV-VSV-G | 0d | 4+5 | 0 | 0 | 50±27 | 46±6 | 44±5 | 51±11 |

^a CD34+ Zellen wurden entweder ohne vorherige Inkubation oder nach zweitägiger Vorstimulation mit SCF, G-CSF und TPO, jeweils 100 ng/ml, transduziert. ^b Ergebnisse von einem oder zwei Experimenten mit vier und fünf Mäusen pro Gruppe sind gezeigt. Nur Ergebnisse von Mäusen, die mehr als 0,35% hCD45+ Zellen im Knochenmark aufwiesen, wurden ausgewertet.

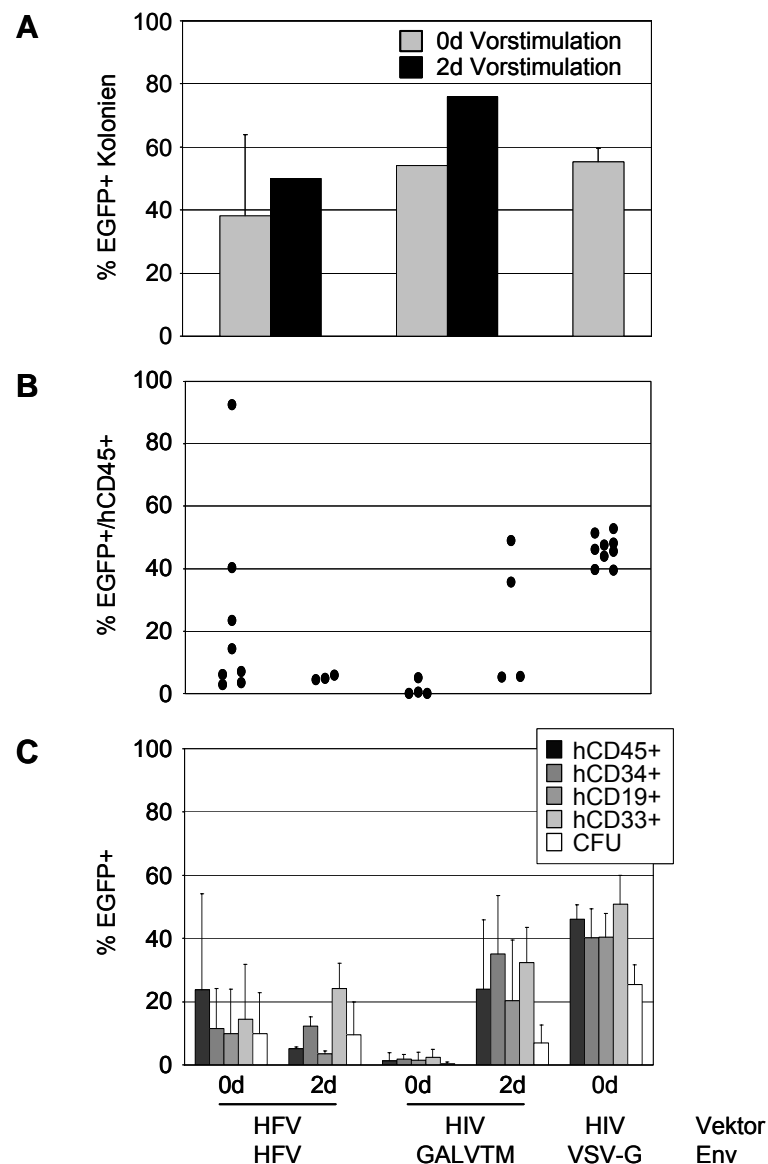


Abbildung 24. Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut. (A) Parallel zur Transplantation der Mäuse wurden Aliquots der transduzierten CD34⁺ Zellen in Progenitorassays plattiert und der Anteil an EGFP⁺ Kolonien wurde 14 Tage später fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. (B) Das Knochenmark der NOD/SCID-Mäuse, die mit unstimulierten oder für 48 Stunden vorstimulierten transduzierten Zellen transplantiert worden waren, wurde 10 oder 13 Wochen nach der Transplantation mittels FACS-Analyse hinsichtlich der hCD45- und EGFP-Expression analysiert. Der Anteil der markierten (EGFP⁺) an den angewachsenen humanen (hCD45⁺) Zellen im murinen Knochenmark ist für jedes Tier angegeben. Die Daten sind für die 0d-HFV-Gruppe sowie für die 0d HIV-VSV-G-Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengeführt. (C) Der mittlere Anteil der EGFP⁺ von der hCD34⁺, hCD19⁺ und hCD33⁺ Zellreihe aus dem Knochenmark der NOD/SCID-Mäuse ist angegeben. Des Weiteren ist der Anteil markierter humaner Kolonien (CFCs), die sechs Wochen nach der Transplantation aus dem Knochenmark der Mäuse angesetzt werden konnten, angegeben.

wurden, betragen 4×10^7 TE/ml. Wegen des teils niedrigen Engraftments in den ersten beiden Experimenten wurden bei den beiden weiteren Experimenten gut doppelt so viele

Zellen transduziert und transplantiert (Tabelle 2, Experimente 3 und 4). Die Mäuse wurden nach 10 bzw. 13 Wochen getötet und wie für die ersten Experimente beschrieben analysiert. Aufgrund der höheren Anzahl transplantierte Zellen war das Engraftment in allen Gruppen deutlich höher als bei den ersten beiden Experimenten (Tabelle 4). Anders als bei den ersten beiden Experimenten, bei denen in unstimulierten Zellen mit HFV im Mittel 72% der SRCs EGFP+ waren, lag die Transduktionseffizienz hier deutlich niedriger. Im Mittel waren 24% der SRCs EGFP+ mit einer großen Streuung von 2,7% bis 92,5% (Abbildung 24). Unabhängig von der Transduktionseffizienz war die EGFP-Expression bei allen Tieren, die HFV-transduzierte Zellen erhielten, wieder sehr stark (Abbildung 25). Auch bei den Tieren, die vorstimulierte HFV-transduzierte Zellen erhielten, war der Gentransfer mit im Mittel 5% deutlich niedriger als in den ersten Experimenten. Wie in Abbildung 24A zu sehen ist, war der initial in den Progenitorzellen gemessene Gentransfer bereits niedriger als bei den Vorexperimenten und in den zuvor beschriebenen Tierexperimenten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die aufgrund der höheren Zielzellzahl aber unveränderten Virusmenge niedrigere m.o.i. während der Infektion (siehe auch Abbildung 7).

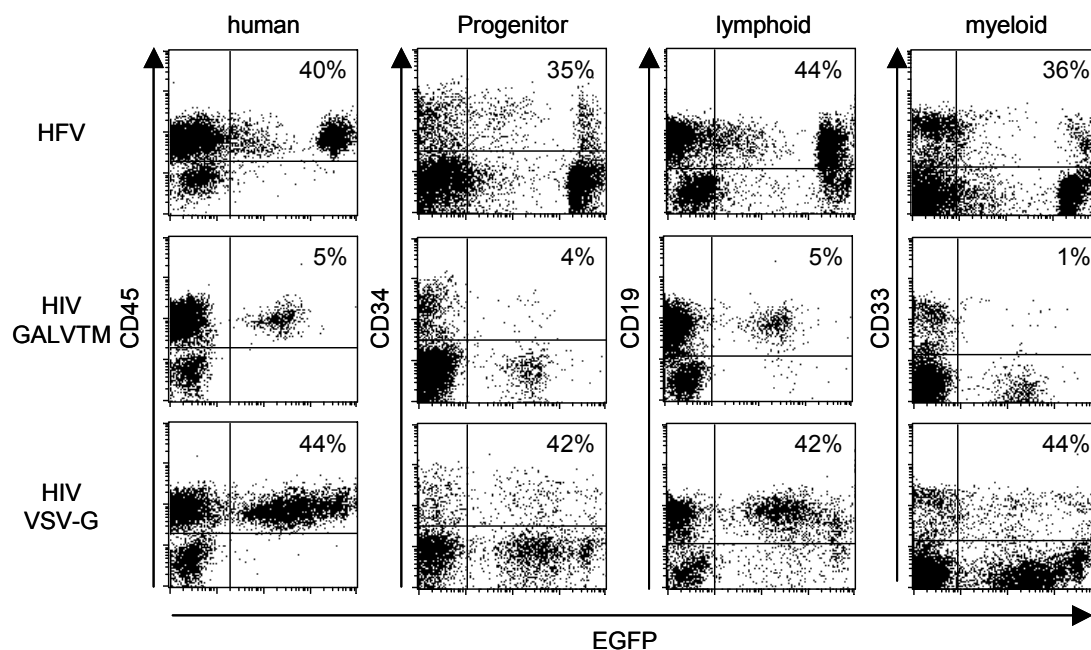


Abbildung 25. Markierung von Zellen der hämatopoetischen Linien mit den verschiedenen Vektoren. Jeweils ein repräsentatives Punktdiagramm zur Analyse von markierten humanen Zellen der verschiedenen hämatopoetischen Linien aus dem Knochenmark der NOD/SCID-Mäuse ist für die 0d-Bedingung jeder Gruppe dargestellt. Die Prozentangabe im oberen rechten Quadranten repräsentiert den Anteil EGFP-exprimierender von den angewachsenen humanen Zellen (hCD45: pan-hämatopoetisch; hCD34: Vorläufer; hCD19: B-lymphoid; hCD33: myeloid).

Die Markierung von hCD45+ Zellen, die aus Mäusen isoliert wurden, welche HIV-GALVTM transduzierte Zellen erhielten, war mit maximal 5% wieder niedrig in der d0-Gruppe (Abbildung 24B) und stieg auf 24% (5,3 bis 49%) in der 2d-Gruppe an. Im Gegensatz dazu

war die Transduktionseffizienz in der Gruppe der Mäuse, die unstimulierte, HIV-VSV-G-transduzierte Zellen erhielt, mit im Mittel 46% (39,6% bis 52,8%, Abbildung 24B) deutlich höher. Die EGFP-Expression in HIV-transduzierten Zellen war insgesamt niedriger als in HFV-transduzierten Zellen, was am Beispiel von zwei Tieren mit vergleichbarer Transduktionseffizienz in Abbildung 25 gezeigt ist. EGFP⁺ Zellen wurden unter lymphoiden und myeloiden Zellen sowie Vorläuferzellen nachgewiesen (Abbildung 24C). Auch wurden markierte Zellen in Milz und peripherem Blut gemessen (Tabelle 4).

Die Daten aus diesen Experimenten zeigen zum einen, dass für eine effiziente Transduktion von SRCs aus humanem Nabelschnurblut mit HFV-Vektoren offenbar eine hohe m.o.i. erforderlich ist. Zum anderen ist deutlich geworden, dass die niedrige Gentransferrate, die mit GALV-pseudotypisierten Vektoren in unstimulierte SRCs erreicht wurde, wahrscheinlich durch eine niedrige Rezeptorexpression auf den Zielzellen zu erklären ist.

3.5 Transduktion von SRCs aus humanem mobilisiertem peripheren Blut

Wie bereits erwähnt werden CD34⁺ Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut und G-CSF-mobilisiertem peripheren Blut isoliert. Die derzeit für eine klinische Anwendung wichtigste Quelle für hämatopoetische Stammzellen stellen G-CSF-mobilisierte CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut dar (To et al., 1997). Der Gentransfer in diese Zellen ist aber problematischer als der in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (Pollok et al., 2001), weil die Zellen weniger teilungsaktiv sind (Roberts und Metcalf, 1995; Yamaguchi et al., 1998). Da die ersten Experimente eine hohe Transduktionseffizienz mit HFV-Vektoren in CD34⁺ SRCs aus humanem Nabelschnurblut gezeigt hatten, sollte nun ermittelt werden, ob die Vektoren auch geeignet sind, um SRCs aus G-CSF-mobilisiertem peripheren Blut zu transduzieren.

