Retroviraler Gentransfer des Chemotherapie-Resistenzgens Cytidindeaminase in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Ina Rattmann

aus Mettmann

März 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden an der Inneren Klinik (Tumorforschung), Direktor Prof. Dr. S. Seeber, der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: PD. Dr. L. Klein-Hitpass

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **6**

Abbildungsverzeichnis **9**

Tabellenverzeichnis **11**

1 Einleitung **12**

1.1 Hämatopoetische Zellen als Zielzellen für die Gentherapie **12**

1.1.1 Gentherapeutische Anwendungen 12
1.1.2 Chemotherapie-Resistenzgene 14
1.1.3 Selektion hämatopoetischer Zellen mittels Chemotherapie-Resistenzgene 15
1.1.4 Aufbau des hämatopoetischen Systems 16
1.1.5 Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen 17

1.2 Gentransfer mittels C-Typ-retroviraler Vektoren **19**

1.2.1 Aufbau und Lebenszyklus eines C-Typ-Retrovirus 19
1.2.2 Genomische Struktur C-Typ-retroviraler Gentherapie-Vektoren 21
1.2.3 Retrovirale Verpackungszelllinien 23

1.3 Cytidindeaminase **25**

1.3.1 Funktion als Chemotherapie-Resistenzgen 25
1.3.2 Physiologische Eigenschaften der CDD 25
1.3.3 AraC und Gemcitabin als Substrat der Cytidindeaminase 26

1.4 Ziel der Arbeit **29**

2 Material und Methoden **31**

2.1 Material **31**

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien 31
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze 31
2.1.3 Antikörper 32
2.1.4 Wachstumsfaktoren 32
2.1.5 Puffer und Lösungen 32
2.1.6 Geräte 33
2.1.7 Primäre Zellen, Zelllinien und Tiere 34
2.1.8 Retrovirale Vektoren 34

2.2 Molekularbiologische Methoden **35**

2.2.1 Transformation kompetenter E. coli-Bakterien des Stammes DH5α 35
2.2.2 Plasmidpräparation aus Bakterien 35
2.2.3 DNA Agarosegelelektrophorese 36
2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA 36

2.3 Zellbiologische Standardmethoden ... 36

2.3.1 Kultivierung von Zellen ... 36
2.3.2 Kryokulturen ... 37
2.3.3 Durchflusszytometrie ... 37
2.3.4 Antikörperfärbung ... 38
2.3.5 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit RetroNektin© ... 38

2.4 Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie zur Produktion hochtitriger Virusüberstände ... 38

2.4.1 Transduktion von FNX-eco-Zellen mit GALV-Überständen ... 38
2.4.2 Anreicherung transduzierter FNX-eco-Zellen ... 39
2.4.3 Selektion einzelner Produzentenzellklone ... 39
2.4.4 Produktion retroviraler Überstände ... 40
2.4.5 Titration retroviraler Überstände ... 40

2.5 In vitro-Analysen zur CDD-vermittelten Zytostatikaresistenz in humanen $CD34^+$-Zellen ... 41

2.5.1 Isolierung humaner $CD34^+$-Zellen aus Nabelschnurblut ... 41
2.5.2 Transduktion humaner $CD34^+$-Zellen aus Nabelschnurblut ... 41
2.5.3 FACS-Sortierung transduzierter $CD34^+$-Zellen ... 42
2.5.4 CFU-Assay mit $CD34^+$-aufgereinigten Zellen aus humanem Nabelschnurblut ... 42
2.5.5 In vitro-Selektion mit AraC ... 43

2.6 In-vivo-Maus-Knochenmarktransplantationsmodell ... 43

2.6.1 Isolierung muriner Knochenmarkzellen für die anschließende Transduktion und Transplantation ... 43
2.6.2 Transduktion muriner Knochenmarkzellen ... 44
2.6.3 FACS-Sortierung transduzierter Knochenmarkzellen ... 44
2.6.4 Transplantation transduzierter Knochenmarkzellen ... 44
2.6.5 Zytostatikabehandlung und Blutanalyse der Empfängermäuse ... 45
2.6.6 Analyse von Knochenmark und Milz am Experimentsende ... 45
2.6.7 CFU-Assay mit mononukleären Zellen aus murinem Knochenmark ... 46
2.6.8 Bestimmung der Enzymaktivität der CDD in Knochenmark- und Milzzellen ... 46

2.7 Statistische Analysen ... 47

3 Ergebnisse ... 48

3.1 Herstellung hochtitriger ecotroper retroviraler Überstände ... 48

3.1.1 Transiente Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung ecotroper Viruspräparationen ... 48
3.1.2 Generierung einer stabilen polyklonalen FNX-eco-Produzentenzellinie ... 49
3.1.3 Stabilität der polyklonalen Produzentenzelllinie ... 51
3.1.4 Selektion einzelner hochtitriger Produzentenzellklone ... 51

3.2 In-vitro-Untersuchungen zum CDD-Gentransfer in humane hämatopoetische Vorläuferzellen ... 53

3.2.1 Gemcitabin Resistenz CDD-transduzierter CFU-GM und BFU-E/CFU-Mix ... 53
3.2.2 Gemcitabin-Resistenz CDD-transduzierter CFU-Mk ... 55
3.2.3 Inhibitorischer Effekt der CDD-Überexpression auf myeloische Vorläuferzellen ... 56
3.2.4 In-vitro-Selektion CDD-tranduzierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen mittels AraC ... 57

3.3 In-vivo-Maus-Transplantationsmodell ... 62

3.3.1 Gentransfereffizienz für ex-vivo-transduzierte mononukleäre Zellen aus murinem Knochenmark ... 63
3.3.2 CDD schützt die Myelopoese vor AraC ... 64
3.3.3 CDD schützt die Myelopoese vor Gemcitabin ... 68
3.3.4 AraC-Resistenz CDD-transduzierter Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark ... 70
3.3.5 Enzymatische CDD-Aktivität in Milz- und Knochenmarkzellen nach CDD-Gentransfer ... 71
3.3.6 Gentransfer der CDD erlaubt im hier eingesetzten Model keine In-vivo-Anreicherung transduzierter Zellen mittels Cytidinanaloga ... 72
3.3.7 Effekt des CDD-Gentransfers auf das lymphoide Kompartiment ... 75
3.3.8 Stabile Langzeitexpression der CDD im Stammzellkompartiment ... 80
3.3.9 Geringer inhibitorischer Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten ... 82

4 Diskussion ... 84

4.1 Herstellung hochtitriger Produzentenzelllinen ... 84

4.2 Gentransfer der CDD in hämatopoetische Zellen ... 88

4.2.1 Schutz der Hämatopoese vor AraC und Gecitabine durch die retroviral vermittelte Überexpression der CDD ... 90
4.2.2 Untersuchungen zur Selektion transduzierter hämatopoetischer Stammzellen ... 93
4.2.3 Auswirkungen der CDD-Überexpression auf unterschiedliche Kompartimente des hämatopoetischen Systems ... 97
4.2.4 Ausblick ... 98

5 Zusammenfassung ... 100

6 Literatur ... 102

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ACNU	1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoharnstoff
ADA	Adenosindeaminase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
BCNU	1,3-bis (2-chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff
BFU-E	Burst forming units erythroid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CDD	Cytidindeaminase
cDNA	komplementäre DNA
CFU-C	Colony forming units cells
CFU-Mix	Colony forming units granulocyte/ erythrocyte/megakaryocyte/macrophage
CFU-Mk	Colony Forming Units Megakaryocytes
CTX-R	Chemotherapie-Resistenzgen
dFdU	Di-Fluoro-Desoxy-Uridin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
env	retrovirale Sequenz der Hüllproteine
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FNX	Phoenix
FS	forward scatter

gag	Gen für retrovirales Kapsidprotein
GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IE	Infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
KM	Knochenmark
LB	Luria Bertani
LD50	halbletale Dosis
L-Glu	L-Glutamin
LMPP	lymphoid primed multipotential progenitors
LTC-IC	long-term-culture-initiating-cell
LTR	lange terminale Sequenzwiederhohlung
mAK	monoklonaler Antikörper
MDR1	Multidrug Resistance Gene 1
MESV	Murine Embryonic Stem Cell Virus
MGMT	O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
ml	Milliliter
MMLV	Molony Murine Leukemia Virus
MSCV	Murine Stem Cell Virus
MW	Mittelwert
NOD	Non-obesic diabetes
O6-BG	O^6-Benzylguanin
P/S	Penicillin + Streptomycin

PBS	phosphatgepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pol	Gen der retroviralen reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNAPolymerase)
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SS	side scatter
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TDX	Transduktion
TMZ	Temozolomid
U/min	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Hierarchische Struktur des hämatopoetischen Systems

Abb. 2 Aufbau und Lebenszyklus eines C-Typ-Retrovirus

Abb. 3 Retrovirales Genom

Abb. 4 Prinzip einer retroviralen Verpackungszelle

Abb. 5 Strukturformeln der Antimetaboliten AraC, Gemcitabin und des natürlichen Metaboliten Desoxycytidin sowie deren Stoffwechselweg

Abb. 6 Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren

Abb. 7 FACS-Sortierung von polyklonalen Produzentenzellen anhand der EGFP Expression am Beispiel von SFβ1-EGFP

Abb. 8 Anstieg der retroviralen Titer durch FACS-Sortierung transduzierter FNX-eco-Produzentenzelllinen anhand der EGFP- Expression

Abb. 9 Gemcitabin Resistenz CDD transduzierter CFU-C

Abb. 10 Gemcitabin Resistenz CDD-transduzierter CFU-Mk

Abb. 11 Effekt der CDD-Expression auf tranduzierte Zellen

Abb. 12 Versuchsaufbau zur In-vitro-Selektion mit AraC

Abb. 13 In-vitro-Selektion CDD-transduzierter Zellen mit AraC

Abb. 14 In-vitro-Selektion CDD-transduzierter klonogener Vorläuferzellen mit AraC

Abb. 15 Murines Knochenmarktransplantationsmodell

Abb. 16 Schutz der Granulopoese vor AraC

Abb. 17 Schutz der Thrombopoese vor AraC

Abb. 18 Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten- und Thrombozyten-Nadirzellzahlen nach AraC-Behandlung

Abb. 19 Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten- und Thrombozyten-Nadirzellzahlen nach Gemcitabin-Behandlung

Abb. 20 AraC Resistenz klonogener Vorläuferzellen (CFU-C) nach Gentransfer der CDD

Abb. 21 Keine Anreicherung CDD-transduzierter Granulozyten nach Behandlung mit Cytidinanaloga

Abb. 22 Wirkung von Cytidinanaloga auf ausgereifte und Vorläuferzellen

Abb. 23 Effekt des CDD-Gentransfers auf das lymphoide Kompartiment nach AraC Behandlung

Abb. 24 Korrelation der geringeren Lymphozytenzahl in der CDD-Gruppe mit der Höhe der Gentransfereffizienz

Abb. 25 Langzeittransgen-Expression nach CDD-Gentransfer

Abb. 26 Sekundärtransplantationen zur Analyse CDD-transduzierter langzeitrepopulierender Zellen

Abb. 27 Korrelation der Granulozytenzahlendifferenz mit der Höhe der Gentransfereffizienz in der CDD-Gruppe

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Titer und EGFP-Expression individueller Produzentenzell-Klone

Tab. 2 Gemcitabin-Resistenz CDD-transduzierter klonogener Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Tab. 3 Viraler Titer und Gentransferraten sechs verschiedenener Transduktionen

Tab. 4 CDD-Enzymaktivität mononukleärer Zellen aus Milz und Knochenmark

Tab. 5 Abnahme der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut nach der ersten AraC Behandlung

Tab. 6 Anteil transduzierter Zellen im peripheren Blut nach hämatopoetischer Rekonstitution

Tab. 7 Anteil transduzierter Zellen am Ende der Experimente

Tab. 8 Niedrige Lymphozytenzahlen nach Gentransfer der CDD

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Zellen als Zielzellen für die Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man die Einführung genetischen Materials in die Körperzellen eines Organismus zu therapeutischen Zwecken (Mulligan, 1993). Hierbei unterscheidet man zwischen zwei grundsätzlichen Prinzipien. Bei der somatischen Gentherapie wird die genetische Veränderung in den Körperzellen vorgenommen und betrifft nur den behandelten Menschen. Bei der Keimbahn-Gentherapie wird das Erbgut von Ei- oder Samenzellen verändert. Durch die letztere würde die genetische Veränderung nicht nur sämtliche Körperzellen, sondern auch die Keimzellen betreffen, so dass die Genkorrektur an die Nachkommen weitervererbt werden kann. Die Keimbahntherapie am Menschen wird weltweit aus ethischen Gründen bislang nicht durchgeführt.

Innerhalb der somatischen Gentherapie wird zwischen In-vivo- und Ex-vivo-Verfahren unterschieden. Bei der In-vivo-Gentherapie wird die DNA direkt in den lebenden Organismus eingebracht, während bei der Ex-vivo-Gentherapie dem Patienten Zellen entnommen, außerhalb des Körpers gentechnisch verändert und anschließend retransplantiert werden. Ex-vivo-Ansätze bieten den Vorteil größerer Sicherheit, da eine Transfektion bzw. Transduktion anderer, nicht-beabsichtigter Zellen leichter vermieden werden kann. Jedoch bieten sich nur wenige Organe für einen Ex-vivo-Gentransfer an.

Ein hervoragendes Ziel für die somatische Gentherapie sind hämatopoetische Stammzellen. Diese Zellen lassen sich aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut leicht isolieren wodurch deren Transduktion ex vivo erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das gesamte hämatopoetische System lebenslang von wenigen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aufrechterhalten wird. Bei stabiler Integration des Vektors in die genomische Wirts-DNA einer einzigen Stammzelle können so letztendlich Millionen reifer Zellen der unterschiedlichen Reihen entstehen, die das Transgen dauerhaft exprimieren.

1.1.1 Gentherapeutische Anwendungen

Die erste klinische Gentherapie-Studie wurde 1990 in den USA an einem vierjährigen Mädchen begonnen, das an der schweren angeborenen Immunschwächekrankheit ADA^{-}-SCID (Adenosine Deaminase-deficient Severe Combined Immunodeficiency)

litt, die durch einen Defekt im ADA-Gen verursacht wird. Die Patientin erhielt ihre eigenen T-Zellen reinfudiert, die ex vivo mittels eines retroviralen Vektors mit einer korrekten Version des ADA-Gens ausgestattet wurden (Blaese et al., 1995). Der erste Versuch der Gentherapie an einem inneren Organ wurde von J. Wilson an einer Patientin mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie, welche durch einen Defekt im Gen für den LDL-Rezeptor verursacht wird, als Infusion von autologen Hepatozyten durchgeführt. Diese wurden ex vivo mit einem retroviralen Vektor behandelt, der die korrekte cDNA des LDL-Rezeptors trug (Grossman et al., 1994). Die erste nicht-virale klinische Gentherapie Studie wurde von G. Nabel begonnen, der einen DNA/Liposomen-Komplex, der ein fremdes HLA-B7-Gen enthielt, direkt in Melanome von HLA-B7-negativen Patienten injizierte, um eine Immunantwort gegen das Tumorgewebe zu induzieren (Nabel et al., 1993).

Diese ersten Studien waren jedoch auf lange Sicht nicht erfolgreich, weil im Falle des Gentransfer mittels retroviraler Vektoren (im Falle der ADA-SCID und der Familiären Hypercholesterinämie) die Gentransferfereffizienzen zu gering waren und im Falle der nicht-viralen Vektoren die Expression der Transgene nur transient erfolgte.

Die erste erfolgreiche Gentherapie Studie, bei der eine Heilung von Patienten mit X-gekoppelter Immunschwäche (SCID-X1) erzielt wurde, wurde 2000 veröffentlicht (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Zehn SCID-X1-Patienten wurden mit einer autologen Retransfusion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus ihrem eigenen Knochenmark behandelt, die vorher ex vivo mit einem retroviralen Vektor transduziert worden waren. Dieser enthielt die cDNA der gemeinsamen γ-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (γc), das Protein, welches in diesen Patienten defekt ist und zu dem defekten Immunsystem führt. Drei der 10 Patienten entwickelten in der Folge jedoch eine T-Zell-Leukämie. Diese wurde durch die Insertion des retroviralen Vektors in der Nähe der Promotorregion des Protoonkogens LMO2 verursacht (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Unter anderem als Folge dieser Ergebnisse ist das Thema der Sicherheit von Gentherapieverfahren und inbesondere retroviralen Vektoren in den Vordergrund getreten (Baum et al., 2004).

Bislang wurden zwei weitere erfolgreiche klinische Gentherapiestudien veröffentlicht, bei denen eine Heilung der Patienten erzielt wurde: 2002 wurde von der erfolgreichen Behandlung der ADA-SCID durch verbesserte Gentransferprotokolle im Vergleich zu der Studie von Blaese et al berichtet (Aiuti et al., 2002), und 2005 wurde

die erfolgreiche Behandlung der chronischen Granulomatose mittels Gentherapie veröffentlicht (Ott et al., 2005).

1.1.2 Chemotherapie-Resistenzgene

Eine weitere vielversprechende Gentherapieanwendung ist der Transfer von Chemotherapie-Resistenzgenen in hämatopoetische Zellen zum Schutz des Knochenmarks vor den myelosuppresiven Nebenwirkungen einer Hochdosis-Chemotherapie (Moritz et al., 2001; Flasshove et al., 2003).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass dosisintensivierte oder Hochdosis-Chemotherapie die Remissionsraten und das Langzeitüberleben von Patienten mit soliden und auch hämatologischen Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Non-Hodgkin Lymphomen, Multiplem Myelom sowie Keimzelltumoren erhöhen können (Peters, 1995; Philip et al., 1995; Attal et al., 1996; Vose, 1996; Sobecks et al., 1999). Jedoch schädigen Zytostatika auch hochproliferierende und regenerative normale Gewebetypen, vor allem auch das hämatopoetische System. Hämatologische Nebenwirkungen können das Potential einer dosisintensivierten Chemotherapie limitieren. Obwohl bereits hämatopoetische Wachstumsfaktoren und die autologe Stammzellretransplantation zur Behandlung dieser Nebenwirkungen eingesetzt werden, lässt sich eine länger andauernde Phase der schweren Myelosuppression nicht verhindern, die mit einem Anteil von 2,5 % zur therapieassoziierten Mortalität der Hochdosis-Chemotherapie beiträgt (Weiss, 1999). Die Überexpression von Genen, die Resistenz gegenüber Zytostatika im hämatopoetischen System vermitteln, stellt ein viel versprechendes Verfahren dar, um diese Probleme zu umgehen und die hämatologischen Nebenwirkungen dosisintensivierter Chemotherapie zu reduzieren. Chemotherapie-Resistenzgene kodieren Proteine, die Zellen vor den zytotoxischen Effekten chemotherapeutischer Medikamente schützen. Sie lassen sich in Bezug auf ihre Funktion und subzelluläre Lokalisation grob in drei Gruppen unterteilen (Moritz et al., 2001; Flasshove et al., 2003). Eine Gruppe bilden die membrangebundenen Proteine, wie das Multi-Drug-Resistance-Protein-1 (MDR-1, Sorrentino et al., 1992; Eckert et al., 1996; Schiedlmeier et al., 2002). Das MDR-1-Gen kodiert eine Effluxpumpe, die eine große Zahl klinisch relevanter Zytostatika wie Anthrazykline, Vinca-Alkaloide oder Taxane aus dem Zellinneren heraustransportiert. Eine weitere Gruppe bilden die im Zellkern lokalisierten Proteine mit DNA-Reparaturfunktionen, wie z.B. die O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT,

Moritz et al., 1995; Maze et al., 1996; Jansen et al., 2002). Die dritte Gruppe wird von zytoplasmatischen Proteinen gebildet, welche auf den Metabolismus zytotoxischer Substanzen einwirken, wie z.B. die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH, Takebe et al., 2001), mutante Formen der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR, Williams et al., 1987; Flasshove et al., 1995) Da die CDD Gegenstand dieser Arbeit ist, wird sie im Abschnitt 1.3 noch genauer beschrieben.

1.1.3 Selektion hämatopoetischer Zellen mittels Chemotherapie-Resistenzgene

Neben der klinischen Anwendungsmöglichkeit der Chemotherapie-Resistenzgene im Rahmen dosisintensivierter Chemotherapie-Protokolle besteht das therapeutische Potenzial einiger dieser Gene in der In-vivo-Selektion von genetisch modifizierten Zellen. Dieses Vorgehen ist z. B. für die Korrektur einzelner monogenetischer Erkrankungen von Interesse, bei der die erfolgreich transduzierten, korrigierten Zellen keinen Überlebensvorteil gegenüber den nicht-korrigierten Zellen besitzen. Durch die Kombination mit einem Chemotherapie-Resistenzgen kann dann mittels der entsprechenden Zytostatika eine In-vivo-Selektion korrigierter Zellen erreicht werden. Ergebnisse aus Selektionsversuchen im Mausmodell legen die Durchführbarkeit dieses Konzeptes auch in klinischen Studien bei entsprechender Optimierung des Transduktionsprotokolls mit einer Erhöhung der In-vivo-Transfereffizienz nahe (Sorrentino et al., 1992; Allay et al., 1998; Jansen et al., 2002; Milsom et al., 2004). Als Selektionsmarkergene wurden insbesondere die Chemotherapie-Resistenzgene MDR-1 (Aran et al., 1994; Bunting et al., 1998; Schiedlmeier et al., 2002) und die humane MGMT (Allay et al., 1995; Moritz et al., 1995; Jansen et al., 2002; Milsom et al., 2004) untersucht.

Das Resistenzgen sowie das entsprechende Zytostatikum sollten unterschiedliche Kriterien erfüllen: So sollte ein zur Selektion eingesetztes Zytostatikum möglichst geringe Nebenwirkungen aufweisen, nicht mutagen jedoch toxisch für hämatopoetische Stammzellen sein. Letzteres ist jedoch auch vom verwendeten Resistenzgen abhängig. Dieses sollte nicht oder nur in geringem Maße in Stammzellen exprimiert werden, da sonst keine hintergrundfreie Selektion möglich ist. Außerdem sollte das vom Resistenzgen kodierte Protein nicht onkogen, toxisch oder immunogen sein.

1.1.4 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Das hämatopoetische System zeichnet sich dadurch aus, dass aus einer geringen Anzahl pluripotenter, zur Selbsterneuerung fähiger Stammzellen lebenslang sämtliche Blut- und Immunzellen wie Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen hervorgehen. Bis vor kurzem herrschte dabei die Meinung vor, dass das hämatopoetische System einer strengen hierarchischen Ordnung unterliegt (Abbildung 1), bei der eine ausgereifte Funktionszelle entweder aus einer gemeinsamen lymphoiden oder aus einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle entsteht (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Dies wird jedoch kontrovers diskutiert, seit Adolfsson et al eine Vorläuferzellpopulation nachweisen konnten, die nicht in diese Heirarchie passt (Adolfsson et al., 2005). Diese als LMPP (lymphoid primed multipotential progenitors) bezeichnete Zellpopulation hat die Fähigkeit, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, nicht jedoch erythroide Zellen oder Megakaryozyten zu bilden.

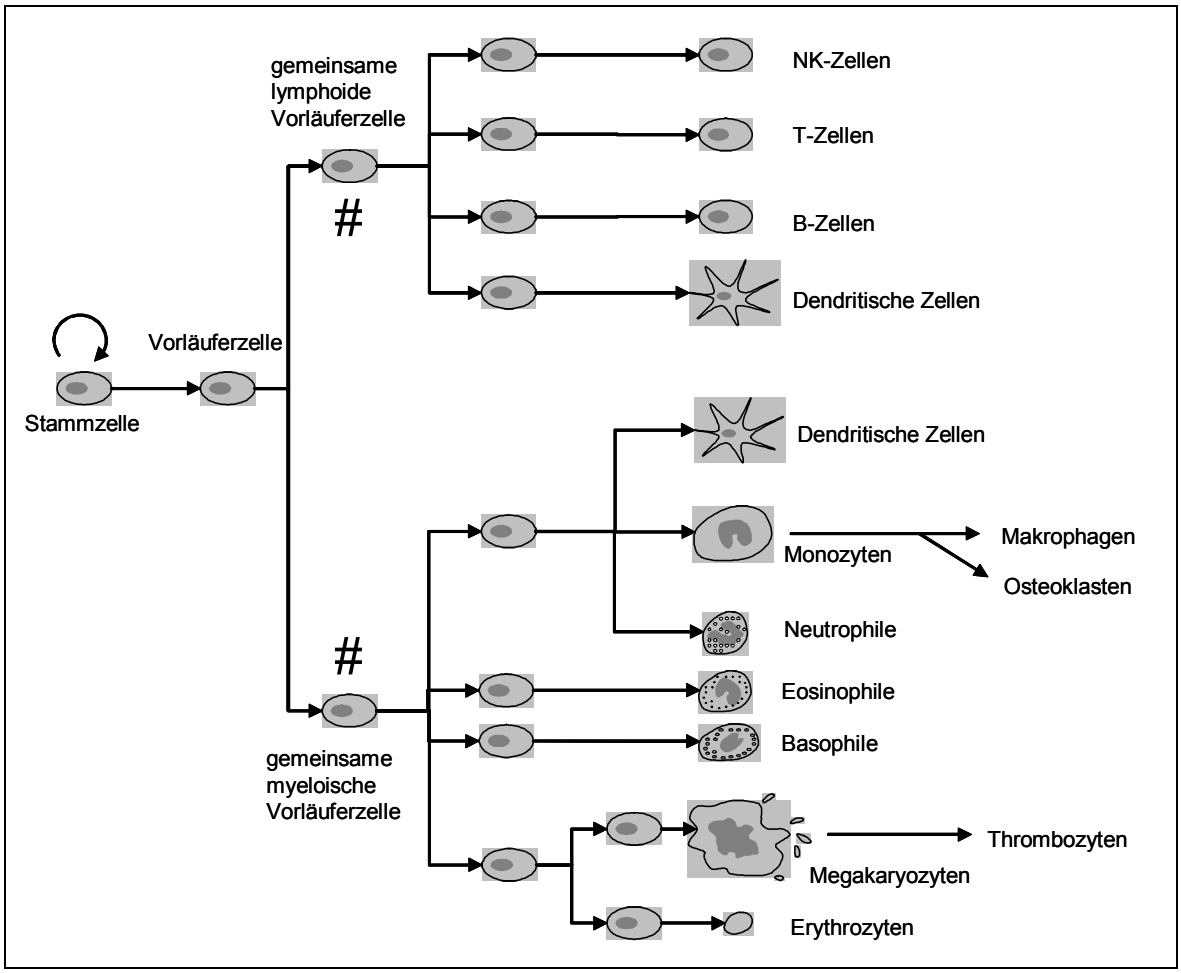

Abbildung 1: Hierarchische Struktur des hämatopoetischen Systems. Die Abbildung zeigt schematisch die Abstammung differenzierter Blutzellen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle. Das Differenzierungspotenzial nimmt von der Stammzelle zu den reifen Funktionszellen ab. # Stringenz der lymphoiden und myeloischen Vorläuferzellen wird zurzeit kontrovers diskutiert (s. Text)

1.1.5 Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Morphologisch und phänotypisch können hämatopoetische Stammzellen zwar eingegrenzt, jedoch nicht eindeutig definiert werden. Ein bedeutender Schritt zur phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen war die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene (Gunji et al., 1995). Dies führte dazu, dass inzwischen die verschiedenen Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Zellen durch diese Oberflächen-Marker definiert werden. Andrews et al. haben in den 80er Jahren einen monoklonalen Antikörper beschrieben, mit dessen Hilfe sehr primitive koloniebildende Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark angereichert werden konnten (Andrews et al., 1986). Das später als CD34 bezeichnete Antigen wird auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen,

vielen Leukämie-Zellen, Endothelzellen und einigen fetalen mesenchymalen Zellen exprimiert (Fina et al., 1990; Krause et al., 1994; Krause et al., 1996). Mit Hilfe weiterer Oberflächenmoleküle gelang es, die heterogene $CD34^+$-Zellpopulation in weitere Untergruppen unterschiedlicher Funktionalität zu fraktionieren. So konnte gezeigt werden, dass $CD34^+/CD38^-$-Zellen eine Fraktion besonders primitiver Vorläuferzellen enthalten (Terstappen et al., 1991; Vormoor et al., 1994; Wang et al., 1997).

Seit Mitte der 90er Jahre wird deutlich, dass primitive hämatopoetische Vorläuferzellen auch einen $CD34^-$-Phänotyp besitzen können. Zanjani et al. demonstrierten, dass nach Transplantation von humanen $CD34^-$-Knochenmarkszellen in fetale Schafe $CD34^+$-Zellen entstehen können (Zanjani et al., 1995). Bhatia et al. konnten den Stammzellcharakter von humanen $CD34^-$-Zellen durch Transplantationsexperimente im NOD/SCID-Mausmodell bestätigen (Bhatia et al., 1998). Im Gegensatz zu $CD34^+$-Zellen bildeten diese Zellen jedoch keine Kolonien im long-term-culture-initiating-cell (LTC-IC)-Assay, was als Hinweis auf ihren Phänotyp als primitivere Vorläuferzellen gewertet wurde.

Der Phänotyp einer Zelle sagt nur eingeschränkt etwas über die biologischen Eigenschaften aus. Um die Funktion der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Testsysteme beschrieben, um unterschiedliche Stufen der hämatopoetischen Differenzierung erfassen zu können. Bislang können Stammzellen nur indirekt durch Darstellung ihrer späteren Differenzierungsstadien bzw. Nachfolgezellen nachgewiesen werden. Dazu wurden In-vivo- und In-vitro-Methoden verwendet: Ein Ziel der In-vivo-Modelle ist die Demonstration der Fähigkeit einer Zellpopulation, auf eine längere Zeit hin die Blutbildung wiederherzustellen (Langzeit-Repopulierung) wogegen mit In-vitro-Testsystemen differenziertere Zellpopulationen wie z.B. klonogene Vorläuferzellen nachgewiesen werden, denen die Fähigkeit zur Langzeit-Repopulierung fehlt.

Langzeit-repopulierende humane Zellen lassen sich in vivo in einem Xenotransplantationsmodell, in dem humane primäre hämatopoetische Zellen in immundefiziente NOD/SCID (Non-obesic diabetes/severe combined Immun-deficiency)-Mäuse transplantiert werden (Lapidot et al., 1992; Larochelle et al., 1996), nachweisen. Die Zellen, die in diesen Mäusen eine humane Hämatopoese initiieren, werden als „SCID-repopulierende Zellen“ (SRCs) definiert. Daneben gibt es

ein Großtier-Xenotransplantationsmodell, bei dem die humanen Zellen in utero in prä-immune Schafföten transplantiert werden (Zanjani et al., 1995).
Klonogene Vorläuferzellen oder „Colony-forming units“ (CFU) lassen sich indirekt durch ihr koloniebildendes Wachstum in semisolidem Medium charakterisieren. Hierbei werden unreifere gemischte Kolonien, die „Colony-forming units-granulocyte / erytrocyte / megakaryocyte / macrophage“ (CFU-GEMM bzw. CFU-Mix) von den differenzierteren „Colony-forming units-granulocyte/macrophage“ (CFU-GM) und „Burst forming units erythroid“ (BFU-E) unterschieden (Moore, 1991). Eine zentrale Rolle bei der Untersuchung der Hämatopoese spielt die Maus, die als Modell für In-vitro- und In-vivo-Versuche dient (Spangrude et al., 1991). Murine hämatopoetische Stammzellen lassen sich in vivo durch serielle Transplantationen nachweisen. Hierbei wird ein Empfängertier letal bestrahlt und durch Transplantation von Knochenmarkzellen eines gesunden Donors gerettet. Ein anderer Nachweis ist der sogenannte spleen colony assay (Till et al., 1972; Magli et al., 1982): In der Milz letal bestrahlter Tiere bilden sich Kolonien hämatopoetischer Zellen nach Transfusion von Knochenmarkzellen eines Donors, wobei jede Kolonie (CFU-S: colony forming unit-spleen) von jeweils einer injizierten Vorläuferzelle abstammt.

1.2 Gentransfer mittels C-Typ-retroviraler Vektoren

1.2.1 Aufbau und Lebenszyklus eines C-Typ-Retrovirus

Derzeit stellt der Gentransfer mittels C-Typ-Retroviren das klinisch am weitesten entwickelte System zur Expression therapeutischer Transgene in hämatopoetischen Zellen dar (Moritz et al., 1998a; Halene et al., 2000). Retroviren sind RNA-Viren, die sich über eine intermediäre DNA replizieren (Coffin, 1996). Das Virus-Partikel, mit einem Durchmesser von 100 nm, besteht aus einem Kernkomplex und einer Hülle (Abbildung 2). Der Kernkomplex enthält die viralen Replikationsenzyme (pol), das Kapsid (gag) und zwei Kopien des linearen, einzelsträngigen RNA-Moleküls (7-11 kb Größe). Die Hülle (env) setzt sich aus der Wirtszellmembran und viralen Glykoproteinen zusammen. Letztere umfassen das Oberflächen-Hüllprotein und das Transmembranglykoprotein. Der Infektionszyklus (Abbildung 2) wird durch spezifische Interaktionen zwischen dem Oberflächen-Hüllprotein und einem zellulären Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle initiiert. Anschließend fusionieren - vermittelt durch das Transmembranglykoprotein - die Virus- und die

Wirtszellmembran, und der Kernkomplex des Virus wird in das Zytoplama entlassen. Nach dem Eintritt in die Zelle wird die virale RNA mit Hilfe der vom Virus mitgelieferten Reversen Transkriptase in eine lineare doppelsträngige DNA (revers) transkribiert, in den Nukleus transportiert und schließlich in das Genom der Wirtszelle stabil integriert. Danach wird diese als Provirus bezeichnete DNA wie ein zelluläres Gen während des Zellzyklus repliziert, exprimiert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Transkription des Provirus führt zur Bildung der viralen mRNA und der genomischen RNA. Im Zytoplasma lagern sich die viralen Kernproteine mit der RNA zusammen (assembling), die viralen Glycoproteine werden eingebaut und das Virus wird von der äußeren Zell-Membran abgeschnürt (budding). Nachdem die Partikel aus der Zelle entlassen wurden, findet die endgültige Zusammenlagerung der Kernproteine statt, wodurch die Formation des ausgereiften infektiösen Virus vermittelt wird.

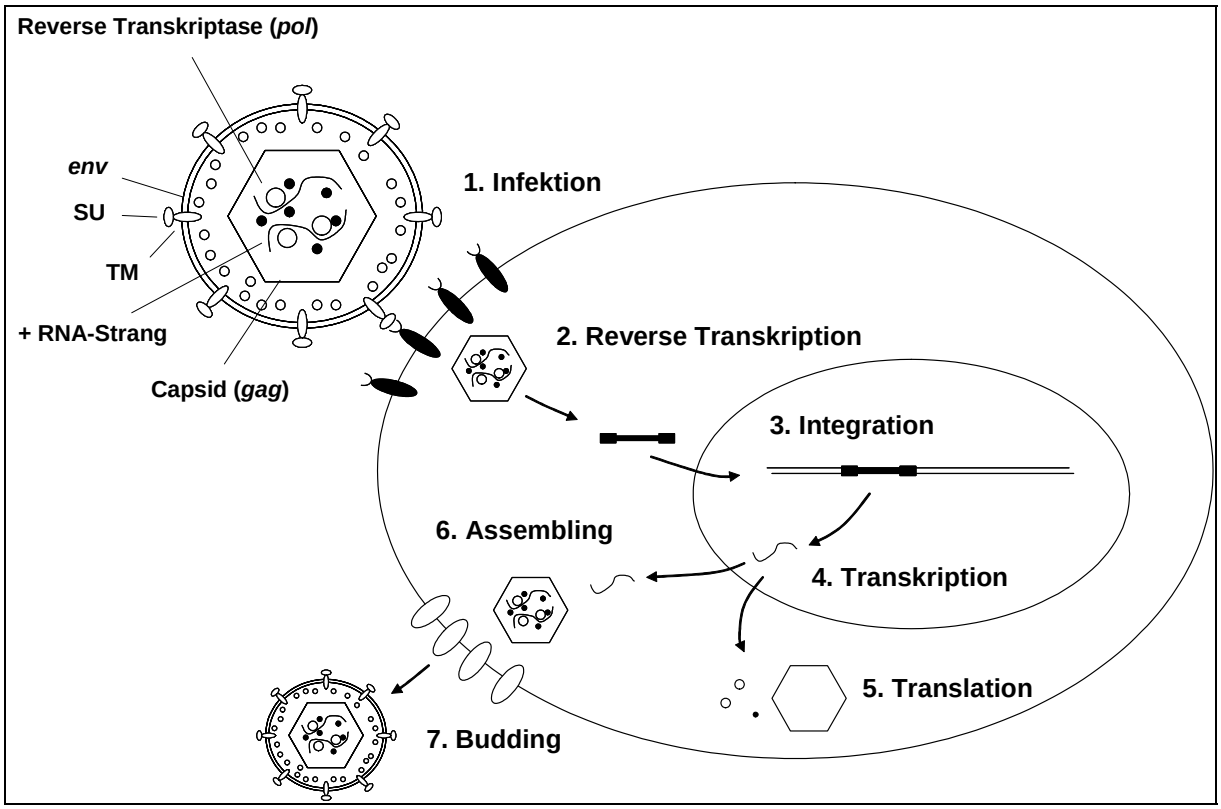

Abbildung 2: Aufbau und Lebenszyklus eines C-Typ-Retrovirus (Beschreibung im Text). SU: Surface protein, TM: Transmembranprotein, env: Hüllproteine, gag: Kapsid.

1.2.2 Genomische Struktur C-Typ-retroviraler Gentherapie-Vektoren

Das Provirus besitzt am 5'- und 3'-Ende zwei identische so genannte LTRs (Long Terminal Repeats), welche sämtlichen cis-aktiven Elemente tragen, die für die virale Genexpression benötigt werden (Abbildung 3a), wie den Promoter, den Transkriptionsterminator und das Polyadenylierungssignal. Am Ende der LTRs befinden sich Bindungsstellen (att, attachment sites), die essenziell für die virale Integration sind, und zusätzliche cis-aktive Signale, die für die reverse Transkription benötigt werden, wie z.B. die Primer Bindungsstelle (PBS). Außerdem liegt in der Nähe der LTRs das Verpackungssignal psi (Ψ), welches benötigt wird, um die virale RNA in Partikel zu verpacken. Normalerweise sind die viralen Gene *gag* (kodieren die Kapsidproteine), *pol* (kodieren virale Enzyme, die für die Replikation und Integration gebraucht werden) und *env* (kodieren die viralen Hüllproteine) zwischen den LTRs lokalisiert.

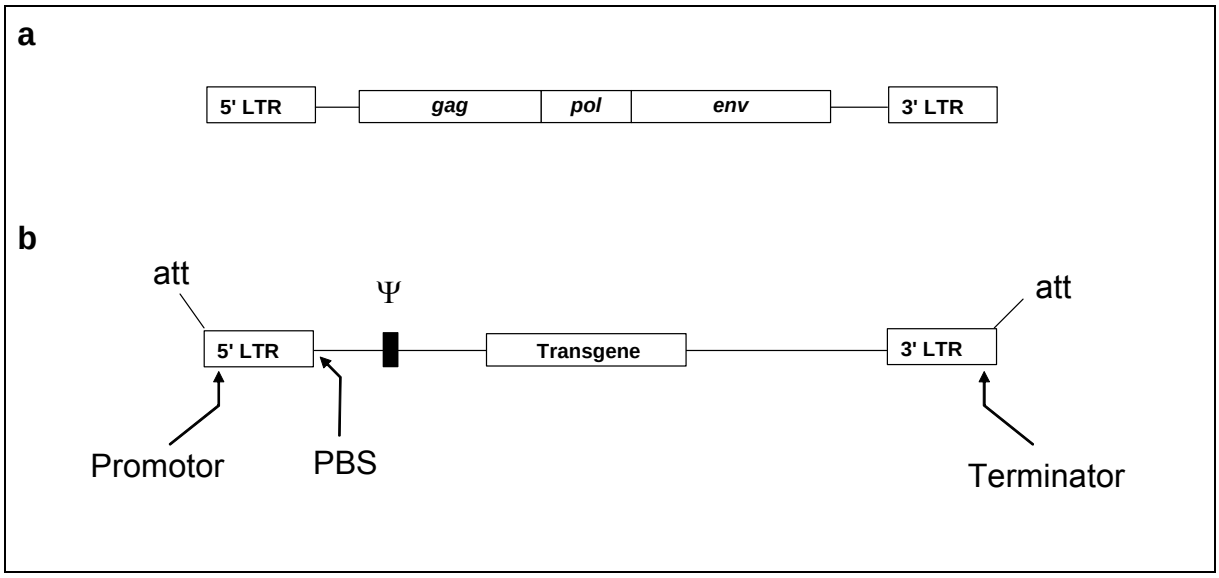

Abbildung 3: Retrovirales Genom. A: Genomische Struktur eines C-Typ-Retrovirus; B: Retroviraler Vektor mit cis-aktiven Elementen. Die retroviralen Gene wurden durch Transgene ersetzt. att: attachment sites; PBS: Primer Bindungsstellen; Ψ: Verpackungssignal; LTR: Long Terminal Repeat.

Es werden verschiedene Hüllproteine unterschieden, die jeweils andere Rezeptoren erkennen. So bindet zum Beispiel das ecotrope *env*-Protein an den mCAT-1-Rezeptor (Wang et al., 1991), einen Translokator für basische Aminosäuren, während das amphotrope *env*-Protein an den Pit-2-Rezeptor bindet, einen Phosphat-Translokator (Kavanaugh et al., 1994). Während „ecotrope" Viren nur murine Zellen

infizieren können, infizieren „amphotrope“ Viren auch humane Zellen. Auch das Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV), dem der Pit-2-verwandte Phohaphattransporter Pit-1 als Rezeptor dient, infiziert neben anderen Primatenzellen auch humane Zellen (O'Hara et al., 1990). Die Art des env-Proteins determiniert somit den Zelltropismus des Retrovirus, da die Rezeptoren nicht in allen Spezies vorkommen und innerhalb eines Organismus differenzierungsabhängig exprimiert werden.

Im Gegensatz zu komplexeren Retroviren erlaubt die relativ einfache Genomstruktur des C-Typ-Retrovirus ein unkompliziertes Design von replikationsdefizienten Vektorsystemen (Miller, 1997). Das typische Genom eines solchen Vektors besteht aus den LTRs und deren benachbarten Regionen, wobei alle viralen kodierenden Regionen durch ein oder mehrere Transgene (Abbildung 3b) ersetzt werden.

Aktuelle Vektoren, die von C-Typ-Retroviren abstammen, erlauben die Verpackung von bis zu 8 kb RNA und umfassen normalerweise die kodierenden Regionen von zwei verschiedenen Transgenen. Dies sind z.B. therapeutische Gene in Kombination mit selektionierbaren Markergenen wie das *lacZ*-Gen (kodiert die β-Galaktosidase), das neo^R-Gen (kodiert die Neomyzinphosphotransferase) oder das *EGFP*-Gen (kodiert das Enhanced Green Fluorescent Protein). Die Expression dieser Gene wird entweder von der 5’LTR oder von einem heterologen Promoter reguliert, und die Transkription von jedem individuellen Gen wird durch „Spleißen“ der RNA oder durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die zwischen den beiden Transgenen liegt und die cap-unabhängige Translation polycistronischer mRNA und damit die Expression von einer mRNA erlaubt, gesteuert (Aran et al., 1994). Alternativ kann das zweite Gen über einen zweiten internen Promoter reguliert werden. Außerdem werden auch Fusionsproteine verwendet, welche die Produkte zweier Gene in einem Polypeptid vereinigen (Budak-Alpdogan et al., 2004). In einem neueren Konzept wird die autoproteolytische 2A-Sequenz des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus in retroviralen Vektoren verwendet (De Felipe et al., 2000). Hierbei werden die zu koexprimierenden Gene über das 2A-Gen verknüpft, so dass ein Fusionsprotein entsteht. Die Trennung der verschiedenen Genprodukte erfolgt hiebei auf Ebene des Polypeptides, so dass sie über einen einzigen Promotor im äquimolaren Verhältnis synthetisiert werden.

Alle Promotoren sollten die dauerhafte Expression der Transgene in der Zielzelle vermitteln, die Expression wird jedoch oft durch sogenanntes „Silencing“ der

heterologen Promotoren durch Mechanismen der Wirtszellen wie z.B. der CpG Methylierung verringert. Daher ist die Entwicklung von regulatorischen Elementen, die auf die jeweilige Zielzelle optimiert sind, wünschenswert. So wurden zum Beispiel retrovirale Vektoren entwickelt, die sowohl regulatorische Elemente des „Spleen Forcus-forming virus“ (SFFV) als auch des „Murine Embryonic Stem Cell Virus“ (MESV) enthalten, um die Expression von Transgenen in humanen $CD34^+$-Zellen zu erhöhen (Baum et al., 1995; Eckert et al., 1996; Becker et al., 1998).

1.2.3 Retrovirale Verpackungszelllinien

1.2.3.1 Stabile Verpackungzelllinien

Ein Meilenstein in der Gentransfer-Technologie war die Erzeugung von Zelllinien, die rekombinante retrovirale RNAs in infektiöse Partikel verpacken konnten, ohne zugleich replikationskompetente Viren zu produzieren (Miller, 1990; Danos, 1991). In diesem Prototyp zur Erzeugung sicherheitsmodifizierter replikationsdefizienter C-Typ-Retroviren wurden die retroviralen Genprodukte gag, pol und env in trans geliefert und von den Elementen getrennt, die für die Verpackung von retroviraler RNA in Viren gebraucht werden. Die erste ecotrope retrovirale Verpackungslinie, Psi-2, entstand durch die stabile Integration einer rekombinanten retroviralen DNA in NIH3T3-Zellen, von der das RNA- Verpackungssignal Ψ entfernt worden war (Mann et al., 1983). Zur Produktion hochtitriger und infektiöser Viren benötigten diese Zellen die anschließende stabile Einführung eines retroviralen Vektors, der das retrovirale Verpackungssignal Ψ, Transkriptions- und Prozessierungselemente und das Transgen enthält (Abbildung 4). Retrovirale Partikel, die auf diese Weise produziert werden, können die Zielzellen einmalig infizieren und das Transgen übertragen, sind aber nicht in der Lage zu replizieren, weil die genomische Information, die die Verpackungsproteine enthält, nicht mit dem retroviralem Partikel übertragen wird. Die Strategie, die Gene auf mehrere Vektoren zu verteilen, wurde anschließend durch eine große Zahl von Forschern modifiziert, mit dem Ziel das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Viren weiter zu verringern und virale Titer zu erhöhen (Miller, 1990; Danos, 1991).

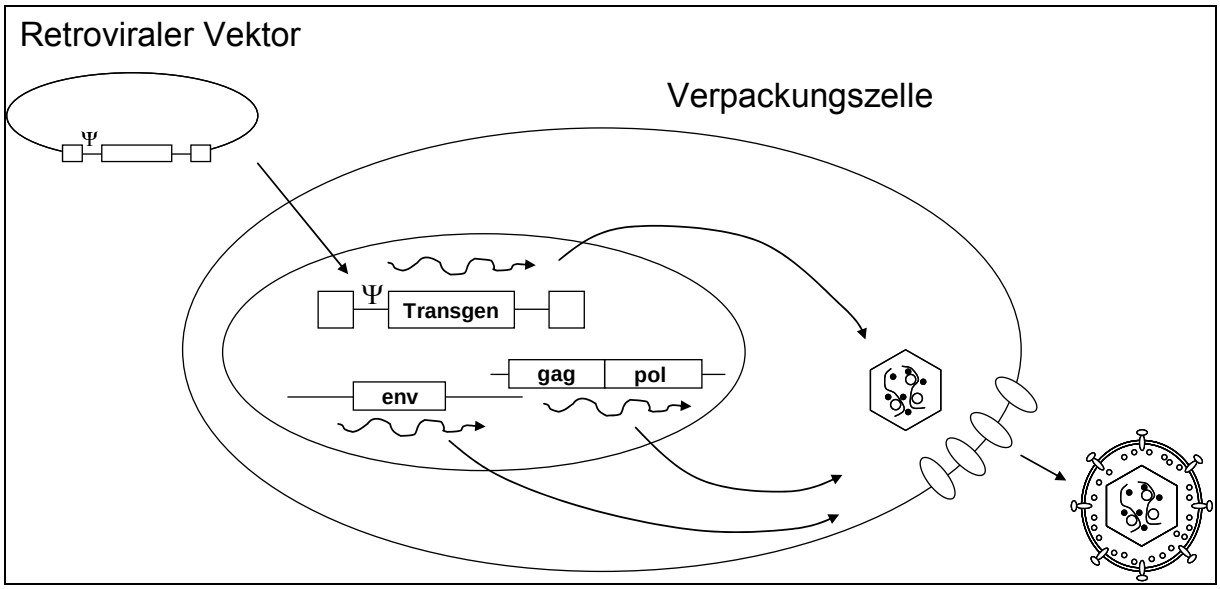

Abbildung 4: Prinzip einer retroviralen Verpackungszelle. Die Gene gag, pol und env sind stabil im Genom der Zelle integriert, wobei das Verpackungssignal Ψ fehlt. Dies wird mit dem retroviralen Vektor geliefert und erst nach Translation und Zusammenlagerung aller Elemente entsteht ein replikationsdefizientes Viruspartikel, dem die viralen Gene gag, pol und env fehlen.

Obwohl infektiöse Retroviren innerhalb von 48 Stunden nach Transfektion dieser Verpackungszellen produziert werden, ist der Titer, der von diesen Zellen generiert werden kann, generell niedrig (10^3 – 10^4 infektiöse Einheiten (IE) / ml). Daher ist es notwendig, Klone zu isolieren, die einen höheren Titer produzieren. Dies wird erreicht, indem einzelne Klone aus der Population der Produzentenzellen selektioniert werden und dann einzeln auf ihre Fähigkeit zur Virusproduktion getestet werden. Selbst unter optimalen Bedingungen ist es hier meist mühsam, die in der Regel mindestens erforderlichen 20 - 40 Klone zu testen und es werden mindestens 2-3 Monate benötigt. Ohnedies muß diese Prozedur für jedes einzelne Konstrukt wiederholt werden.

1.2.3.2 Transiente Verpackungszelllinien

Alternativ zu den stabilen Verpackungszelllinien hat sich in den letzten Jahren ein transientes Verpackungssystem etabliert, das den zeit- und arbeitsaufwändigen Schritt der Selektion einzelner Zellklone umgeht. Dieses erstmals von G. Nolan beschriebene System (Pear et al., 1993) basiert auf der 293T-Zelllinie, einer Variante der 293-Zellen, in die das Grosse-T-Antigen des SV40-Affenvirus eingefügt wurde (DuBridge et al., 1987). Die retroviralen Strukturgene wurden stabil in das Genom der 293T-Zelle integriert, und der retrovirale Vektor wird mittels transienter

Transfektion in die Zelle eingebracht. Hochtitrige transiente Verpackungszelllinien, die in Weiterentwicklung dieses Systems für die Transduktion hämatopoetischer Zellen weit verbreitet sind, sind die amphotropen und ekotropen Phoenix- (FNX-) Zelllinien (Grignani et al., 1998).

1.3 Cytidindeaminase

1.3.1 Funktion als Chemotherapie-Resistenzgen

Die potentielle Rolle der CDD als Chemotherapie-Resistenzgen wurde aus dem Metabilismus des Zytostatikums AraC abgeleitet. Anfang der 70er Jahre wurde erstmalig eine erhöhte Resistenz gegenüber AraC bei leukämischen Zellen mit einer erhöhten CDD-Expression beschrieben (Steuart et al., 1971), und diese Beobachtung wurde in der Folge von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Colly et al., 1987; Jahns-Streubel et al., 1997; Schroder et al., 1998). Nach Klonierung und Sequenzierung der humanen CDD cDNA (Laliberte et al., 1994) konnte dann die CDD erstmals in humanen Fibroblasten und Zelllinien überexprimiert werden. Dabei wurde erhöhte Resistenz gegenüber AraC beobachtet (Momparler et al., 1996b; Schroder et al., 1996). Auch nach retroviralen Gentransfer der CDD in murine hämatopoetische Zellen (Momparler et al., 1996a; Neff et al., 1996; Eliopoulos et al., 1998a; Flasshove et al., 1999; Sauerbrey et al., 1999) wurde in vitro eine erhöhte Resistenz gegenüber AraC beobachtet. Außerdem bewirkte die Überexpression der CDD auch eine Resistenz gegenüber anderen Cytidinanaloga wie Gemcitabin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Eliopoulos et al., 1998b; Eliopoulos et al., 2002). Überdies wurde die erfolgreiche Behandlung von Lymphomen mit einer Kombination aus Methotrexat und AraC in NOD/SCID Mäusen erreicht. Diesen Tieren wurde Knochenmark transplantiert, das mit einem DHFR/CDD-Fusionskonstrukt transduziert wurde, wodurch sich bei diesen Tieren einen Überlebensvorteil während der Chemotherapie im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte (Budak-Alpdogan et al., 2004).

1.3.2 Physiologische Eigenschaften der CDD

Die CDD deaminiert Cytidin und dessen Analoga, wie AraC und Gemcitabin, wodurch die Akkumulation derer toxischen Triphosphatderivate verhindert wird (Kufe et al., 1985; Huang et al., 1991). Die höchste Enzymaktivität der humanen CDD

wurde in der Leber gefunden (Camiener et al., 1965; Ho, 1973; Laliberte et al., 1994). Aber auch in der Milz, Lunge, Darmmukosa (Ho, 1973), Plazenta (Laliberte et al., 1994) und ausgereiften Granulozyten (Chabner et al., 1974) konnte eine hohe CDD-Aktivität gemessen werden. Dagegen ist die CDD-Aktivität in humanen $CD34^+$-Zellen aus peripherem Blut gering (Schroder et al., 1996).

Das die humane CDD kodierende Gen liegt als Einzelkopie auf Chromosom 1, hat eine Länge von 31 kb (Saccone et al., 1994) und enthält 4 Exons (Demontis et al., 1998). Die cDNA besteht aus 910 bp und kodiert ein Protein mit 146 Aminsäureresten (Laliberte et al., 1994). In der Quartärstruktur liegt die CDD als Tetramer vor, welches aus 4 identischen Untereinheiten von annähernd je 16 kDa zusammengesetzt wird (Vincenzetti et al., 1996). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Organismen weist als Konsensus eine Zinkfingerstruktur auf, die für die katalytische Funktion des Enzyms wichtig ist (Demontis et al., 1998), wobei Zink als Kofaktor benötigt wird. Es existieren zwei verschiedene Isoformen der humanen CDD, die sich durch eine nichtkonservative Aminosäuresubstitution im Kodon 27 unterscheiden. An dieser Position befindet sich bei der einen Isoform (CDD-1) ein Glutaminrest (Kuhn et al., 1993) und bei der anderen (CDD-2) ein Lysinrest (Laliberte et al., 1994). Bislang ist es unklar, ob Unterschiede in der enzymatischen Aktivität zwischen der CDD-1 und der CDD-2 existieren. Während Kirch et al. eine 1,3 - 3,3fach höhere Enzymaktivität der CDD-2 gegenüber der CDD-1 in Bezug auf AraC beobachteten (Kirch et al., 1998), konnten Vincenzetti et al hierfür keine signifikanten Unterschiede finden (Vincenzetti et al., 2004).

Obwohl die CDD im allgemeinen als zytosolisch vorkommendes Enzym beschrieben wird, wurde die humane CDD immunhistochemisch auch im Zellkern nachgewiesen (Somasekaram et al., 1999). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass die Aminosäuresequenz der CDD ein nukleäres Lokalisationssignal besitzt, welches den Import des Proteins in den Zellkern steuert.

1.3.3 AraC und Gemcitabin als Substrat der Cytidindeaminase

Cytidinanaloga wie AraC und Gemcitabin werden erfolgreich als Zytostatika zur Behandlung von Tumoren eingesetzt (Galmarini et al., 2001; Matsuda et al., 2004). Während AraC das wichtigste Medikament zur Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) darstellt (Lister et al., 1987; Mastrianni et al., 1992) und auch gegen

andere hämatologische Krebserkrankungen wie der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) und non-Hodgkin Lymphomen wirksam ist (Peters et al., 1987; Stryckmans et al., 1987) wird Gemcitabin vor allem gegen solide Tumoren der Brust (Carmichael et al., 1997), des Pankreas (Casper et al., 1994; Burris et al., 1997), der Blase (Stadler et al., 1997), der Eierstöcke (Lund et al., 1994; Kaufmann et al., 1997), der Lunge (Abratt et al., 1994; Cormier et al., 1994; Fossella et al., 1997) und des Kopf/Halsbereichs (Catimel et al., 1994) eingesetzt.

Aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit zu Cytidin und Desoxycytidin (Abbildung 5a) werden beide Substanzen auf ähnliche Weise verstoffwechselt (Abbildung 5b). Beide Sie werden als inaktive Vorstufen verabreicht und nach dem aktiven Transport über membranständige Nukleosidtransporter erst intrazellulär über eine Enzymkaskade in deren aktive (zytotoxische) Triphosphatformen umgewandelt (Liliemark et al., 1985; Plunkett et al., 1987). Dazu erfolgt ein dreifacher Phosphorylierungsprozess, wobei die erste Phosphorylierung zum Monophosphat mittels der Deoxycytidinkinase (dCK) erfolgt (Plagemann et al., 1978; Kufe et al., 1985). Antagonistisch zur dCK wirkt die 5’-Nukleotidase, welche die Nukleosidmonophosphate dephosphoryliert (Dumontet et al., 1999). Nach der primären Phosphorylierung, die gleichzeitig den passiven Efflux der Substanz verhindert, erfolgt die weitere Umsetzung zum Diphosphat durch die Pyrimidin-Nukleosid-Monophosphat-Kinase und zum Triphosphat durch die entsprechende Nucleosid-Diphosphat-Kinase (Hande et al., 1978).

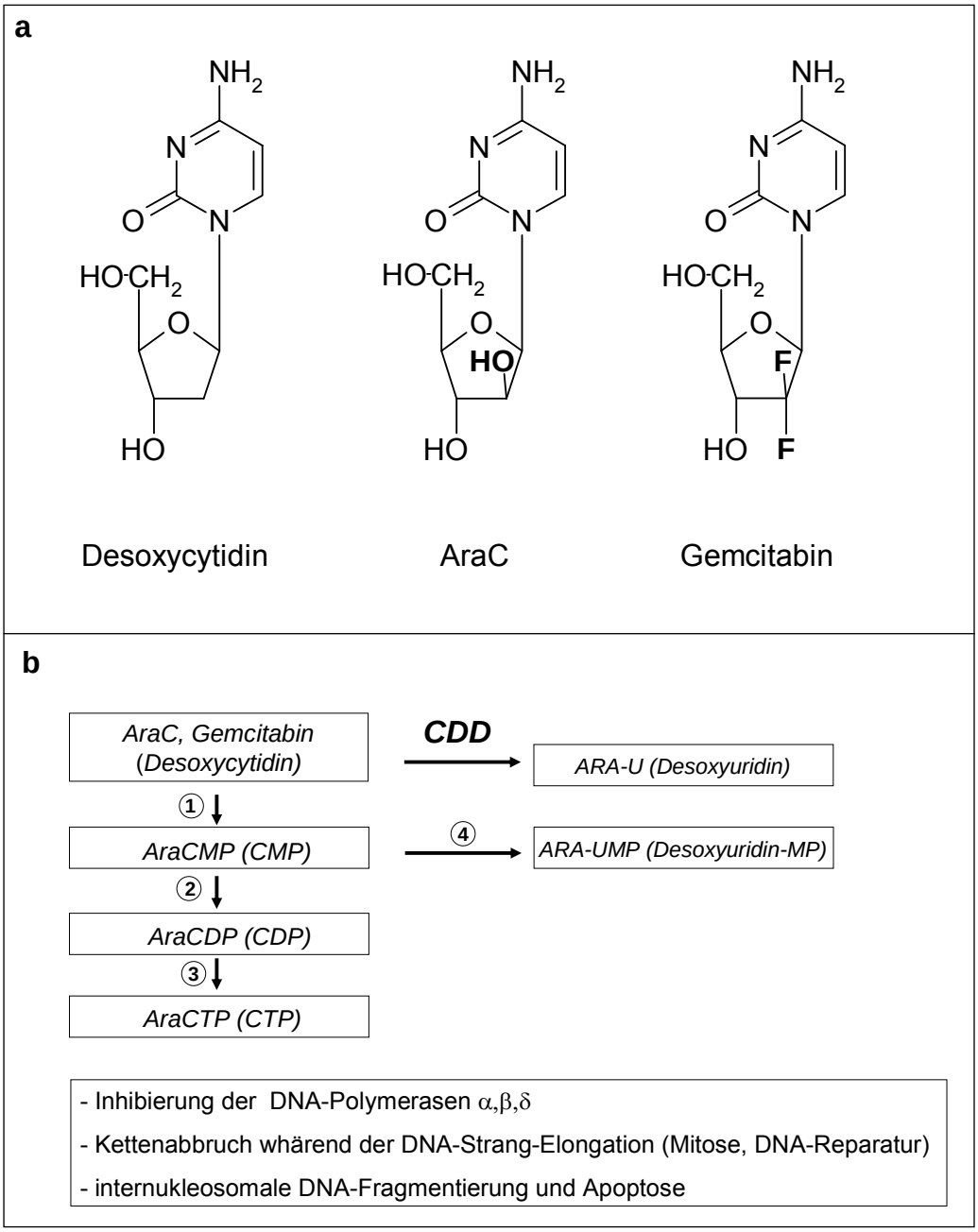

Abbildung 5: Strukturformeln der Antimetaboliten AraC, Gemcitabin und des natürlichen Metaboliten Desoxycytidin sowie deren Stoffwechselweg. a: AraC trägt im Gegensatz zum Desoxycytidin am 2'C-Atom des Zuckerringes eine Hydroxylgruppe in β-Konfiguration, während Gemcitabin an dieser Position zwei Fluoride trägt. b: Cytdinanaloga werden entweder zu ihren toxischen Triphosphaten phosphoryliert oder zu den entsprechendne Uridin-Derivaten deaminiert. 1: Deoxycytidinkinase; 2: Pyrimidin-Nukleosid-Monophosphat-Kinase; 3: Pyrimidin-Nucleosid-Diphosphat-Kinase; 4: Desoxycytidylatdeaminase (Beschreibung: s. Text)

Die Triphosphate entfalten ihren zytotoxischen Effekt durch Einbau in neu entstehende DNA während Replikations- und DNA-Reparaturprozessen und damit verbundener Hemmung von DNA-Polymerasen (Huang et al., 1991; Abdel-Aziz et al., 2000) und der Topoisomerase I (Pourquier et al., 2000; Pourquier et al., 2002),

wodurch ein Kettenabbruch (Huang et al., 1991; Plunkett et al., 1995; Gmeiner, 2002) mit anschließender Apoptose (Fram et al., 1982) hervorgerufen wird.
Alternativ zur Aktivierung werden Cytidinanaloga zum einen durch hydrolytische Deaminierung über die Cytidindeaminase (CDD) zu den entsprechenden Uridinderivaten konvertiert (Camiener et al., 1965), zum anderen werden die Monophosphate durch die Desoxycytidylatdeaminase zu den jeweiligen Uridinmonophosphaten (Mancini et al., 1983) abgebaut.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Myelosuppression, als wesentliche Nebenwirkung der Cytidinanaloga AraC und Gemcitabin bei der Chemotherapie, limitiert in vielen Situationen die Höhe der Dosierung und verhindert die Ausnutzung des maximalen Potenzials dieser Zytostatika. Der Gentransfer der Cytidindeaminase könnte gesunden hämatopoetischen Zellen Resistenz gegenüber diesen Zytostatika verleihen und damit diese Limitationen möglicherweise beheben. Allerdings wurde der CDD-Gentransfer in humane hämatopoetische Zellen bisher kaum untersucht und zu Beginn dieser Arbeit lagen nur In-vitro-Daten für einen Schutzeffekt der CDD in primären humanen $CD34^+$-Zellen gegenüber AraC vor (Bardenheuer et al., 2005).
Aufbauend auf diesen Ergebnissen war es Ziel dieser Arbeit, den Gentransfer der humanen CDD weiter zu untersuchen. Hierzu wurden mehrere Teilzielem formuliert:

- Für die erfolgreiche retrovirale Transduktion primärer hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen werden Viruspräparationen mit verlässlich hohen Virustitern benötigt. Es sollten daher stabile Produzentenzelllinien erzeugt werden, die hochtitrigen virushaltigen Überstand produzieren.

- Da für AraC bereits ein CDD-vermittelter Schutzeffekt für primäre humane $CD34^+$-Zellen gezeigt wurde, sollte in weiteren in vitro-Experimenten untersucht werden, ob der CDD-Gentransfer diesen Zellen auch einen Schutz gegenüber Gemcitabin, einem weiteren klinisch häufig eingesetzten Cytidinanalogon, vermittelt.

- Ein Problem des retroviralen Gentransfers stellt die für viele therapeutische Anwendungen ungenügende Effizienz bei der Transduktion primärer

hämatopoetischer Zellen dar. Daher sollte hier untersucht werden, ob sich CDD-transduzierte primäre hämatopoetische Zellen mittels AraC zumindest in vitro selektionieren lassen.

- Angesichts fehlender In-vivo-Daten für den Schutz hämatopoetischer Zellen vor AraC- oder Gemcitabin-induzierter Myelosuppression sollte diese Fragestellung mit Hilfe eines murinen In-vivo-Knochenmarktransplantationsmodells untersucht werden. Hierbei sollte auch untersucht werden, ob sich CDD-transduzierte Zellen mit AraC oder Gemcitabin in vivo selektionieren lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

BSA	Fluka Biochemica
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AraC (AraCell®)	cell pharm, Hannover
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll	Serva, Heidelberg
FKS	Life Technologies, Eggenstein
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Gemcitabine (Gemzar®)	Lilly, Gießen
Methyzellulose	Fluka Biochemica
PBS	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Retronektin®	TaKaRa, Otsu, Japan
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Qualität verwendet.