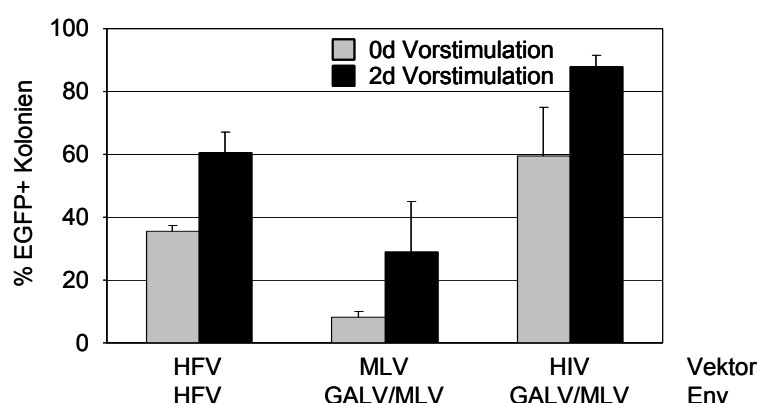


Abbildung 26. Transduktion von Progenitorzellen aus mobilisiertem peripheren Blut. Unstimulierte und vorstimulierte CD34⁺ Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut wurden mit HFV, MLV-GALV/MLV und HIV-GALV/MLV transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde in Progenitorassays fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Zunächst wurden analog zu den unter 3.3 beschriebenen Experimenten Vorexperimente mit klonogenen Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt. Der mit HFV erreichte mittlere Gentransfer in unstimulierte Zellen betrug 35%, der mit HIV-GALV/MLV 60%. Mit MLV-GALV/MLV wurde nur ein Gentransfer von 8% erreicht. In allen drei Fällen konnte der Gentransfer nach zweitägiger Inkubation der Zellen mit den Zytokinen deutlich erhöht werden, bei HFV auf 60%, bei MLV auf 29% und bei HIV auf 88%. Im Vergleich zu den mit CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut fällt auf, dass der Gentransfer mit HFV und MLV insgesamt niedriger ist, während der mit HIV vergleichbar ist.

Tabelle 5. Transduktion von SRCs aus humanem mobilisiertem peripheren Blut: Übersicht

| Exp. | Anzahl MPB Proben | Transplantierte CD34+/CD38- Zellen/Maus | Transplantierte bestrahlte Trägerzellen/Maus | Mäuse/Gruppe | Gruppen d0 | Wochen bis Analyse |
|------|-------------------|---|--|--------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 1 frisch | $5,2 \times 10^4$ | $2,0 \times 10^6$ | 3 | HFV MLV-GALVTM HIV-GALVTM | 6 |

CD34+/CD38- Zellen wurden aus G-CSF-mobilisiertem peripheren Blut (MPB) eines gesunden Spenders isoliert. Die Zellen wurden ohne Vorstimulation transduziert und zusammen mit bestrahlten Trägerzellen transplantiert.

Der Anteil an echten Stammzellen unter den CD34+ Zellen ist bei mobilisiertem peripheren Blut geringer als bei Nabelschnurblut (Wang et al., 1997). Folglich müssen mehr Zellen transduziert und transplantiert werden. Die Stammzellen befinden sich in der Population der CD34+/CD38- Zellen (Bhatia et al., 1997). Die CD38- Zellen umfassen im mobilisierten peripheren Blut etwa 1% der CD34+ Zellen. Um mit niedrigeren Zellzahlen arbeiten zu können und somit weniger virushaltigen Überstand produzieren und konzentrieren zu müssen, wurden aus dem mobilisierten peripheren Blut eines gesunden Spenders die CD34+/CD38- Zellen mit einem FACS-Gerät isoliert. Die Zellen wurden, wie für die Experimente mit den CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut beschrieben, unmittelbar nach der Isolierung transduziert und am folgenden Tag zusammen mit bestrahlten Trägerzellen transplantiert (Tabelle 5).

Sechs Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse wie unter 3.4.1 beschrieben analysiert. Wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Anzahl transplantierte Zellen war das Engraftment in allen Tieren sehr niedrig. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 6 angegeben. Auch wenn die statistische Auswertung problematisch ist, sind die Daten hinsichtlich der Transduktionseffizienz von HFV in unstimulierte CD34+ Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut vielversprechend. Während weder bei den MLV- noch bei den HIV-transduzierten Zellen trotz besseren Engraftments ein nennenswerter Anteil EGFP+ Zellen nachweisbar war, waren im Knochenmark zweier Mäuse, die HFV-transduzierte Zellen erhielten, 43% bzw.

36% der humanen Zellen EGFP+. Die Daten lassen die Durchführung weiterer Experimente mit CD34+ Zellen aus mobilisiertem peripheren Blut lohnenswert erscheinen.

Tabelle 6. Transduktion von SRCs aus humanem mobilisiertem peripheren Blut

| Vektor | Vorstimulation ^a | Anzahl Mäuse transplantiert | Anzahl Mäuse verstorben | Humanes Engraftment in KM | EGFP+/hCD45+ (%) BM |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| HFV | 0d | 3 | 0 | 0,07 | 43 |
| | | | | 0,00 | 0 |
| | | | | 0,22 | 36 |
| MLV-GALV/MLV | 0d | 3 | 0 | 0,09 | 0 |
| | | | | 1,16 | 0 |
| | | | | 2,50 | 0 |
| HIV-GALV/MLV | 0d | 3 | 0 | 0,03 | 0 |
| | | | | 1,84 | 0 |
| | | | | 3,79 | 1,2 |

^a CD34+/CD38- Zellen wurden ohne Vorstimulation in Anwesenheit von SCF, G-CSF und TPO, jeweils 100 ng/ml, über Nacht transduziert. Es wurden drei Mäuse je Gruppe transplantiert. Das Engraftment war sehr niedrig und ist für jede Maus angegeben. Trotz des niedrigen Engraftments wurden eindeutig EGFP+ Zellen nachgewiesen.

4. Diskussion

Gentransfer mit retroviralen Vektoren wird seit mehr als zwölf Jahren klinisch erprobt (Rosenberg et al., 1990). In vielen Studien sind hämatopoetische Stammzellen Zielzellen für den Gentransfer: Sie sind einfach zu gewinnen, sie können *ex vivo* manipuliert und anschließend retransplantiert werden. So sollen sie eine lang anhaltende selbsterneuernde Quelle für genetisch modifizierte Blutzellen bei der Behandlung spezifischer genetischer Erkrankungen, Krebs und HIV-1 Infektionen sein. Die frühen Studien verliefen ohne einen klinischen Erfolg für die Patienten, da der Gentransfer in die hämatopoetischen Stammzellen zu niedrig war. Mittlerweile gibt es aber Studien, bei denen ein Teil der Patienten mit der Gentherapie hämatopoetischer Stammzellen erfolgreich behandelt werden konnte (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Aiuti et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; ASGT, 2003; Kohn et al., 2003). Diese Erfolge bleiben allerdings weit hinter den Erwartungen zurück, die in die Gentherapie gesteckt werden. Dabei ist das größte Problem der Gentherapie immer noch die Biologie selbst. Es ist schwierig, das Transkriptom einer menschlichen Zelle ohne schädliche Nebenwirkungen spezifisch zu verändern und diese Veränderung langfristig aufrecht zu erhalten.

Zwei wesentliche Probleme, die klinische Erfolge bei der Stammzellgentherapie erschweren, scheinen derzeit im Vordergrund zu stehen. Das erste ist die unbekannte Natur der hämatopoetischen Stammzelle selbst. Da lediglich die Zellpopulation bekannt ist, in der sich Stammzellen zu einem geringen Anteil befinden, sie selbst aber phänotypisch bislang nicht eindeutig charakterisiert werden können, ist es nur schwer möglich, ihre erfolgreiche Manipulation präklinisch nachzuweisen. Die Vergangenheit zeigte, dass Methoden, die eine effiziente Transduktion von humanen Progenitorzellen und murinen hämatopoetischen Stammzellen erlaubten, nicht geeignet waren, um menschliche hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren (Orkin und Motulsky, 1995). Das zweite Problem ist darin begründet, dass sich hämatopoetische Stammzellen selten teilen. Da die zunächst etablierten onkoretroviralen Vektoren den Zusammenbruch der Kernmembran brauchen, um die provirale DNA in das Wirtszellgenom zu integrieren (Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Lewis und Emerman, 1994), lassen sich die hämatopoetischen Stammzellen von diesen Vektoren nicht effizient transduzieren. Die Induktion von Zellteilung durch Inkubation der Zielzellen mit verschiedenen Zytokinkombinationen interferiert wiederum mit der Repopulationskapazität der hämatopoetischen Stammzellen (Gothot et al., 1998; Guenechea et al., 1999).

Bei den wenigen Patienten, die bislang von dem Konzept der Gentherapie profitierten, handelt es sich um Kinder, die an einem angeborenen Immundefekt („severe combined immunodeficiency disease“, SCID) litten. Die zugrunde liegenden Gendefekte führen dazu, dass die Betroffenen kein funktionierendes lymphatisches System besitzen und ohne eine Stammzelltransplantation im ersten Lebensjahr an Infektionen versterben. Der Erfolg der Gentherapie bei den SCID-Patienten liegt möglicherweise daran, dass ein starker *in vivo* Selektionsvorteil der von den korrigierten CD34+ Zellen abstammenden Lymphozyten eine

initial niedrige Transduktionseffizienz kompensiert hat. Darüber hinaus wird spekuliert, dass die Stammzellen aus dem Knochenmark der sehr jungen Patienten (jünger als ein Jahr) möglicherweise ein höheres proliferatives Potential haben, was den viralen Gentransfer erleichtert haben könnte (Kohn et al., 2003).

Angesichts der wenigen Erfolge wird seit Mitte der 1990er Jahre nach alternativen Vektorsystemen gesucht, die die Transduktion teilungsinaktiver Zellen erlauben. Es wurden vor allem HIV-1-basierte Vektoren etabliert, aber auch SIV- und FIV-Vektoren. Mit diesen wurde eine effiziente Transduktion verschiedener ausdifferenzierter Zelltypen (DuBridge et al., 1987; Naldini et al., 1996; Kafri et al., 1997; Miyoshi et al., 1998; Takahashi et al., 1999) und auch SRCs gezeigt (Miyoshi et al., 1999; Guenechea et al., 2000; Scherr et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HFV-basierte Vektoren ebenfalls geeignet sind, effizient primitive CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut und mobilisiertem peripheren Blut zu transduzieren. Das kurze Transduktionsprotokoll sollte den Zellen erlauben, in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zu verbleiben und somit ihre Repopulationskapazität zu bewahren (Peters et al., 1996; Gothot et al., 1998; Glimm et al., 2000). Die markierten Zellen wuchsen in NOD/SCID Mäusen an. Eine hohe Genexpression wurde in lymphoiden und myeloiden Zellen sowie in Vorläuferzellen gemessen. Einzelne und mehrere Integrationsstellen in muriner Knochenmark DNA sowie unterschiedliche Integrationsmuster in EGFP+ Kolonien, die aus dem Knochenmark der Mäuse gewonnen wurden, zeigten eine Repopulation mit mehreren humanen Zellklonen je Maus. Die Transduktionseffizienzen waren bei einer hohen m.o.i. höher als die, die mit einem VSV-G-pseudotypisierten HIV-Vektor erreicht wurden. Versuche, HIV-Vektoren, die mit einem neuen chimären GALV Hüllprotein pseudotypisiert waren, für die Transduktion von SRCs zu verwenden, scheiterten.

Bei der transienten Herstellung von Foamyvirus-haltigen Überständen zeigte sich, dass die Verwendung von aktivierten Dendrimern für die Transfektion deutlich höhere Virustiter ergab. Durch das Aufbrechen der Produzentenzellen mittels Einfrieren und Auftauen konnten nicht mehr intrazelluläre Partikel freigesetzt werden, wenn Polyfect für die Transfektion verwendet wurde. Wurde hingegen ein liposomales Transfektionsreagenz verwendet, konnte der initial recht niedrige Titer durch dieses Vorgehen erhöht werden. Offenbar werden die Foamyvirus-Partikel bei Verwendung aktivierter Dendrimere effizienter aus den Zellen freigesetzt. Die unterschiedlich effiziente Bildung infektiöser Partikel scheint in Zusammenhang mit dem Env Protein der Foamyviren zu stehen, da eine effizientere Partikelbildung auch dann erfolgte, wenn MLV-Partikel mit chimären Foamyvirus-Hüllproteinen pseudotypisiert wurden, nicht aber, wenn sie mit anderen retroviralen Env Proteinen verpackt wurden. Das Env Protein von Foamyviren gleicht funktionell und strukturell in vielen Punkten den Hüllproteinen anderer Retroviren (Wang und Mulligan, 1999). Allerdings teilen Foamyviren im Hinblick auf ihr Hüllprotein auch Besonderheiten mit Hepadnaviren. So benötigen beide Viren das Hüllprotein essentiell für das intrazelluläre und

extrazelluläre Knospen (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998). In Abwesenheit des Glykoproteins kann Foamyvirus-Gag nicht freigesetzt werden, wohingegen bei allen anderen Retroviren so genannte „virus-like particles“ durch das Gag Protein alleine gebildet werden können. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Foamyvirus-Env ähnlich dem HBV-Hüllprotein in Abwesenheit aller anderen viralen Proteine extrazelluläre subvirale Partikel bilden kann (Shaw et al., 2003). Die Autoren folgern daraus, dass die Domänen für die Assemblierung, Knospung und Freisetzung der Foamyvirus-Partikel innerhalb des Env Proteins liegen und nicht wie bei anderen Retroviren innerhalb des Gag Proteins. Eine weitere Besonderheit ist, dass die sehr kurze zytoplasmatische Domäne des foamyviralen Hüllproteins ein ER-Retentionssignal enthält, das seinen Transport an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al., 1997) und dafür mitverantwortlich ist, dass Foamyviren hauptsächlich an intrazytoplasmatischen Membranen knospen (Goepfert et al., 1999). Die einzige Ausnahme bildet das Equine Foamyvirus (EFV), das kein ER-Retentionssignal enthält und hauptsächlich an der Plasmamembran knospt (Tobaly-Tapiero et al., 2000). Ob der beobachtete Effekt des Transfektionsreagenzes auch bei Verwendung dieses Hüllproteins auftritt, könnte Aufschluss darüber geben, ob es einen Zusammenhang zwischen der verbesserten Partikelfreisetzung und der ER-Retention gibt.