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (High Glucose)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IMDM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3 Antikörper

PE konjugierter hAK CD38	BD PharMingen, San Jose, CA
FITC konjugierter hAK CD34	BD PharMingen, San Jose, CA
PerCP konjugierter hAK CD45	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK GR-1 (RB6-8C5)	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK CD45/B220 (RA3-6B2)	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK CD3ẹ (500A2)	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK Ter-119 (Ter-119)	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK CD49b/Pan-NK cells DX5)	BD PharMingen, San Jose, CA
PE konjugierter mAK CD11b (M1/70)	BD PharMingen, San Jose, CA
APC-Cy7 konjugierter mAK Sca-1 (2B8)	eBioscienece, San Diego, CA

2.1.4 Wachstumsfaktoren

rhEPO	Roche, Mannheim
rmIL-3	PeproTech, Rocky Hill, NJ
rhIL-3	Sandoz, Basel, Schweiz
rhIL-6	Sandoz, Basel, Schweiz
rmSCF	PeproTech, Rocky Hill, NJ
rhSCF	CellGenix, Freiburg
rhG-CSF	Roche, Mannheim

2.1.5 Puffer und Lösungen

Trypsin-EDTA-Lösung:	0,05% Trypsin
	0,53 mM EDTA
	in PBS
Gelatine-Lösung:	0,1% Gelatine
	in PBS
$CD34^+$ -Puffer	0,6% HSA
	2 mM EDTA
	in PBS
IMDM/Methylzellulose	2,1% Methylzellulose
	in IMDM

50-fach TAE-Puffer	242 g/l Tris 57,1 ml/l Eisessig 50 mM EDTA pH 8,5
Ethidiumbromid	1 µg/ml in 1x TAE-Puffer

2.1.6 Geräte

Blutbilddifferenzierer VetABC	scil animal care company, Viernheim
CO_2-Inkubator NU 2700 E	NUAIRE, Plymouth, USA
Durchflusszytometer EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld
FACS Vantage, Laser Coherent, 0.4W	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACSCanto	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Gefrierschrank –80°C, ULT 2186-7-Ultima 12	REVCO, Asheville
Gilson-Pipetten	Villers-le-Bel, Frankreich
Knick pH-Meter 761, Calimatic	Ingold-Messtechnik, Steinbach
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	Olympus Optical Co., Hamburg
pipetus-akku, P 990 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt
pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt
Präzisionswaage AE120	Bosch, Jungingen
Sicherheitswerkbank NU4400-400E	NUAIRE, Plymouth, USA
Sicherheitswerkbank NU4400-600E	NUAIRE, Plymouth, USA
Stabilipan (Röntgenquelle)	Siemens, Erlangen
Vortexer L46	GLW, Würzburg
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge GS-6R	Beckman Instruments, München

Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München

2.1.7 Primäre Zellen, Zelllinien und Tiere

FNX-eco	ATCC, Manassas, VA, USA
NIH-3T3	ATCC, Manassas, VA, USA
HT1080	ATCC, Manassas, VA, USA
293T	ATCC, Manassas, VA, USA
GP+E86 Cl29	Dr. S. Ragg, Riley Hospital, Indianapolis, IN, USA
Nabelschnurblut für $CD34^+$-Zellen	Elisabeth-Krankenhaus, Essen
C57Bl/6-Mäuse	Harlan, Borchen

2.1.8 Retrovirale Vektoren

Für die Expression der Cytidindeaminase wurde der Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP (Bardenheuer et al., 2005) benutzt, der die cDNA der CDD-2 (Kirch et al., 1998) enthält, welche an der Codonposition 27 einen Lysin- statt eines Glutaminrestes besitzt. In Kombination mit der CDD wird EGFP als Reportergen über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) koexprimiert. Als Kontrolle diente der Vektor SFβ1-EGFP, der nur EGFP exprimiert. Beide Vektoren (Abbildung 6) basieren auf einem SFFV/MESV-Hybridvektor (Baum et al., 1995; Hildinger et al., 1999), der für die Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert wurde.

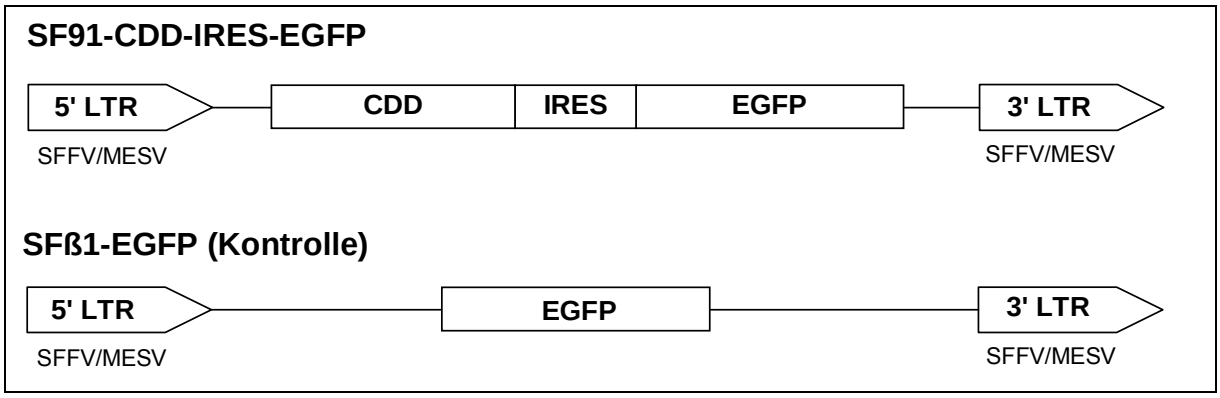

Abbildung 6: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren. Die Expression der Cytidindeaminase (CDD) und des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) wird über die Promotor- und Enhancer-Elemente des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und des Murine Embryonic Stem Cell Virus (MESV) reguliert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation kompetenter E. coli-Bakterien des Stammes DH5α

Für die Präparation von Pasmid-DNA der in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren wurden E. coli-Zellen des Stammes DH5α verwendet. 50 µl Bakteriensuspension wurden zur Transformation mit 5 ng DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 37°C und anschließender Kühlung auf Eis wurden 950 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben, und der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C mit 225 U/min geschüttelt. Je 50 µl und 100 µl der Bakteriensuspension wurden danach auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden einzelne Kolonien isoliert und in LB-Medium überführt, um Übernachtkulturen für Plasmidpräparationen zu erhalten.

2.2.2 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die präparative Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde mit dem „Plasmid Maxi-Preparation Kit“ der Firma Sigma nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und spektrophotometrisch quantifiziert. Aliquots der Plasmid-DNA wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdaus (Enzyme und Puffer von New England Biolabs, Frankfurt) und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.3 DNA Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese (Ausubel et al., 1996) wurde für die Analyse von verdauter Plasmid-DNA durchgeführt. Die DNA wurde je nach erwarteter Fragmentgröße in 1,0 - 1,5 %igen Agarosegelen, die mit 1x TAE-Puffer hergestellt wurden, aufgetrennt. Es wurde jeweils 1 µg DNA auf das Gel geladen. Nach dem Gellauf bei einer Spannung von 120 Volt für 1 h wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromidlösung inkubiert, anschließend in H_2O gewaschen und unter UV-Belichtung und Verwendung eines Orangefilters fotografiert.

2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrock et al., 1989). Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} lässt sich die Proteinkontamination der Lösung ermitteln. Es wurde ausschließlich DNA mit einem OD_{260}/OD_{280} - Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 verwendet.

2.3 Zellbiologische Standardmethoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Sämtliche Lösungen und Plastikwaren wurden durch entsprechende Methoden (Bestrahlung, Autoklavierung) vor der Benutzung sterilisiert.

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten primären Zellen und Zelllinien wurden in Zellkulturgefäßen mit entsprechendem Kulturmedium bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Adhärente Zellen wurden regelmäßig alle 2 bis 3 Tage oder spätestens beim Erreichen der Konfluenz in ein neues Kulturgefäß überführt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe einer den Zellrasen bedeckenden Menge einer Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung und einigen Minuten Inkubation bei RT wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe von Medium mit 10 bis 20 % FKS abgestoppt. Ein Aliquot, typischerweise 1/3 bis 1/20 der Zellen, wurde nach Resuspendierung in ein neues mit Gelatine beschichtetes Kulturgefäß

mit frischem Kulturmedium überführt. Zur Beschichtung mit Gelatine wurde der Boden des Kulturgefäßes mit 0,2 %iger Gelatine in PBS bedeckt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend abgesaugt.

2.3.2 Kryokulturen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, wurden sie in Medium mit 45% FKS und 10% DMSO in einer Dichte von 3 – 5 x 10^6/ml suspendiert und in 1 ml Aliquots in einem Einfrierbehälter auf –80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Kryokulturen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen einer Kryokultur erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen schnell mit 5 ml FKS gemischt und 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml des dem Zelltyp entsprechenden Kulturmediums resuspendiert, in eine 10 cm - Platte oder eine T75 Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie oder FACS- (Fluorescence Activated Cell Sorter) Analyse können Zellcharakteristika wie Zellgröße, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Die Zellen werden durch einen Flüssigkeitsstrom geleitet, der es erlaubt, diese Parameter von jeder einzelnen Zelle zu erfassen. Hierfür werden die Zellen einem Argon-Laserstrahl ausgesetzt, der zum einen durch die Zellen gestreut wird und so die Werte für die Zellgröße FS (Forward Scatter) und Granularität SS (Side Scatter) liefert und zum anderen die in den Zellen vorhandenen Fluorochrome (wie z. B. Fluoreszein und EGFP) anregt, was zur Emission von Fluoreszenz charakteristischer Wellenlänge führt. Diese Fluoreszenz wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und dokumentiert.

Zur Analyse wurde das Durchflusszytometer Epics XL der Firma Coulter verwendet. Bei jeder Messung wurden die jeweiligen nicht-transduzierten Ausgangszelllinien als Negativkontrolle benutzt. Eine Messung umfasste 10 000 – 30 000 im FACS detektierte Ereignisse. EGFP und FITC gekoppelte Antikörper wurden im Kanal FL1, PE gekoppelte Antikörper im Kanal FL2 und PerCP gekoppelte Antikörper im Kanal FL3 gemessen.

Für die Sortierung von Zellen nach ihrer EGFP-Expression wurde das FACSVantage Gerät der Firma BD Bioscience verwendet. Bei jedem Sortiervorgang wurden ca. 100 000 $EGFP^+$-Zellen selektiert.
Zur Analyse der lin^- $Sca\text{-}1^+$ Subpopulation im murinen Knochenmark wurde das FACSCanto der Firma BD Bioscience verwendet.

2.3.4 Antikörperfärbung

Zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen wurden Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-, Phycoerythin (PE)- oder Peridinin-Chlorophyllprotein (PerCP)-gekoppelte Antikörper gegen den nachzuweisenden Oberflächenmarker entsprechend der vom Hersteller angegebenen Konzentration eingesetzt. Nach Zugabe des Antikörpers zur Zellsuspension wurde der Ansatz gemischt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und mit 3,8 %igem Formalin in PBS für 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut gewaschen, anschließend in FACS-Puffer resuspendiert und am Duchflusszytometer oder FACS analysiert.

2.3.5 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit RetroNektin©

Zur Optimierung der Gentransfereffizienz in hämatopoetische Zellen wurden humane und murine primäre hämatopoetische Zellen auf RetroNektin-beschichteten Plastikoberflächen transduziert. Retronektin ist ein rekombinantes Fibronektinfragment mit virus- und zellbindenden Domänen (Moritz et al., 1996). Die Beschichtung von Kulturgefäßen, die nicht für die Gewebekultur vorbehandelt waren, mit Retronektin (4 $\mu g/cm^2$) in PBS erfolgte für über Nacht bei 4°C. Nach der Beschichtung wurden die Gefäße einmal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung noch freier Bindestellen auf den Oberflächen folgte eine 20minütige Inkubation mit PBS/2 % BSA und zwei anschließenden Waschschritten mit PBS.

2.4 Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie zur Produktion hochtitriger Virusüberstände

2.4.1 Transduktion von FNX-eco-Zellen mit GALV-Überständen

Für die Transduktion von FNX-eco-Zellen (Kinsella et al., 1996) wurden GALV-pseudotypisierte Überstände von monoklonalen stabilen PG13-Zellen (Miller et al., 1991) benutzt, die SF91-CDD-IRES-EGFP- oder SFβ1-EGFP-haltige Viren

produzieren (Bardenheuer et al., 2005). Hierzu wurden am Tag vor der ersten Transduktion $3x10^4$ FNX-eco-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte in DMEM (10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, P/S, 20 mM HEPES) ausgesät. Zur Transduktion wurden die Zellen je dreimal an drei aufeinander folgenden Tagen mit 1 ml GALV-pseudotypisiertem Überstand für 4 h mit 8 µg/ml Polybrene inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 - 2 Wochen kultiviert, durchflusszytometrisch auf ihren Anteil an $EGFP^+$-Zellen analysiert und zur Überstandproduktion eingesetzt.

2.4.2 Anreicherung transduzierter FNX-eco-Zellen

Die mit pSF91-CDD-IRES-EGFP und pSFβ1-EGFP transduzierten FNX-eco-Zellen wurden mittels FACS-Sorter angereichert. Hierbei wurden lediglich Zellen mit einer hohen EGFP-Expression selektiert (ca. 30 % aller EGPF-exprimierenden Zellen). Anschließend wurden die angereicherten Zellen für 2 Wochen kultiviert, auf ihren Anteil an $EGFP^+$-Zellen analysiert und zur Überstandproduktion eingesetzt.

2.4.3 Selektion einzelner Produzentenzellklone

Zur Erzeugung von Einzelzellklonen wurden die mittels FACS angereicherten Zellen mit einer Zelldichte von 2,5 Zellen / ml in einem Volumen von 10 ml auf 10 cm Platten ausgesät. Nach 7 – 13 Tagen konnten unter dem Lichtmikroskop einzelne Kolonien dieser Zellen unterschieden werden. Das Medium wurde abgesaugt, und die Platten wurden mit 5 ml PBS gewaschen. Hierbei war es wichtig, dass das PBS in der Umgebung der Kolonien vollständig abgesaugt wurde. Dadurch war es möglich, die Oberflächenspannung einzelner Tropfen (ca. 20 µl) Trypsin/EDTA in PBS, die auf die einzelnen Kolonien gegeben wurden, aufrechtzuerhalten. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Kolonien in den Trypsin/EDTA-Tropfen mit 20 µl-Pipettenspitzen resuspendiert und in die Vertiefungen von 24-Loch Platten mit je 2 ml frischem Medium überführt. Mit dieser Methode wurden 14 Kolonien der SFβ1-EGFP und 20 Kolonien der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten FNX-eco isoliert. Die Zellen wurden kultiviert, expandiert und anschließend auf den Anteil an $EGFP^+$-Zellen und die Höhe der EGFP-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Je zwei Klone mit hoher, mittlerer und niedriger Expression wurden zur Überstandproduktion und Analyse der Titer eingesetzt.

2.4.4 Produktion retroviraler Überstände

Zur Produktion retroviraler Überstände mittels stabiler Produzentenzelllinien wurden $5x10^6$ Zellen in 10 ml Kulturmedium (entsprechend des Produzentenzelltyps) pro 10 cm Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Wurden PG13-Zellen als Produzenten benutzt, wurde hierbei auf Medium mit 20 % FKS gewechselt (IMDM mit 20 % FKS, 2 mM L-Glu, 1 % P/S), um das optimale Kulturmedium für die spätere Transduktionsphase von primären humanen hämatopoetischen Zellen zu erhalten. Nach weiteren 24 h und 48 h wurde der Überstand abgenommen, filtriert (0,45 µm Porengröße) und bei –80°C gelagert.

2.4.5 Titration retroviraler Überstände

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Überstand enthalten sind. Die Titer der hergestellten Überstände wurden durch die Expression des Markergens EGFP in transduzierten Zielzellen ermittelt. Als Zielzellen für die Titration wurden 3T3-Zellen für ecotrope und HT1080-Zellen für GALV-pseudotypisierte Überstände verwendet.

Es wurden $3x10^4$ Zellen je Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Zellzahl pro Vertiefung bestimmt, und die Zellen wurden mit zunehmenden Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, und 1:1000) der Überstände transduziert. Hierzu wurden die Zellen in Doppelbestimmungen für 4 h mit je 1 ml der verdünnten bzw. unverdünnten Überstände zusammen mit 8 µg/ml Polybren inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere drei Tage in Kultur gehalten. Nachdem die Zellen geerntet wurden, wurden sie für 30 min bei RT mit 3,8%igem Formalin in PBS fixiert und durchflusszytometrisch 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 geschlossen werden:

Titer des retroviralen Überstandes [IE/ml] =
Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion X Anteil der $EGFP^+$-Zellen X Verdünnungsfaktor

2.5 In vitro-Analysen zur CDD-vermittelten Zytostatikaresistenz in humanen CD34$^+$-Zellen

2.5.1 Isolierung humaner CD34$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut

Zunächst wurden mononukleäre Zellen über Dichtezentrifugation mittels Ficoll aus dem Nabelschnurblut isoliert. Eine Nabelschnurblutprobe umfasste in der Regel ein Volumen von ca. 120 ml und wurde 1:2 mit PBS verdünnt. Je 30 ml verdünntes Blut wurden vorsichtig auf 20 ml Ficoll, das im 50 ml Röhrchen vorlag, geschichtet und für 50 min mit 1500 U/min zentrifugiert. Die Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, wurde entnommen und 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml CD34-Puffer aufgenommen und gezählt. Die CD34$^+$-Zellen wurden hieraus mittels magnetischer Zellseparierung (MACS; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers 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 Microbeads-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). Die Reinheit der Proben wurde anschließend durchflusszytometrisch nach Markierung mit FITC-gekoppeltem CD34-Antikörper bestimmt. Zusätzlich wurde noch mit PE-gekoppeltem CD38-Antikörper gefärbt, um den Anteil an sehr frühen Vorläuferzellen abzuschätzen.

2.5.2 Transduktion humaner CD34$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut

Nach der Aufreinigung wurden die CD34$^+$-Zellen auf eine Zellkonzentration von $5x10^5$ Zellen/ml IMDM eingestellt und für 24 h mit 10 ng/ml rh-IL3, 20 ng/ml rh-IL6 und 20 ng/ml rh-SCF in IMDM (20 % FKS, 2 % L-Glutamine, P/S) in 6-Loch Platten (2 ml pro Vertiefung) stimuliert.

Für die Transduktion wurde das Medium der stimulierten Zellen durch retroviralen Überstand ersetzt, indem je 2 ml Zellsuspension für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert wurde und das Zellsediment in 2 ml des retroviralen Überstandes (SF91-CDD-IRES-EGFP oder SFß1-EGFP) mit 10 ng/ml rh-IL3, 20 ng/ml rh-IL6 und 20 ng/ml rh-SCF resuspendiert wurde. Nach 2 h wurden abermals 2 ml Überstand

(einschließlich Wachstumsfaktoren) hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen ein zweites Mal auf gleiche Weise transduziert. 72 h nach Aufreinigung wurden die transduzierten Zellen geerntet. Hierbei wurden auch die am Boden haftenden Zellen durch zweiminütige Behandlung mit Trypsin/EDTA bei RT vom Gefäßboden abgelöst.

Um die Höhe der Transduktionsrate, gemessen über die EGFP-Markergenexpression, in $CD34^+$-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit PE-gekoppeltem CD34 und PerCP gekoppeltem CD45-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.3 FACS-Sortierung transduzierter $CD34^+$-Zellen

Für einige Experimente wurden $CD34^+$-Zellen nach der Transduktion mit IMDM (20 % FKS, 2 L-Glutamin, P/S) auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und mittels FACS (FACSVantage, Beckton Dickinson) über die EGFP-Expression angereichert („sortiert“). Nach dem Sortiervorgang wurden die Zellen in 1 ml reinem FKS aufgefangen.

2.5.4 CFU-Assay mit $CD34^+$-aufgereinigten Zellen aus humanem Nabelschnurblut

Der CFU-Assay 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 Zellmigration weitgehend verhindert. Reife hämatopoetische Zellen sterben gewöhnlich innerhalb weniger Tage, nachdem sie in Kultur genommen wurden, ab. Zellen, die hingegen als Nachkommen von Vorläuferzellen neu gebildet werden, bilden Kolonien, die in dem viskosen Medium unter dem Mikroskop leicht identifiziert werden.

Für die Experimente wurden $1 – 500 \times 10^3$ $CD34^+$-angereicherte Zellen in IMDM mit 0,9 % Methylzellulose, 35 % FKS, 10 ng/ml rh-IL 3, 20 ng/ml rh-IL 6, 20 ng/ml SCF, 6 U/ml EPO, 1000 U/ml G-CSF und 10 µM ß-Mercaptoethalnol und aufsteigenden Konzentrationen von AraC (0, 30, 60, 100, 300 und 500 nM) oder Gemcitabin (0, 1, 3, 6, 8, 10, 15 und 30 nM) in 35 mm-Platten als Triplikate ausgesät. Nach einer 10-14tägigen Inkubation in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 wurden die entstandenen Kolonien unter einem Phasenkontrastinversionsmikroskop ausgezählt. Hierbei wurde morphologisch unterschieden zwischen CFU-GM, die Granulozyten

und Makrophagen enthalten, und BFU-E/CFU-Mix, die erythropoetische Zellen enthalten. Es wurden nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen berücksichtigt.
Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Koloniezahlen der Triplikate in Abwesenheit von Cytarabin gleich 100 % gesetzt. Die Mittelwerte der Triplikate in Anwesenheit von Cytarabin konnten nun relativ dazu in Prozent angegeben werden.

2.5.5 In vitro-Selektion mit AraC

Die transduzierten$CD34^+$-Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit einer Zellkonzentration von 1 x 10^4 Zellen/ml in einem Volumen von je 2 ml IMDM (20 % FKS, 2mM L-Glutamin, 1 % P/S, 10 ng/ml rhIL-3, 20 ng/ml rhIL-6, 20 ng/ml rhSCF, 10^3 U/ml rhG-CSF) ausgesät. AraC wurde in den Konzentrationen 30, 60 oder 100 nM zugesetzt. Als Kontrolle dienten transduzierte CD34+ Zellen, denen kein AraC zugesetzt wurde. Nach 4 und 8 Tagen wurde der Anteil an transduzierten Zellen durchflusszytometrisch über die EGFP Expression ermittelt. Außerdem wurden nach 4 Tagen Selektionskultur CFU-Assays mit aufsteigenden Konzentrationen AraC durchgeführt.

2.6 In-vivo-Maus-Knochenmarktransplantationsmodell

Um einen potenziellen Schutz der Hämatopoese vor AraC- und Gemcitabin-induzierter Myelosuppression durch die retrovirale Überexpression der Cytidindeaminase in vivo zu analysieren, wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell angewandt (Jansen et al., 2002), welches schematisch in Abbildung 15 (Abschnitt 3) dargestellt ist. Die einzelnen Schritte werden nachfolgend ausführlich beschrieben.

2.6.1 Isolierung muriner Knochenmarkzellen für die anschließende Transduktion und Transplantation

Acht - zehn Wochen alte weibliche Knochenmarkspendertiere des Mausstammes C57Bl/6J wurden 72 h vor Isolierung des Knochenmarks 150 mg/kg Körpergewicht Fluoruracil intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Isolierung des Knochenmarks wurden die Tiere durch Genicküberstreckung getötet, und Tibia, Femur und Coxa wurden präpariert. Die Knochenmarkzellen wurden durch Spülen der Knochenmarkhöhlen mit IMDM mittels einer 20 ml-Spritze und einer G28-Kanüle isoliert. Anschließend wurden die Zellen durch ein 70 µm-Zellsieb filtriert, abzentrifugiert und für 7 min mit PharMLyse™ auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die resultierenden

mononukleären Zellen wurden anschließend für 48 h auf NTC-Platten (Non Tissue Culture-Platten; nicht beschichtete Zellkulturplatten) mit einer Zelldichte von 1-2x10^7 Zellen/ml in IMDM (20 % FKS, P/S, 2 mM L-Glutamin) mit 20 ng/ml rhIL6 und 20 ng/ml rmSCF stimuliert.

2.6.2 Transduktion muriner Knochenmarkzellen

Für die Transduktion der Knochenmarkzellen wurden Retronektin©-beschichtete 10 cm NTC-Platten mit jeweils 4 ml retroviralen Überstand für 30 – 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt. Auf die so beladenen Schalen wurden je 3 – 5 x 10^7 Zellen in 8 ml retroviralem Überstand mit 20 ng/ml rhIL-6 und 20 ng/ml rmSCF hinzugegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert (t = 0). Anschließend wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt. Die Transduktion wurde an Tag 2 (t = 24h) wiederholt. An Tag 3 wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen, das Kulturgefäß mit PBS gespült, die adhärenten Zellen zuerst mit Zelldissoziationspuffer inkubiert und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst.

2.6.3 FACS-Sortierung transduzierter Knochenmarkzellen

Eines der Transplantationsexperimente wurde mit Knochenmarkzellen durchgeführt, die nach der Transduktion mittels FACS über ihre EGFP-Expression angereichert wurden. Hierfür wurde pro Vektor eine Zellzahl von 1 x 10^7 Knochenmarkzellen/ml eingestellt. Um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern, wurden den Proben 50 mM EDTA in PBS hinzugefügt. Nach dem Sortiervorgang wurden die Zellen in FKS aufgefangen, für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und anschließend für die Transplantation mit IMDM auf eine Zellkonzentration von 1-2 x 10^6 Zellen/200 µl eingestellt.

2.6.4 Transplantation transduzierter Knochenmarkzellen

Vor der Transplantation erhielten die 8-10 Wochen alten weiblichen C57Bl/6J Mäuse eine Ganzkörperbestrahlung mit einer letalen Dosis von 10 Gy, verteilt auf zwei Zyklen im Abstand von 4 Stunden (7 + 3 Gy). Anschließend wurden 1 - 2 x 10^6 SF91-CDD-IRES-EGFP- bzw. SFβ1-EGFP-transduzierte Zellen in einem Volumen von 200 µl IMDM (ohne Zusätze) in die Schwanzvene eines jeden Tieres injiziert. Diese Tiere werden im Folgenden als CDD- bzw. Kontroll-transduzierte Tiere bezeichnet.

2.6.5 Zytostatikabehandlung und Blutanalyse der Empfängermäuse

Den Empfängermäusen wurde 24 - 27 Tage nach der Transplantation Blut aus der Schwanzvene entnommen, um die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu kontrollieren und um Ausgangswerte für die Zellzahlen der Granulozten, Lymphozyten und Thrombozyten im peripheren Blut zu bestimmen. Zusätzlich wurde mittels durchflußzytometrischer Analyse der Anteil an $EGFP^+$-Zellen der Granulozyten und Lymphozyten im peripheren Blut bestimmt. Drei Tage später wurde mit der Zytostatikabehandlung begonnen. Als Kontrolle wurde ein Teil der CDD- und Kontroll-transduzierten Tiere nicht mit Zytostatika behandelt.

Zur Behandlung mit AraC wurde an 4 aufeinander folgenden Tagen jeweils 500 mg/kg Körpergewicht AraC in 0,9 %igem NaCl und zur Behandlung mit Gemcitabin an 2 oder 3 aufeinander folgenden Tagen jeweils 250 mg/kg Körpergewicht Gemcitabin in 0,9 %igem NaCl i.p. injiziert.

Die Zellzahlen im peripheren Blut wurden 1, 4 und 8 Tage nach der letzten Injektion bestimmt. Am 8. Tag wurde zusätzlich der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten und -Lymphozyten im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt, um eine potenzielle Anreicherung transduzierter Zellen zu detektieren. Um dabei zwischen Granulozyten und Lymphozyten im peripheren Blut zu unterscheiden, wurde in zwei Ansätzen durch Färbung mit einem granulozytenspezifischen, PE-konjugierten α-GR-1 monoklonalen Antikörper (mAK) bzw. mit den lymphozytenspezifischen mAK α-B220 PE (B-Zellen) und dem α-CD3e PE mAK (T-Zellen) gefärbt. Hierzu wurden je 50 µl heparinisiertes Blut zur Lysierung der Erythrozyten mit 2 ml PharMLyse-Puffer für 7 min auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen, nach Zentrifugation in 100 µl FACS-Puffer mit je 2 µl des entsprechenden Antikörpers aufgenommen und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3,8%igem Formaldehyd für 30 min fixiert und in 200 µl FACS-Puffer durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.6 Analyse von Knochenmark und Milz am Experimentsende

Am Experimentsende wurde den überlebenden Tieren die letzte Blutprobe entnommen, und anschließend wurden sie durch Genicküberstreckung getötet. Diesen Tieren wurde neben Tibia, Femur und Coxa auch die Milz entnommen. Das Knochenmark wurde wie unter Abschnitt 2.6.1 beschrieben isoliert und analog zum peripheren Blut mit den mAK α-GR-1 PE, α-B220 PE und α-CD3e PE im

Durchfluszytometer (Epics XL, Coulter) analysiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit den murinen Antikörpern Sca-1 APC, c-kit APC-Cy7 und einem PE-markierten Lineage-Cocktail, bestehend aus den mAK α-GR-1 PE, α-B220 PE, α-CD3e PE, PanNK PE, Ter119 und CD11b, gefärbt und im FACSCanto analysiert.
Aus der Milz wurden die Zellen isoliert und durch ein 70 µm-Zellsieb filtriert. Für die nachfolgende FACS-Analyse wurden die Zellen mit α-B220 PE oder α-CD3e PE gefärbt.

2.6.7 CFU-Assay mit mononukleären Zellen aus murinem Knochenmark

5×10^4 mononukleäre Zellen aus murinem Knochenmark wurden in einem Milliliter IMDM mit 0,9 % Methylzellulose, 35 % FKS, 10 ng/ml rh-IL 3, 20 ng/ml rm-SCF, 6 U/ml EPO, 1000 U/ml G-CSF und aufsteigenden Konzentrationen von AraC (0, 30, 60, 100, 500 und 1000 nM) in 35 mm-Petrischalen ausplattiert und für 7 Tage inkubiert. Die Auszählung der Kolonien (>50 Zellen) erfolgte unter einem Phasenkontrastinversionsmikroskop.

2.6.8 Bestimmung der Enzymaktivität der CDD in Knochenmark- und Milzzellen

1×10^7 Knochenmark- oder Milzzellen, die als Zellsedimente bei -80°C lagerten, wurden in 200 µl 5 mM Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert. Durch 4 Zyklen Einfrieren (in flüssigem Stickstoff), Auftauen (im 37°C Wasserbad) und „Vortexen“ wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Lysate 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes, der dem Gesamtproteingehalt des Zytoplasmas der Zellen entspricht, wurde mittels „Advanded Protein Assay Reagent“ nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zur Bestimmung der CDD-Enzymaktivität wurde Lysat mit einem Gehalt von 0,02 – 0,2 mg Protein in 100 µl Tris/Acetat-Puffer pH 7,4 mit 2 mM Gemcitabin aufgenommen und für 0 oder 60 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde jeweils durch Zugabe von 300 µl Methanol gestoppt. Die Abnahme des Substrates Gemcitabin und die Zunahme des durch die CDD umgesetzten Endproduktes dFdU wurde mittels HPLC bestimmt, die freundlicherweise von Herrn Mathias Gruber aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ralf Hilger (Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen) durchgeführt wurde. Die CDD-Enzymaktivität wurde als U/mg (bezogen auf Gesamtprotein im Zelllysat) angegeben, wobei U als nmol abgebautes Gemcitabin/min definiert wurde.

2.7 Statistische Analysen

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Werten verschiedener Versuchsgruppen wurde der Student'sche t-Test benutzt, wenn die Messwerte eine einer Gaußschen Normalverteilung folgten, ansonsten wurde der Mann-Whitney-Test benutzt. In beiden Fällen wurden p-Werte <0,05 als statistisch signifikant angesehen. Für Korrelationsanalysen wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r berechnet. Hierbei gilt allgemein, dass für r-Werte >0,67 eine starke, zwischen 0,34 und 0,66 eine mittelstarkte, zwischen 0 und 0,33 eine schwache und für r = 0 keine Korrelation besteht.

Wenn nicht anders gekennzeichnet sind Mittelwerte ± SEM (Standard Error of Mean, entspricht dem Quotienten aus Standardabweidung und der Wurzel aus n) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung hochtitriger ecotroper retroviraler Überstände

Lange Zeit gehörte eine niedrige und für therapeutische Zwecke ungenügende Gentransfereffizienz bei der Transduktion primitiver hämatopoetischer Zellen zu den Hauptproblemen des retroviralen Gentransfers mittels C-Typ-Retroviren. Obwohl diese Situation inzwischen durch den Einsatz geeigneter hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, die Verwendung von Fibronektinfragmenten während der Transduktion, den Einsatz pseudotypisierter viraler Partikel mit erhöhter Bindungsspezifität für hämatopoetische Stammzellen sowie die Optimierung der Transgenexpression von den retroviralen Vektorkonstrukten deutlich verbessert wurde (Moritz et al., 1998b; Halene et al., 2000), existieren nach wie vor häufig Probleme bei der Herstellung von Viruspräparationen mit gleichbleibend hohen Titern.

Im der vorliegenden Arbeit wurde der retrovirale Gentransfer der CDD sowohl im humanen als auch im murinen System untersucht. Für die Infektion von humanen Zellen standen bereits stabile PG13 Produzentenzelllinen zur Verfügung, welche die Herstellung GALV-pseudotypisierter Vektoren (nachfolgend SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP genannt) mit Titern von 2 x 10^4 IE/ml ermöglichen (Bardenheuer et al., 2005). Zur Transduktion muriner hämatopoetischer Zellen mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP wurden zusätzlich hochtitrige ecotrope retrovirale Präparationen benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

3.1.1 Transiente Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung ecotroper Viruspräparationen

Zur Herstellung geeigneter ecotroper Viruspartikel wurde zunächst die Methode der transienten Transfektion von 293T-Zellen angewendet, eine verbreitete Methode, um zeitsparend hochtitrige virushaltige Überstände herzustellen. Die Transfektion dieser Zellen wurde mit den drei Plasmiden SF91-CDD-IRES-EGFP, K73 (enthält das Gen für das ecotrope Hüllprotein) und pHIT60 (enthält das gag/pol-Gen) (Soneoka *et al.*, 1995) durchgeführt. Hiermit konnte in 11 Experimenten ein maximaler Titer von 1 x 10^5 IE/ml (Infektiöse Einheiten/ml) erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Überstände wurden dann benutzt, um primäre Knochenmarkzellen von C57BlJ/6-Spendermäusen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu transduzieren. Mittels

Durchflusszytometer wurde 24 h nach Transduktion der Anteil an $EGFP^+$-Zellen als Maß für die Gentransfereffizienz bestimmt. Hierbei wurden jedoch keine $EGFP^+$-Zellen detektiert. Demnach ist für den Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP ein Titer von 1×10^5 IE/ml in ecotropen Überständen erwartungsgemäß nicht ausreichend, um primäre hämatopoetische Zellen erfolgreich zu transduzieren.

3.1.2 Generierung einer stabilen polyklonalen FNX-eco-Produzentenzellinie

Die Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie ist eine gebräuchliche Alternative zur Überstandsproduktion mittels transienter Transfektion. Die auf 293T Zellen basierende FNX-eco Zelllinie hat das eco/env- und das gag/pol-Konstrukt bereits stabil in ihrem Genom integriert. Somit muß nur noch der retrovirale Vektor, der das Transgen enthält, in die Zelle eingebracht werden. Dies erfolgte für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Produzentenlinien durch die retrovirale Transduktion mit GALV-pseudotypisierten Viren. Für die Erzeugung GALV-pseudotypisierter retroviraler Partikel für die Vektoren pSF91-CDD-IRES-EGFP und pSFβ1-EGFP standen dabei die bereits oben erwähnten stabilen PG13-Produzentenzellen zur Verfügung. Um stabile ecotrope Produzentenzellen zu erzeugen, wurden diese Überstände zur dreimaligen Transduktion von FNX-eco-Zellen benutzt. Die Transduktionsraten wurden wiederum durchflusszytometrisch über die EGFP-Expression bestimmt und lagen bei 7,5% für den Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP und bei 19.1% für den Vektor SFβ1-EGFP.

Anschließend wurden diese polyklonalen Produzentenzellen benutzt, um retrovirushaltige Überstände herzustellen. Die Titer dieser Überstände lagen bei Titration auf NIH3T3-Zellen für beide Vektoren bei 2×10^4 IE/ml. Um diesen Titer zu erhöhen, wurden die polyklonalen Produzentenzellen für weitere 10–20 Tage kultiviert, expandiert und anschließend nach der Höhe ihrer EGFP-Expression mittels Durchflusszytometer sortiert. Hierzu wurden zunächst intakte Zellen anhand ihres Forward und Side Scatters identifiziert. Im Anschluss wurden hoch EGFP-exprimierende Zellen sortiert, während niedrig exprimierende ausgeschlossen wurden (Abbildung 7a). Danach wurden diese Zellen durchflusszytometrisch analysiert, um den Erfolg der Sortierung zu kontrollieren. Die Anreicherung resultierte in 87,7% $EGFP^+$-Zellen für den Vektor SFβ1-EGFP (Abbildung 7b, rechte Seite) und in 85,4% $EGFP^+$-Zellen für den Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP.

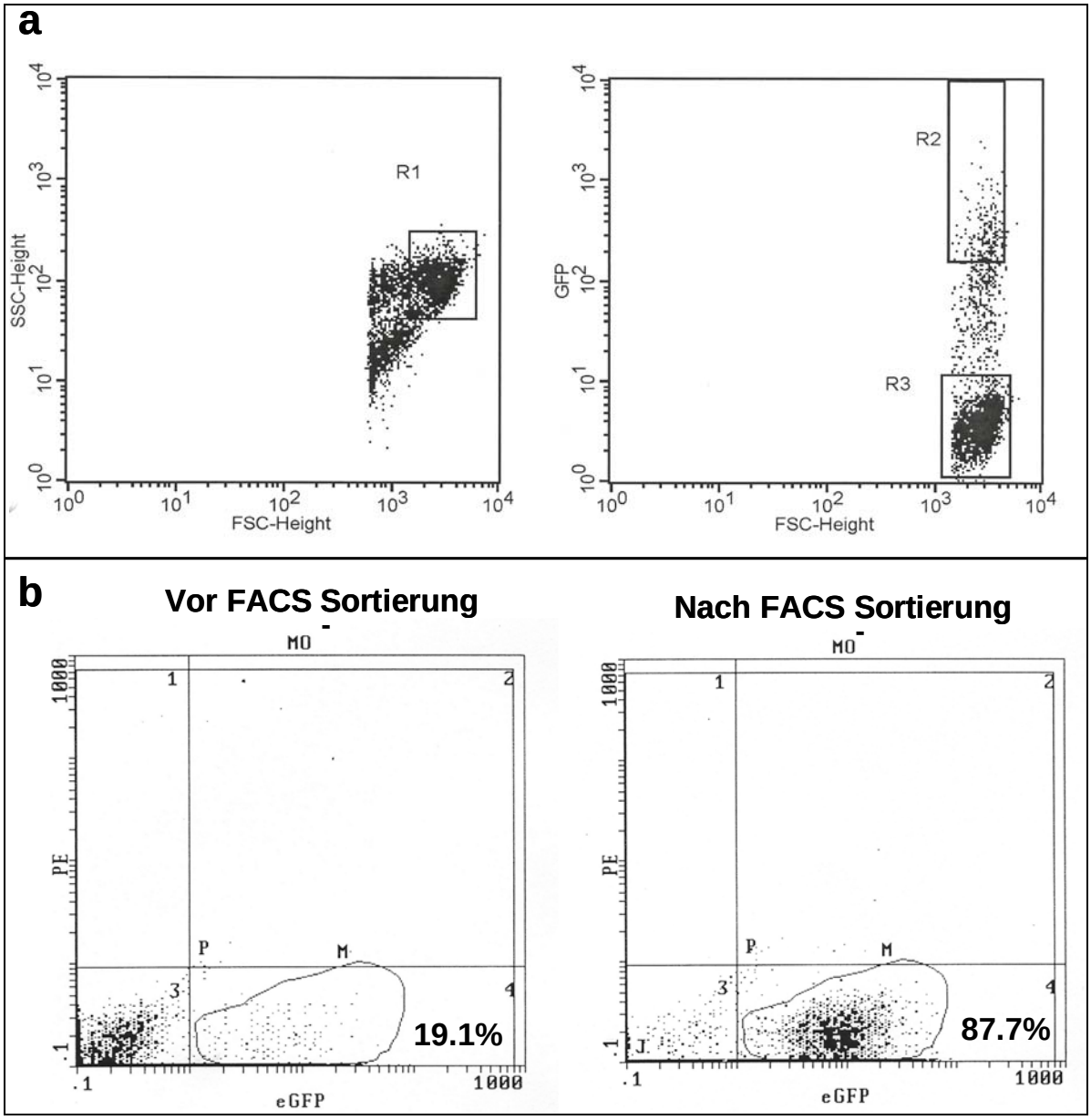

Abbildung 7: FACS-Sortierung von polyklonalen Produzentenzellen anhand der EGFP-Expression am Beispiel des Vektors SFβ1-EGFP. a) linke Seite: side scatter (SSC) gegen forward scatter (FSC) zur Identifizierung von lebenden Zellen (Bereich R1); rechte Seite: grüne Fluoreszenz gegen FSC zur Identifizierung von hoch EGFP exprimierenden Zellen, die angereichert wurden (Bereich R2); b) durchflusszytometrische Analyse der Produzentenzellen vor Sortierung (linke Seite) und nach Sortierung (rechte Seite).

Von diesen sortierten Zellen wurden wiederum Überstände geerntet und deren Virustiter mit den Titern der Überstände verglichen, die vor der Sortierung erhalten wurden. Mittels der FACS-Sortierung konnten die Virus-Titer dabei um das 15-fache für SF91-CDD-IRES-EGFP (von $2x10^4$ auf $3x10^5$ IE/ml) und um das 25-fache für SFβ1-EGFP (von $2x10^4$ auf $5x10^5$ IE/ml) erhöht werden (Abbildung 8).

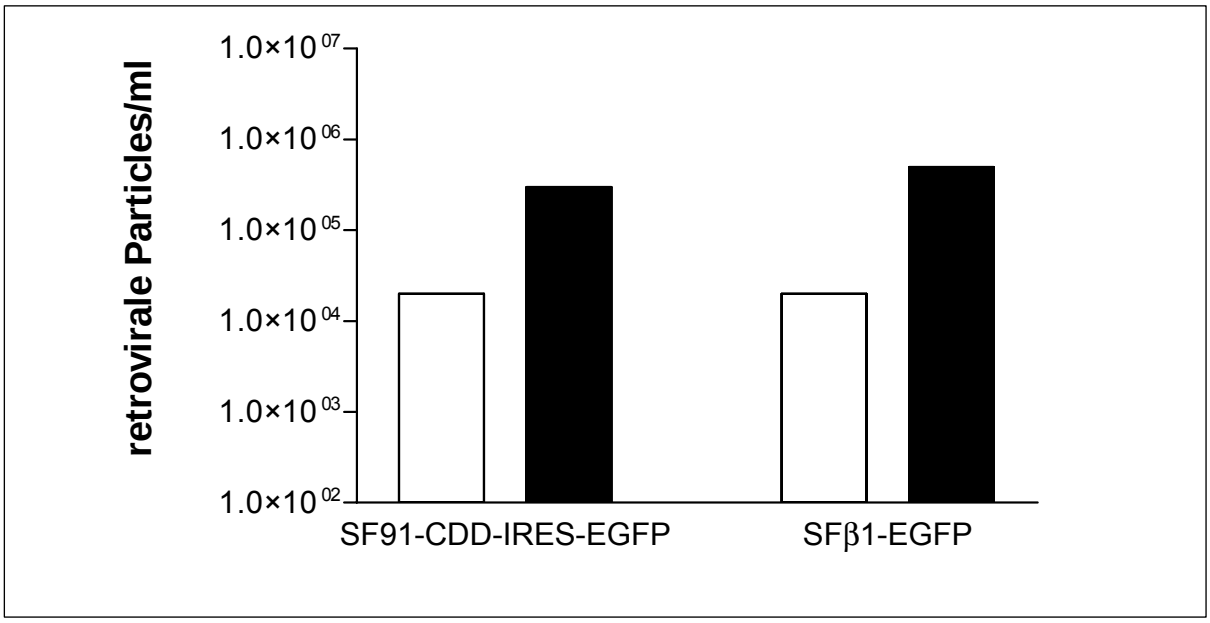

Abbildung 8: Anstieg der retroviralen Titer durch FACS-Sortierung transduzierter FNXeco-Produzentenzelllinen anhand der EGFP- Expression. weiß: vor Sortierung, schwarz: nach Sortierung

3.1.3 Stabilität der polyklonalen Produzentenzelllinie

Die Stabilität der Virusproduktion der FACS-sortierten polyklonalen Produzentenzellen wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen exemplarisch für die SFβ1-EGFP-Produzentenzellen untersucht. Hierbei wurde eine hohe Stabilität dieser polyklonalen Produzentenzellen beobachtet. Überstände, die 1, 3, 5 und 8 Wochen nach FACS Sortierung abgenommen wurden, zeigten stabile Titer mit $3x10^5$, $4x10^5$, $4x10^5$ und $5x10^5$ IE/ml.

3.1.4 Selektion einzelner hochtitriger Produzentenzellklone

Um zu analysieren, ob ausgewählte Subklone einen höheren Titer im Vergleich zu der generierten polyklonalen Produzentenzelllinie erzeugen konnten, wurden einzelne Klone der polyklonalen stabilen SF91-CDD-IRES-EGFP- und SFβ1-EGFP -Prozuzentenzelllinien durch limitierte Verdünnung erzeugt. Hierzu wurden die Zellen in einer so hohen Verdünnung (25 Zellen/Platte) auf 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät, dass nach 1 - 2 Wochen Kultur deutlich voneinander abgegrenzte einzelne Kolonien identifiziert und isoliert werden konnten. Für SFβ1-EGFP wurden auf diese Weise 14 Klone und für SF91-CDD-IRES-EGFP 20 Klone erhalten. Nach Zellexpansion wurde von diesen Klonen durchflusszytometrisch die durchschnittliche emittierte Fluoreszenzintensität (MFI, Mean Fluorescence Intensity) bestimmt, die ein

Maß für die Höhe der EGFP-Expression darstellt. Diese lag für die SF91-CDD-IRES-EGFP Klone im Bereich von 4,7 bis 35,0 und für die SFβ1-EGFP-Klone im Bereich von 4,1 bis 72,6. Von diesen Klonen wurden je zwei Klone mit hoher, mittlerer und niedriger EGFP-Expression (MFI) zur Überstandsproduktion ausgewählt und die Höhe der retroviralen Titer miteinander verglichen (s. Tabelle 1). Für beide Vektoren wurden mit dieser Methode individuelle Klone identifiziert, die besonders hochtitrige Überstände produzieren konnten. Die höchsten Titer waren hierbei $6x10^6$ IE/ml für SF91-CDD-IRES-EGFP und $2x10^6$ IE/ml for SFβ1-EGFP. Beim Vergleich dieser Titer mit Überständen der polyklonalen Produzentenzellen zeigte sich somit nochmals eine 20-fache Erhöhung für SF91-CDD-IRES-EGFP (von $3x10^5$ auf $6x10^6$ IE/ml) sowie eine 4-fache Erhöhung für SFβ1-EGFP (von $5x10^5$ auf $2x10^6$ IE/ml).

Sowohl Viruspräparationen der polyklonalen als auch der monoklonalen Produzentenzellen (SC11 für SF91-CDD-IRES-EGFP und SC5 für SFβ1-EGFP) wurden für die in Abschnitt 3.3 beschriebenen In-Vivo-Experimente benutzt.

Tabelle 1: Titer und EGFP-Expression individueller Produzentenzell-Klone.

Vektor	Klon	EGFP-Expression [MFI]	Titer [IE/ml]
SF91-CDD-IRES-EGFP	SC9	35.0 (h)*	6×10^6
	SC12	30.2 (h)	8×10^4
	SC18	13.2 (m)	3×10^5
	SC20	12.6 (m)	2×10^4
	SC14	5.0 (n)	1×10^5
	SC11	4.7 (n)	0
SFβ1-EGFP	SC3	72.6 (h)	6×10^4
	SC11	40.6 (h)	0
	SC5	11.9 (m)	2×10^6
	SC12	10.8 (m)	9×10^4
	SC10	5.7 (n)	0
	SC1	4.1 (n)	2×10^5

*kennzeichnet Klone mit hoher (h), mittlerer (m) und niedriger (n) EGFP-Expression

3.2 In-vitro-Untersuchungen zum CDD-Gentransfer in humane hämatopoetische Vorläuferzellen

Zum Zeitpunkt dieser Doktorarbeit war bereits gezeigt worden, dass der retrovirale Gentransfer der CDD humane hämatopoetische Zellen in vitro vor AraC schützt (Bardenheuer et al., 2005). Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde nun untersucht, ob die CDD in humanen hämatopoetischen Zellen auch gegenüber Gemcitabin, einem weiteren vielversprechenden Cytidinanalogon, welches auch zur Behandlung solider Tumore eingesetzt wird, einen Schutz vermittelt.

3.2.1 Gemcitabin Resistenz CDD-transduzierter CFU-GM und BFU-E/CFU-Mix

Die Frage, ob der CDD-Gentransfer in primären hämatopoetischen Zellen auch Resistenz gegenüber Gemcitabin vermittelt, wurde anhand $CD34^+$ klonogener Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut untersucht. Hierzu wurde der CFU (Colony Forming Units) Assay angewandt, mit dem die klonogenen Vorläuferzellen innerhalb der $CD34^+$-Fraktion der Nabelschnurblutzellen, von denen ca. 10 % im halbfesten Medium nach 10 - 14 Tagen Kolonien bilden, nachgewiesen werden können. Bei diesen Kolonien wurde auf Grund der Morphologie unterschieden zwischen den CFU-GM (Colony Forming Units - Granulocytes and Macrophages), die myeloische Vorläuferzellen enthalten, den BFU-E (Burst Forming Units Erythroid), die erythropoetische Vorläuferzellen enthalten und den CFU-Mix, die sowohl erythroide als auch myeloische Vorläuferzellen enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die BFU-E und die CFU-Mix bei der Auswertung in einer Gruppe zusammengefasst, weil sie insbesondere im Nabelschnurblut nur schwer voneinander zu unterscheiden sind.

In vier Experimenten wurden $CD34^+$-Zellen aus Nabelschnurblut (Reinheitsgrad: 86,5 ± 2,8 % $CD34^+$) mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP oder SFβ1-EGFP (Kontrolle) transduziert. Anschließend wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch sortiert und angereichert. Der Anteil am $EGFP^+$-Zellen lag im Bereich zwischen 14,0 und 41,3 % vor der Sortierung und zwischen 69 und 96 % nach der Sortierung. Anschließend wurden diese sortierten Zellen für 10 - 14 Tage im CFU-Assay in Methylzellulose kultiviert und dabei Gemcitabin-Konzentrationen von 1 bis 30 nM ausgesetzt.

Für CDD-transduzierte Zellen konnte eine erhöhte Gemcitabin-Resistenz der klonogenen Vorläuferzellen in einem Dosisbereich von 3 bis 30 nM festgestellt

werden. In Bezug auf die Zahl aller Kolonien (CFU-C) war dieser Unterschied statistisch signifikant für die Konzentrationen 8 und 10 nM Gemcitabin (Abbildung 9a). Der beobachtete Schutzeffekt war hierbei in den myeloisch differenzierten Vorläuferzellen (CFU-GM) stärker ausgeprägt als in den erythroiden Vorläuferzellen (BFU-E). Während für die CFU-GM ein signifikanter Schutz im Bereich von 3 – 15 nM zu beobachten war (Abbildung 9b), zeigten die BFU-E/CFU-Mix einen signifikanten Schutz nur für 8 nM (Abbildung 9c).

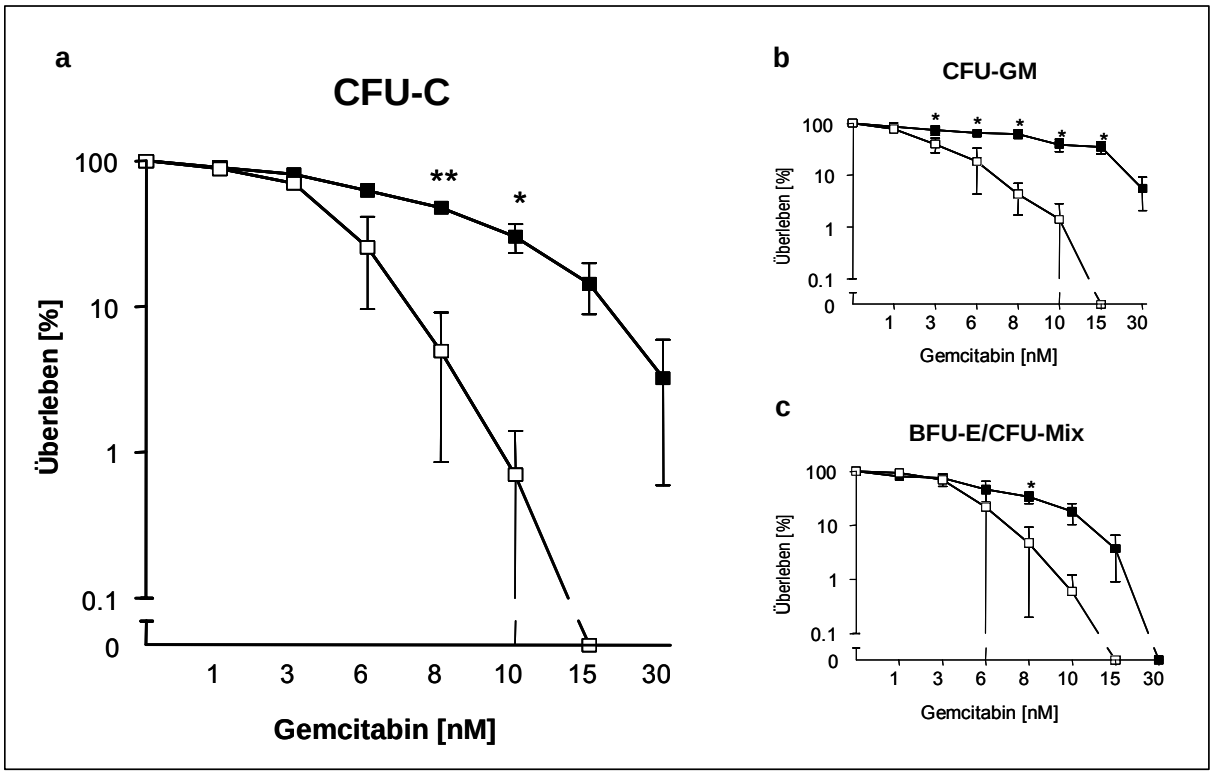

Abbildung 9: Gemcitabin Resistenz CDD transduzierter CFU-C. Das Überleben von CFU-C (a), CFU-GM (b) und BFU-E/CFU-Mix (c) in $CD34^+$ angereicherten, SFβ1-EGFP- (□) oder SF91-CDD-IRES-EGFP- (■) transduzierten und anschließend EGFP-selektionierten Nabelschnurblutzellen ist angegeben als Mittelwerte ± SEM (n = 4). */** zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05/0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen an (Student´scher t-Test)

Der Schutzeffekt zeigte sich auch bei der Betrachtung der IC_{50}-Werte (Tabelle 2), d.h. der Gemcitabin-Dosis, bei der 50 % der Kolonien inhibiert wurden. Hier war nach CDD Transduktion für die Gesamtheit der CFU-C im Durchschnitt eine 1,8-fache Erhöhung nachzuweisen, während für die CFU-GM eine 3,0-fache Erhöhung, für die BFU-E/CFU-Mix aber nur eine 1,4-fache Erhöhung beobachtet wurde.

Tabelle 2: Gemcitabin-Resistenz CDD-transduzierter klonogener Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

	IC_{50} [nM]		
	CDD	Kontrolle	CDD/Kontrolle
CDU-C	7,7 ± 0,6 *	4,6 ± 0,6	1,8 ± 0,3
CFU-GM	8,8 ± 1,8 *	3,1 ± 0,7	3,0 ± 0,2
BFU-E/CFU-Mix	5,9 ± 1,0 *	4,5 ± 1,0	1,3 ± 0,008

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n=4 Experimenten mit EGFP-sortierten Zellen; IC_{50}: Gemcitabin-Dosis, bei der 50% der Kolonien inhibiert wurden; CDD: SF91-CDD-IRES-EGFP-transduziert, Kontrolle: SFβ1-EGFP-transduziert; CDD/Kontrolle: Verhältnis der entsprechenden IC_{50} Werte. *zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollen an (Student´scher t-Test)

3.2.2 Gemcitabin-Resistenz CDD-transduzierter CFU-Mk

Die unterschiedliche Stärke der CDD-vermittelten Resistenz in den CFU-GM und den BFU-E/CFU-Mix sowie die besondere Bedeutung der Thrombozytopenie im Zusammenhang mit der klinischen Gabe von Gemcitabin führten dazu, den Grad der CDD-vermittelten Resistenz gegenüber Gemcitabin auch in den megakaryozytären Vorläuferzellen (CFU-Mk, Colony Forming Units Megakaryocytes) zu untersuchen.

Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit Frau A. Brückner im Rahmen ihrer Promotion ein Megakaryozyten-Assay durchgeführt, der auf einem ähnlichen Prinzip wie der oben beschriebene CFU-Assay basiert. Es wurden wiederum $CD34^+$-angereicherte Zellen aus Nabelschnurblut mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP oder SFβ1-EGFP (Kontrolle) transduziert und anschließend die EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch sortiert und angereichert. Diese Zellen wurden einem klonogenen Assay für CFU-Mk unterzogen und dabei ansteigenden Konzentrationen Gemcitabin ausgesetzt. Durch die Zugabe des Zytokinmixes Interleukin-3, Interleukin-6 und Thrombopoetin wurde zu ca. 90 % das Wachstum der CFU-Mk begünstigt, während anders differenzierte Vorläuferzellen abstarben. Durch Markierung mit einem Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIa (CD41) am Experimentende wurde sichergestellt, dass ausschließlich CFU-Mk ausgewertet wurden.

Wie Abbildung 10 zeigt, ist der CDD-vermittelte Schutz gegenüber Gemcitabin in den CFU-Mk besonders deutlich ausgeprägt. Für alle untersuchten Gemcitabindosierungen von 1 bis 30 nM Gemcitabin wurde ein deutlicher Unterschied des Wachstums zwischen CDD- und Kontroll-transduzierten CFU-Mk beobachtet. Dieser Unterschied war statistisch signifikant für Konzentrationen von 1

und 3 nM (p=0,01 und p=0,005). Für die Kontroll-transduzierten CFU-Mk lag der IC_{50}-Wert bei 0,6 ± 0,05 nM Gemcitabin. Dieser Wert liegt im Vergleich zu den CFU-GM (IC_{50}: 3,1 ± 0,7 nM) und den BFU-E/CFU-Mix (IC_{50}: 4,5 ± 1,0 nM) deutlich niedriger und zeigt eine deutlich höhere Empfindlichkeit der CFU-Mk gegenüber Gemcitabin an. Die CDD-transduzierten CFU-Mk haben jedoch im Vergleich zur Kontrolle einen 23,5fach höheren IC_{50}-Wert mit 13,6 ± 5,5 nM und sind somit deutlich besser gegenüber Gemcitabin geschützt als die anderen klonogenen Vorläuferzellen.

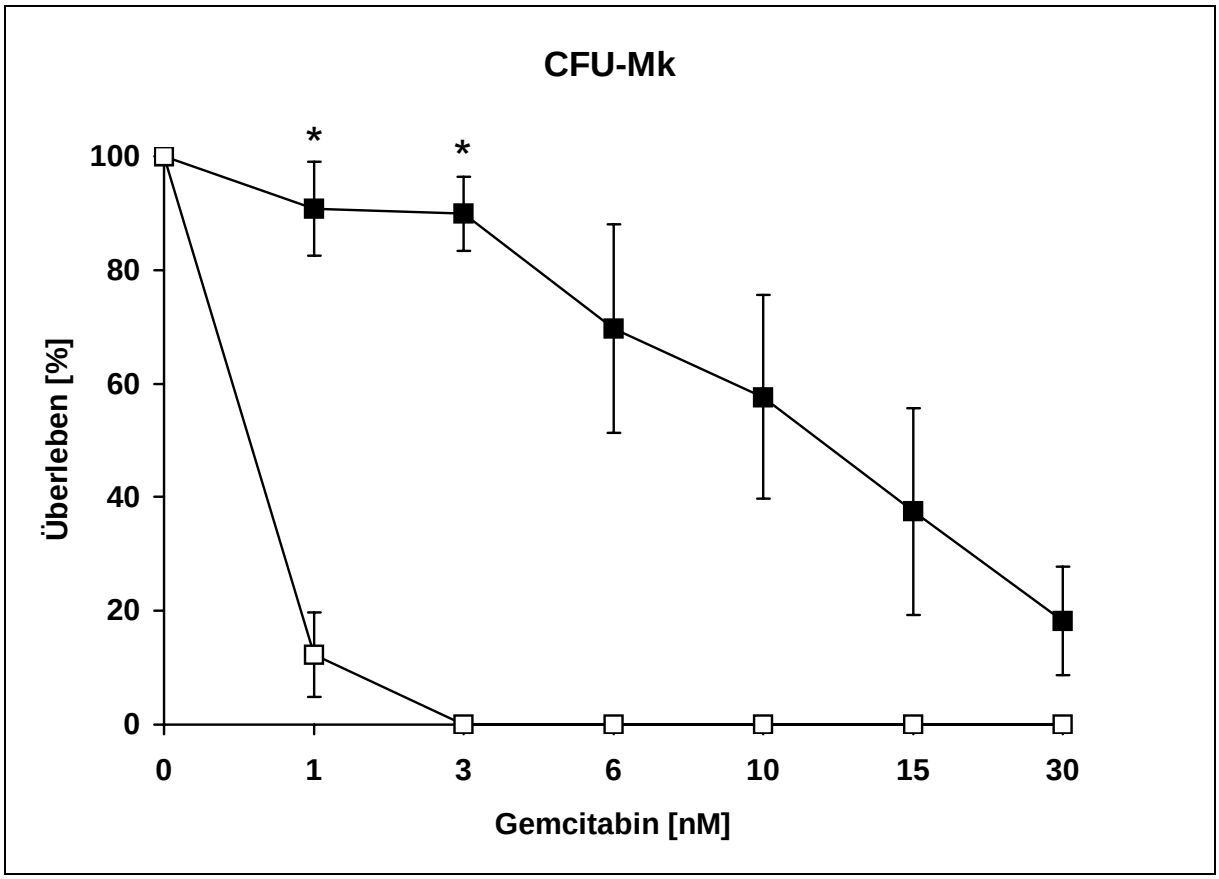

Abbildung 10: Gemcitabin Resistenz CDD-transduzierter CFU-Mk. Das Überleben von CFU-Mk in $CD34^+$-angereicherten SFβ1-EGFP- (□) oder SF91-CDD-IRES-EGFP- (■) transduzierten und anschließend $EGFP^+$-selektionierten Nabelschnublutzellen ist angegeben als Mittelwerte ± SEM (n = 3). *zeigt signifikante Unterschiede (p < 0,05) im Vergleich zu den Kontrollen an (Student´scher t-Test)

3.2.3 Inhibitorischer Effekt der CDD-Überexpression auf myeloische Vorläuferzellen

Interessanterweise wurde in den CFU-Assays ein inhibitorischer Effekt der CDD-Transduktion auf myeloische Vorläuferzellen beobachtet. So befanden sich bereits in den Kontrollkulturen bei Abwesenheit von Zytostatika 37,2 ± 5,2 % (n=5, p=0,007) weniger CDD-exprimierende CFU-GM im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Zellen (Abbildung 11), die nur mit EGFP transduziert wurden. Für die erythroiden

Vorläuferzellen und die CFU-Mk wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt.

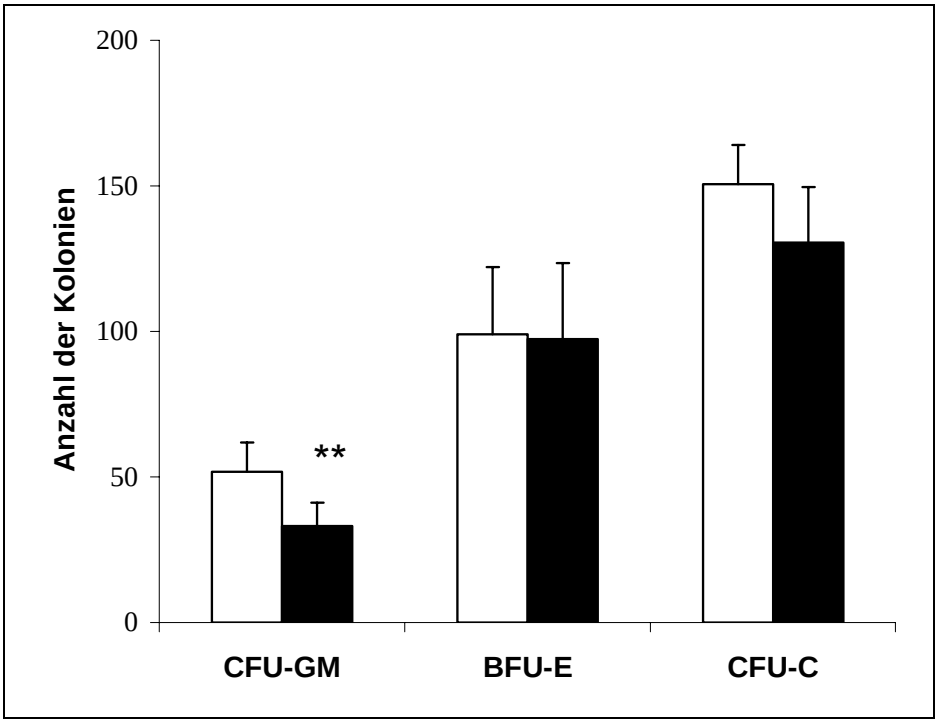

Abbildung 11: Effekt der CDD-Expression auf tranduzierte Zellen. Die Anzahl überlebender Kolonien im CFU-Assay nach Aussaat von 1000 nach der Transduktion anhand ihrer EGFP-Expression sortierten Zellen ist angegeben als Mittelwerte ± SEM **□:** SFβ1-EGFP-transduzierte Zellen**; ■:** SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierte Zellen; keine Zugabe von Zytostatika; ** zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0{,}01$, $n = 5$) im Vergleich zu SFβ1-EGFP transduzierte Zellen an (Student´scher t-Test).

3.2.4 In-vitro-Selektion CDD-tranduzierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen mittels AraC

Nachdem gezeigt worden war, dass der Gentransfer der CDD in humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen in vitro einen Schutz gegenüber den Cytidinanaloga AraC und Gemcitabin vermittelt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich diese CDD-transduzierten Zellen mit Cytidinanaloga anreichern lassen. Als Selektionsreagenz wurde hierbei AraC gewählt, weil diese Substanz schon deutlich länger existiert als Gemcitabin und daher auch im klinischen Einsatz besser etabliert ist.

Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten wurden $CD34^+$-Zellen aus humanem Nabelschnurblut mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP oder SFβ1-EGFP (Kontrolle) transduziert (Abbildung 12).

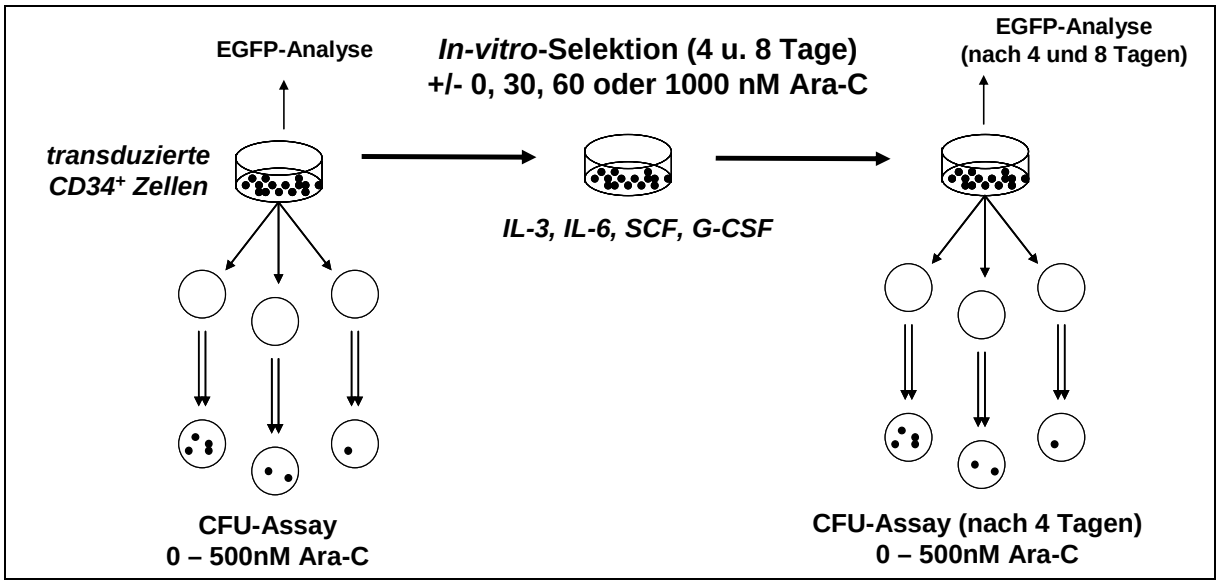

Abbildung 12: Versuchsaufbau zur In-vitro-Selektion mit AraC. Ein Teil der transduzierten CD34$^+$-Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurde im CFU-Assay eingesetzt, und ein anderer Teil wurde für 4 und 8 Tage in Suspensionskulturen mit Wachstumsfaktoren aufsteigenden AraC-Konzentrationen von 0, 30, 60 und 100 nM AraC ausgesetzt. Der Anteil an EGFP$^+$-Zellen wurde vor und nach der Selektionskultur durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde nach 4 Tagen Selektionskultur der CFU-Assay durchgeführt.