Die Verwendung retroviraler Überstände ist bei vielen *in vitro* und *in vivo* Anwendungen durch einen niedrigen Titer limitiert. Es wurden die verschiedensten Maßnahmen beschrieben, um die Dichte an infektiösen Partikeln je Volumeneinheit bzw. in Zielzellnähe zu erhöhen. Diese Maßnahmen betreffen zunächst das Vektordesign und die Produzentenzellen sowie deren Kultivierung. Des Weiteren betreffen sie die Interaktion mit den Zielzellen. So kann die Wahrscheinlichkeit, dass ein Viruspartikel die Zielzelle infiziert, beispielsweise durch die Inkubation mit Polykationen (Toyoshima und Vogt, 1969; Manning et al., 1971), die Komplexierung der retroviralen Partikel mit Liposomen oder liposomalen Lipiden (Porter et al., 1998), einem „flow-through“ des Kulturüberstandes vorbei an einer Zielzellschicht (Chuck et al., 1996) und der gleichzeitigen Zentrifugation von retroviralen Partikeln mit ihren Zielzellen (Kotani et al., 1994; Bunnell et al., 1995) erhöht werden. Auch kann durch die Kolokalisation von Viruspartikeln mit den Zielzellen auf dem rekombinanten Fibronectinfragment CH296 eine höhere Transduktionseffizienz erreicht werden (Hananberg et al., 1996). Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt im Fall der Foamyviren die Verwendung von Protaminsulfat während der Transduktion zu keiner höheren Transduktionseffizienz - im Gegenteil, die Transduktionseffizienz wird geringfügig erniedrigt. Offenbar ist die Oberflächenladung der Foamyvirus-Partikel kein limitierender Faktor für die Adsorption an die Zielzellen. Durch die Verwendung von Fibronectin hingegen konnte die HFV-Transduktionseffizienz von hämatopoetischen Zelllinien und primären hämatopoetischen Zellen zwischen 1,3- und 3,4-fach erhöht werden. Allerdings bleibt zu prüfen, ob Foamyviren an Fibronectin haften oder ob der Effekt alleine auf der Bindung der Zielzellen an die VLA-4 und VLA-5 Bindungsstellen des Fibronectinfragments beruht. Nach einer Adhäsion kommt es

zur Vereinzelungen der Zellen, die den Viruspartikeln einen besseren Zugang zu den Rezeptormolekülen erlauben könnte. Auch wurde beschrieben, dass die Bindung von hämatopoetischen Zellen an Fibronectin Wachstum induzieren kann, was ebenfalls die Erhöhung der Transduktionseffizienz erklären könnte (Yokota et al., 1998; Yin et al., 1999). Den weitaus größeren Effekt auf die Transduktionseffizienz hatte aber die Titererhöhung der Überstände durch Konzentrierung. Das Einengen des Volumens bei Beibehaltung der Infektiösität der viralen Partikel ist vielfach beschrieben. Die klassische Methode, virushaltige Überstände zu konzentrieren, ist die Ultrazentrifugation. Ihre Anwendung ist aber limitiert auf Vektoren, die mit sehr stabilen Hüllproteinen pseudotypisiert sind, wie dem VSV-G Protein (Burns et al., 1993) oder dem RD114-Env (Kelly et al., 2001). Konzentrieren anders pseudotypisierter Vektoren erfolgte durch Ultrafiltration (Paul et al., 1993; Kotani et al., 1994; Parente und Wolfe, 1996), Lyophilisation (Kotani et al., 1994) und Kopräzipitation mit CaP (Morling und Russell, 1995; Pham et al., 2001). Diese Maßnahmen sind zum Teil sehr aufwendig und können vom Aufkonzentrieren unerwünschter Komponenten begleitet sein, die die Infektion inhibieren (Le Doux et al., 1996) oder toxisch für die Zielzellen sind (Morling und Russell, 1995). Das Sedimentieren von Viruspartikeln durch Zentrifugation bei verglichen mit der Ultrazentrifugation niedrigen Geschwindigkeiten ist ebenfalls beschrieben. Hier werden teilweise Substanzen wie Poly-L-Lysin oder Pansorbin zugegeben, die eine Komplexbildung der Viruspartikel untereinander hervorrufen, wodurch diese besser sedimentieren (Darling et al., 2000; Zhang et al., 2001). Wenige Publikationen beschreiben die „low-speed“ Zentrifugation unabhängig von Zusätzen. So zentrifugieren Bowles et al. sehr große Volumina (4 x 250 ml) eines amphotropen MLV-Vektors für 16 Stunden bei 6.000 x g und 4°C und resuspendieren das Sediment in 1/10 bzw. 1/100 des ursprünglichen Volumens bei einem mit 3% bzw. 10% recht geringen Verlust an infektiösen Partikeln (Bowles et al., 1996). Yang et al. finden die optimalen Zentrifugationsbedingungen von amphotropen MLV-Vektoren bei vier Stunden mit 20.000 x g, ohne einen Verlust an initial eingesetzten Viruspartikeln (Yang et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zentrifugation GALV-pseudotypisierter MLV-Vektoren, die mit einer stabilen Verpackungszelllinie hergestellt worden waren, systematisch hinsichtlich der Dauer der Zentrifugation und des Volumens des einzusetzenden Virusüberstandes untersucht. Die Geschwindigkeit war durch die verwendeten Polypropylenröhrchen auf 12.000 x g limitiert. Die Ergebnisse zeigen, dass GALV-pseudotypisierte MLV-Vektoren sich bei dieser Geschwindigkeit sehr gut sedimentieren lassen. Dabei ist die Dauer der Zentrifugation abhängig vom Volumen und der damit verbundenen Trennstrecke. Aber bereits nach 60-minütiger Zentrifugation kann die Menge an eingesetzten Partikeln wiedergewonnen werden. Bei einer längeren Zentrifugationszeit war die Gesamtmenge an gewonnenen infektiösen Partikeln größer als die, die initial gemessen wurde. Die mehr eingesetzte Menge an Viruspartikeln wurde also nicht nur vollständig wiedergewonnen, die erhöhte Dichte an Viruspartikeln, die durch die Zentrifugation erreicht werden kann, erlaubt offenbar erst das Sichtbarwerden der eigentlich initial in dem unkonzentrierten Überstand vorhandenen Partikel. Funktionell wird immer nur

ein minimaler Titer bestimmt werden. Ein Großteil der im Überstand befindlichen Partikel erreicht innerhalb der Halbwertszeit von Retroviren keine Zelle, da allein durch die Brown'sche Molekularbewegung viel zu geringe Strecken zurückgelegt werden (Palsson und Andreadis, 1997). Die Erhöhung der Partikeldichte mittels Zentrifugation sowie die Verwendung von Transduktionseffizienz-erhöhenden Zusätzen wie Protamin oder Fibronectin kann aber auch wieder nur eine untere Grenze an tatsächlich im Überstand vorhandenen Partikeln widerspiegeln.

Die „low-speed“ Zentrifugation konnte, unabhängig vom Hüllprotein, auch bei den verschiedenen transient hergestellten Vektoren durchgeführt werden. Ob die Viruspartikel unmittelbar miteinander oder über Bestandteile des Serums untereinander assoziiert sind und nur deshalb bei den niedrigen Geschwindigkeiten sedimentierbar sind, bleibt zu untersuchen. Auch wird zu ermitteln sein, inwieweit der höhere Titer durch die Entfernung überschüssigen Env Proteins, das die Rezeptoren der Zielzellen blockieren könnte, aus der Partikelfraktion nach der Zentrifugation bedingt ist.

Insgesamt konnte hier eine sehr effiziente und einfache Methode zur Titererhöhung etabliert werden, die auch aus praktischen Gesichtspunkten gut anwendbar ist. So können die infektiösen Überstände in preiswerten sterilen Einmalröhrchen zentrifugiert werden und es können in dem verwendeten Rotor 12 x 50 ml Überstand zentrifugiert werden, während beispielsweise bei der Ultrazentrifugation in dem gängigsten Rotor lediglich 6 x 37,5 ml zentrifugiert werden können. Ein weiterer großer Vorteil bei der Zentrifugation von Überständen ist, dass man das Medium, das bereits durch die Produzentenzellen konditioniert ist, entfernt und durch frisches bzw. anderes Medium austauschen kann. Im Hinblick auf die Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien und insbesondere primären hämatopoetischen Zellen mit HFV-Vektoren war das Konzentrieren der Überstände essentiell für eine effiziente Transduktion.

Um die verschiedenen retroviralen Vektorsysteme hinsichtlich ihrer Kapazität, frühe hämatopoetische Zellen zu transduzieren, miteinander zu vergleichen, wäre es sinnvoll, wenn die Unterschiede sich allein auf den Vektor bezögen, nicht aber auf die Art der Wechselwirkung zwischen Zielzelle und Rezeptorprotein und das Expressionsniveau der Rezeptormoleküle auf den Zielzellen. Da HFV-Vektoren aber bislang nicht mit heterologen Env Proteinen pseudotypisiert werden können (Pietschmann et al., 1999) und MLV und HIV nur sehr ineffizient mit dem wt-Env von HFV verpackt werden können (Lindemann et al., 1997), wurden Hüllproteine des FFV und SFV sowie verschiedene chimäre Foamyvirus-Hüllproteine verwendet. Die Titer, die mit diesen Hüllproteinen auf den verschiedenen Kapsiden erreicht werden konnten, deuten mit $4,7 \times 10^5$ bis $6,3 \times 10^7$ TE/ml auf eine effiziente Partikelbildung hin, waren aber offenbar nicht ausreichend, um effizient Progenitorzellen zu transduzieren. Auch wenn die erreichten Transduktionseffizienzen die Verwendung derartig verpackter Vektoren *in vivo* als nicht sinnvoll erscheinen ließen, zeigen die Daten aber, dass MLV-Vektoren weder in unstimulierten noch in vorstimulierten Zellen

eine effiziente Transduktion erlauben und HIV-Vektoren HFV-Vektoren hinsichtlich ihrer Effizienz leicht überlegen waren. Für die weiteren Experimente wurde das wt-HFV-Env zur Verpackung der HFV-Vektoren und ein chimäres GALV-Env, mit dem nicht nur MLV-, sondern auch HIV-Vektoren pseudotypisiert werden konnten, verwendet. Da das GALV-Env bereits in klinischen Studien zur Pseudotypisierung von onkoretroviralen Vektoren eingesetzt wurde, erschien sein Gebrauch angesichts der Schwierigkeiten, die mit einer Verwendung des VSV-G Proteins bei der Etablierung stabiler Verpackungszelllinien verbunden sind, sinnvoll. Mit den so pseudotypisierten Vektoren entsprachen die Transduktionseffizienzen, die auf Progenitorzellen aus Nabelschnurblut erreicht werden konnten, den Erwartungen: Mit HFV konnten unabhängig von einer Vorstimulation der Zielzellen Transduktionseffizienzen um 70% erreicht werden, während das bei MLV-Vektoren nur der Fall war, wenn die Zellen vorstimuliert waren. Mit rund 50% Transduktionseffizienz war auch der HIV-Vektor sehr effizient auf unstimulierten Zellen, die Transduktionseffizienz ließ sich aber durch die Vorstimulation der Zielzellen auf über 80% erhöhen.