Ein Teil der transduzierten Zellen wurde direkt zur EGFP-Analyse und im CFU-Assay eingesetzt, und ein weiterer Teil der Zellen wurde über 4 oder 8 Tage mit und ohne Zusatz von AraC in einer Suspensionskultur gehalten. Dazu wurden die Zellen in einem zytokinhaltigen Medium mit 0, 30, 60 oder 100 nM AraC inkubiert. Im Anschluss an diese Selektionskultur wurde erneut der Anteil transduzierter EGFP$^+$-Zellen bestimmt sowie CFU-Assay zur Ermittlung der AraC-Resistenzen durchgeführt.

Der Anteil an EGFP$^+$-Zellen unmittelbar nach der Transduktion betrug 19,9 ± 2,5 % für die CDD- und 36,7 ± 3,3 % für die Kontroll-transduzierten Zellen. Sowohl nach 4tägiger als auch nach 8tägiger AraC-Exposition in Suspensionskulturen wurde für CDD-transduzierte Zellen im Vergleich zu Kontrollkulturen, die nicht mit AraC behandelt wurden, eine beträchtliche Anreicherung von EGFP$^+$-Zellen beobachtet (Abbildung 13). Diese Anreicherung war signifikant für alle drei getesteten AraC-Konzentrationen ($p<0,001$). Nach 4 Tagen Selektion wurde die höchste Anreicherung bei einer Konzentration von 60 nM AraC beobachtet, wobei ein Anstieg des Anteils von EGFP$^+$-Zellen von 25,2 ± 4,6 (0 nM AraC) auf 38,9 ± 5,7 % (n=10) für SF91-CDD-IRES-EGFP transduzierte Zellen beobachtet wurde. Nach 8-tägiger Selektionskultur wurde eine noch höhere Anreicherung erreicht. Hier war die höchste

Anreicherung bei einer Konzentration von 100 nM AraC mit einem Anstieg von 19,1 ± 5,1 (0 nM AraC) auf 46,0 ± 10,7 % (n = 7) zu beobachten.

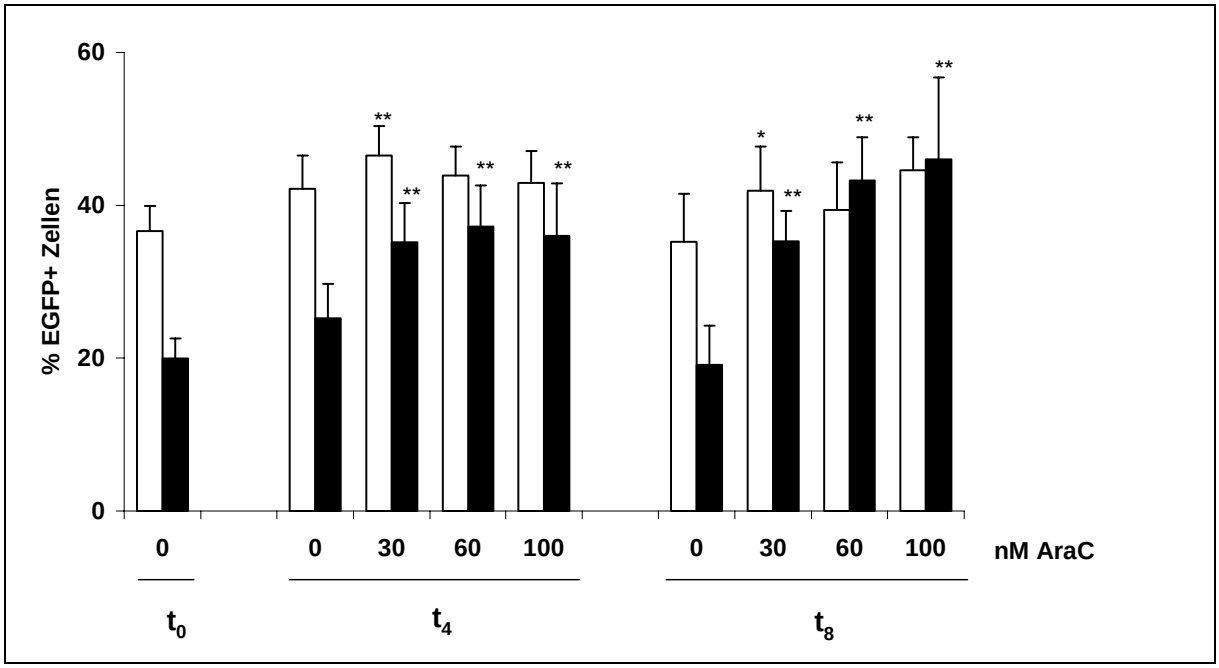

Abbildung 13: In-vitro-Selektion CDD-transduzierter Zellen mit AraC. Nach Transduktion mit SFβ1-EGFP (weiße Balken) oder SF91-CDD-IRES-EGFP (schwarze Balken) wurden $CD34^+$-Zellen aus Nabelschnurblut sofort einer EGFP-Analyse unterzogen (t_0) oder für 4 bzw. 8 Tage (t_4 und t_8) mit 0, 30, 60 oder 100 nM AraC in Suspensionskultur kultiviert. Der Anteil an $EGFP^+$-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist angegeben als Mittelwert ± SEM (n = 10 für t_4 und n = 7 für t_8). */** zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05/0,01$) im Vergleich zu Kulturen ohne AraC (Student'scher *t*-Test)

Eine moderate, aber signifikante Anreicherung von $EGFP^+$-Zellen wurde auch in der Kontroll-Gruppe bei einer Konzentration von 30 nM AraC beobachtet. Es wurde allerdings ein leichter Anstieg der $EGFP^+$-Zellen in Kulturen von CDD-transduzierten Zellen in Abwesenheit von AraC nach 4tägiger Suspensionskultur im Vergleich zu Tag 0 beobachtet. Am ehesten reflektieren diese Veränderungen die unterschiedlichen Proliferationscharakteristika von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen, da ein erfolgreicher retroviraler Gentransfer proliferierende Zielzellen benötigt. Diese proliferierenden Zellen könnten also auch einen Wachtstumsvorteil in der anschließenden Kultur haben, was sich nach einer 4-tägigen In-vitro-Kultur manifestiert. Eine weitere Anreicherung SFβ1-EGFP-transduzierter Zellen bei höheren AraC-Konzentrationen wird wahrscheinlich durch die zunehmende Toxität verhindert.

Zusätzlich wurde die funktionelle AraC-Resistenz der CFU-C nach 4-tägiger in vitro-Suspensionskultur (t_4) mit 0 oder 60 nM untersucht. Hierzu wurden die Zellen im

Anschluss an die Suspensionskultur im CFU-Assay aufsteigenden AraC-Konzentrationen von 0 - 500 nM ausgesetzt. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse für CFU-Assays, die zu den Zeitpunkten t_0 und t_4 durchgeführt wurden, verglichen. Hier wurde der anreichernde Effekt einer Konzentration von 60 nM AraC für transduzierte und somit vermehrt AraC-resistente CFU-C bestätigt. Dieser Effekt war besonders deutlich ausgeprägt bei höheren AraC-Konzentrationen und erreichte statistische Signifikanz für Vorläuferzellen, die in CFU-Assays resistent gegenüber 300 nM AraC waren. Bei dieser Konzentration zeigten nach vorheriger Exposition gegenüber 60 nM AraC 6,4 ± 1,3 % eine AraC-Resistenz gegenüber nur 2,5 ± 0,9 % (n = 4) der Vorläuferzellen aus Kontroll-Suspensionskulturen mit 0 nM AraC (Abbildung 14a,c). Ein ähnlicher Anstieg der AraC-Resistenz nach Suspensionskultur in 60 nM AraC wurde für CFU-GM festgestellt (Abbildungen 14b,d).

Dieser Anstieg an funktioneller AraC-Resistenz ging einher mit einer erhöhten Transgenexpression, gemessen anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) des EGFP-Markergens. So wurde nach 4 Tagen Kultur in Gegenwart von 30, 60 oder 100 nM AraC eine moderate, jedoch signifikante Steigerung der MFI von 29,9 ± 3,0 (0 nM AraC) auf 34,7 ± 4,1 (30 nM AraC, $p = 0,03$), 36,1 ± 4,8 (60 nM AraC, $p = 0,009$) oder 38,8 ± 5,3 ($p = 0,026$) beobachtet (n = 11; alle MFIs in relativen Einheiten). Diese erhöhte EGFP-Expression lässt indirekt darauf schließen, dass auch die CDD höher exprimiert wird, weil die Expression beider Gene über denselben Promotor (5'-LTR) reguliert wird und durch die Verknüpfung beider Konstrukte über eine IRES (internal ribosomal entry site) eine Koexpression erfolgen sollte (Aran et al., 1994). Da allerding das Gen, welches 3' der IRES positioniert ist, eher geringer exprimiert wird (Zhou et al., 1998; Flasshove et al., 2000), ist davon auszugehen, dass die oben genannten MFI-Werte nicht exakt mit dem Expressionsniveaus der CDD gleichzusetzen sind.

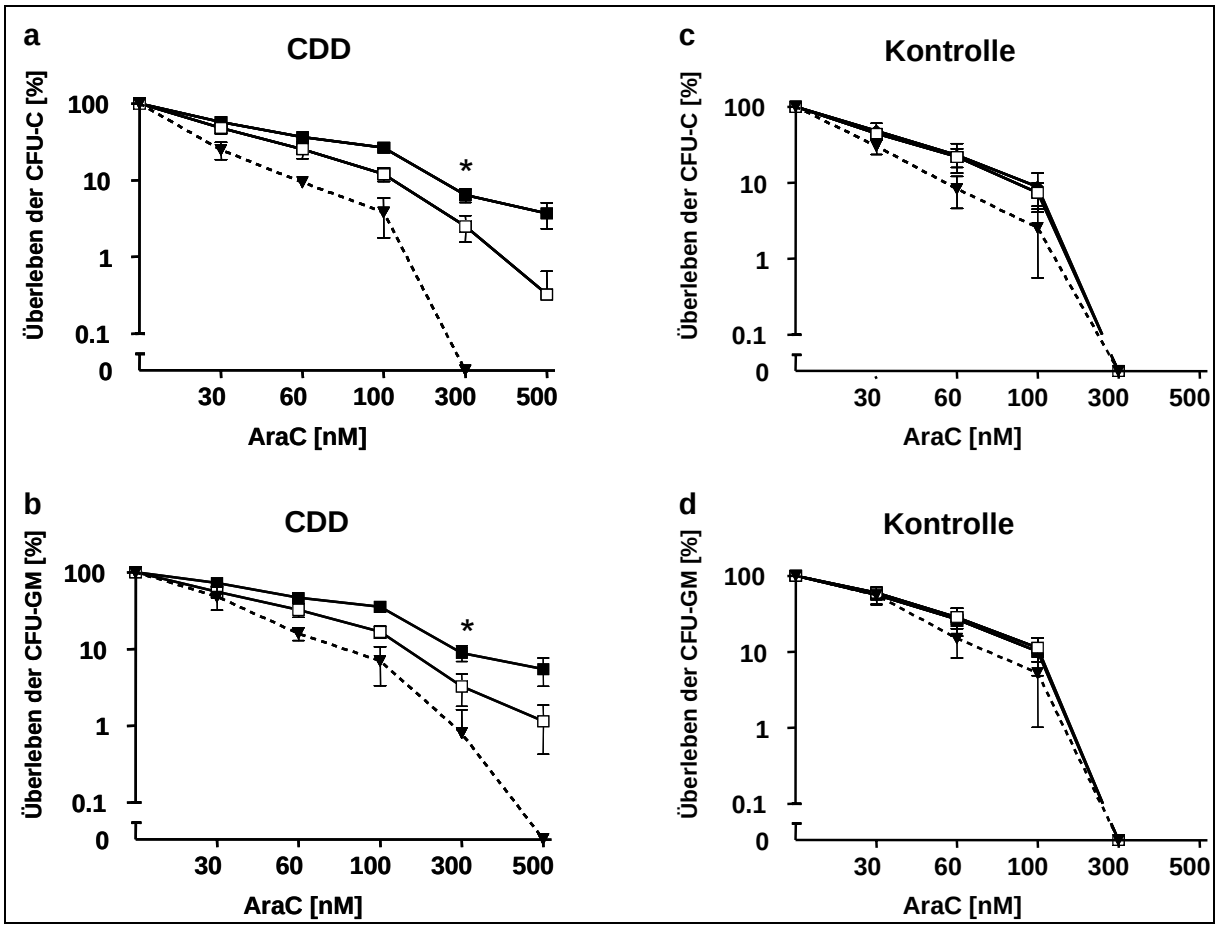

Abbildung 14: In-vitro-Selektion CDD-transduzierter klonogener Vorläuferzellen mit AraC. Das Überleben von CFU-C (a und c) und CFU-GM (b und d) aus $CD34^+$-angereicherten humanen Nabelschnurblutzellen nach Transduktion mit SF91-CDD-IRES-EGFP (CDD) und SFβ1-EGFP (Kontrolle) vor Suspensionskultur (▼, gestrichelte Linie) und nach 4 Tagen Suspensionskultur mit 0 nM (□) oder 60 nM (■) AraC wurde im CFU-Assay bei aufsteigenden AraC-Konzentrationen (0 - 500 nM) verglichen. Die Mittelwerte ± SEM von n=4 Experimenten sind angegeben. *zeigt signifikante Unterschiede ($p<0,05$) im Vergleich zu den Kontroll-Suspensionskulturen ohne AraC an (Student´scher *t*-Test)

3.3 In-vivo-Maus-Transplantationsmodell

Da bislang In-vivo-Untersuchungen zum CDD-vermittelten Schutz vor Cytidinanaloga nach retroviralem Gentransfer fehlten, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Überexpression der CDD auch in vivo einen Schutz gegenüber Gemcitabin und AraC vermittelt. Außerdem wurde untersucht, ob sich CDD-transduzierte hämatopoetische Stammzellen in vivo mit AraC oder Gemcitabin anreichern lassen. Hierzu wurde ein Maus-Transplantationsmodell gewählt, welches in Abbildung 15 schematisch dargestellt ist.

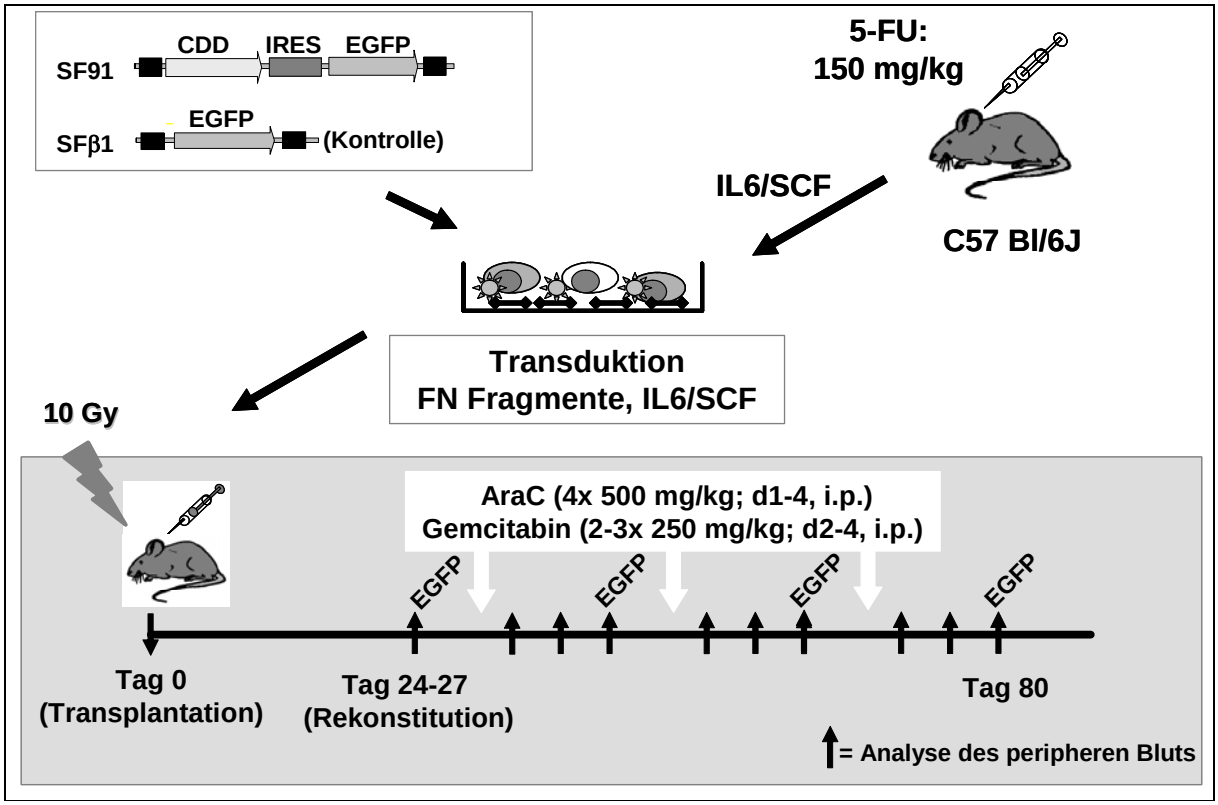

Abbildung 15: Murines Knochenmarktransplantationsmodell. Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten C57Bl/6J-Spendermäusen wurde mit IL-6 und SCF prästimuliert, mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP (Kontrolle) auf Fibronektinfragmenten (FN) transduziert und in letal bestrahlte Empfängermäuse über die Schwanzvene transplantiert. Nach hämatopoetischer Rekonstitution (Tag 24-27) wurde mit der Chemotherapie begonnen, die entweder aus 4 i.p.-Injektionen von 500 - 600 mg/kg AraC oder aus 2-3 i.p.-Injektionen von 250 mg/kg Gemcitabin bestanden. Die Zellzahlen im peripheren Blut und der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten und Lymphozyten wurden als Maß für die Gentransfereffizienz vor und nach jedem Behandlungszyklus bestimmt.

3.3.1 Gentransfereffizienz für ex-vivo-transduzierte mononukleäre Zellen aus murinem Knochenmark

Zur Untersuchung des CDD-Gentransfers im In-vivo-Maus-Transplantionsmodell wurden 6 verschiedene Transduktionen (T_{1-6}) von mononukleären Zellen aus dem murinen Knochenmark mit den Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP (CDD) und SFβ1-EGFP (Kontrolle) durchgeführt. Dabei wurden je nach Zielsetzung der einzelnen Experimente verschiedene Viruspräparationen mit unterschiedlichen Titern zwischen 1×10^5 - 6×10^6 IE/ml benutzt. Zur Bestimmung der Gentransfereffizienzen wurde nach retroviraler Transduktion der Anteil an $EGFP^+$-Zellen in den aus dem Knochenmark stammenden mononukleären Zellen durchflußzytometrisch bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Viraler Titer und Gentransferraten sechs verschiedenenerTransduktionen.

TD	Exp.	CDD			Kontrolle		
		ÜS Titer [IE/ml]	% $EGFP^+$-Zellen vor Tx	% $EGFP^+$-Zellen nach Tx	ÜS Titer [IE/ml]	% $EGFP^+$-Zellen vor Tx	% $EGFP^+$-Zellen nach Tx
T_1 (n = 5)	C_1	3×10^5	33,1	41,7 ± 3,7	5×10^5	31,4	57,0 ± 1,7
T_2 (n = 8)	C_2	3×10^5	29,3	30,9 ± 0,6	5×10^5	26,1	42,1 ± 0,7
T_3 (n = 3 u. 4)	G_1	6×10^6	46,1	64,0 ± 2,6	2×10^6	38,0	71,9 ± 3,0
T_4 (n = 12)	C_3/G_2	6×10^6	25,8	69,2 ± 1,6	2×10^6	29,5	23,3 ± 0,9
T_5 (n = 3)	C_4	1×10^5	7,9	4,8 ± 0,2	2×10^5	8,2	1,6 ± 0,6
T_6 (n = 10)	C_5	3×10^5	8,3	15,6 ± 1,0	5×10^5	9,7	42,1 ± 1,5

Angegeben sind die Titer der für die einzelnen Transduktionen (TD) benutzten virushaltigen Überstände (ÜS) als infektiöse Einheiten/ml (IE/ml), der prozentuale Anteil an $EGFP^+$ mononukleären Zellen nach Transduktion, vor Transplantation (Tx) und der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten (Mittelwert ± SEM) im peripheren Blut nach hämatopoetischer Rekonstitution. Sechs verschiedene Transduktionen (T_{1-6}) mit SF91-CDD-IRES-EGFP (CDD) sowie SFβ1-EGFP (Kontrolle) wurden durchgeführt. Für T_{1-4} wurde ÜS von monoklonalen und für T_5 von polyklonalen stabilen FNX-eco-Produzentenzellen benutzt, während für T_6 ÜS nach transienter Transfektion von 293T-Zellen benutzt wurden. C_{1-5}: Experimente (Exp.) mit AraC; G_{1-2}: Experimente mit Gemcitabin

Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die Höhe der Virus-Titer mit der Höhe der Gentransferraten korrelierte ($r = 0{,}58$ für die CDD-Gruppe und $r = 0{,}69$ für die Kontroll-Gruppe). So resultierte aus Transduktion T_5 für die CDD-Gruppe mittels des Überstandes mit dem niedrigsten Titer (1×10^5 IE/ml) die niedrigste Gentransferrate

(7,9 % $EGFP^+$-Zellen) und aus Transduktion T_3 mit dem höchsten Titer (6 x 10^6 IE/ml) die höchste Gentransferrate (46,1% $EGFP^+$-Zellen). Ebenso wurde in der Kontroll-Gruppe mit dem niedrigsten Virus-Titer die niedrigste Gentransferrate und mit dem höchsten Titer die höchste Gentransferrate erreicht (2 x 10^5 für 8,2 % $EGFP^+$-Zellen und 2 x 10^6 für 38,0 % $EGFP^+$-Zellen).

Da Granulozyten mit einer mittleren Lebendauer von 4 Tagen sehr schnell im Knochenmark erneuert werden und daher die Zellen im peripheren Blut darstellen, die die Situation im Knochenmark am besten repräsentieren, wurde nach hämatopoetischer Rekonstitution der Empfängermäuse der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten im peripheren Blut bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass die Titerhöhe der verwendeten virushaltigen Überstände mit der Höhe des Anteils an $EGFP^+$-Granulozyten korrelierte (r = 0,88 für die CDD-Gruppe und r = 0,35 für die Kontroll-Gruppe). Der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten reichte dabei von 4,8 ± 0,2 % (n = 3) bis 69,2 ± 1,6 % (n = 12) in der CDD-Gruppe und von 1,6 ± 0,6 % (n = 3) bis 57,0 ± 1,7 % (n = 5) in der Kontroll-Gruppe.

3.3.2 CDD schützt die Myelopoese vor AraC

Nach der hämatopoetischen Rekonstitution wurde in drei Experimenten (C_{1-3}) den Empfängermäusen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen AraC mit einer Dosis von 500 - 600 mg/kg Körpergerwicht i.p. injiziert, und diese Behandlung wurde im Abstand von 2 Wochen bis zu 2-mal wiederholt (C_1: 3 Zyklen, C_2: 2 Zyklen, C_3: 1 Zyklus).

In Abbildung 16 sind die Granulozytenzahlen im peripheren Blut für alle drei Experimente dargestellt. In jedem der drei Experimente fiel nach jedem der Behandlungszyklen die Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut sowohl in der CDD-Gruppe als auch in Kontroll-Gruppe ab und erreichte 4 Tage nach der Behandlung den tiefsten Wert (Nadir). Es zeigte sich anhand der Nadir-Zellzahlen, dass die Myelosuppression der Tiere, denen CDD-transduzierte Knochenmarkszellen transplantiert wurden, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt war.

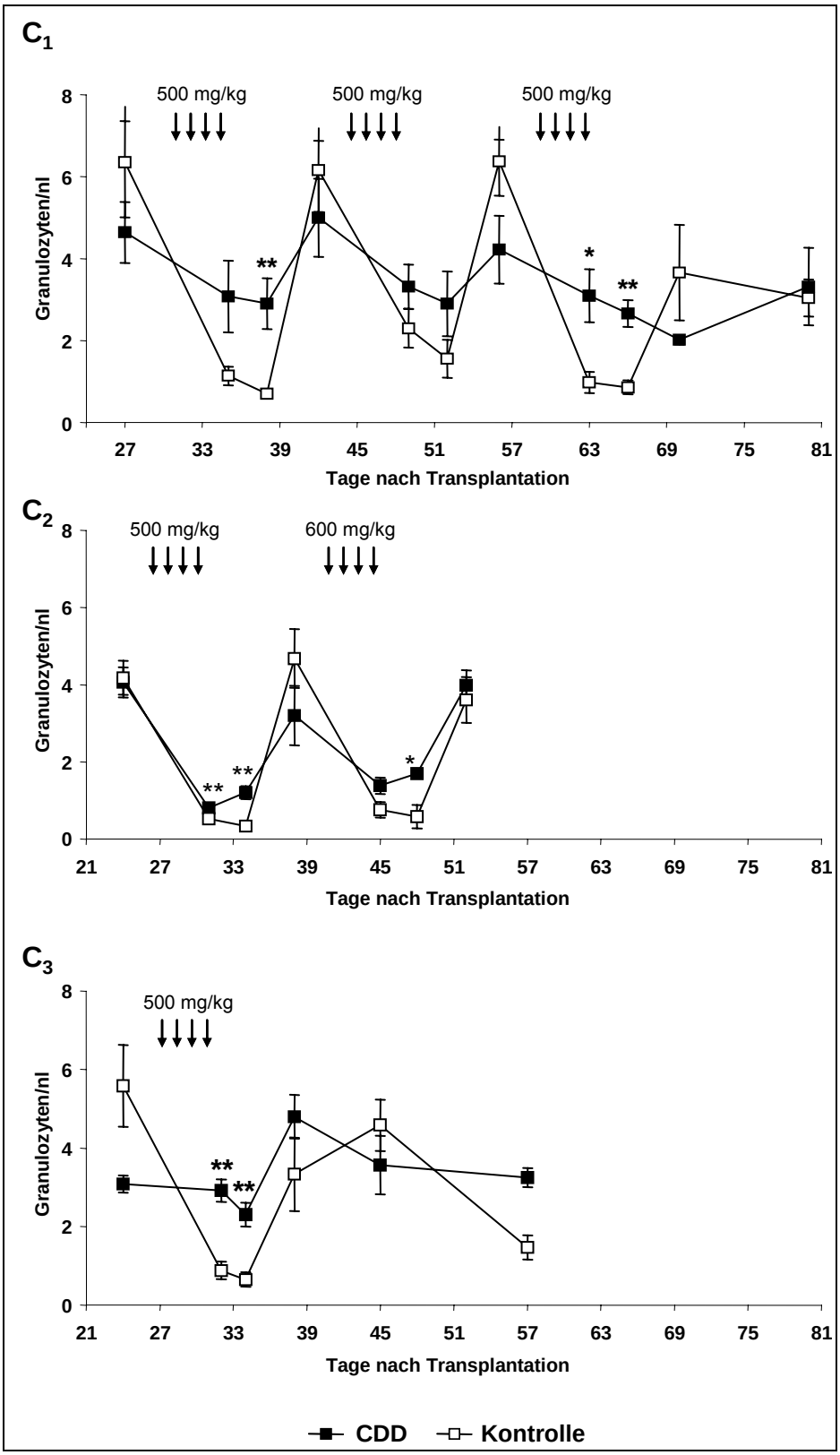

Abbildung 16: Schutz der Granulopoese vor AraC. Die Granulozytenzahlen im peripheren Blut von drei verschiedenen Experimenten (C_{1-3}) sind angegeben als Mittelwerte ± SEM für n = 5 (C_1), n = 6 (C_2) und n = 5 (C_3) Tiere. */** zeigt signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05/0{,}01$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Student'scher *t*-Test)

So betrug nach dem ersten Zyklus in Experiment C_1 die Granulozytenzahl im Nadir 2,9 ± 0,6 /nl in der CDD-Gruppe, jedoch nur 0,7 ± 0,1 /nl in der Kontroll-Gruppe, ein mit p=0,008 hochsignifikanter Unterschied (n = 5). Dieser Schutzeffekt war auch bei den beiden folgenden Behandlungszyklen reproduzierbar. So zeigte sich auch nach dem dritten Zyklus mit einer Nadirzellzahl von 2,7 ± 0,3 /nl in der CDD-Gruppe und 0,9 ± 0,2 /nl in der Kontroll-Gruppe (p = 0,02) ein signifikanter Schutz. Dieser Schutz vor AraC-Toxizität durch CDD-transduziertes Knochenmark konnte auch durch die beiden weiteren Experimente C_2 und C_3 bestätigt werden. In C_2 betrugen die Granulozytenzahlen nach dem ersten AraC-Zyklus 1,1 ± 0,2 /nl in der CDD-Gruppe und 0,5 ± 0,1 /nl in der Kontroll-Gruppe (p = 0,001; n = 6) und nach dem zweiten Zyklus 4,6 ± 0,2 /nl in der CDD-Gruppe und 1,0 ± 0,5 /nl in der Kontroll-Gruppe (p = 0,01). In Experiment C3 wurde nur ein Behandlungszyklus durchgeführt. Während hier die Granulozytenzahl für die CDD-Gruppe im Nadir 2,3 ± 0,3 /nl betrug, wurden in der Kontroll-Gruppe nur 0,7 ± 0,2 /nl gezählt (p = 0,001, n = 5).

Ein ähnlicher durch den Gentransfer der CDD vermittelter Schutzeffekt vor AraC-Toxizität konnte auch für die Thrombopoese beobachtet werden. Die Thrombozytenzahlen im peripheren Blut für die Experimente C_{1-3} sind in Abbildung 17 zusammengefasst. In allen drei Experimenten zeigte sich ein Abfall der Thrombozytenzahlen nach Behandlung mit AraC und der Nadir wurde - wie auch schon bei den Granulozyten beobachtet - 4 Tage nach der Behandlung erreicht. Auch hier zeigte sich reproduzierbar eine signifikant geringere Myelosuppression in der CDD-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. In Experiment C_1 betrugen die Nadirzellzahlen nach dem ersten AraC-Behandlungszyklus 509 ± 147 /nl in der CDD-Gruppe und 80 ± 9 /nl in der Kontroll-Gruppe (p = 0,02) und auch nach der zweiten und der dritten Behandlung waren die Nadirzellzahlen in der CDD-Gruppe deutlich höher als in der Kontroll-Gruppe, und zumindest nach der dritten Behandlung war dieser Unterschied auch wieder statistisch signifikant (p = 0,02).

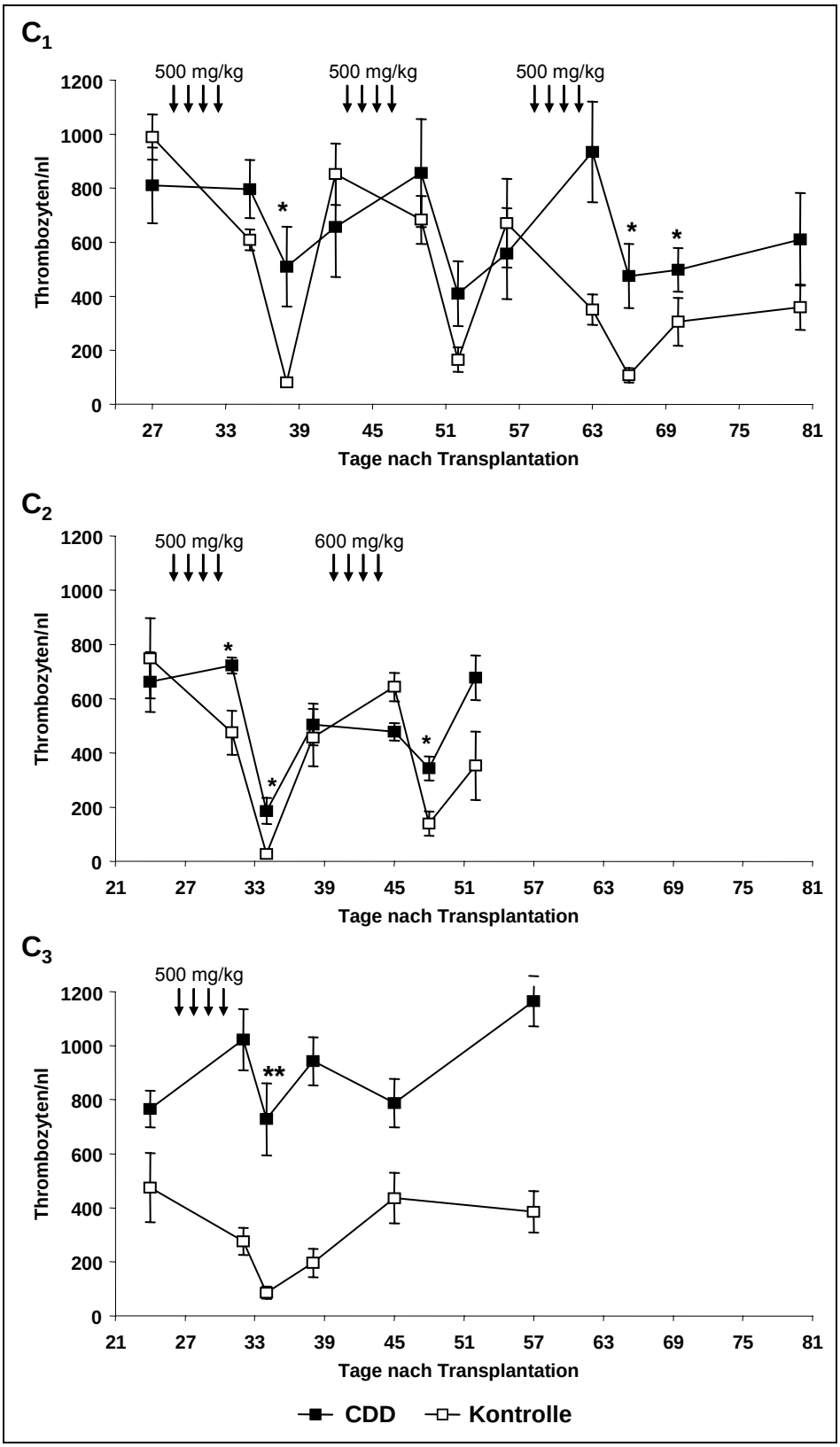

Abbildung 17: Schutz der Thrombopoese vor AraC. Die Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von drei verschiedenen Experimenten (C_{1-3}) sind angegeben als Mittelwerte ± SEM für n = 5 (C_1), n = 6 (C_2) und n = 5 (C_3) Tiere. */** zeigt signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05/0{,}01$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Student'scher *t*-Test)

Auch in Experiment C_2 waren signifikante Unterschiede zwischen den Nadirzellzahlen der CDD-Gruppe (186 ± 49 /nl nach dem ersten und 343 ± 44 /nl

nach dem zweiten Zyklus) und der Kontroll-Gruppe (28 ± 4 bzw. 139 ± 45 /nl) zu beobachten (jeweils p = 0,02). Experiment C_3 muss bezüglich eines CDD-vermittelten Schutzeffektes vorsichtiger beurteilt werden, weil sich hier die Ausgangszahlen der Thrombozyten vor der AraC-Therapie in der CDD- und der Kontroll-Gruppe stark unterschieden. Auch hier war jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Nadirzellzahlen der CDD- und der Kontroll-Gruppe zu beobachten.

In Abbildung 18 sind die Nadirzellzahlen der Granulozyten und Thrombozyten nach der ersten AraC-Behandlung der Experimente C_{1-3} gegenüber gestellt, um zusammenfassend zu verdeutlichen, dass der retrovirale Gentransfer der CDD den Granulozyten und den Thrombozyten einen Schutz vor der Toxizität von AraC vermittelt.

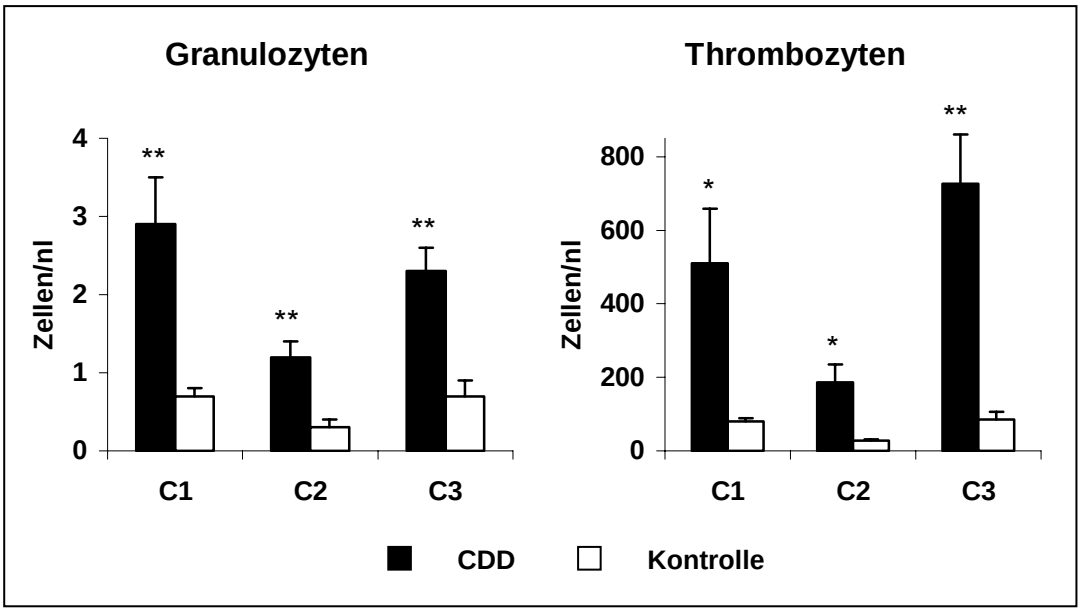

Abbildung 18: Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten- und Thrombozyten-Nadirzellzahlen nach AraC-Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM für n = 5 (C_1), n = 6 (C_2) und n = 5 (C_3) Tiere. */** zeigt signifikante Unterschiede (p ≤ 0,05/0,01) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Student'scher *t*-Test)

3.3.3 CDD schützt die Myelopoese vor Gemcitabin

Zusätzlich zum Schutz vor AraC wurde der CDD-vermittelte Schutz gegenüber Gemcitabin als weiterem Cytidinanalogon in zwei Experimenten (G_{1-2}) untersucht. Auch hierbei wurde mit der Behandlung nach hämatopoetischer Rekonstitution der Empfängertiere begonnen, wobei zwei unterschiedliche Dosierungen angewendet wurden. In Experiment G_1 wurde den Tieren im ersten Zyklus Gemcitabin mit einer

Dosierung von 250 mg/kg an zwei aufeineinanderfolgenden Tagen und im zweiten Zyklus an drei aufeineinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert, während in Experiment G_2 nur die Dosierung 3 x 250 mg/kg verabreicht wurde. Wie bei den Experimenten mit AraC wurde den Tieren 1, 4 und 8 Tagen nach der Behandlung peripheres Blut entnommen und die Zahlen der Granulozyten, Thrombozyten und Lymphozyten bestimmt. In Abbildung 19 sind die Granulozyten- und Thrombozytennadirwerte für die Experimente G_1 und G_2 zusammengefasst.

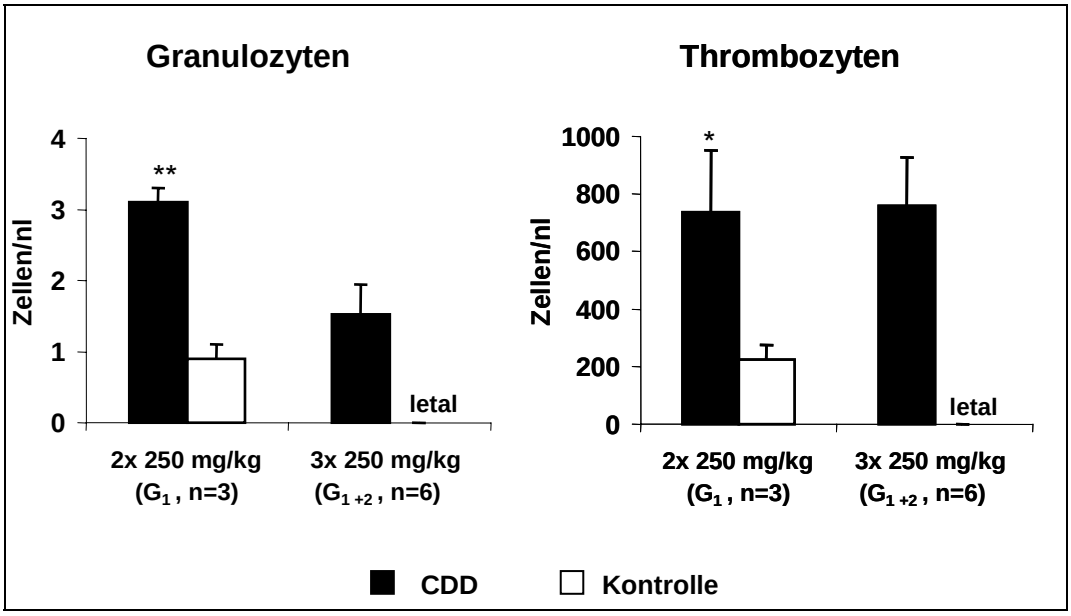

Abbildung 19: Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten- und Thrombozyten-Nadirzellzahlen nach Gemcitabin-Behandlung. Die Granulozyten- und Thrombozyten-Nadirzellzahlen im peripheren Blut nach Behandlung mit 2 x 250 mg/kg oder 3 x 250 mg/kg in zwei verschiedenen Experimenten (G_1 und G_2) sind angegeben als Mittelwerte ± SEM fü je n = 3 (G_1 und G_2) Tiere. */** zeigt signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05/0{,}01$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Stutent'scher *t*-Test)

Es zeigte sich, dass der Gentransfer der CDD auch einen Schutz gegenüber Gemcitabin vermittelt. Bei einer Dosierung von 2 x 250 mg/kg Gemcitabin in Experiment G_1 betrugen die Nadirzellzahlen der Granulozyten im peripheren Blut 3,1 ± 0,2 /nl in der CDD-Gruppe und nur 0,9 ± 0,2 /nl in der Kontroll-Gruppe ($p = 0{,}001$, $n = 3$) und die Nadirzellzahlen der Thrombozyten 737 ± 183 /nl in der CDD- und 214 ± 53 /nl in der Kontroll-Gruppe ($p = 0{,}02$). Im zweiten Zyklus von Experiment C_1 und im ersten Zyklus von Experment C_2 wurde eine Dosierung von 3 x 250 mg/kg Gemcitabin verabreicht. Bei dieser Dosierung starben alle Tiere aus der Kontroll-Gruppe am Tag 2 und 3 nach der Behandlung, während alle Tiere in der CDD-Gruppe mit einer Granulozyten-Nadirzellzahl von 1,5 ± 0,4 /nl (n = 6) und einer

Thrombozyten-Nadirzellzahl von 758 ± 169 /nl überlebten und nach ca. 8 Tagen eine vollständig rekonstituierte Hämatopoese zeigten.

3.3.4 AraC-Resistenz CDD-transduzierter Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark

Der CDD-vermittelte Schutzeffekt wurde zusätzlich auf der Ebene klonogener Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark getestet. Hierzu wurden 6 Monate nach der Transplantation mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von je 2 Tieren aus der CDD- und der Kontroll-Gruppe aus Experiment C_3 auf funktionelle Resistenz gegenüber AraC im CFU-Assay untersucht, indem sie in der Methylzellulose-Kultur für 7 Tage aufsteigenden Konzentrationen AraC von 0 bis 1000 nM ausgesetzt wurden.

Wie Abbildung 20 zeigt, vermittelte der CDD-Gentransfer in klonogenen Zellen (CFU-C) eine Resistenz gegenüber AraC bis zu einer Konzentration von 1000 nM, während das Wachstum der klonogenen Zellen von Kontroll-Mäusen schon zwischen 30 und 60 nM AraC inhibiert wurde. Der Anteil überlebender CFU-C ist in der Kontroll-Gruppe bei einer Konzentration von 30 nM AraC mit 15,7 % bei Maus #2 und 35,1 % bei Maus #1 deutlich geringer als in der CDD Gruppe (60,7 % bei Maus #2 und 81,4 % bei Maus #1). Bei 100 nM AraC waren in der Kontroll-Gruppe keine CFU-C mehr nachweisbar, während in der CDD-Gruppe noch 55,8 % (Maus #1) und 60,7 % (Maus #2) der Kolonien überlebten. Bei einer Konzentration von 1000 nM AraC überlebten in der CDD-Gruppe immer noch 41,9 % (#1) bzw. 36,1 % (#2) CFU-C.

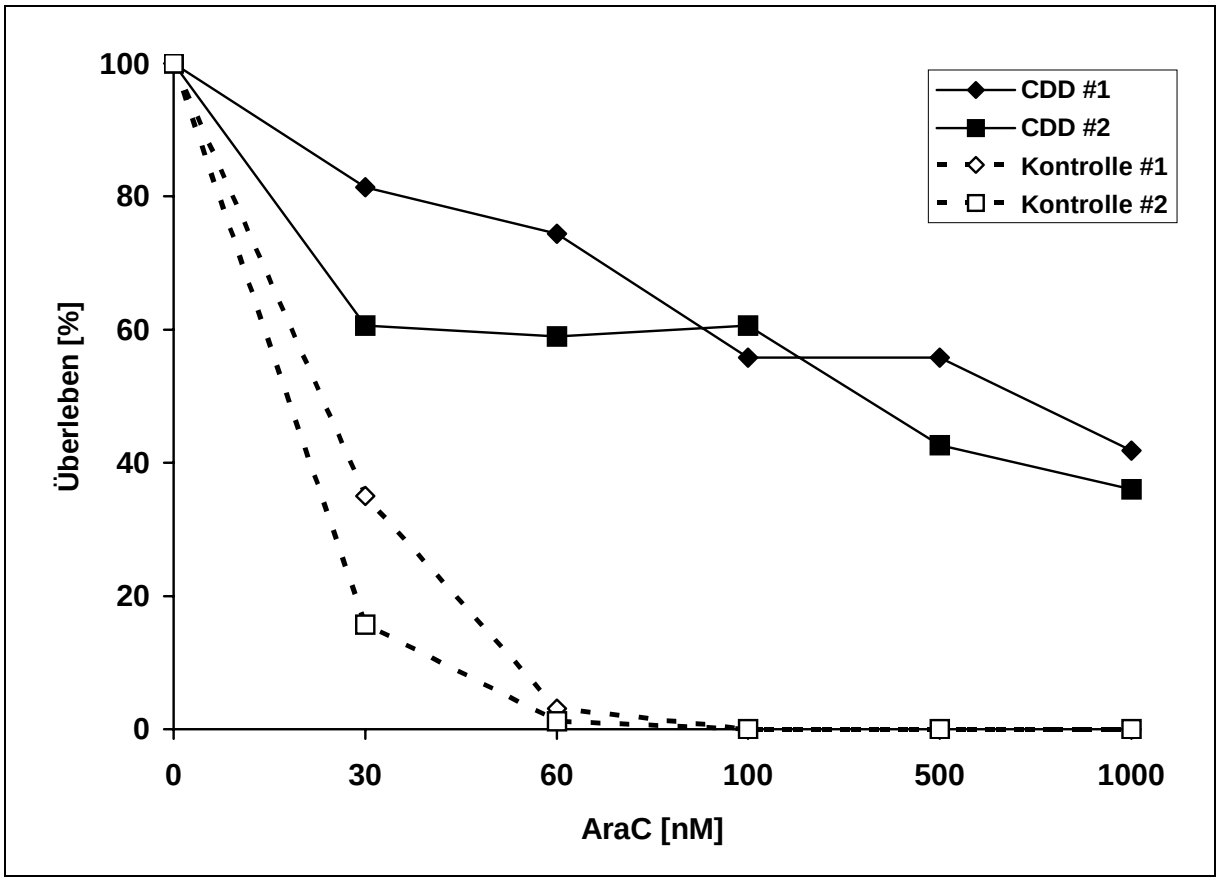

Abbildung 20: AraC-Resistenz klonogener Vorläuferzellen (CFU-C) nach Gentransfer der CDD. Mononukleäre Knochenmarkzellen von je 2 Tieren aus der CDD- und der Kontroll-Gruppe aus Experiment C_3 wurden 6 Monate nach der Transplantation aufsteigenden AraC-Konzentrationen im CFU-Assay ausgesetzt.

3.3.5 Enzymatische CDD-Aktivität in Milz- und Knochenmarkzellen nach CDD-Gentransfer

Um die Überexpression der CDD in transduzierten Zellen funktionell nachzuweisen und damit die CDD-vermittelte Resistenz möglichst direkt mit der Transgenexpression in Zusammenhang zu bringen, wurde am Ende von Experiment C_3 die Enzymaktivität der CDD in mononukleären Zellen der Milz und des Knochenmarks analysiert. Dabei wurden aus der Kontroll- und der CDD-Gruppe je 3 Tiere, die mit AraC behandelt worden waren, sowie 2 bzw. 3 unbehandelte Tiere untersucht. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde Lysat der Zellen mit Gemcitabin als Substrat inkubiert und die Abbaugeschwindigkeit anhand der Abnahme von Gemcitabin mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ermittelt.

Wie Tabelle 4 zeigt, war die Enzymaktivität in CDD-transduzierten Knochenmarks- und Milzzellen sowohl in der Gruppe der unbehandelten Tiere (-AraC) als auch in der Gruppe der behandelten Tiere (+AraC) drastisch erhöht im Vergleich zur nicht

transduzierten Kontrolle. Die Enzymaktivität reichte in der CDD-Gruppe von 39,1 bis 401 U/mg, während sie in der Kontroll-Gruppe nur Werte von 1,6 ± 0,7 bis 4,5 ± 0,4 U/mg erreichten. In der CDD-Gruppe war die Enzymaktivität dabei sowohl im Knochenmark als auch in der Milz bei AraC-behandelten Tieren im Mittel deutlich höher als bei nicht-behandelten Tieren (401 gegenüber 116,2 U/mg im Knochenmark sowie 172 gegenüber 39,1 U/mg in der Milz). In der Kontroll-Gruppe dagegen scheint die Behandlung mit AraC keinen Einfluss auf die Höhe der Enzymaktivität zu haben.

Tabelle 4: CDD-Enzymaktivität mononukleärer Zellen aus Milz und Knochenmark.

	Knochenmark		Milz	
	CDD	Kontrolle	CDD	Kontrolle
- AraC	116,2[#]	4.5 ± 0.4[$]	39,1[#]	1.6 ± 0.7[$]
+ AraC	401 ± 38[§]	2.7 ± 1.2[$]	172 ± 33[§]	2.7 ± 1.1[$]

Die Enzymaktivitäten wurden 6 Monate nach Transplantation in Zelllysaten aus mononukleären Knochenmark- und Milzzellen von Experiment C_3 bestimmt und sind als Mittelwerte ± SEM [U/mg] angegeben. [#]: n = 2; [$]: n=3; [§]: n = 4

Außerdem wurde eine unterschiedliche Höhe der CDD-Enzymaktivität in Knochenmark- und Milzzellen sowohl in der CDD- als auch in der Kontroll-Gruppe beobachtet. Im Knochenmark war die Enzymaktivität bei den nicht mit AraC behandelten Tieren in der CDD-Gruppe um das 3,0-fache und in der Kontroll-Gruppe um das 2,8-fache höher als in der Milz, während sie bei den mit AraC behandelten Tieren in der CDD-Gruppe um das 2,4-fache und in der Kontroll-Gruppe um das 1,6-fache erhöht war.

Diese deutlich höhere Enzymaktivität in der CDD-Gruppe in Vergleich zur Kontroll-Gruppe deutet auch auf Proteinebene darauf hin, dass der beobachtete Schutzeffekt der CDD gegenüber den Cytidinanaloga AraC und Gemcitabin tatsächlich auf eine Überexpression der CDD-cDNA zurückzuführen ist.

3.3.6 Gentransfer der CDD erlaubt im hier eingesetzten Model keine In-vivo-Anreicherung transduzierter Zellen mittels Cytidinanaloga

Nachdem gezeigt worden war, dass der retrovirale Gentransfer der CDD in hämatopoetischen Zellen in vivo einen Schutz vor den zytotoxischen Wirkungen von AraC und Gemcitabin vermittelt, wurde im nächsten Schritt der Frage nachgegangen,

ob sich CDD-transduzierte hämatopoetische Zellen mit diesen Cytidinanaloga anreichern lassen.

Hierzu wurde der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten im peripheren Blut im Verlauf der Experimente C_{1-3} und G_{1-2} beobachtet. Wie in Abbildung 21a gezeigt ist, konnte in den Experimenten C_{1-3} nach AraC-Gabe keine Anreicherung CDD-transduzierter Zellen beobachtet werden. So blieb der initial bestimmte Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten mit 41,7 ± 3,7 % in C_1, 30,9 ± 0,6 % in C_2 und 69,2 ± 1,6 % in C_3 bis zum Ende der Experimente mit 33,5 ± 2,9 % in C_1, 20,9 ± 3,2 % in C_2 und 72,7 ± 9,7 % in C_3 weitgehend konstant.

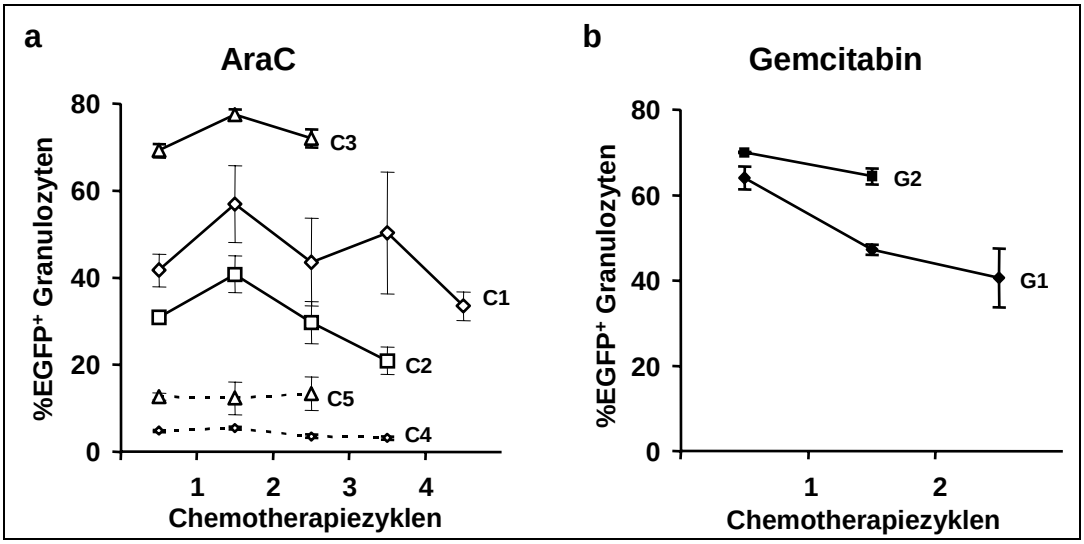

Abbildung 21: Keine Anreicherung CDD-transduzierter Granulozyten nach Behandlung mit Cytidinanaloga. Der Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten im peripheren Blut nach mehreren Behandlungszyklen mit AraC (a) oder Gemcitabin (b) ist angegeben als Mittelwerte ± SEM für n = 5 (C_1, C_2), n = 6 (C_3), n = 4 (C_4), n = 3 (C_5, G_1 und G_2). Die Experimente C_4 und C_5 wurden mit initial niedrigen Gentransferraten durchgeführt (gestrichelte Linien).

Um einen möglichen Selektionseffekt bei initial hohen Gentransferraten nicht zu übersehen, wurden zwei zusätzliche Experimente mit initial niedrigen Gentransferraten (C_4 und C_5) durchgeführt. Aber auch in diesen Experimenten konnte trotz mehrerer Behandlungszyklen keine Anreicherung CDD-transduzierter Granulozyten beobachtet werden. In Experiment C_5 lag die Gentransferrate vor Behandlung mit AraC bei 12,7 ± 0,8 % und nach der letzten Behandlung bei 13,4 ± 3,8 % und in Experiment C_4 betrug die initiale Gentransferrate 4,8 ± 0,2% und nach der letzten Behandlung 3,2 ± 0,4 %.

Auch in den Experimenten mit Gemcitabin (G_1 und G_2) wurde keine Anreicherung von CDD-transduzierten Granulozyten beobachtet (Abbildung 21b). Die initialen Gentransferraten betrugen hier 70,0 ± 0,2 % in G_1 und 64,0 ± 2,8 % in G_2 und waren

nach der letzten Behandlung mit Gemcitabin mit 64,4 ± 1,9 % in G_1 und 40,6 ± 6,9 % in G_2 sogar deutlich niedriger.

Neben dem Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten wurde auch der Anteil an $EGFP^+$-Lymphozyten im Verlauf der oben beschriebenen Experimente beobachtet. Jedoch wurde auch hier keine Anreicherung von CDD-transduzierten Lymphozyten mit AraC oder Gemcitabin erreicht.

In dem von uns angewandten Modell konnte somit weder mit AraC noch mit Gemcitabin eine Selektion CDD-transduzierter hämatopoetischer Zellen erreicht werden. Diese fehlende Anreicherung trotz eines signifikanten Schutzeffektes der CDD gegenüber Cytidinanaloga induzierter Myelotoxizität ließ vermuten, dass der Schutzeffekt eher auf Ebene der Vorläuferzellen oder der ausgereiften Zellen stattfindet als auf der Ebene des hämatopoetischen Stammzellkompartiments.

Um diese Vermutung weiter zu präzisieren wurde in einem zusätzlichen Experiment die Toxizität der Cytidinanaloga für ausgereifte sowie Vorläuferzellen vergleichend untersucht. Hierzu wurde bei C57/Bl6-Mäusen 48 h nach Gabe von 4 x 500 mg/kg AraC oder 3 x 250 mg/kg Gemcitabin der Gehalt an ausgereiften Zellen (gemessen als Gesamtzahl mononukleärer Zellen) sowie Vorläuferzellen (gemessen als $lin^-/Sca\text{-}1^+$-Zellen) im Knochenmark bestimmt (Abbildung 22).

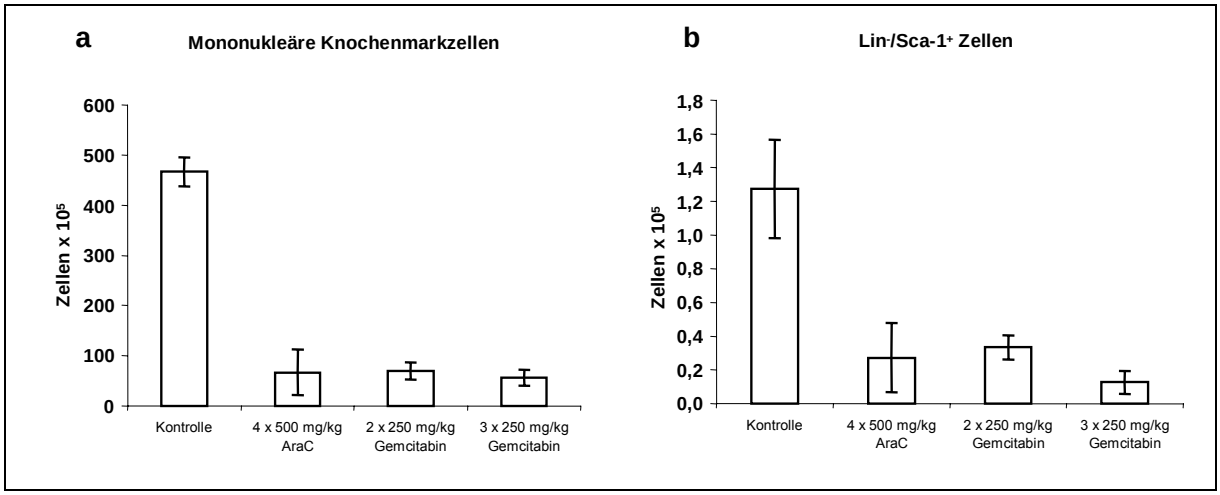

Abbildung 22: Wirkung von Cytidinanaloga auf ausgereifte und Vorläuferzellen. Angegeben ist die Anzahl aller mononukleärer Knochenmarkzellen (a) und der $Lin^-/Sca\text{-}1^+$-Zellen (b) 48 h nach Gabe von AraC oder Gemcitabin als Mittelwerte ± SEM für jeweils n = 3 Tiere.

Hierbei zeigte sich, dass AraC und Gemcitabin eine ähnlich hohe toxisch Wirkung auf die ausgereiften sowie auf die Vorläuferzellen haben. Die Anzahl an $Lin^-/Sca\text{-}1^+$-Zellen wurde hierbei in ähnlichem Maße reduziert wie die Azahl der gesamten mononukleären Knochenmarkzellen.

3.3.7 Effekt des CDD-Gentransfers auf das lymphoide Kompartiment

Neben dem myeloischen wurde auch das lymphoide Kompartiment auf einen möglichen CDD-vermittelten Schutzeffekt gegenüber AraC und Gemcitabin hin analysiert. Wie schon für das myeloische Kompartiment beschrieben, wurden nach AraC- oder Gemcitabin-Behandlung die Nadirzellzahlen auch der Lymphozyten im peripheren Blut 4 Tage nach der letzten Injektion erreicht. Dabei wurde jedoch weder in den drei Experimenten mit AraC (C_{1-3}, Abbildung 23) noch in Experiment G_1 mit Gemcitabin ein signifikanter Unterschied zwischen den Lymphozyten-Nadirzellzahlen der CDD- und der Kontroll-Gruppe festgestellt. So betrug die Anzahl der Lymphozyten des peripheren Bluts im Nadir nach der ersten AraC-Behandlung jeweils im Vergleich der CDD- mit der Kontroll-Gruppe 4,6 ± 0,8 /nl gegenüber 5,4 ± 0,4 /nl in C_1, 4,7 ± 0,7 nl gegenüber 3,2 ± 0,3 nl in C_2 und 2,5 ± 0,3 nl gegenüber 4,5 ± 0,3 nl in C_3. Gleiches zeigte sich auch nach Gabe von 2 x 250 mg/kg Gemcitabin in Experiment G_1. Hier betrug die Lymphozyten-Nadirzahl 4,4 ± 1,0 nl in der CDD-Gruppe und 7,7 ± 1,4 /nl in der Kontroll-Gruppe.

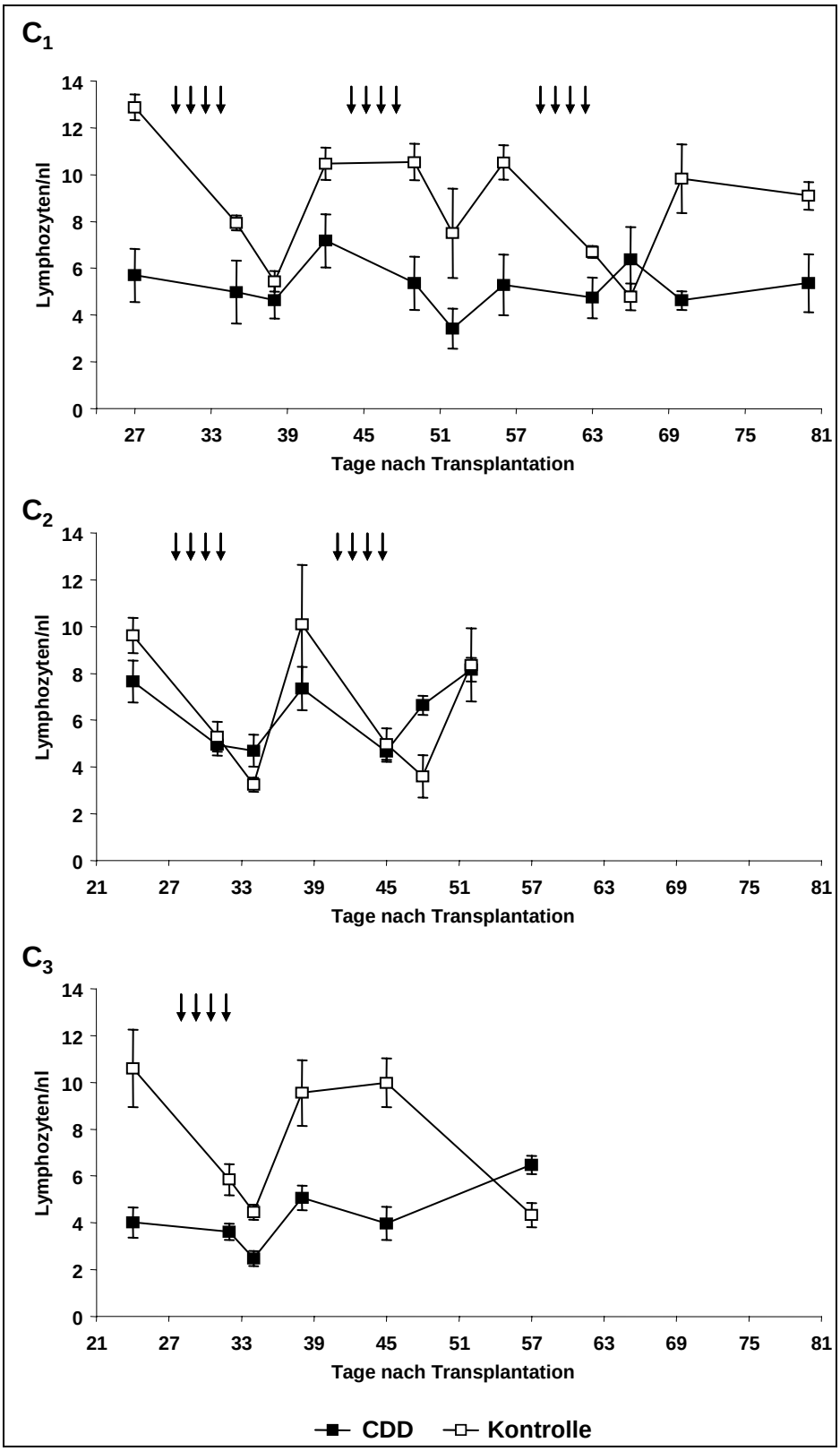

Abbildung 23: Effekt des CDD-Gentransfers auf das lymphoide Kompartiment nach AraC-Behandlung. Die Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von drei verschiedenen Experimenten (C_{1-3}) sind angegeben als Mittelwerte ± SEM für n = 5 (C_1), n = 6 (C_2) und n = 5 (C_3) Tiere. */** zeigt signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$ / $p \leq 0{,}01$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Student'scher t-Test)

Da sich die Ausgangszahlen der Lymphozyten im peripheren Blut vor Behandlung mit AraC zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe sehr stark unterschieden, wurde der Effekt der Chemotherapie zusätzlich anhand der relativen Abnahme der Lymphozytenzahlen im Nadir beurteilt. In Tabelle 5 wurden die Lymphozytenzahlen vor der ersten Behandlung den Nadir-Lymphozytenzahlen nach der ersten Behandlung gegenübergestellt und die prozentuale Abnahme dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass die Lymphozyten sowohl in den drei Experimenten mit AraC (C_{1-3}) als auch in dem Experiment mit Gemcitabin (G_1) in der Kontroll-Gruppe signifikant stärker sanken als in der CDD-Gruppe. Somit scheinen also auch CDD-transduzierte Lymphozyten im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Lymphozyten unempfindlicher gegenüber Cytidinanaloga zu sein.

Tabelle 5: Abnahme der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut nach der ersten AraC Behandlung.