Bei den ersten beiden Tierexperimenten, bei denen den NOD/SCID Mäusen transduzierte Zellen aus Nabelschnurblut transplantiert wurden, entsprachen die Transduktionseffizienzen in den Progenitorassays, die parallel zur Transplantation angesetzt worden waren, bezüglich HFV und HIV-GALVTM den Vorexperimenten. Sechs Wochen danach war der Anteil der transduzierten an den in den Mäusen angewachsenen humanen unstimulierten Zellen bei HFV mit 62% bis 83% sehr hoch. Bei Transplantation von HFV-transduzierten vorstimulierten Zellen sank die mittlere Transduktionseffizienz auf 42%. Die Transduktionseffizienzen schwankten hier stark zwischen 3,9% und 78%. Diese starken Schwankungen traten auch bei den folgenden beiden Experimenten auf, dort bei den Mäusen, die unstimulierte HFV-transduzierte Zellen erhalten hatten (2,7 bis 92,5%, Mittel 23,7%). Auch hier waren zwei Tage vorstimulierte Zellen schlechter transduziert als die unstimulierten Zellen. Eine mögliche Erklärung für die teilweise niedrigeren Transduktionsraten im dritten und vierten Experiment sowie auf den vorstimulierten Zellen kann eine geringere m.o.i. sein. Die durch die Proliferationsrate während der Vorstimulation etwa 2- bis 2,5-fach höhere Zellzahl sowie die in den beiden letzten Experimenten gewählte größere Anzahl an Zellen, die transplantiert werden sollten, wurden im gleichen Volumen Virusüberstand transduziert, wie die unstimulierten Zellen bzw. wie die in den ersten beiden Experimenten geringere Menge an Zellen. Allerdings sind hierdurch nicht die starken Schwankungen zu erklären. Diese lassen sich möglicherweise durch die zytotoxische Wirkung des Foamyvirus-Envs begründen, die bei größerer Dichte der Zellen während der Transduktion höher als bei geringer Dichte sein dürfte. Die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen unter dem Einfluß des viralen Hüllproteins dann miteinander fusionieren, wäre größer und die transduzierten Zellen sterben möglicherweise selektiv ab.

Obgleich die Expressionskassette für das Markergen bei allen drei Vektoren die gleiche war, war die Expressionsstärke des EGFPs bei den Foamyviren im Vergleich zu den Lentiviren

sehr hoch. Das war auch der Fall, wenn die Transduktionseffizienz niedrig war. Hier ist eine mögliche Erklärung die unterschiedliche Konstruktion der 3'-LTRs in den Vektoren. Während die 3'-LTRs des MLV- und des HIV-Vektors deletiert sind, damit der Promotor nach der Integration in das Wirtszellgenom inaktiv ist, ist der HFV-3'-LTR dies nicht. Ohne den Transaktivator Tas hat der HFV-LTR keinerlei Promotoraktivität, so dass eine Deletion nicht erforderlich ist. Es ist aber beschrieben, dass bei selbst-inaktivierenden 3'-LTRs eine ineffizientere Polyadenylierung erfolgt (Zaiss et al., 2002). Möglicherweise lassen sich dadurch die niedrigeren Expressionslevel des MLV- und HIV-Vektors gegenüber dem HFV-Vektor erklären.

Mit den GALV-pseudotypisierten HIV-Vektoren war die Transduktion unstimulierter SRCs überraschenderweise sehr ineffizient. Nach zweitägiger Vorstimulation war die Transduktion zwar effizienter, aber erreichte nicht das Niveau, das mit VSV-G-pseudotypisierten HIV-Vektoren auf unstimulierten Zellen erreicht wurde. Die niedrigen Transduktionseffizienzen mit dem GALV-pseudotypisierten HIV-Vektor liegen also offenbar weniger an dem Vektor selbst als vielmehr an einem ineffizienten Eintritt in die Zielzellen. Offenbar ist die Expression des zellulären Proteins Pit-1, das als Rezeptor für GALV fungiert, zu niedrig für die Titer, die bei den beschriebenen Herstellungsbedingungen erreicht werden konnten. Ein niedriges Expressionsniveau des Pit-1 Proteins auf CD34+CD38- humanen Zellen wurde beschrieben (Orlic et al., 1998). Die höhere Transduktionseffizienz nach Zytokininkubation der Zielzellen kann durch die verstärkte Zellteilung und/oder einer wie für den amphotropen Rezeptor Pit-2 beschriebenen (Orlic et al., 1998; Horwitz et al., 1999) Hochregulierung der Pit-1 Expression erklärt werden.

VSV-G bindet nicht an ein Protein, sondern an Phospholipide der Zelloberfläche. Dementsprechend ist der Tropismus von VSV-G-pseudotypisierten Vektoren recht breit und die Transduktionseffizienz weniger stark von der Rezeptorexpression auf bestimmten Zielzellen abhängig. Das spiegelt sich auch in den im Vergleich zu den übrigen Vektoren geringen Schwankungen der Transduktionseffizienz in den SRCs wider, die bei acht Mäusen zwischen 39,6% und 52,8% lagen. Die Markierungsraten, die mit dem VSV-G-pseudotypisierten HIV-Vektor erreicht werden konnten, entsprachen den Werten, die in der Literatur beschrieben werden. Das GALV-Env wurde erfolgreich für die Pseudotypisierung von MLV-Vektoren etabliert und unter Verwendung entsprechender Protokolle kann auch eine effiziente Transduktion von SRCs aus Nabelschnurblut oder mobilisiertem peripheren Blut erreicht werden (Schilz et al., 2000; Pollok et al., 2001). Dementsprechend werden GALV-pseudotypisierte MLV-Vektoren verstärkt in klinischen Studien eingesetzt (Reeves et al., 2000). Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen aber, dass das GALV-Env für die Transduktion unstimulierter Zielzellen mit HIV-Vektoren in kurzen Transduktionsprotokollen keine Alternative zum VSV-G Protein darstellt.

Mit MLV-Vektoren war die Transduktionseffizienz bei den Progenitorassays, die parallel zu den Transplantationen in die NOD/SCID-Mäuse angesetzt wurden, in unstimulierten Zellen höher und bei vorstimulierten Zellen deutlich niedriger als bei den Vorexperimenten beobachtet. Da die Titer der Überstände nicht niedriger waren als bei den Vorexperimenten

ist der Grund für die Unterschiede bei den Zellen zu suchen. Anders als bei den Vorexperimenten wurden nicht frisch aufgereinigte Zellen eines einzelnen Produktes transduziert, sondern es waren mehrere Produkte vereinigt, die zum Teil aufgetaut und über Nacht in 10 ng/ml SCF gehalten wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einer dieser Faktoren die Teilungsrate oder die Rezeptorexpression auf den Zielzellen beeinflusst hat und es so zu den Unterschieden kommen konnte.

Die zelluläre Membranstruktur, die Foamyviren als Rezeptor für die Adsorption an die Zielzellen dient, ist unbekannt. Da bislang sämtliche Säugerzellen, die getestet wurden, mit Foamyviren infizierbar waren (Russell und Miller, 1996; Hill et al., 1999; Mergia und Heinkelein 2003), ist zu vermuten, dass der Rezeptor ubiquitär exprimiert wird. Eine Untersuchung von CD34+ Zellen aus humanem Knochenmark zeigte allerdings, dass die Expression des funktionellen Foamyvirusrezeptors auf primitiven hämatopoetischen Zellen niedrig sein könnte (von Laer et al., 2001). Dies würde die hohe m.o.i. erklären, die für eine effiziente Transduktion der SRCs aus humanem Nabelschnurblut offenbar erforderlich ist.

Ob Foamyviren teilungsinaktive Zellen transduzieren können wird kontrovers diskutiert (Bieniasz et al., 1995; Russell und Miller, 1996; Saib et al., 1997; Mergia et al., 2001). Bieniasz et al. zeigten, dass Foamyviren nicht effizient in Fibroblastenzelllinien replizieren können, die in der G₁/S oder G₂-Phase des Zellzyklus arretiert wurden (Bieniasz et al., 1995). Das wird unterstützt von Saib et al., die zwar Foamyvirus DNA im Zellkern von G₁- oder S-Phase-arretierten Zellen finden, aber keine Genexpression nachweisen können (Saib et al., 1997). Auf der anderen Seite konnten Russell und Miller stationäre Zellen effizienter mit HFV-Vektoren als mit MLV-Vektoren transduzieren (Russell und Miller, 1996). Schließlich zeigten Mergia et al. eine effiziente Transduktion nicht teilungsaktiver Zellen: Mit Aphidicolin in der G₁/S-Phase arretierte Zellen und unstimulierte Lymphozyten sowie postmitotische Neurone konnten mit einem SFV-1 basierten Vektor transduziert werden, nicht aber mit einem MLV-Vektor (Mergia et al., 2001). Mergia et al. vermuten den Grund für die konträren Resultate in den unterschiedlichen verwendeten Promotoren. Während Saib et al. den HFV-LTR verwendeten (Saib et al., 1997), trug der SFV-1 Vektor von Mergia et al. einen internen CMV-Promotor für die Transgenexpression, der auch in verschiedenen wachstumsarretierten Zellen aktiv ist (Mergia et al., 2001).

Eine mögliche Erklärung für die hohen Transduktionseffizienzen, die in den unstimulierten SRCs mit den HFV Vektoren erreicht werden konnten, ist der ungewöhnliche Zeitpunkt der reversen Transkription im Lebenszyklus der Foamyviren. Die reverse Transkription erfolgt spät im Replikationszyklus der Viren (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999). Da die reverse Transkription ein sehr empfindlicher und fehleranfälliger Schritt ist, dürfte es einen großen

Vorteil darstellen, wenn dieser Schritt noch vor der Infektion einer neuen Zelle abgeschlossen werden kann. Falls die Barriere für den Gentransfer die reverse Transkription sein sollte, haben Foamyviren einen Vorteil, denn ein großer Teil der Partikel enthält bereits ein DNA Genom (Yu et al., 1999; Roy et al., 2003). Ein niedriger Pool an Nukleotiden in unstimulierten Zellen wäre somit nicht so problematisch. Darüber hinaus hat doppelsträngige DNA eine höhere Stabilität als einzelsträngige RNA. Die intrazelluläre Halbwertszeit der Viren könnte dadurch ausreichend lang sein, um die Integration in das Genom sich selten teilender Zellen zu erlauben. Ob der Grund für die hohen Transduktionseffizienzen, die teilweise mit den Foamyvirus Vektoren erreicht wurden, der Anteil an DNA-haltigen Partikeln ist, könnte bestimmt werden, indem man die Zellen in Anwesenheit eines Inhibitors der reversen Transkription transduziert. Wenn lediglich die DNA-haltigen Partikel die Transduktion in die SRCs bewirken, wäre das auch eine Erklärungsmöglichkeit für die hohe m.o.i., die für eine effiziente Transduktion erforderlich zu sein scheint.

Die Integrationsstellenanalyse von DNA aus dem Knochenmark der Mäuse sowie aus einzelnen EGFP+ Kolonien zeigte sowohl für HFV als auch für HIV, dass jeder Klon eine oder mehrere Integrationsstellen hatte und die Repopulation der Mäuse mit den menschlichen Zellen oligoklonal war. Nach dem Auftreten zweier Leukämiefälle in einer klinischen Gentherapiestudie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Kohn et al., 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b) wird die Integrationsstellenanalyse von retroviralen Vektoren künftig eine zunehmend wichtige Rolle bei präklinischen und klinischen Studien einnehmen.

In verschiedenen Modellsystemen induzieren replikationskompetente Retroviren Krebs (Lund et al., 2002; Mikkers et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Theoretisch kann die Tumorgenese dabei von mehreren proviralen Integrationsstellen in einer einzelnen Zelle ausgehen oder von einer einzelnen Insertionsstelle, die die Proliferation der Zelle verstärkt und damit die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sekundäre Veränderungen in Subklonen dieser Zelle vorkommen. Für die letztere Hypothese spricht, dass die Analyse von Tumoren, die experimentell durch Infektion mit replikationskompetenten Retroviren induziert wurden, häufig nur eine Insertion enthalten. Die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Mutagenese Ereignisses (Onkogen Aktivierung) durch ein Retrovirus oder einen Retrovirus Vektor, die zur Entstehung eines malignen Phänotyps führt, wurde als 10^{-7} eingeschätzt (Stocking et al., 1993).