	CDD			Kontrolle		
	vor AraC [/nl]	nach AraC [/nl]	Abnahme [%]	vor AraC [/nl]	nach AraC [/nl]	Abnahme [%]
C1	5,7 ± 1,1	4,6 ± 0,8	22 ± 8*	12,9 ± 0,5	5,4 ± 0,4	57 ± 5
C2	7,7 ± 0,9	4,7 ± 0,7	39 ± 4*	9,6 ± 0,8	3,2 ± 0,3	67 ± 4
C3	4,0 ± 0,6	2,5 ± 0,3	36 ± 7*	10,6 ±1,6	4,5 ± 0,3	54 ± 6
G_1	4,4 ± 0,4	4,4 ± 1,0	0*	16,7 ± 1,4	10,2 ± 1,3	39,1 ± 6,8

Angegeben sind die Lymphozytenzahlen im peripheren Blut zum Zeitpunkt vor der ersten Behandlung mit AraC (nach hämatopoetischer Rekonstitution), zum Zeitpunkt nach der ersten Behandlung (Nadir-Werte) und die prozentuale Abnahme der Lymphozyten als Mittelwerte ± SEM für n=5 (C_1), n=6 in (C_2) und n=6 (C_3) Tiere. * zeigt signifikante Unterschiede ($p<0,05$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Student'scher t-Test)

Überraschende Ergebnisse ergaben die Analysen der EGFP-Expression in den Lymphozyten (Tabelle 6). Hierbei zeigte sich in der CDD-Gruppe beim Vergleich zwischen Granulozyten und Lymphozyten nach hämatopoetischer Rekonstitution reproduzierbar in jedem der Experimente ein hochsignifikant niedrigeren Anteil an $EGFP^+$ Lymphozyten im Vergleich zum Anteil an $EGFP^+$-Granulozyten. So betrug beispielsweise in Experiment C_1 in der CDD-Gruppe der Anteil an $EGFP^+$ Granulozyten 41,7 ± 3,7 % während der Anteil an $EGFP^+$-Lymphozyten nur 8,7 ± 1,2 % betrug. Dagegen waren die Ergebnisse für die Granulozyten und Lymphozyten in der Kontroll-Gruppe sehr ähnlich. Hier betrug in C_1 der Anteil an

EGFP$^+$-Granulozyten 57,0 ± 1,7 % und der Anteil an EGFP$^+$ Lymphozyten 57,5 ± 1,5 %.

Tabelle 6: Anteil transduzierter Zellen im peripheren Blut nach hämatopoetischer Rekonstitution.

Experiment	Granulozyten		Lymphozyten	
	CDD	Kontrolle	CDD	Kontrolle
C_1	41,7 ± 3,7	57,0 ± 1,7	8,7 ± 1,2**	57,5 ± 1,5
C_2	30,9 ± 0,7	41,7 ± 0,7	10,6 ± 0,8**	35,2 ± 0,7*
G_1	64,0 ± 2,3	71,9 ± 3,0	22,4 ± 1,5**	60,4 ± 0,4
C_3/G_2	69,2 ± 1,6	23,3 ± 1,0	35,6 ± 2,9**	21,9 ± 2,0
C_4	4,8 ± 0,2	1,6 ± 0,6	2,9 ± 0,1**	0,5 ± 0,04
C_5	12,6 ± 1,0	42,1 ± 2,5	7,4 ± 1,5**	38,5 ± 1,2

Angegeben ist der prozentuale Anteil an EGFP$^+$-Granulozyten und Lymphozyten im peripheren Blut nach hämatopoetischer Rekonstitution als Mittelwert ± SEM von 6 verschiedenen Transduktionen (T_{1-6}) nach retroviraler Transduktion mit SF91-CDD-IRES-EGFP (CDD) und SFβ1-EGFP (Kontrolle). ** zeigt signifikante Unterschiede (p<0,01) im Vergleich zu CDD-transduzierten Granulozyten

Bei der Analyse von Milzzellen am Versuchsende wurde dann deutlich, dass sich die niedrigen Transduktionsraten in den Lymphozyten sowohl auf B- als auch auf T-Zellen bezogen (Tabelle 7). So waren In Versuch C_1 in der CDD-Gruppe 33,5 ± 2,9 % der Granulozyten im peripheren Blut EGFP$^+$, aber nur 2,9 ± 0,2 % der B-Zellen und 4,4 ± 0,7 % der T-Zellen aus der Milz. In der Kontroll-Gruppe war mit einem Anteil von 72,5 ± 5,6 % EGFP$^+$-Granulozyten, 59,0 ± 8,4 % EGFP$^+$-B-Zellen und 53,1 ± 5,8 % EGFP$^+$-T-Zellen kein so deutlicher Unterschied zu beobachten. In den Versuchen C_2 und C_3 zeigte sich ein ähnliches Muster.

Tabelle 7: Anteil transduzierter Zellen am Ende der Experimente.

	CDD			Kontrolle		
	Granulozyten	B-Zellen	T-Zellen	Granulozyten	B-Zellen	T-Zellen
C_1	33,5 ± 2,9	2,9 ± 0,2*	4,4 ± 0,7*	72,5 ± 5,6	61,8 ± 11,7	57,0 ± 10,8*
C_2	20,9 ± 3,2	8,9 ± 7,7	11,5 ± 2,0	43,9 ± 4,1	42,0 ± 5,3	38,4 ± 5,6
C_3	41,6 ± 5,5	9,8 ± 2,1*	18,4 ±11,6*	32,9 ± 1,4	11,5 ± 2,7*	20,4 ± 6,2

Angegeben ist der prozentuale Anteil an EGFP$^+$ Granulozyten im peripheren Blut und der prozentuale Anteil an EGFP$^+$ B- und T-Zellen in der Milz nach Versuchsende für die Experimente C_{1-3}. * zeigt signifikante Unterschiede (p<0,05) im Vergleich zu den Granulozyten

Eine Erklärung für den geringen Anteil CDD-transduzierter Lymphozyten stellt ein toxischer Effekt der CDD auf das lymphoide Kompartiment dar. Diese Vermutung

wird durch einen Vergleich der Lymphozytenzahlen zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe zum Zeitpunkt der initialen hämatopoetischen Rekonstitution bestätigt (Tabelle 8). Hier zeigte sich in den Versuchen C_{1-3} und G_1 eine signifikant geringere Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut in der CDD- im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. So lagen die Lymphozytenzahlen nach hämatopoetischer Rekonstitution in der CDD-Gruppe zwischen 4,1 ± 0,3 /nl und 7,4 ± 0,8 /nl während in der Kontroll-Gruppe Werte zwischen 7,7 ± 1,5 /nl und 16,7 ± 1,4 /nl erreicht wurden. Dagegen war in den Experimenten mit niedrigen Transduktionsraten (C_4 und C_5) kein signifikanter Unterschied zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe zu beobachten.

Tabelle 8: Niedrige Lymphozytenzahlen nach Gentransfer der CDD.

	Lymphozyten [/nl]		Granulozyten [/nl]		Transduktionsrate [% $EGFP^+$ Granulozyten]
	CDD	Kontrolle	CDD	Kontrolle	CDD
C1	5,7 ± 1,1**	12,9 ± 0,5	4,6 ± 0,7	6,4 ± 1,4	41,7 ± 3,7
C2	7,4 ± 0,8*	9,5 ± 0,6	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,4	30,9 ± 0,7
C3	4,1 ± 0,3**	10,8 ± 0,9	3,1 ± 0,2*	5,8 ± 0,5	69,2 ± 1,6
C4	13,3 ± 1,1	12,1 ± 1,2	4,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	4,8 ± 0,8
C5	10,6 ± 1,0	11,7 ± 0,5	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,4	12,6 ± 1,0
G1	4,4 ± 0,7**	16,7 ± 1,4	4,0 ± 0,3	6,2 ± 1,6	64,0 ± 2,8

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM als Zellen/nl und % $EGFP^+$-Granulozyten zum Zeitpunkt nach hämatopoetischer Rekonstitution. */** zeigt signifikante Unterschiede ($p<0,05/0,01$) im Vergleich zur Kontrolle

Deshalb sollte in einer Korrelationsanalyse festgestellt werden, ob die Stärke des inhibitorischen Effektes der CDD mit der Höhe der Gentransfereffizienzen zusammenhängt. Hierzu wurde für jedes einzelne Experiment (C_{1-5} und G_1) die Differenz der Lymphozytenzahlen - bezogen auf die Mittelwerte - zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe bestimmt und der Höhe der Gentransferraten der CDD in den Granulozyten gegenübergestellt (Abbildung 24) und daraus der Pearson'sche Korrelationskoeffizient ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Höhe der Differenz der Lymphozytenzahlen zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe mit der Höhe der Gentransferraten der CDD stark korrelierte (r = 0,89).

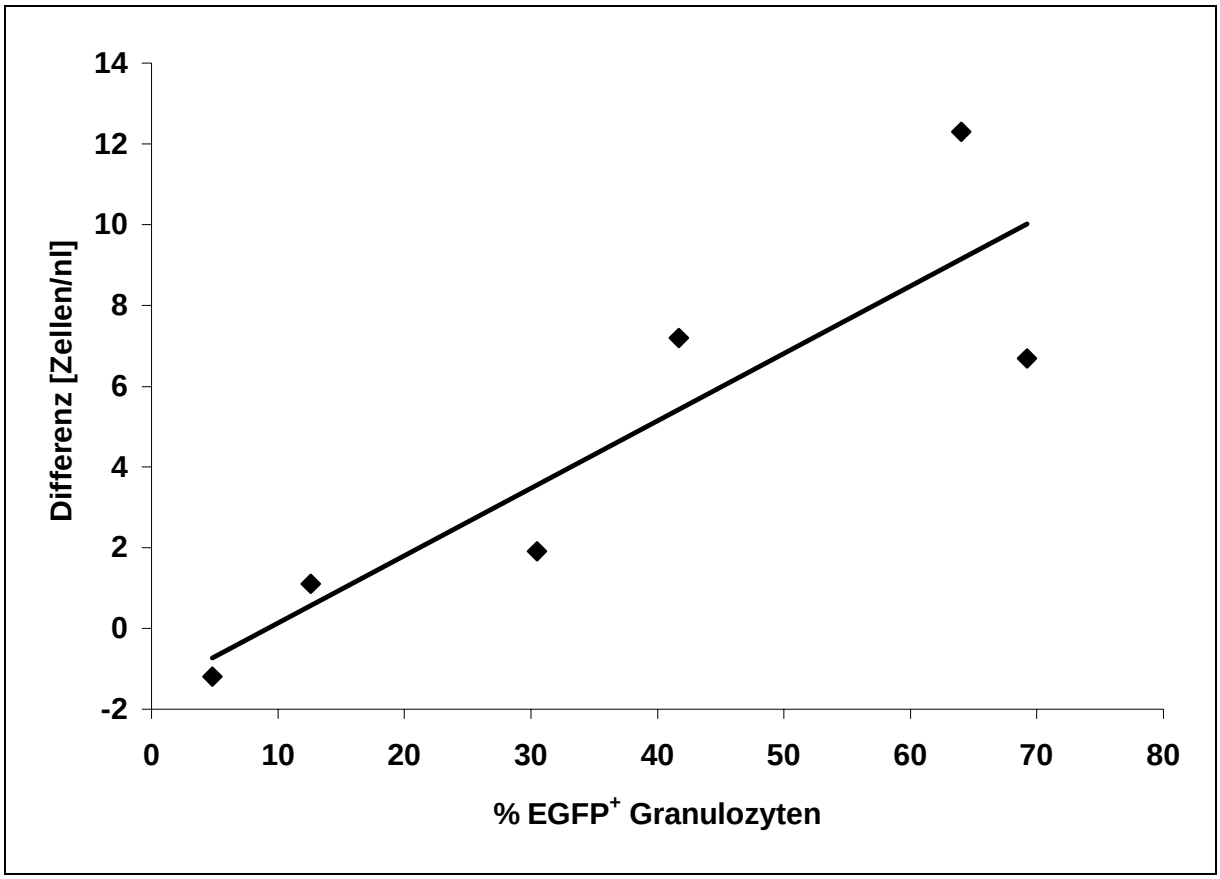

Abbildung 24: Korrelation der geringeren Lymphozytenzahl in der CDD-Gruppe mit der Höhe der Gentransfereffizienz. Die Differenz der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe nach initialer hämatopoetischer Rekonstitution der einzelnen Experimente (C_{1-5} und G_1) wurde gegen die jeweilige Höhe der Gentransferrate der CDD in den Granulozyten gegenübergestellt.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Gentransfer der CDD einen toxischen Effekt auf die Lymphozyten ausübt, der in den hier gezeigten Experimenten bei Gentransferraten über 30,9 % signifikant wurde.

3.3.8 Stabile Langzeitexpression der CDD im Stammzellkompartiment

In Langzeitanalysen und Sekundärtransplantationen wurde untersucht, ob Zellen des Stammzellkompartiments erfolgreich mit der CDD transduziert wurden und damit die Fähigkeit zur Langzeitrepopulierung besaßen.

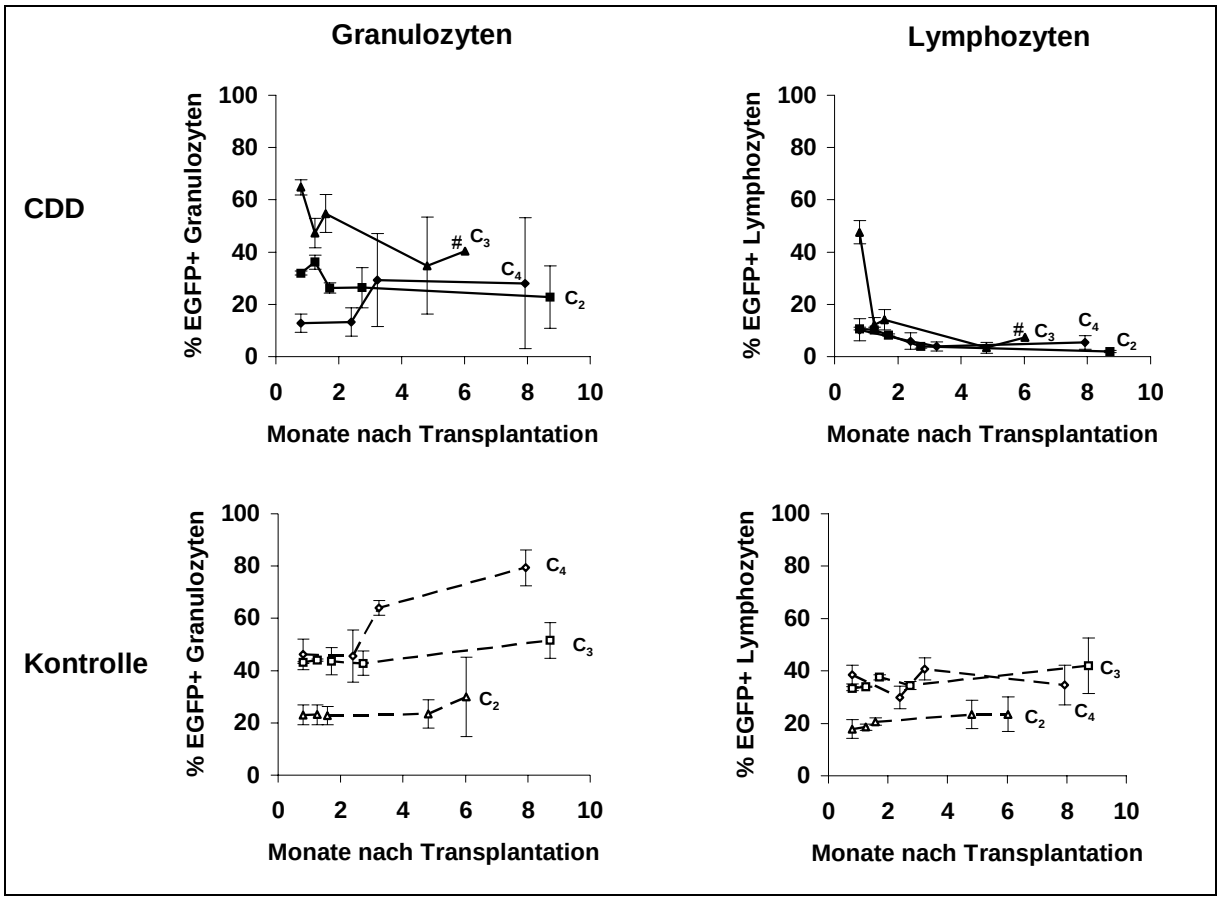

Abbildung 25: Langzeittransgen-Expression nach CDD-Gentransfer. Die prozentualen Anteile an EGFP$^+$-Granulozyten (linke Seite) und Lymphozyten (rechte Seite) der CDD- (oben) und der Kontroll-Gruppe (unten) von unbehandelten Tieren aus 3 verschiedenen Experimenten sind angegeben als Mittelwerte ± SEM mit jeweils n = 3, außer Datenpunkt # mit n = 2.

Für die Langzeitanalysen wurde der Anteil an EGFP$^+$-Granulozyten und Lymphozyten im peripheren Blut in den Versuchen $C_{2\text{-}4}$ von je 2 bis 3 unbehandelten Tieren für bis zu 9 Monate nach Transplantation erfasst. Hierbei wurde kein negativer Einfluss der CDD auf das Stamzellkompartiment beobachtet. Wie in Abbildung 25 dargestellt ist, blieb der Anteil an EGFP$^+$-Granulozyten nach einigen Schwankungen während der ersten vier bis acht Wochen anschließend bis zu neun Monate nach Transplantation weitgehend stabil. Dabei wurden bei Vergleich der Werte nach 2-3 Monaten (C_2: 26,1 ± 2,0 %, C_3: 54,8 ± 7,5 %, C_4: 13,2 ± 5,4 %) mit den Werten am Ende der Experimente nach 6 - 9 Monaten (C_2: 22,8 ± 11,8 %, C_3: 40,0 %, C_4: 29,3 ± 17,8 %) keine wesentlichen Veränderungen festgestellt.

Ein ähnlich stabiles Muster wurde für die Lymphozyten beobachtet. Allerdings waren, wie bereits in Abschnitt 3.3.7 beschrieben, die Gentransferraten in den CDD-transduzierten Lymphozyten nach hämatopoetischer Rekonstitution deutlich niedriger als in den CDD-transduzierten Granulozyten.

Für die Sekundärtransplantationen wurde den Tieren aus Experiment C_1 4½ Monate nach der primären Transplantation das Knochenmark entnommen und in letal bestrahlte sekundäre Empfängertiere transplantiert. Wie aus Abbildung 26 ersichtlich, blieb hierbei der Anteil an $EGFP^+$ Granulozyten sowohl in der CDD- als auch in der Kontroll-Gruppe über einen Zeitraum von über 4 Monaten stabil.

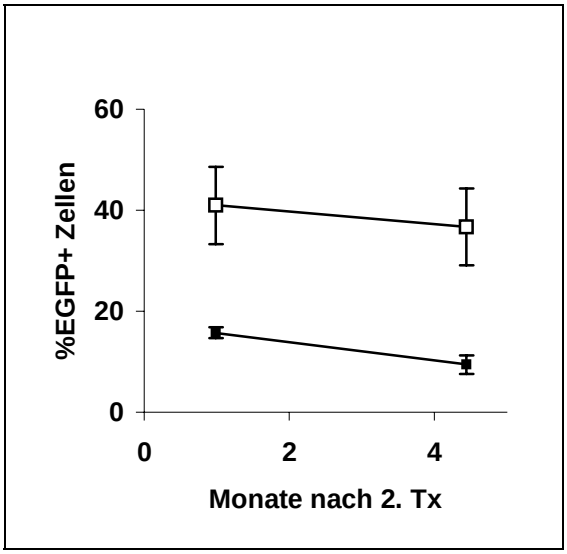

Abbildung 26. Sekundärtransplantationen zur Analyse CDD-transduzierter langzeitrepopulierender Zellen. Dargestellt ist der Anteil an $EGFP^+$ Granulozyten (■) und Lymphozyten (□) im peripheren Blut nach Sekundärtransplantation (2. Tx) von mononukleären Knochenmarkzellen aus Experiment C_1 als Mittelwerte ± SEM für n=8 Tiere aus der CDD-Gruppe.

3.3.9 Geringer inhibitorischer Effekt des CDD-Gentransfers auf Granulozyten

Angesichts des inhibitorischen Effekts des CDD-Gentransfers auf myeloische Vorläuferzellen in den zuvor beschriebenen In-vitro-Experimenten (Abschnitt 3.2.3), wurde ein möglicher toxischer Effekt des CDD-Gentransfers auf die Granulozyten des peripheren Bluts untersucht. Hier zeigte die Analyse der Granulozytenzahlen in Tabelle 8, dass zunächst in Versuch C_3, d.h. dem Versuch mit der höchsten Transduktionsrate von 69,2 ± 1,6 % $EGFP^+$-Granulozyten, ein signifikanter Unterschied zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe zu beobachten war. Außerdem zeigte die Korrelationsanalyse (Abblidung 27), dass die Höhe der Differenz der Granulozytenzahlen zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe mit der Höhe der Gentransferraten der CDD stark korrelierte (r = 0,95).

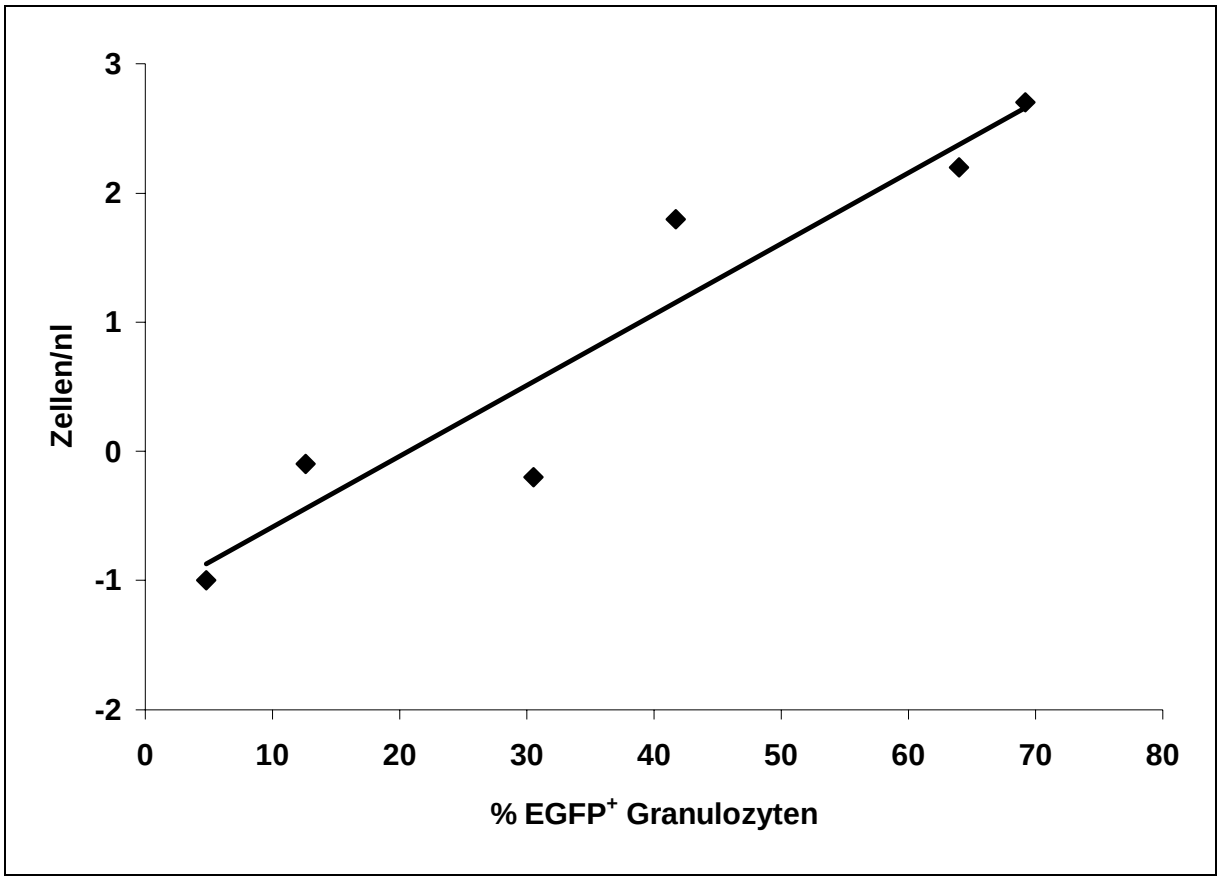

Abbildung 27: Korrelation der Granulozytenzahlendifferenz mit der Höhe der Gentransfereffizienz in der CDD-Gruppe. Die Differenz der Granulozytenzahlen im peripheren Blut zwischen der CDD- und der Kontroll-Gruppe nach initialer hämatopoetischer Rekonstitution der einzelnen Experimente (C_{1-5} und G_1) wurde gegen die jeweilige Höhe der Gentransferrate der CDD in den Granulozyten gegenübergestellt.

Diese Daten weisen zunächst darauf hin, dass der CDD-Gentransfer auch in vivo einen inhibitorischen Effekt auf die Granulopoese hat, wobei dieser Effekt recht gering bzw. in der Regel als gut kompensiert erscheint.

4 Diskussion

Die Myelosuppression stellt die häufigste dosislimitierende Nebenwirkung bei der Behandlung von Tumorerkrankungen mit Zytostatika dar. Allerdings wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Gene identifiziert, die bei (Über-) Expression eine zelluläre Resistenz gegenüber bestimmten Zytostatika vermitteln können. Eines dieser Resistenzgene ist die Cytidindeaminase (CDD), welche die zur Chemotherapie eingesetzte Analoga des Desoxycytidins wie AraC, Gemcitabin oder 5-Aza-2'-deoxycytidin deaminiert, und somit die intrazelluläre Akkumulation derer aktiver zytotoxischer Metaboliten verhindert. Daher gilt die CDD als klinisch hochinteressantes Resistenzgen, dessen Schutzpotenzial von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits in Zelllinien und im murinen hämatopoetischen System untersucht wurde (Momparler et al., 1996a; Momparler et al., 1996b; Neff et al., 1996; Schroder et al., 1996; Flasshove et al., 1999; Sauerbrey et al., 1999). Vor kurzem konnte außerdem zum ersten Mal gezeigt werden, dass der retrovirale Gentransfer der CDD auch humanen primären hämatopoetischen Zellen einen Schutz gegenüber AraC verleiht (Bardenheuer et al., 2005). Aufgrund dieser viel versprechenden Ergebnisse wurden die Effekte eines CDD-Gentransfers weitergehend untersucht. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Produzentenzelllinie etabliert, die dazu benötigt wurde, hochtitrigen virushaltigen Überstand für den erfolgreichen retroviralen Gentransfer der CDD zu erzeugen. Im zweiten Teil wurde dann anhand von In-vitro-Experimenten der durch die CDD vermittelte Schutz in humanen Zellen gegenüber Gemcitabin sowie die Selektierbarkeit transduzierter Zellen untersucht. Auf die beiden ersten Teile aufbauend wurden schließlich im dritten Teil die Effekte des CDD-Gentransfers im In-vivo-Maustransplantationsmodell untersucht.

4.1 Herstellung hochtitriger Produzentenzelllinen

Lange Jahre war es schwer, insbesondere humane primäre hämatopoetische Zellen mittels retroviraler Vektoren mit ausreichender Effizienz zu transduzieren, die Gentransferraten lagen meist unter 1%. Ursachen hierfür sind z.B. die geringe Teilungsaktivität hämatopoetischer Stammzellen oder die geringe Zahl an Oberflächenrezeptoren, an die die retroviralen Partikel mit ihren Hüllproteinen binden können. Durch verbesserte Transduktionsprotokolle, wie z.B. die Benutzung von Fibronektin, die Verbesserung retroviraler Vektorkonstrukte oder verbesserte

Pseudotypisierung der viralen Partikel zur Nutzung häufiger vorhandener Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen (Sandrin et al., 2003), konnten die Gentransfereffizienzen mittlerweile deutlich verbessert werden. Dennoch hängt die Gentransfereffizienz weiterhin stark vom Titer der zur Transduktion benutzten Viruspräparation ab. Derzeit steht hier zwar eine große Anzahl von Methoden mit stabiler oder transienter Expression von Helferfunktionen zur Produktion hochtitriger retroviraler Vektorpräparationen zur Verfügung (Mulligan, 1993; Yang et al., 1999), jedoch können für individuelle Vektor-Konstrukte immer wieder Probleme bei der Erzeugung hochtitriger Viruspräparationen entstehen. So wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP nach transienter Transfektion von FNX-eco-Zellen (Kinsella et al., 1996) ein Titer von 1 x 10^5 IE/ml erzielt, welcher nicht ausreichte, um erfolgreich hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren. Deshalb wurde zur Herstellung hochinfektiöser Titer auf die Herstellung einer stabilen Linie zurückgegriffen. Hierbei wurde die von Gary Nolan eingeführte Phoenix-Verpackungszelllinie benutzt, die in der Regel zur transienten Virusproduktion eingesetzt wird (Kinsella et al., 1996). Diese Zelllinie basiert auf humanen 293T-Zellen (embryonale Nierenzelle mit neuronalen Markern), welche mit zwei retroviralen Genen stabil transfiziert wurden. Diese beiden Gene befinden sich auf zwei voneinander unabhängigen Konstrukten, was die Bildung rekombinanter replikationskompetenter Viren durch homologe Rekombination erschwert (Markowitz et al., 1988). Bei diesen Konstrukten wurden außerdem die 5'LTRs vollständig durch den RSV-Promotor (gag/pol-Konstrukt) bzw. den CMV-Promotor (env-Konstrukt) ersetzt, um homologe Regionen zwischen den verwendeten Konstrukten bzw. dem retroviralen Vektor zu verringern. Somit wären mindestens drei Rekombinationsereignisse notwendig, damit replikationskompetente Viren entstehen können. Damit gilt diese Verpackungszellline als besonders sicher.

Die in dieser Doktorarbeit beschriebene Technologie erlaubt die reproduzierbare Herstellung hochtitriger retroviraler Präparationen mit begrenztem Zeit- und Materialaufwand. Dabei konnte eine stabile FNX-eco-basierte polyklonale Produzentenzelllinie hergestellt werden, mit der sich virushaltige Überstände mit Titern von 3 bzw. 5 x 10^5 IE/ml für die Vektoren SFβ1-EGFP bzw. SF91-CDD-IRES-EGFP erzeugen ließen. Mit diesen Überständen war es möglich, primäre hämatopoetische Zellen mit Effizienzen von mehr als 30 % zu transduzieren. Diese Titer ließen sich durch Selektion einzelner Produzentenklone sogar auf 2 bzw.

6 x 10^6 IE/ml steigern. Gegenüber dem Titer von 1 x 10^5 IE/ml, der mittels transienter Transfektion für das Konstrukt SF91-CDD-IRES-EGFP im Rahmen dieser Arbeit erreicht wurde, bedeutet die Verwendung der stabilen Linie nach Selektion einzelner Produzentenklone eine Steigerung des Titers um das 60-fache. Mit diesem hochtitrigen Überstand war es dann möglich, für primäre hämatopoetische Zellen Gentransfereffizienzen von bis zu 70 % zu erhalten.

Speziell in Hinblick auf eine wiederholte Nutzung desselben Vektorkonstruktes stellen stabile Zelllinien eine zuverlässige, schnelle und kostengünstige Methode dar, um hochreproduzierbar virale Präparationen mit hohen Virustitern zu gewinnen. Darüber hinaus hat diese Methode den Vorteil, dass nahezu beliebig große Mengen an virushaltigen Überstand erzeugt werden können. Der Zeitaufwand bis zur Herstellung einer stabilen monoklonalen Produzentenzelllinie betrug 4 Wochen. Zwar wird bei der Virusherstellung mittels transienter Transfektion deutlich weniger Zeit benötigt (ca. 1 Woche), jedoch existiert hierbei der große Nachteil, dass die Höhe der Titer von Transfektion zu Transfektion stark schwanken können. Daher ist es in der Regel notwendig, für jede einzelne Virusproduktion mittels transienter Transfektion eine Titration der virushaltigen Überstände durchzuführen, was nochmals bis zu einer Woche Zeit in Anspruch nimmt. Bei der Herstellung einer stabilen monoklonalen Produzentenzelle existieren diese Probleme nicht, wie die Langzeituntersuchungen zur Stabilität der Titer belegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Virustiter auch nach 8 wöchiger Kultur der stabilen Produzentenzellen noch gleich bleibend hoch waren.

Die Produktion hochtitriger retroviraler Überstände mittels der hier beschriebenen Methode beschränkt sich auf Vektoren, die ein selektierbares Markergen enthalten. Mittlerweile existiert eine große Anzahl solcher Markergene, deren Selektierbarkeit auf unterschiedlichen Prinzipien beruht. In früherer Zeit war das bakterielle Neomycin-Phosphotransferase-Gen sehr verbreitet, welches die Resistenz gegenüber dem Neomycin-Analogon G418 vermittelt und somit eine pharmakologische Selektierbarkeit ermöglicht (Southern et al., 1982). Aber auch Chemotherapie-Resitenzgene wie MGMT, MDR-1 oder DHFR eignen sich in diesem Zusammenhang als pharmakologische Markergene. Bei einem anderen Prinzip werden transduzierte Zellen durchflusszytometrisch aufgrund ihrer Markierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff selektioniert. Hier werden zum einen modifizierte (nichtfunktionelle) Formen von Zelloberflächenproteinen wie die verkürzte Version

des NGF- (Nerve growth factor-) Rezeptors (Valtieri et al., 1994) oder Spleißvarianten des CD34-Oberflächenmarkers (Fehse et al., 2000) eingesetzt, die auf der normalen Zelle nicht vorkommen und sich durch spezifische fluoreszenzgekoppelte Antikörper im Durchflusszytometer leicht nachweisen lassen. Zum anderen werden Markergene, die autofluoreszierende Proteine wie das EGFP, EYFP (enhanced yellow fluoerescent protein) oder ECFP (enhanced cyano fluorescent protein) kodieren, zur direkten Nachweis transduzierter Zellen benutzt (Green et al., 2002).