Umso überraschender war, dass im August 2002 eines von neun in einer französischen Studie erfolgreich mit einer Gentherapie behandelten Kinder 30 Monate nach der Behandlung eine monoklonale T-Zell-Leukämie entwickelt hatte (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a). Mittels LAM-PCR wurde eine Integrationsstelle in dem T-Zell Klon entdeckt und im ersten Intron des LMO-2 Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 kartiert (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Obgleich die Integration in einer inversen Orientierung erfolgt war, wurde eine aberrante Expression von LMO-2 in den Leukämiezellen gezeigt. Die Aktivierung dieses Gens erfolgte somit möglicherweise durch Enhancer Elemente des integrierten

Vektors, die einen kryptischen Promotor aktivierten, der normalerweise in T-Zellen inaktiv ist. Der leukämische Klon zeigte darüber hinaus eine chromosomale Translokation, was darauf hindeutet, dass sekundäre Ereignisse zur Entwicklung der Leukämie geführt haben könnten. Für diese Hypothese spricht, dass der Klon mit der Vektorintegration in archivierten Blutproben des Patienten zwar relativ überrepräsentiert war, aber noch nicht die Translokation hatte.

Im Dezember 2002 wurde bei einem anderen Kind aus dieser Studie ebenfalls eine Leukämie diagnostiziert (Marshall, 2003; ASGT, 2003; Kohn et al., 2003; Hacain-Bey-Abbina et al., 2003b). Eine Vektorintegrationsstelle wurde bei diesem Patienten in Vorwärts-Orientierung etwa 3.000 bp stromaufwärts von Exon 1 des LMO-2 Gens nahe des Starts des putativen Promotors dieses Gens gefunden. Wie bei dem ersten Fall wurde eine aberrante Expression des LMO-2 Gens festgestellt. Bei diesem Patienten wurden ebenfalls andere chromosomale Veränderungen gefunden, die später als die T-Zell Expansion aufgetreten sind. T-Zell Leukämien wurden bereits früher mit einer aberranten Expression von LMO-2 in Zusammenhang gebracht (Rabbitts et al., 1999). Das Auftreten dieser LMO-2-assoziierten Leukämien bei zwei Patienten aus einer Gruppe von zehn Patienten, die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden, deutet auf einen gemeinsamen Mechanismus der Leukämogenese hin und ist wohl nicht zufällig. Die aberrante Produktion des LMO-2 Proteins gibt den T-Zellen möglicherweise einen zusätzlichen Wachstumsvorteil zu dem, den sie durch die unregulierte Expression des Transgens, der gemeinsamen γ -Kette eines Interleukinrezeptors, erhielten.

Bereits im Frühjahr 2002 war von einer Leukämie in einem Mausmodell berichtet worden, die durch eine Vektorintegration ausgelöst wurde (Li et al., 2002). Bei diesem Fall verursachte die Vektorintegration in Vorwärts-Orientierung in Exon 1 die Aktivierung des Evi-1 Gens. Das übertragene Transgen war der trunkierte Nerven-Wachstumsfaktorrezeptor, von dem die Autoren annehmen, dass er Tyrosinkinase-Rezeptoren für Neutrophine aktiviert. Auch hier gibt es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dem Transgen und dem Gen, das durch die Integration aktiviert wurde. Der leukämische Klon konnte in mehrere weitere Mäuse transplantiert werden. In einer anderen Tierstudie erfolgte die Integration eines lentiviralen Vektors in humanen SRCs aus Nabelschnurblut in ein Allel des Tumorsuppressorgens BRCA1 (Woods et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Art der Integration *in vivo* physiologische Konsequenzen bei Menschen hätte.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass die initial angenommene Wahrscheinlichkeit für eine kritische Integration eines Vektors als zu niedrig beschrieben wurde. Die generelle Annahme, Retroviren würden zufällig in das Genom der Wirtszelle integrieren, wurde kürzlich durch mehrere Veröffentlichung in Frage gestellt, bei denen gezeigt wurde, dass sowohl MLV- als auch HIV-Vektoren bevorzugt in transkriptionell aktive Gene integrieren (Schroder et al., 2002; Laufs et al., 2003; Wu et al., 2003). MLV-Vektoren integrieren dabei vor allem in der Nähe von Promotoren, während HIV-Vektoren gleichmäßig verteilt innerhalb der Transkriptionseinheiten integrieren (Wu et al., 2003). Zwar präferieren beide Viren die Integration in offenes Chromatin, die Präferenz für verschiedene Regionen innerhalb der

Gene deutet aber eher auf eine aktive Erkennung durch spezifische Komponenten als auf eine passive Diffusion hin. Bisher ist allerdings noch sehr wenig über die Vorgänge im Zellkern und die Rolle involvierter zellulärer Proteine bekannt. Diese Berichte und die beschriebenen Fälle der Integrationsmutagenese machen deutlich, dass es derzeit nicht vorhersagbar ist, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Insertion an bestimmten Stellen des Genoms erfolgt. Hier wird experimentell zu ermitteln sein, ob es für die verschiedenen Vektortypen bevorzugte Integrationsstellen gibt. Ein positiver Effekt könnte sein, dass es bei besserem Verständnis der Integrationsvorgänge möglich werden könnte, die Vektoren an sichere Integrationsorte zu dirigieren. Und auch wenn dies nicht der Fall sein sollte, wäre eine bessere individuelle Risikoabschätzung für bestimmte Applikationen möglich.

Angesichts der aufgezeigten Problematik bleibt zu fragen, warum in einer Vielzahl von präklinischen und klinischen Studien, die nicht nur mit hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen seit mehr als einem Jahrzehnt durchgeführt wurden, niemals zuvor derartige Zwischenfälle beobachtet werden konnten. In den meisten der Studien bei Menschen war das Engraftment mit modifizierten Zellen sehr gering. Und bei vielen Tierstudien war der Beobachtungszeitraum nicht länger als ein Jahr. Die Gesamtzahl an Integrationsstellen je Großtier oder Patient ist demnach sehr gering und es erfordert möglicherweise einen deutlich längeren Zeitraum, bis weitere Ereignisse eine maligne Entartung verursachen. Bei den beiden Leukämiefällen waren es fast drei Jahre nach der Infusion der genetisch modifizierten Zellen.

Es wird interessant sein zu ermitteln, ob foamyvirale Vektoren wie onkoretrovirale und lentivirale Vektoren ebenfalls in transkriptionell aktive Bereiche des Genoms integrieren und ob das Risiko für eine Insertionsmutagenese bei den verschiedenen retroviralen Vektortypen unterschiedlich ist. Weitere Integrationsstellenanalysen von wt-Viren und replikationsdefekten Vektoren werden darüber Aufschluss geben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich des Potentials von foamyviralen Vektoren, SRCs effizient zu transduzieren, unterstützt kürzlich veröffentlichte Untersuchungen anderer Gruppen. Josephson et al. erreichen mit einem HFV-Vektor ebenfalls Transduktionseffizienzen zwischen 60% und 80% (Josephson et al., 2002b). Interessanterweise erreichen sie diese Werte mit einer relativ niedrigen m.o.i. Wie aber bereits zuvor erwähnt, ist der Vergleich von Titern sehr schwierig. So wurden die Titer bei dieser Gruppe auf 293T-Zellen bestimmt, die nach eigener Erfahrung deutlich schlechter suszeptibel für eine Transduktion mit Foamyviren als beispielsweise HT1080-Zellen sind. Aus einer anderen Veröffentlichung dieser Gruppe geht hervor, dass die verwendete Zielzellzahl bei der Titration relativ hoch ist (Trobridge et al., 2002), was ein zusätzlicher Grund für einen falsch niedrig bestimmten Titer sein könnte. Josephson et al. sortierten und expandierten die humanen Zellpopulationen nach der Isolierung aus den Mäusen und bewiesen durch die Untersuchung der viralen Integrationsorte nicht nur, dass humane pluripotente hämatopoetische Stammzellen (lymphoid/myeloid) NOD/SCID-Mäuse

repopulieren, sondern auch, dass diese Zellen mit Foamyviren transduzierbar sind (Josephson et al., 2002b). Die von derselben Gruppe vorgestellten Daten zur Transduktion von SRCs aus mobilisiertem peripheren Blut unterstützen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen vorläufigen Ergebnisse zu diesen Zellen (Josephson et al., 2002a).

In einer weiteren Arbeit von Zucali et al. wurde für die Transduktion von SRCs aus Nabelschnurblut ein SFV-Vektor verwendet. Es konnten 7,4% bis 25,9% transduzierte Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark der NOD/SCID-Mäuse angesetzt worden waren, nachgewiesen werden. Die m.o.i., die hierfür erforderlich war, ist schlecht zu bestimmen, da die Zellen zwei bis dreimal nacheinander transduziert wurden und die Transduktion mit der „spin-oculation“ Methode durchgeführt wurde (Zucali et al., 2002).

Es gibt aber auch verschiedene Probleme, die mit der Verwendung foamyviraler Vektoren assoziiert sind. Dazu gehört, dass dieses Virusgenus verglichen mit den anderen Genera bislang schlechter untersucht ist und dementsprechend viele regulatorische Elemente des Genoms noch unbekannt sind. Hier ist vor allem das Verpackungssignal zu nennen, dessen genaue Lokalisation noch unbekannt ist. Dementsprechend ist das Vektordesign noch nicht optimal. Ein weiteres wichtiges Problem ist der zytopathische Effekt, der durch das Env Protein von Foamyviren verursacht wird. Dieser Effekt ist möglicherweise für das teilweise niedrigere Engraftment verantwortlich, das mit den foamyviral transduzierten Zellen erreicht wurde. Mutationen, die die fusogenen Eigenschaften des Foamyvirus-Env verändern, vermindern gleichzeitig die Infektiosität (D. Lindemann, nicht publizierte Beobachtungen). Da das Foamyvirus-Env unverzichtbar für die Partikelbildung ist, können foamyvirale Vektoren bislang nicht mit alternativen Hüllproteinen, die keinen zytopathischen Effekt verursachen, pseudotypisiert werden. Zusätzlich zu den zytopathischen Effekten des Env Proteins sind auch hohe Expressionslevel des Foamyvirus Gag Proteins mit einer zellulären Toxizität assoziiert. Das erschwert die Etablierung stabiler Verpackungszellen, die hochtitrige Überstände produzieren. Diese Probleme sind allerdings auch bei lentiviralen Vektoren vorhanden, so dass die in dieser Arbeit dargestellten hohen Transduktionseffizienzen der foamyviralen Vektoren in SRCs aus menschlichem Nabelschnurblut und mobilisiertem peripheren Blut sowie die Apathogenität der Foamyviren eine weitere Entwicklung foamyviraler Vektoren als Alternative zu den Onko- und Lentivirus-basierten Systemen sinnvoll erscheinen lassen.

5. Ausblick

Die Entwicklung foamyviraler Vektoren seit Mitte der 1990er Jahre hat dazu beigetragen, verschiedene Fragen des viralen Lebenszyklus aufzuklären. Ein besseres Verständnis der viralen Replikation, insbesondere was die Verpackung des Genoms und die Partikelbildung betrifft, wird weiterhin wichtig sein, um effiziente Transfervektoren herzustellen, die in möglichst geringem Maße Virussequenzen beinhalten und die Verpackung vergleichsweise großer heterologer DNA Sequenzen erlauben. Berichte über die erfolgreiche Transduktion verschiedener Zielzellen führen zu einer Verbreitung des Vektorsystems und so testen mehr und mehr Arbeitsgruppen diese Vektoren für ihre jeweiligen Fragestellungen. Dennoch stellen die foamyviralen Vektoren im Vergleich zu anderen Vektorsystemen derzeit lediglich eine kleine Nische dar. Aber sie bieten eine interessante Alternative, über deren Relevanz in der Zukunft weitere Studien entscheiden werden.

Vor dem Hintergrund der hohen Transduktionsraten, die mit den foamyviralen Vektoren in SRCs erreicht werden können, wurden in Weiterführung der vorliegenden Arbeit Konstrukte kloniert, die therapeutische Gene tragen. Bei diesen handelt es sich zum einen um ein Chemotherapieresistenzgen, das für die O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT^{P140K}) kodiert, und zum anderen um die Fanconi-Gene *FANCA* und *FANCC*. Letztere exprimieren DNA-Reparaturenzyme, deren Ausfall zu der seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Fanconi-Anämie führt. Mit den Konstrukten wurden hochtitrige Vektorüberstände hergestellt, die in verschiedenen *in vitro* Assays hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht wurden und dann verwendet wurden, um hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zu transduzieren. Derzeit werden die mit den HFV-Vektoren transduzierten Zellen im NOD/SCID-Maus Modell bzw. in *Fanca*^{-/-} und *Fancc*^{-/-} knock-out Mäusen untersucht.

Wie bereits diskutiert wird die Integrationsstellenanalyse der verschiedenen integrierenden Vektorsysteme zukünftig eine wichtige Rolle spielen. Bislang ist noch nicht bekannt, wo Foamyviren oder foamyvirale Vektoren in das Genom ihrer Zielzellen integrieren. Mittels der LAM-PCR und einer ähnlichen Methode, der „ligation-mediated“ (LM)-PCR, werden derzeit in einem weiteren Projekt die Übergänge zwischen foamyviralem Genom und dem Wirtszellgenom in transduzierten Zelllinien und hämatopoetischen Progenitorzellen isoliert. Die anschließende Sequenzanalyse dieser Übergänge soll nach Vergleich mit entsprechenden Datenbanken eine Kartierung der Integrationsstellen ermöglichen.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten wird die Etablierung einer induzierbaren Produzentenzelllinie sein, die eine kostengünstige und standardisierte Herstellung hochtitriger Vektorüberstände ermöglichen soll.

6. Zusammenfassung

Foamyviren sind vor dem Hintergrund einer Vektorentwicklung für die somatische Gentherapie aus verschiedenen Gründen interessant: Sie haben einen sehr breiten Wirts- und Gewebetropismus, kommen aber bei Menschen natürlicherweise nicht vor. Weder bei ihren eigentlichen Wirten noch bei akzidentell infizierten Personen konnte die Infektion mit Foamyviren mit einer Pathogenität assoziiert werden. Foamyviren haben das größte Genom aller Retroviren und damit eine potentiell hohe Verpackungskapazität für heterologe Sequenzen. Sie werden durch menschliches Serum nicht inaktiviert und es wurde gezeigt, dass sie sich langsam teilende Zellen effizienter transduzieren können als Onkoretroviren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Murine Leukämie Virus (MLV)-Vektoren mit Humanen Immundefizienz Virus (HIV)-Vektoren und Foamyvirus-Vektoren hinsichtlich ihres Potentials, effizient hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren, miteinander verglichen. Zunächst wurde die Herstellung der drei identisch konstruierten Vektoren in einem transienten Transfektionssystem etabliert und optimiert, so dass die Produktion hochtitriger viraler Überstände möglich wurde. Damit wurden in einem kurzen Transduktionsprotokoll hämatopoetische Zellen aus menschlichem Nabelschnurblut und mobilisiertem peripheren Blut transduziert. Um zu überprüfen, ob diese Zellen einen Organismus langfristig repopulieren können, wurden Xenotransplantationsexperimente in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID-Mäuse) vorgenommen. Die transduzierten humanen Zellen wurden in die Schwanzvene sublethal bestrahlter Mäuse injiziert. Sechs bis dreizehn Wochen nach der Transplantation wurden Blut, Knochenmark und Milz auf das Vorhandensein angewachsener humaner Zellen (SCID-repopulierende Zellen, SRCs) untersucht, die das vom integrierten retroviralen Vektor übertragene Markergen EGFP exprimierten. Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der gewählten „multiplicity of infection“ zwischen 24% und 72% der foamyviral transduzierten humanen Zellen markiert waren. EGFP wurde sowohl in lymphoiden als auch in myeloiden Zellen exprimiert. Im Knochenmark der Tiere ließen sich EGFP+ primitive humane Vorläuferzellen nachweisen, die *in vitro* noch ein klonogenes Wachstum zeigten. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass die menschliche Hämatopoese in den Tieren oligoklonal war und dass jeder Klon mehrere Vektor-Integrationsstellen aufwies. Im Gegensatz dazu war eine effiziente Transduktion der Zellen mit MLV-Vektoren auch nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren nicht möglich. Eine effiziente Transduktion der SRCs mit HIV-Vektoren war nur mit dem Vesicular Stomatitis Virus-G (VSV-G) Pseudotyp möglich (im Mittel 46% Markierungseffizienz), nicht aber, wenn die Viren mit dem Hüllprotein des Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) pseudotypisiert waren (im Mittel 1% Markierungseffizienz bei unstimulierten Zellen).

Insgesamt stellt sich das auf Foamyviren basierte Vektorsystem als sehr gut geeignet für die genetische Modifikation von hämatopoetischen Stammzellen dar und es erscheint lohnenswert, es weiter in Richtung einer klinischen Anwendung zu optimieren.

7. Literaturverzeichnis

- Abonour, R., Williams, D. A., Einhorn, L., Hall, K. M., Chen, J., Coffman, J., Traycoff, C. M., Bank, A., Kato, I., Ward, M., *et al.* (2000). Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6, 652-658.
- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A., and Clifford, P. (1971). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 46, 299-307.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Ali, M., Taylor, G. P., Pitman, R. J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheingsong-Popov, R., Weber, J. N., Bieniasz, P. D., Bradley, J., and McClure, M. O. (1996). No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 1473-1483.
- ASGT (2003). Report from the ASGT Ad Hoc Committee on Retroviral-mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem cells, April 2003. www.asgt.org.
- Ausubel, F. M. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York, USA, John Wiley & Sons, Inc.).
- Baldwin, D. N., and Linial, M. L. (1998). The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol* 72, 3658-3665.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H. G., Stocking, C., and Ostertag, W. (1995). Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69, 7541-7547.
- Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M., and Rethwilm, A. (1993). Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J Virol* 67, 5411-5418.
- Bell, A. C., and Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 9, 191-198.
- Bhatia, M., Wang, J. C. Y., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5320-5325.
- Bieniasz, P. D., Weiss, R. A., and McClure, M. O. (1995). Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection. *J Virol* 69, 7295-7299.
- Bodem, J., Zemba, M., and Flugel, R. M. (1998). Nuclear localization of the functional Bel 1 transactivator but not of the gag proteins of the feline foamy virus. *Virology* 251, 22-27.
- Bolognesi, D. P., Langlois, A. J., and Schafer, W. (1975). Polypeptides of mammalian oncornaviruses. IV. Structural components of murine leukemia virus released as soluble antigens in cell culture. *Virology* 68, 550-555.
- Boulanger, P., and Jones, I. (1996). Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 237-260.
- Bowles, N. E., Eisensmith, R. C., Mohuidin, R., Pyron, M., and Woo, S. L. (1996). A simple and efficient method for the concentration and purification of recombinant retrovirus for increased hepatocyte transduction in vivo. *Hum Gene Ther* 7, 1735-1742.
- Broudy, V. C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90, 1345-1364.

- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature* 365, 666-669.
- Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M., and Morgan, R. A. (1995). High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7739-7743.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-8037.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- Chien, M. L., Foster, J. L., Douglas, J. L., and Garcia, J. V. (1997). The amphotropic murine leukemia virus receptor gene encodes a 71-kilodalton protein that is induced by phosphate depletion. *J Virol* 71, 4564-4570.
- Chu, T. H., and Dornburg, R. (1997). Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. *J Virol* 71, 720-725.
- Chuck, A. S., Clarke, M. F., and Palsson, B. O. (1996). Retroviral infection is limited by Brownian motion. *Hum Gene Ther* 7, 1527-1534.
- Coelen, R., Jose, D., and May, J. (1983). The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of primate retroviruses SSV1/SSAV1 and BaEV. *Arch Virol* 75, 307-311.
- Cornetta, K., and Anderson, W. F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods* 23, 187-194.
- Crooks, G. M., and Kohn, D. B. (1993). Growth factors increase amphotropic retrovirus binding to human CD34+ bone marrow progenitor cells. *Blood* 82, 3290-3297.
- Dao, M. A., Hannum, C. H., Kohn, D. B., and Nolte, J. A. (1997). FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction. *Blood* 89, 446-456.
- Dao, M. A., Hashino, K., Kato, I., and Nolte, J. A. (1998). Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 92, 4612-4621.
- Darling, D., Hughes, C., Galea-Lauri, J., Gaken, J., Trayner, I. D., Kuiper, M., and Farzaneh, F. (2000). Low-speed centrifugation of retroviral vectors absorbed to a particulate substrate: a highly effective means of enhancing retroviral titre. *Gene Ther* 7, 914-923.
- Dirksen, U., Moritz, T., Burdach, S., Flasshove, M., and Hanenberg, H. (1999). Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches. *Klin Pädiatr* 211, 329-335.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Eaton, D. L., and de Sauvage, F. J. (1997). Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. *Exp Hematol* 25, 1-7.

- Eiden, M. V., Farrell, K. B., and Wilson, C. A. (1996). Substitution of a single amino acid residue is sufficient to allow the human amphotropic murine leukemia virus receptor to also function as a gibbon ape leukemia virus receptor. *J Virol* 70, 1080-1085.
- Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J., and Stamatoyannopoulos, G. (2000). A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9150-9155.
- Emi, N., Friedmann, T., and Yee, J. K. (1991). Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 65, 1202-1207.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., and Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 71, 7312-7317.
- Fairbairn, L. J., Lashford, L. S., Spooncer, E., McDermott, R. H., Lebens, G., Arrand, J. E., Arrand, J. R., Bellantuono, I., Holt, R., Hatton, C. E., *et al.* (1996). Long-term in vitro correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2025-2030.
- Fanning, G., Amado, R., and Symonds, G. (2003). Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen. *J Gene Med* 5, 645-653.
- Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A., and Naldini, L. (2001). A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 981-997.
- Finer, M. H., Dull, T. J., Qin, L., Farson, D., and Roberts, M. R. (1994). kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* 83, 43-50.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J. G., and Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J Virol* 72, 1610-1615.
- Friedmann, T., and Yee, J. K. (1995). Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy. *Nat Med* 1, 275-277.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9825-9830.
- Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M., and Trono, D. (1996). Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 70, 1027-1032.
- Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C., and Trono, D. (1995a). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80, 379-388.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995b). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- Ganem, D., and Schneider, R. (2001). *Hepadnaviridae: The viruses and their replication*, 4 edn (Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams & Wilkins).
- Gatlin, J., Melkus, M. W., Padgett, A., Kelly, P. F., and Garcia, J. V. (2001). Engraftment of NOD/SCID mice with human CD34(+) cells transduced by concentrated oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *J Virol* 75, 9995-9999.
- Glimm, H., Oh, I. H., and Eaves, C. J. (2000). Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0). *Blood* 96, 4185-4193.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H., and Mulligan, M. J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* 73, 7210-7217.

- Goepfert, P. A., Shaw, K. L., Ritter, G. D., Jr., and Mulligan, M. J. (1997). A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J Virol* 71, 778-784.
- Goff, S. P. (2001). *Retroviridae: The retroviruses and their replication*, 4 edn (Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams & Wilkins).
- Gothot, A., van der Loo, J. C., Clapp, D. W., and Srour, E. F. (1998). Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92, 2641-2649.
- Guenechea, G., Gan, O. I., Inamitsu, T., Dorrell, C., Pereira, D. S., Kelly, M., Naldini, L., and Dick, J. E. (2000). Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther* 1, 566-573.
- Guenechea, G., Segovia, J. C., Albella, B., Lamana, M., Ramirez, M., Regidor, C., Fernandez, M. N., and Bueren, J. A. (1999). Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood* 93, 1097-1105.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., et al. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003b). LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hajihosseini, M., Lavachev, L., and Price, J. (1993). Evidence that retroviruses integrate into post-replication host DNA. *Embo J* 12, 4969-4974.
- Han, X., Kasahara, N., and Kan, Y. W. (1995). Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9747-9751.
- Hanenberg, H., Batish, S. D., Pollok, K. E., Vieten, L., Verlander, P. C., Leurs, C., Cooper, R. J., Göttische, K., Haneline, L., Clapp, D. W., et al. (2002). Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells from patients with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 30, 410-420.
- Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R. A., Kato, I., and Williams, D. A. (1997). Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8, 2193-2206.
- Hanenberg, H., and Moritz, T. (2001). Gene transfer into hematopoietic stem cells: new perspectives for monogenetic diseases and the treatment of cancer. In *Akt. Onkol*, P. Dall, and H. G. Bender, eds. (München, W. Zuckschwerdt Verlag), pp. 106-124.
- Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2, 876-882.
- Hatton, T., Zhou, S., and Standing, D. N. (1992). RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* 66, 5232-5241.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2002a). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* 76, 3774-3783.

- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., and Rethwilm, A. (2002b). Pregenomic RNA is required for the efficient incorporation of Pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* *76*, 10069-10073.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., et al. (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J* *19*, 3436-3445.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Ennsle, J., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* *72*, 6307-6314.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P. A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* *201*, 187-199.
- Hill, C. L., Bieniasz, P. D., and McClure, M. O. (1999). Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* *80*, 2003-2009.
- Hirata, R. K., Miller, A. D., Andrews, R. G., and Russell, D. W. (1996). Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood* *88*, 3654-3661.
- Horn, P. A., Topp, M. S., Morris, J. C., Riddell, S. R., and Kiem, H.-P. (2002). Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood* *100*, 3960-3967.
- Horwitz, M. E., Malech, H. L., Anderson, S. M., Girard, L. J., Bodine, D. M., and Orlic, D. (1999). Granulocyte colony-stimulating factor mobilized peripheral blood stem cells enter into G1 of the cell cycle and express higher levels of amphotropic retrovirus receptor mRNA. *Exp Hematol* *27*, 1160-1167.
- Ikeda, Y., Takeuchi, Y., Martin, F., Cosset, F. L., Mitrophanous, K., and Collins, M. (2003). Continuous high-titer HIV-1 vector production. *Nat Biotechnol* *21*, 569-572.
- Josephson, N. C., Trobridge, G. D., Vassilopoulos, G., and Russell, D. W. (2002a). Transduction of Long-Term and Mobilized Peripheral Blood Derived SCID repopulating Cells by Foamy Virus Vectors. *Blood*.
- Josephson, N. C., Vassilopoulos, G., Trobridge, G. D., Priestley, G. V., Wood, B. L., Papayannopoulou, T., and Russell, D. W. (2002b). Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 8295-8300.
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* *17*, 314-317.
- Kafri, T., Van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* *73*, 576-584.
- Kasahara, N., Dozy, A. M., and Kan, Y. W. (1994). Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* *266*, 1373-1376.
- Kelly, P. F., Carrington, J., Nathwani, A., and Vanin, E. F. (2001). RD114-pseudotyped oncoretroviral vectors. Biological and physical properties. *Ann N Y Acad Sci* *938*, 262-276; discussion 276-267.
- Kelly, P. F., Vandergriff, J., Nathwani, A., Nienhuis, A. W., and Vanin, E. F. (2000). Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* *96*, 1206-1214.

- Kiem, H.-P., Heyward, S., Winkler, A., Potter, J., Allen, J. A., Miller, A. D., and Andrews, R. G. (1997). Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and GALV pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90, 4638-4645.
- Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D., and Alexander, W. S. (1998). Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1195-1200.
- Kohn, D. B. (1996). Gene therapy for hematopoietic and immune disorders. *Bone Marrow Transplant* 18 Suppl 3, S55-58.
- Kohn, D. B., Sadelain, M., Dunbar, C., Bodine, D., Kiem, H. P., Candotti, F., Tisdale, J., Riviere, I., Blau, C. A., Richard, R. E., et al. (2003). American society of gene therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 8, 180-187.
- Konvalinka, J., Lochelt, M., Zentgraf, H., Flugel, R. M., and Krausslich, H. G. (1995). Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* 69, 7264-7268.
- Kotani, H., Newton, P. B. r., Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F., and McGarrity, G. J. (1994). Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum Gene Ther* 5, 19-28.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Kurre, P., Kiem, H. P., Morris, J., Heyward, S., Battini, J. L., and Miller, A. D. (1999). Efficient transduction by an amphotropic retrovirus vector is dependent on high-level expression of the cell surface virus receptor. *J Virol* 73, 495-500.
- Kurre, P., Morris, J., Horn, P. A., Harkey, M. A., Andrews, R. G., and Kiem, H. P. (2001). Gene transfer into baboon repopulating cells: A comparison of Flt-3 Ligand and megakaryocyte growth and development factor versus IL-3 during ex vivo transduction. *Mol Ther* 3, 920-927.
- Lam, J. S., Reeves, M. E., Cowherd, R., Rosenberg, S. A., and Hwu, P. (1996). Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope. *Hum Gene Ther* 7, 1415-1422.
- Landau, N. R., and Littman, D. R. (1992). Packaging system for rapid production of murine leukemia virus vectors with variable tropism. *J Virol* 66, 5110-5113.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C. Y., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., et al. (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.
- Laufs, S., Gentner, B., Nagy, K. Z., Jauch, A., Benner, A., Naundorf, S., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Ho, A. D., Zeller, W. J., and Fruehauf, S. (2003). Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 101, 2191-2198.
- Le Doux, J. M., Morgan, J. R., Snow, R. G., and Yarmush, M. L. (1996). Proteoglycans secreted by packaging cell lines inhibit retrovirus infection. *J Virol* 70, 6468-6473.
- Lecellier, C. H., Neves, M., Giron, M. L., Tobaly-Tapiero, J., and Saib, A. (2002). Further Characterization of Equine Foamy Virus Reveals Unusual Features among the Foamy Viruses. *J Virol* 76, 7220-7227.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K. E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D. A., and Hanenberg, H. (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34(+) cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-519.

- Lewis, P. F., and Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 510-516.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., et al. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M., and Rethwilm, A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol* 71, 4815-4820.
- Lindemann, D., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol* 72, 4088-4094.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* 8, 284-289.
- Linial, M. L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* 73, 1747-1755.
- Löchelt, M., Muranyi, W., and Flügel, R. M. (1993). Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7317-7321.
- Lund, A. H., Turner, G., Trubetskoy, A., Verhoeven, E., Wientjens, E., Hulsman, D., Russell, R., DePinho, R. A., Lenz, J., and van Lohuizen, M. (2002). Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* 32, 160-165.
- Luskey, B. D., Rosenblatt, M., Zsebo, K., and Williams, D. A. (1992). Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* 80, 396-402.
- MacKenzie, T. C., Kobinger, G. P., Kootstra, N. A., Radu, A., Sena-Esteves, M., Bouchard, S., Wilson, J. M., Verma, I. M., and Flake, A. W. (2002). Efficient transduction of liver and muscle after in utero injection of lentiviral vectors with different pseudotypes. *Mol Ther* 6, 349-358.
- Manning, J. S., Hackett, A. J., and Darby, N. B., Jr. (1971). Effect of polycations on sensitivity of BALD-3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity. *Appl Microbiol* 22, 1162-1163.
- Markowitz, D., Hesdorffer, C., Ward, M., Goff, S., and Bank, A. (1990). Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 612, 407-414.
- Marshall, E. (2003). Gene Therapy. Second child in french trial is found to have leukemia. *Science* 299, 320.
- Maurice, M., Mazur, S., Bullough, F. J., Salvetti, A., Collins, M. K., Russell, S. J., and Cosset, F. L. (1999). Efficient gene delivery to quiescent interleukin-2 (IL-2)-dependent cells by murine leukemia virus-derived vectors harboring IL-2 chimeric envelope glycoproteins. *Blood* 94, 401-410.
- Meiering, C. D., and Linial, M. L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.
- Mergia, A., Chari, S., Kolson, D. L., Goodenow, M. M., and Ciccarone, T. (2001). The efficiency of simian foamy virus vector type-1 (SFV-1) in nondividing cells and in human PBLs. *Virology* 280, 243-252.
- Mergia, A., and Luciw, P. A. (1991). Replication and regulation of primate foamy viruses. *Virology* 184, 475-482.
- Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003). Foamy Virus Vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 131-159.
- Mikkers, H., Allen, J., Knipscheer, P., Romeijn, L., Hart, A., Vink, E., Berns, A., and Romeyn, L. (2002). High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat Genet* 32, 153-159.
- Miller, A. D. (1990). Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1, 5-14.

- Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65, 2220-2224.
- Miller, D. G., Adam, A. A., and Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10, 4239-4242.
- Miller, D. L., Meikle, P. J., and Anson, D. S. (1996). A rapid and efficient method for concentration of small volumes of retroviral supernatant. *Nucleic Acids Res* 24, 1576-1577.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157.
- Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M., and Torbett, B. E. (1999). Transduction of Human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice with HIV vectors. *Science* 283, 682-686.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71, 7305-7311.
- Moritz, T., Dutt, P., Xiao, X. L., Carstanjen, D., Vik, T., Hanenberg, H., and Williams, D. A. (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.
- Morling, F. J., and Russell, S. J. (1995). Enhanced transduction efficiency of retroviral vectors coprecipitated with calcium phosphate. *Gene Ther* 2, 504-508.
- Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 35-71.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 66, 4107-4116.
- Naviaux, R. K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I. M. (1996). The pCL system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70, 5701-5705.
- Ng, H. H., and Bird, A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9, 158-163.
- Nolan, G. P. (1996). Phoenix cells. www.stanford.edu/group/nolan.
- O'Hara, B., Johann, S. V., Klinger, H. P., Blair, D. G., Rubinson, H., Dunn, K. J., Sass, P., Vitek, S. M., and Robins, T. (1990). Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ* 1, 119-127.
- Ohashi, T., Boggs, S., Robbins, P., Bahnson, A., Patrene, K., Wei, F.-S., Wei, J.-F., Li, J., Lucht, L., Fei, Y., et al. (1992). Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11332-11336.
- Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W. B., Eiden, M. V., and Wilson, C. A. (1994). The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter. *J Biol Chem* 269, 25426-25431.

- Olsen, J. C. (1996). Gene therapy protocols (Totowa, NJ, Humana Press).
- Orkin, S. H., and Motulsky, A. G. (1995). Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. December 7, 1995 www.nih.gov/news/panelrep.html.
- Orlic, D., and Bodine, D. M. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! [editorial]. *Blood* 84, 3991-3994.
- Orlic, D., Girard, L. J., Anderson, S. M., Pyle, L. C., Yoder, M. C., Broxmeyer, H. E., and Bodine, D. M. (1998). Identification of human and mouse hematopoietic stem cell populations expressing high levels of mRNA encoding retrovirus receptors. *Blood* 91, 3247-3254.
- Orlic, D., Girard, L. J., Jordan, C. T., Anderson, S. M., Cline, A. P., and Bodine, D. M. (1996). The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11097-11102.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A., and Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11400-11406.
- Palsson, B., and Andreadis, S. (1997). The physico-chemical factors that govern retrovirus-mediated gene transfer. *Exp Hematol* 25, 94-102.
- Parente, M. K., and Wolfe, J. H. (1996). Production of increased titer retrovirus vectors from stable producer cell lines by superinfection and concentration. *Gene Ther* 3, 756-760.
- Paul, R. W., Morris, D., Hess, B. W., Dunn, J., and Overell, R. W. (1993). Increased viral titers through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines. *Hum Gene Ther* 4, 609-615.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retrovirus by transient infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8392-8396.
- Peters, S. O., Kittler, E. L., Ramshaw, H. S., and Quesenberry, P. J. (1996). Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 87, 30-37.
- Pham, L., Ye, H., Cosset, F. L., Russell, S. J., and Peng, K. W. (2001). Concentration of viral vectors by co-precipitation with calcium phosphate. *J Gene Med* 3, 188-194.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722-4730.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 73, 2613-2621.
- Pollok, K. E., van der Loo, J. C. M., Cooper, R. J., Hartwell, J. R., Miles, K. R., Breese, R., Williams, E. P., Montel, A., Seshadri, R., Hanenberg, H., and Williams, D. A. (2001). Differential transduction efficiency of SCID-repopulating cells derived from umbilical cord blood and G-CSF mobilized peripheral blood. *Hum Gene Ther* 12, 2095-2108.
- Porter, C. D., Collins, M. K., Taylor, C. S., Parkar, M. H., Cosset, F. L., Weiss, R. A., and Takeuchi, Y. (1996). Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Hum Gene Ther* 7, 913-919.
- Porter, C. D., Lukacs, K. V., Box, G., Takeuchi, Y., and Collins, M. K. (1998). Cationic liposomes enhance the rate of transduction by a recombinant retroviral vector in vitro and in vivo. *J Virol* 72, 4832-4840.
- Rabbits, T. H., Bucher, K., Chung, G., Grutz, G., Warren, A., and Yamada, Y. (1999). The effect of chromosomal translocations in acute leukemias: the LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Res* 59, 1794s-1798s.

- Radsak, K., Fuhrmann, R., Franke, R. P., Schneider, D., Kollert, A., Brucher, K. H., and Drenckhahn, D. (1989). Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch Virol* 107, 151-158.
- Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R. J., Mazo, I., and Miller, A. D. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2129-2134.
- Reeves, L., Smucker, P., and Cornetta, K. (2000). Packaging cell line characteristics and optimizing retroviral vector titer: the National Gene Vector Laboratory experience. *Hum Gene Ther* 11, 2093-2103.
- Reiser, J., Lai, Z., Zhang, X. Y., and Brady, R. O. (2000). Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol* 74, 10589-10599.
- Rethwilm, A. (2003). The replication strategy of foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 1-26.
- Rivella, S., Callegari, J. A., May, C., Tan, C. W., and Sadelain, M. (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 74, 4679-4687.
- Robbins, P. B., Yu, X. J., Skelton, D. M., Pepper, K. A., Wasserman, R. M., Zhu, L., and Kohn, D. B. (1997). Increased probability of expression from modified retroviral vectors in embryonal stem cells and embryonal carcinoma cells. *J Virol* 71, 9466-9474.
- Roberts, A. W., and Metcalf, D. (1995). Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood* 86, 1600-1605.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12, 2099-2108.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., and et al. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323, 570-578.
- Roy, J., Wolfram, R., Juretzek, T., Gärtner, K., Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., and Rethwilm A. (2003). Feline Foamy Virus Genome and Replication Strategy. *J Virol* 77, 11324-11331.
- Russell, D. W., and Miller, A. D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* 70, 217-222.
- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., and de The, H. (1997). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* 71, 1155-1161.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition (Cold Spring Harbor, N.Y., USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34(+) cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823-832.
- Scherr, M., Battmer, K., Blömer, U., Schiedlmeier, B., Ganser, A., Grez, M., and Eder, M. (2002). Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID- repopulating cells. *Blood* 99, 709-712.
- Schilz, A. J., Schiedlmeier, B., Kuhlcke, K., Fruehauf, S., Lindemann, C., Zeller, W. J., Grez, M., Fauser, A. A., Baum, C., and Eckert, H. G. (2000). MDR1 gene expression in NOD/SCID repopulating cells after retroviral gene transfer under clinically relevant conditions. *Mol Ther* 2, 609-618.
- Schliephake, A. W., and Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* 68, 4946-4954.

- Schmidt, M., Herchenröder, O., Heeney, J., and Rethwilm, A. (1997). Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* 230, 167-178.
- Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* 210, 167-178.
- Schmidt, M., Zickler, P., Hoffman, G., Haas, S., Wissler, M., Muessig, A., Tisdale, J. F., Andrews, R. G., Wu, T., Kiem, H.-P., et al. (2002). Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood online June 21, 2002:DOI 10.1182/blood-2002-02-0407*.
- Schmidt, M., Glimm, H., Wissler, M., Hoffmann, G., Olsson, K., Sellers, S., Carbonaro, D., Tisdale, J. F., Leurs, C., Hanenberg, H., et al. (2003). Efficient characterization of retro-, lenti-, and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 996, 112-121.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K. O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A., and Neumann-Haefelin, D. (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 161-170.
- Shaw, K. L., Lindemann, D., Mulligan, M. J., and Goepfert, P. A. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* 77, 2338-2348.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.
- Sparacio, S., Pfeiffer, T., Schaal, H., and Bosch, V. (2001). Generation of a flexible line with regulatable, high-level expression of HIV-Gag/Pol particles capable of packaging HIV-derived vectors. *Mol Ther* 3, 602-612.
- Stitz, J., Buchholz, C. J., Engelstadter, M., Uckert, W., Bloemer, U., Schmitt, I., and Cichutek, K. (2000). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* 273, 16-20.
- Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagener, T., Starke, C., Kitamura, T., Miyajima, A., and Ostertag, W. (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* 8, 197-209.
- Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2002). New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* 32, 166-174.
- Swanstrom, R., and Wills, J. W. (1997). *Synthesis, Assembly and Processing of Viral Proteins* (Plainview, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Taylor, C. S., Nouri, A., Zhao, Y., Takeuchi, Y., and Kabat, D. (1999). A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *J Virol* 73, 4470-4474.
- Takahashi, M., Miyoshi, H., Verma, I. M., and Gage, F. H. (1999). Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol* 73, 7812-7816.
- Tanaka, J., Sadanari, H., Sato, H., and Fukuda, S. (1991). Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology* 185, 271-280.
- Temin, H. M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.

- Thomas, E. D. (1999). Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol* 36, 95-103.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C., and Ferrebee, J. W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 157, 491-496.
- To, L. B., Haylock, D. N., Simmons, P. J., and Juttner, C. A. (1997). The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89, 2233-2258.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de The, H., and Saib, A. (2000). Isolation and Characterization of an Equine Foamy Virus. *J Virol* 74, 4064-4073.
- Toyoshima, K., and Vogt, P. K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polybrene. *Virology* 38, 414-426.
- Trobridge, G.D., and Russell, D.W. (1998). Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther* 9, 2517-2525.
- Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N., and Russell, D. W. (2002). Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* 346, 628-648.
- Trono, D. (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 7, 20-23.
- Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., et al. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 105, 1013-1021.
- Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deleage, G., Aumailley, M., Heard, J. M., Danos, O., Verdier, G., and Cosset, F. L. (1994). Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol* 68, 4609-4619.
- van der Loo, J. C., and Ploemacher, R. E. (1995). Marrow- and spleen-seeding efficiencies of all murine hematopoietic stem cell subsets are decreased by preincubation with hematopoietic growth factors. *Blood* 85, 2598-2606.
- van der Loo, J. C., Xiao, X., McMillin, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1998a). VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 102, 1051-1061.
- van der Loo, J. C. M., Hanenberg, H., Cooper, R. J., Luo, F. Y., Lazaridis, E. N., and Williams, D. A. (1998b). Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells. *Blood* 92, 2556-2570.
- van Hennik, P. B., Verstegen, M. M., Bierhuizen, M. F., Limon, A., Wognum, A. W., Cancelas, J. A., Barquinero, J., Ploemacher, R. E., and Wagemaker, G. (1998). Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. *Blood* 92, 4013-4022.
- van Zeijl, M., Johann, S. V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T. B., and O'Hara, B. (1994). A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1168-1172.
- von Laer, D., Corovic, A., Vogt, B., Herwig, U., Roscher, S., Fehse, B., and Baum, C. (2000). Amphotropic and VSV-G-pseudotyped retroviral vectors transduce human hematopoietic progenitor cells with similar efficiency. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2, S75-79.
- von Laer, D., Lindemann, D., Roscher, S., Herwig, U., Friel, J., and Herchenröder, O. (2001). Low-level expression of functional foamy virus receptor on hematopoietic progenitor cells. *Virology* 288, 139-144.

- Wang, G., and Mulligan, M. J. (1999). Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses. *J Gen Virol* 80, 245-254.
- Wang, J. C. Y., Doedens, M., and Dick, J. E. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared to adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell (SRC) assay. *Blood* 89, 3919-3924.
- Williams, D. A. (1993). Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? [editorial]. *Blood* 81, 3169-3172.
- Williams, D. A., Lemischka, I. R., Nathan, D. G., and Mulligan, R. C. (1984). Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* 310, 476-480.
- Williams, D. A., Levitsky, H. I., Dinauer, M. C., and Russell, D. W. (1997). Genetic therapies in hematology: human diseases, mouse models and new approaches. *ASH Education Book 12'1997*, 55-74.
- Wolffe, A. P., and Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-486.
- Woods, N. B., Fahlman, C., Mikkola, H., Hamaguchi, I., Olsson, K., Zufferey, R., Jacobsen, S. E., Trono, D., and Karlsson, S. (2000). Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood* 96, 3725-3733.
- Woods, N. B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C., and Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101, 1284-1289.
- Wu, M., and Mergia, A. (1999). Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* 73, 4498-4501.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Xu, K., Ma, H., McCown, T. J., Verma, I. M., and Kafri, T. (2001). Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3, 97-104.
- Yamaguchi, M., Ikebuchi, K., Hirayama, F., Sato, N., Mogi, Y., Ohkawara, J., Yoshikawa, Y., Sawada, K., Koike, T., and Sekiguchi, S. (1998). Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle. *Blood* 92, 842-848.
- Yang, J., Friedman, M. S., Bian, H., Crofford, L. J., Roessler, B., and McDonagh, K. T. (2002). Highly efficient genetic transduction of primary human synoviocytes with concentrated retroviral supernatant. *Arthritis Res* 4, 215-219.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flugel, R. M., and Lochelt, M. (1997). Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* 15, 17-23.
- Yang, Y., Vanin, E. F., Whitt, M. A., Fornerod, M., Zwart, R., Schneiderman, R. D., Grosveld, G., and Nienhuis, A. W. (1995). Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther* 6, 1203-1213.
- Yee, J. K., Friedmann, T., and Burns, J. C. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43, 99-112.
- Yin, Z., Giacomello, E., Gabriele, E., Zardi, L., Aota, S., Yamada, K. M., Skerlavaji, B., Doliana, R., Colombatti, A., and Perris, R. (1999). Cooperative activity of alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins in mediating human B-cell lymphoma adhesion and chemotaxis on fibronectin through recognition of multiple synergizing binding sites within the central cell-binding domain. *Blood* 93, 1221-1230.
- Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., Aoyama, K., Ishikawa, J., Sugahara, H., Matsumura, I., Tsai, S., Tomiyama, Y., Kanakura, Y., and Matsuzawa, Y. (1998). Growth-supporting activities of fibronectin on

- hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. *Blood* 91, 3263-3272.
- Yonemura, Y., Ku, H., Hirayama, F., Souza, L. M., and Ogawa, M. (1996). Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4040-4044.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S., and Linial, M. L. (1996a). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, 1579-1582.
- Yu, S. F., Edelman, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A., and Linial, M. L. (1996b). The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* 70, 8255-8262.
- Yu, S. F., and Linial, M. L. (1993). Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J Virol* 67, 6618-6624.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., and Linial, M. L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* 73, 1565-1572.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-3198.
- Zaiss, A. K., Son, S., and Chang, L. J. (2002). RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol* 76, 7209-7219.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., and Flake, A. W. (1996). The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int J Hematol* 63, 179-192.
- Zemba, M., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flugel, R. M., and Lochelt, M. (1998). The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* 247, 7-13.
- Zhang, B., Xia, H. Q., Cleghorn, G., Gobe, G., West, M., and Wei, M. Q. (2001). A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther* 8, 1745-1751.
- Zucali, J. R., Ciccarone, T., Kelley, V., Park, J., Johnson, C. M., and Mergia, A. (2002). Transduction of umbilical cord blood CD34+ NOD/SCID-repopulating cells by simian foamy virus type 1 (SFV-1) vector. *Virology* 302, 229-235.

Lebenslauf

Cordula Leurs

geboren am 23.03.1973 in Kempen

Schulbildung

| | |
|-------------|--|
| 1979 – 1983 | St. Michael Grundschule, Wachtendonk |
| 1983 – 1992 | Liebfrauenschule Mülhausen, Grefrath Abschluss mit dem Abitur |

Universitätsstudium

| | |
|-------------|--|
| 1992 – 1995 | Grundstudium der Biologie Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn |
| 1995 – 1998 | Hauptstudium der Biologie Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Diplomarbeit am Institut für Med. Mikrobiologie und Virologie Thema: Der Einfluss der Sequenz des HIV-1 Spleißdonors 4 auf die Rev-abhängige <i>env</i> -Expression |

Dissertation

| | |
|-------------|--|
| 1999 - 2003 | Labor für Stammzelltransplantation und Exp. Hämatologie Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Universitätsklinikum Düsseldorf Thema: Etablierung foamyviraler Vektoren zur Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen |
|-------------|--|

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Hanenberg H., Batish S. D., Pollok K. E., Vieten L., Verlander P. C., **Leurs C.**, Cooper R. J., Götsche K., Haneline L., Clapp D. W., Lobitz S., Williams D. A., Auerbach, A. D. (2002). Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 30, 410-20.

Heinkelein M., **Leurs C.**, Rammling M., Peters K., Hanenberg H., Rethwilm A. (2002). Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* 76, 10069-73.

Leurs C., Jansen M., Pollok K. E., Heinkelein M., Schmidt M., Wissler M., Lindemann D., von Kalle C., Rethwilm A., Williams D. A., Hanenberg H. (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of NOD/SCID repopulating CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-19.

Schmidt M., Glimm H., Wissler M., Hoffmann G., Olsson K., Sellers S., Carbonaro D., Trisdale J. F., **Leurs C.**, Hanenberg H., Dunbar C. E., Kiem H. P., Karlsson S., Kohn D. B., Williams D. A., von Kalle C. (2003). Efficient Characterization of Retro-, Lenti-, and Foamyvector-Transduced Cell Populations by High-Accuracy Insertion Site Sequencing. *Ann NY Acad Sci* 996, 112-21.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den

Cordula Leurs