Für Vektoren, die mehr als ein Gen enthalten, sollte dabei die Expression der zusätzlichen Gene von derselben Expressionskassette wie die des Markergens erfolgen, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass das zweite, nichtselektierbare Gen bei Gebrauch einer seperaten Expressionskassette ungleichmäßig exprimiert wird (Bowtell et al., 1988; Apperley et al., 1991). Die Verwendung von internen ribosomalen Eintrittsstellen (internal ribosomal entry sites, IRES) gestattet in der hier vorliegenden Arbeit die Expression mehrerer Gene vom gleichen Transkript, d. h. beide Gene werden vom gleichen Promotor aus transkribiert (Morgan et al., 1992). Der erste offene Leserahmen auf der mRNA wird 5'-cap-abhängig translatiert, der zweite offene Leserahmen, der auf die IRES folgt, cap-unabhängig. Hierbei erfolgt kein Abtasten der mRNA durch das Ribosom vom 5'-Ende aus (wie bei der cap-abhängigen Translation); vielmehr erkennt das Ribosom interne Sequenzen der IRES (analog zur prokaryontischen Translation). Nachteilig kann sich bei Einsatz der IRES auswirken, dass die kombinierten Gene nicht exakt im gleichen Verhältnis exprimiert werden. So wurde gezeigt, dass das Gen, welches hinter der IRES liegt, schwächer exprimiert wird, das Ausmaß dieser Reduktion ist jedoch variabel und im Einzelfall nicht sicher vorherzusagen. Eine neuere Strategie zur Vermeidung dieses Problems ist eine proteolytische Koexpression über eine Verknüpfung des Transgens und des Markergens mit der 2A-Sequenz des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus (de Felipe et al., 1999). Hierbei werden die zu koexprimierenden Proteine als Fusionsprotein synthetisiert und anschließend durch die 2A-Protease autoproteolytisch gespalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Erzeugung hochtitriger Produzentenzellen mit ecotropem Wirtsspektrum beschrieben. Die hierbei eingesetzte Technologie sollte sich jedoch nach leichten Modifizierungen auch für die Produktion von amphotropen, GALV- oder RD114-pseudotypisierten Retroviren bei Nutzung von FNX-ampho,

FNX-GALV oder FNX-RD114-Verpackungszellen zur Herstellung von Viren für die Infektion von humanen Zellen eignen. So wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits FNX-RD114-Verpackungszellen als stabile Linie etabliert, mit der ein 30 -40-facher Anstieg im Titer von RD114-pseudotypisierten retroviralen Präparationen bei der Nutzung eines EGFP-enthaltenen Vektor-Konstruktes durch durchflusszytometrische Selektion erreicht wurden (A. Brückner, pers. Mitteilung).

Die hier beschriebenen Experimente haben außerdem gezeigt, dass retrovirale Titer durch die systematische Suche nach individuellen hochtitrigen Produzentenklonen weiter erhöht werden konnten, wodurch vorangegangene Studien bestätigt wurden (Sheridan et al., 2000; Green et al., 2002). Während in der Vergangenheit die Suche nach hochtitrigen Produzentenklonen normalerweise eine arbeits- und zeitintensive Angelegenheit war, kann dies zumindest bei der Nutzung von Fluoreszenzmarkern wie EGFP, EYFP oder ECFP mittlerweile deutlich effizienter gestaltet werde. Eine ensprechende „high-throughput“-Technologie auf Basis des 96-well Formates wurde hier vor kurzem beschrieben (Green et al., 2002).

4.2 Gentransfer der CDD in hämatopoetische Zellen

Obwohl die dosislimitierenden Nebenwirkungen der systemischen Chemotherapie in Abhängigkeit von den verwendeten Substanzen ganz unterschiedliche Organsysteme betreffen können, repräsentiert die Myelosuppression mit möglicherweise lebensbedrohlicher Neutropenie und Thrombozytopenie das dominierende klinische Problem und verhindert insbesondere bei dosisintensiven Therapie-Konzepten häufig die Applikation der geplanten Zytostatikadosis. Eine autolog transplantierbare Population von hämatopoetischen Zellen, die zuvor ex vivo durch genetische Modifikation chemotherapieresistent gemacht wurden, würde die Myelosuppression in kurativen Hochdosis-Konzepten deutlich reduzieren bzw. verhindern und könnte damit Remissionsraten und Langzeitüberleben der Patienten günstig beeinflussen.

Das erste Resistenzgen, das in hämatopoetische Zellen transferiert wurde, war eine mutante Form des DHFR-Gens, das ein Schlüsselenzym im Folatstoffwechsel kodiert, welches die Reduktion von Dihydrofolat zum metabolisch aktiven Tetrahydrofolat katalysiert (Chu et al., 2001). Der Folatantagonist Methotrexat (MTX) und seine Derivate sind kompetitive Inhibitoren der DHFR. Die Behandlung mit diesen Substanzen verursacht den Zelltod durch die zelluläre Depletion der Tetrahydrofolate und die Akkumulation von Dihydrofolat und ähnlichen Produkten. Es

wurden einige Mutanten identifiziert, die weiterhin die physiologische Reaktion des Enzyms aufrechterhalten können, aber nicht länger durch MTX gehemmt werden, und damit vielversprechende Kanditaten als Resistenzgene darstellen (Flasshove et al., 1995; Meisel et al., 2003; Budak-Alpdogan et al., 2004). Ein weiteres viel untersuchtes Resistenzgen ist das MDR-1-Gen, das für p-Glykoprotein, eine membranständige Effluxpumpe für zytotoxische Substanzen wie Anthrazykline, Vinkaalkaloide, Taxane oder Etoposid, kodiert, die zytotoxische Substanzen aus dem Zellinnern heraustransportiert und damit entgiftet (Abonour et al., 2000; Schiedlmeier et al., 2002). Ein aufgrund seiner guten Selektierbarkeit besonders intensiv untersuchtes Resistenzgen ist das Gen für die O^6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) (Moritz et al., 1995; Jansen et al., 2002; Neff et al., 2005). Dieses DNA-Reparaturprotein entfernt die besonders toxischen Alkylierungen an der O^6-Position des Guanins, welche durch alkylierende Substanzen wie Temozolomid oder Chloroethylnitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU oder CCNU) verursacht werden, in einem Einstufen-Prozess, bei dem die zytotoxische Alkylgruppe auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum der MGMT übertragen wird. Neben diesen Resistenzgenen gibt es eine Reihe weiterer Resistenzgene, wie z.B. die Gene für die Aldehyddehydrogenase (Takebe et al., 2002), die Glutathion-S-Transferase (Matsunaga et al., 2000) oder die Thymidylat-Synthase (Landis et al., 2001), für die jedoch nur relativ wenige Daten bezüglich des retroviralen Gentransfers in hämatopoetische Zellen existieren. Häufig stellt jedoch die nur eingeschränkte klinische Nutzbarkeit der Resistenzgene ein Problem für den klinischen Einsatz dar. So sind heutzutage Chemotherapien. bei denen Methotrexat, Chloroethylnitrosoharnstoffe oder Temozolomid, die die dosislimitierenden Therapiekomponeneten darstellen, auf wenige Tumorentitäten wie z.B. maligne Hirntumoren, maligne Melanome, bestimmte Sarkome oder Lymphome des Zentralnervensystems beschränkt. Lediglich das MDR-1-Gen bietet einen Schutz gegen eine Reihe klinisch häufig eingesetzter Medikamente. In dieser Hinsicht entspricht die CDD mit der Schutzvermittlung gegenüber AraC und Gemcitabin weitgehend dem MDR-1.

Die Idee, die CDD als Chemotherapie-Resistenzgen einzusetzen, wurde aus dem Metabolismus des Pyrimidinanalogons AraC abgeleitet. Die CDD deaminiert Cytosinnukleoside und deren Analoga, wie AraC, indem sie die Akkumulation des intrazellulären AraCTP, dem aktiven Metaboliten des AraC, verhindert (Kufe et al.,

1984). AraC ist zusammen mit Anthrazyklinen die wirksamste Substanz bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie und ist in der Kombinationschemotherapie auch effektiv gegen die akute lymphatische Leukämie und Non-Hodgkin-Lymphome. Sowohl niedrig als auch hoch dosierte AraC-Applikationen führen häufig zu einer schweren und lebensbedrohlichen Myelosuppression.

4.2.1 Schutz der Hämatopoese vor AraC und Gecitabine durch die retroviral vermittelte Überexpression der CDD

Eine erhöhte Resistenz gegenüber AraC wurde erstmal in humanen Myeloblasten und Zelllinien beobachtet, die die CDD überexprimieren (Steuart et al., 1971). Erst nachdem das CDD-Gen kloniert wurde (Kuhn et al., 1993; Laliberte et al., 1994), war es möglich, gezielt die Überexpression der CDD in spezifischen Zelltypen zu untersuchen. So wurde dann gezeigt, dass die stabile Transfektion des CDD-Gens in murine Fibroblasten-Zelllinien zu einer erhöhten Resistenz gegenüber AraC führt (Momparler et al., 1996b; Schroder et al., 1996). Eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen haben anschließend im murinen System nachgewiesen, dass die retroviral vermittelte Überexpression der CDD Zelllinien und primären hämatopoetischen Zellen einen Schutz vor Cytidinanaloga verleiht (Neff et al., 1996; Eliopoulos et al., 1998a; Flasshove et al., 1999). Daten zum Schutz in humanen hämatopoetischen Zellen fehlten jedoch bislang, obwohl $CD34^+$-Zellen aufgrund der geringen endogenen CDD-Expression prinzipiell ein geeignetes Ziel für die retrovirale Überexpression der CDD darstellen (Schroder et al., 1996). Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe der Transfer des CDD-Gens im humanen System untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass der retrovirale CDD-Gentransfer auch humane primäre hämatopoetische Vorläuferzellen in vitro vor der Toxizität von AraC schützt (Bardenheuer et al., 2005).

Darauf aufbauend wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Schutz gegenüber Gemcitabin, einem weiteren Cytidinanalogon mit breiterem Wirkunsspektrum als AraC, in primären humanen hämatopoetischen Zellen untersucht. Gemcitabin ist im Vergleich zu AraC ein relativ neues Medikament, das sowohl gegen hämatologische Krebserkrankungen als auch gegen solide Tumoren wirksam ist. Die Empfindlichkeit humaner hematopoetischer Vorläuferzellen gegenüber Gemcitabin wurde im CFU-Assay untersucht, in dem die Zellen für 10-14 Tage aufsteigenden Konzentrationen an Gemcitabin ausgesetzt waren. Dabei zeigte sich, dass der retrovirale CDD-

Gentransfer den humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen einen Schutz gegenüber Gemcitabin vermittelt. Der Schutzeffekt für die Gesamtheit der Vorläuferzellen (CFU-C) lag hier in einem Dosisbereich von 3 - 15 nM Gemcitabin und war bei den verschiedenen Vorläuferzellen-Subgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt. So war der IC_{50}-Wert in der CDD-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe der BFU-E/CFU-Mix um das 1,4-fache und der CFU-GM um das 3,0-fache erhöht. Der Dosisbereich, in dem hier ein Schutz erzielt wurde, bestätigt Daten anderer Arbeitsgruppen, die anhand des retroviralen CDD-Gentransfers in Zelllinen oder primären murinen hämatopoetischen Zellen gewonnen wurden. Hierbei wurde von einer Resistenz gegenüber Gemcitabin im Bereich von 1 bis 10 nM in NIH3T3-Zellen (Neff et al., 1996) und zwischen 20 und 40 nM in primären murinen Knochemarkzellen (Beausejour et al., 2001) berichtet. Mit Erhöhungen der IC_{50} Werte vom 1,4-fachen bis zum 3,0-fachen für Gemcitabin durch CDD-Gentransfer liegt der Grad der Resistenz, der durch die CDD-Expression in CD34+-Zellen vermittelt wird, unterhalb der von anderen Resistenzgenen wie des MGMT- oder des DHFR-Gens. Bei diesen Resistenzgenen liegt der Schutz zwischen dem 1,3 bis 6-fachen für das MGMT-Gen (Jansen et al., 2001) und dem 40-fachen im Falle des mutierten DHFR-Gens (Takebe et al., 2000; Meisel et al., 2003).

Dagegen war der Schutzeffekt, den die CDD den CFU-Mk vermittelte, deutlich höher ausgeprägt im Vergleich zu den anderen Subgruppen. Hier waren die IC_{50}-Werte für Gemcitabin nach CDD-Gentransfer in den CFU-Mk um das 23,5-fache erhöht. Da Thrombopenie neben der Leukopenie zu den häufigsten Nebenwirkungen der Chemotherapie mit Gemcitabin gehört (Kummar et al., 2005), ist dieses Ergebnis in Bezug auf eine potentielle klinische Anwendung des CDD-Gentransfers sicherlich relevant.

Im Gegensatz zur In-vitro-Situation lagen aus In-vivo-Studien bislang kaum Daten für einen CDD-vermittelten Schutzeffekt auf die Hämatopoese vor. So wurde in einer Studie die Langzeitexpression der CDD, jedoch kein Schutz der Hämatopoese nach AraC-Behandlung gezeigt (Eliopoulos et al., 1998a). In einer anderen Studie wurde die erfolgreiche Behandlung eines Lymphoms mit einer Kombination von Methotrexat und AraC in NOD/SCID-Mäusen gezeigt, deren Knochenmark zuvor mit einem $DHFR^{mut}$/CDD-Fusionskonstrukt transduziert worden war (Budak-Alpdogan et al., 2004). Allerdings geht aus dieser Studie der individuelle Beitrag der CDD zum Schutz der Hämatopoese nicht klar hervor.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde der retrovirale CDD-Gentransfer mittels eines murinen Knochenmarktransplantationsmodells in der In-vivo-Situation untersucht. Hierbei wurden Knochenmarkmarkzellen von C57/Bl6-Spendermäusen ex vivo mittels retroviralen Transfers des CDD-Gens (in Kombination mit dem EGFP-Gen als Markergen) transduziert und Emfängertieren transplantiert. Bei diesen Experimenten wurde die eigene Hämatopoese der Empfängertiere zuvor durch letale Bestrahlung vollständig zerstört, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Hämatopoese nach der Rekonstitution ausschließlich von den transplantierten Zellen ausgeht. Anschließend wurden die Tiere wiederholt mit AraC oder Gemcitabin behandelt. Hierbei spiegelt dieses Knochenmarktransplantationsmodell die bei der klinischen Anwendung von AraC und Gemcitabin zu beobachtenden hämatotoxischen Nebenwirkungen gut wieder, und sowohl nach der Verabreichung von AraC als auch von Gemcitabin zeigte sich eine ausgeprägte Granulozytopenie als auch Thrombozytopenie. Dies war zu erwarten gewesen, da zum einen sowohl humane als auch murine hämatopoetische Vorläuferzellen eine geringe CDD-Enzymaktivität zeigen (Schroder et al., 1996) und zum anderen bereits in vitro vergleichbare Toxizitäten von Cytidinanaloga gegenüber murinen und humanen Zellen gezeigt worden waren (Bardenheuer et al., 2005). Außerdem war bekannt, dass in vivo das hämatopoetische System ein kritisches Zielorgan sowohl für AraC als auch für Gemcitabin darstellt (Eliopoulos et al., 1998a; Johnson, 2000).

Der Schutzeffekt der CDD für das hämatopoetische System im Vergleich zu Kontrolltieren nach Behandlung mit AraC oder Gemcitabin wurde anhand der Nadir-Zellzahlen im peripherem Blut gemessen. Es zeigte sich hierbei, dass der CDD-Gentransfer Granulozyten und Thrombozyten signifikant sowohl vor AraC als auch vor Gemcitabin schützt. Dabei wurden Dosierungen eingesetzt, die verglichen mit den normalerweise beim Menschen angewandten Dosierungen deutlich höher lagen. Für AraC wurde die intraperitoneale Injektion von 500 mg/Kg an jeweils 4 aufeinanderfolgenden Tagen gewählt, weil sich in Vorversuchen mit gesunden Mäusen zeigte, dass bei dieser Dosierung eine deutliche Myelosuppression erreicht wurde. Die Standarddosierung einer Chemotherapie beim Menschen mit AraC liegt bei 100 - 200 mg/m² an 5 - 7 aneinanderfolgenden Tagen. Bei hochdosierter Therapie werden 2-6 g/m² an 3 - 4 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Unter der Annahme, dass ein durchschnitllicher Mensch eine Körperoberfläche von ca. 2 m² und ein Gewicht von 75 kg hat, entspricht die Dosierung, die die Mäuse erhalten

haben, einer Dosierung von 18,75 g/m² pro Tag. Hieran zeigt sich die allgemein bekannte Tatsache, dass sich Toxizitäten, die im Mausmodell ermittelt wurden, nicht unbedingt direkt auf den Menschen übertragen lassen. Unabhängig davon ist jedoch zu erwarten, dass die Überexpression der CDD auch der humanen Hämatopoese einen Schutz gegenüber Cytidinanaloga vermittelt. Ein wichtiger nächster Schritt zur Klärung dieser Frage wäre die Untersuchung des CDD-Gentransfers in anderen relevanten In-vivo-Modellen, wie z.B. einem Hunde- oder Primaten-Großtiermodell.

4.2.2 Untersuchungen zur Selektion transduzierter hämatopoetischer Stammzellen

Prinzipiell bietet der Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen die Möglichkeit, die Behandlung von malignen, genetischen und infektiösen Erkrankungen zu verbessern. Dabei sind zurzeit retrovirale Vektoren das am besten untersuchte Vehikel für die klinischen gentherapeutischen Anwendungen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, stabil in das Chromosom der hämatopoetischen Stammzelle zu integrieren, wird bei diesen Vektoren das Transgen an die Vorläuferzellen aller Linien weitergegeben. Mit den derzeitig zur Verfügung stehenden Methoden des retroviralen (lentiviralen, gammaretroviralen oder spumaviralen) Gentransfers sind die Effizienzen für problematische Zielzellen, wie z.B. blutbildenden Stammzellen, jedoch häufig nicht ausreichend, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Einige Chemotherapieresistenzgene besitzen aufgrund der von ihnen vermittelten Schutzwirkung gegenüber Zytostatika die Eigenschaft, den transduzierten hämatopoetischen Stammzellen einen Selektionsvorteil während der Chemotherapie zu vermitteln. So ist das hämatopoetische System bei initial niedrigen Gentransferraten der Resistenzgene nur gering vor der Einwirkung von Zytostatika geschützt, jedoch wird dann durch die Selektion transduzierter Zellen dieser Effekt mit jedem Chemotherapiezyklus verstärkt (Jansen et al., 2002). Aufgrund dieser Eigenschaft könnten Chemotherapie-Resistenzgene auch als selektierbare Marker in der Gentherapie von monogenetischen Erkrankungen, die das hämatopoetische System betreffen, genutzt werden. Insbesondere dann, wenn das therapeutische Gen selbst den transduzierten Zellen keinen selektiven Wachstumsvorteil vermittelt, erscheint die Kombination mit einem selektierbaren Markergen als sinnvoll. Als Beispiel wurde für die β-Thalassämie geschätzt, dass 20% der erythroiden Vorläuferzellen transduziert sein müssten um eine klinisch relevante Verbesserung zu sehen und 50% korrigierte Zellen für eine annähernd normale Hämatopoese

ausreichen würden (Persons et al., 2001). Um diese Raten zu erreichen, könnten Chemotherapie-Resistenzgene in Kombination mit einem therapeutischen Gen eingesetzt werden. Besonders intensiv wurden bisher im In-vivo-System mutierte Formen des DHFR-Gens, das MDR-1-Gen und mutierte Formen des MGMT-Gens auf ihre Eignung als selektierbare Marker hin untersucht (Neff et al., 2006).

In diesem Zusammenhang erschien auch das CDD-Gen aufgrund des nachgewiesenen Schutzeffektes gegenüber Cytidinanaloga als ein potentielles Selektionsmarkergen interessant. In den hier vorliegenden In-vitro-Untersuchungen wurde eine signifikante Anreicherung CDD-transduzierter humaner $CD34^+$-Zellen aus Nabelschnurblut sowohl nach 4- als auch nach 8-tägiger AraC-Exposition mit Konzentrationen von 30-100 nM AraC beobachtet. Die auf funktioneller Ebene nachgewiesene erhöhte Resistenz klonogener Vorläuferzellen nach 4 Tagen Selektion mit AraC und die signifikant erhöhten MFI-Werte nach 4 und 8 Tagen Selektion, welche die Höhe der Transgenexpression widerspiegeln, bestätigen, dass der Selektionseffekt auf die Überexpression der CDD zurückzuführen war. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe mit primären murinen Knochenmarkzellen, in denen keine In-vitro-Selektion mit AraC nach Gentransfer der CDD möglich war (Beausejour et al., 2001). Als Ursache für die fehlende Selektion wurde von dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass größere Mengen der überexprimierten CDD von den transduzierten Zellen in das Medium entlassen wurden und auch die nicht-transduzierten Zellen geschützt hatte. Von der selben Arbeitsgruppe wurde jedoch eine Ex-vivo-Anreicherung von murinen primären Knochenmarkstromazellen nach retroviralem CDD-Gentransfer und 7tägiger Kultur in Anwesenhet von 2,5 µM AraC gezeigt (Eliopoulos et al., 2002).

Für uns überraschend war die fehlende Anreicherung CDD-transduzierter Zellen nach der Verabreichung von AraC oder Gemcitabin in dem in dieser Arbeit eingesetzten In-vivo-CDD-Gentransfermodel, obwohl Zellen signifikant vor der Myelotoxizität dieser Substanzen durch den CDD-Gentransfer geschützt wurde. In Experimenten sowohl mit hoch- als auch mit niedrigeffizient transduzierten Zellen ließ sich weder mit AraC noch mit Gemcitabin eine Anreicherung transduzierter Zellen erreichen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Schutzeffekt, der durch die CDD-Überexpression hervorgerufen wurde, primär auf der Ebene der Vorläuferzellen gegeben ist und sich nicht gleichermaßen auf das Stammzellkompartiment erstreckt. Tatsächlich wurde für AraC bisher nur von einer

moderaten Stammzelltoxizität im Vergleich zu anderen hämatotoxischen Substanzen, wie z.B. BCNU oder Busulfan, berichtet (Neben et al., 1993). Eine gewisse Stammzellen-schonende Aktivität von AraC wird auch durch das klinische Toxizitätsprofil nahegelegt. Hier folgt auf die wiederholte hochdosierte Gabe (3 g/m^2, 6-8 Dosierungen) von AraC eine ausgeprägte und lang andauernde, teilweise lebensbedrohende Myelosuppression, die jedoch nahezu immer in einer kompletten hämatopoetischen Rekonstitution endet. Zwar wurde auch eine gewisse Stammzelltoxizität von AraC beschrieben, die sich in eine vierfach reduzierte Langzeitrepopulierungskapazität (Neben et al., 1993) und einer 10-fachen Reduktion der CFU-S-Aktivität (Paukovits et al., 1993) äußerte, aber zumindest in dem in dieser Arbeit angewandten experimentellen System konnte dies nicht in eine signifikante In-vivo-Selektion übertragen werden.

Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Stammzelltoxizität von AraC könnte darin bestehen, dass AraC vor allem in der S-Phase des Zellzyklus toxisch wirkt (Capizzi et al., 1991) und daher nur der sehr geringe Anteil an teilungsaktiven Stammzellen inhibiert wird. Ein Weg, die Stammzelltoxizität von AraC zu erhöhen um damit eventuell eine Selektion zu erreichen, könnte die Rekrutierung der Stammzellen in den Zellzyklus sein. Dies könnte zum Beispiel durch die Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren wie G-CSF und SCF (Bodine et al., 1996) oder mit Zytostatika wie 5-Fluoruracil (Bodine et al., 1991) erreicht werden.

Als weitere Ursache für die fehlende Selektion käme eine möglicherweise hohe extrazelluläre Konzentration der CDD im Blut-Plasma in Frage, wodurch auch nicht-transduzierte Zellen geschützt worden wären. So wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass in vitro kultivierte CDD-überexprimierende Zellen eine ausreichend hohe Menge an aktivem Enzym in das umgebende Medium entlassen, um auch nicht transduzierte Zellen vor der Toxizität von Cytidinanaloga zu schützen (Beausejour et al., 2001; Ge et al., 2004). Ebenso wurde gezeigt, dass die CDD im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen bei der rheumatischen Arthritis von neutrophilen Granulozyten in das Blut-Plasma abgegeben wird (Thompson et al., 1986; Paira et al., 2005). Angesichts der extrem hohen CDD-Aktivität in den CDD-transduzierten Zellen erscheint eine in diesem Zusammenhang relevante Erhöhung der Plasma-CDD Aktivität zumindest möglich. Dieser Fragestellung wird zurzeit experimentell nachgegangen.

In Anbetracht der fehlenden Selektierbarkeit CDD-transduzierter Zellen zumindest in unserem experimentellen Modell, erscheint die kombinierte Expression des CDD-Gens mit anderen selektierbaren Resistenzgenen wie z. B. das Gen der MDR-1 oder von Mutanten des MGMT-Gens als ein vielversprechender Ansatz für die klinische Anwendung. Dies würde nicht nur die In-vivo-Anreicherung der transduzierten Zellen und damit einen zunehmenden Schutz des hämatopoetischen Systems ermöglichen, sondern gleichzeitig würde der Schutz auch auf andere Substanzen ausgedehnt. Vor dem Hintergrund, dass heutzutage die Chemotherapie bei den meisten Tumorpatienten als Kombination aus mehreren Medikamenten verabreicht wird, erscheint eine solche Kombination auch von Resistenzgenen dabei besonders attraktiv. Es wurden bereits retrovirale Konstrukte beschrieben, die die gleichzeitige Expression des CDD-Gens mit einer mutierten Form des DHFR-Gens in hämatopoetischen Zellen erlauben (Sauerbrey et al., 1999; Budak-Alpdogan et al., 2004), und bei einer dieser Studien wurde von der erfolgreichen Behandlung eines B-Zell-Lymphoms im Mausmodell durch eine Kombinationsbehandlung mit AraC und Methotrexat berichtet (Budak-Alpdogan et al., 2004). Als klinisch besonders interessant erscheint die Kombination des CDD-Gens mit dem MDR-1-Gen, da dieses vor Anthrazyklinen schützt, welche neben dem AraC eine weitere wichtige Substanzklasse in der Behandlung von Lymphomen und der AML darstellen. Allerdings wird auch die Eignung des MDR-1-Gens im Einsatz als Resistenz- und Selektionsmarkergen kontrovers diskutiert. Die cDNA des MDR-1-Gens ist über 4 kB groß, wodurch dessen Einbau in einen Doppelgen-Vektor erschwert wird. Außerdem wurde die Überexpression des MDR-1-Gens mit der Transformation muriner hämatopoetischer Stammzellen in Zusammenhang gebracht (Bunting et al., 1998). Allerdings konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die maligne Transformation durch eine hohe Kopienzahl des Transgens innerhalb des Wirtszellgenoms und durch Insertionsmutagenese und nicht durch das MDR-1-Transgen selbst ausgelöst wurde (Modlich et al., 2005). Hier sind noch weitere Studien zur Evaluierung der Wertigkeit des MDR-1-Gens als klinisch einsetzbares Resistenzgen und Selektionsmarker notwendig.

Ebenso könnte die Kombination des CDD-Gens mit dem mutierten MGMT-Gen bei der Behandlung von Lymphomen mit dem Dexa-BEAM-Chemotherapie-Protokoll, welches das MGMT-assozierte BCNU enthält, eingesetzt werden. Hier stellt das Gen der O^6-Benzylguanin rsistentem $MGMT^{P140K}$-Punktmutante ein besonders effizientes

Selektionsgen dar. So wurde die hocheffiziente In-vivo-Selektion MGMT-transduzierter hämatopoetischer Stammzellen mittlerweile im Mausmodell (Davis et al., 2000; Ragg et al., 2000; Sawai et al., 2001; Jansen et al., 2002), im Großtiermodell (Neff et al., 2003; Neff et al., 2005) und an humanenen NOD/SCID repopulierenden Zellen (Pollok et al., 2003; Zielske et al., 2003) nachgewiesen.

4.2.3 Auswirkungen der CDD-Überexpression auf unterschiedliche Kompartimente des hämatopoetischen Systems

Insgesamt sprechen unsere Daten zum Gentransfer des CDD-Gens mittels des SF91-CDD-IRES-EGFP-Vektors für eine stabile und dauerhafte Expression der Transgene der CDD und des EGFP im Stammzellkompartiment und gegen einen wesentlichen toxischen Effekt der CDD-Überexpression auf diese primitiven hämatopoetischen Zellen. So konnte im peripheren Blut sowohl primär als auch sekundär transplantierter Tiere ein annähernd konstantes Niveaus an EGFP-exprimierenden Zellen gezeigt werden. Außerdem wurde selbst 6 Monate nach der initialen Transplantation transduzierter Zellen noch eine stark erhöhte intrazelluläre CDD-Enzymaktivität in Knochenmark- und Milzzellen beobachtet. Diese ging einher mit einer stark erhöhten Resistenz klonogener Zellen aus dem Knochenmark dieser Tiere gegenüber AraC. Zusätzlich wurde die stabile Langzeitexpression des CDD-Gentransfers durch den Schutz des hämatopoetischen Systems vor wiederholten Gaben von AraC für einen Zeitraum von bis zu 2 Monaten gezeigt.

Auf der anderen Seite wurde in den lymphoiden Zellen des peripheren Blutes, der Milz oder des Knochenmarks in der CDD-Gruppe ein stark reduzierter Prozentsatz Transgen-exprimierender Zellen im Vergleich zum myeloischen Kompartiment beobachtet. Hierfür ist ein toxischer Effekt der CDD in Lymphozyten die wahrscheinlichste Erklärung. Diese Annahme wird auch durch die signifikant reduzierte Lymphozytenzahl im peripheren Blut solcher Tiere bestätigt, denen Knochenmark nach hocheffizienter Transduktion (41,7 - 69,2 %, 4 Versuche) mit dem Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP transplantiert wurde. Bei niedrig effizienter Transduktion (4,8 - 15,6 %, 2 Versuche) ist diese Reduktion nicht zu sehen. Ein Faktor, der zu dieser Toxizität erheblich beitragen dürfte, ist dabei die hohe funktionelle CDD Expression, die bei diesen Tieren beobachtet wurde. Hier bestätigten unsere Untersuchungen, in denen ein 24-149-fachen Anstieg an zytoplasmatischer CDD-Aktivität in Knochenmark und Milzzellen nachgewiesen

wurde, das beachtliche Expressionsniveau, welches für SFFV/MESV basierende virale Promotor/Enhancer-Konstrukte in hämatopoetischen Zellen beschrieben wurde (Hildinger et al., 1998; Hildinger et al., 1999; Flasshove et al., 2000; Ragg et al., 2000; Jansen et al., 2001; Knipper et al., 2001; Rappa et al., 2001; Meisel et al., 2003). Eine spezifische Inaktivierung des CDD-Transgens (Gene-Silencing) in lymphoiden Zellen, welche prinzipiell eine weitere Erklärung für unsere Ergebnisse wäre, erscheint angesichts der in der Regel stabilen und hohen Transgenexpressionen von den SFFV/MESV-basierten Vektoren auch in Lymphozyten (Kiem et al., 1994; Ragg et al., 2000; Fehse et al., 2002; Jansen et al., 2002; Engels et al., 2003) als unwahrscheinlich.

Zumindest in der In-vitro-Situation wurde auch ein inhibitorischer Effekt der CDD auf klonogene myeloische Zellen (CFU-GM) beschrieben (Boyum et al., 1994; Gran et al., 1998). So wurde berichtet, dass ausgereifte humane Granulozyten große Mengen von CDD freisetzten und damit in der Lage waren, die Bildung von CFU-GMs zu verhindern. Die Autoren haben daraus geschlossen, dass eine hohe CDD-Expression möglicherweise im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife späte Schritte der myeloischen Differenzierung reguliert. Allerdings war in diesen Experimenten die Hemmung des Wachstums von humanen und murinen CFU-GM durch exogen hinzugefügte CDD von supraphysiologischen Thymidin-Konzentrationen im Medium abhängig (Gran et al., 1998). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte eine moderate Hemmung des CFU-GM-Wachstums durch Überexpression der CDD in vitro jetzt auch bei normalen Thymidin-Konzentrationen gezeigt werden. Hierzu passt die Beobachtung, dass in den hier durchgeführten In-vivo-Maustransplantations-Experimenten bei den Experimenten mit einem hohen Anteil an CDD-exprimierenden Zellen eine leichte Reduktion der Granulozytenzahlen im peripheren Blut zu beobachten war. Es scheint jedoch, dass der inhibitorische Effekt der CDD-Expression auf myeloische Vorläuferzellen in der In-vivo-Situation aufgrund der homöostatischen Regulation der Granulozytenzahlen besser toleriert wird. Diese Hypothese wird auch von vorläufigen Daten unserer Arbeitsgruppe im NOD/SCID-Xenotransplatationsmodel gestützt, in denen sich ebenfalls kein verlässlicher Effekt der CDD Überexpression auf die humane Granulopoese zeigte.

4.2.4 Ausblick

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Daten, dass hämatopoetische Zellen vor Cytidinanaloga durch die transgene Überexpression der

CDD sowohl in vitro, als auch in einem In-vivo-Model geschützt werden können. Diese Befunde machen die CDD zu einen attraktiven Kanditaten-Gen für Stammzellschutz mittels Chemotherapie-Resistenzgene. Sicherlich sind vor einem klinischen Einsatz noch eine Reihe weiterführender Untersuchungen wie z.B. eine detaillierte Analyse der potentiellen Toxizität der CDD, die Bestätigung der Ergebnisse in anderen relevanten In-vivo-Modellen sowie eine gründlichere Evaluierung der Beziehung zwischen der CDD-Transgenexpression und der Myeloprotektion notwendig. Außerdem muss vor dem Einsatz des CDD-Gentransfers im Rahmen einer autologen Transplantation bei leukämischen Erkrankungen das Risiko einer unbeabsichtigten Transduktion von Tumorzellen abgeklärt werden. Daher wäre möglicherweise bei diesen Erkrankungen eine initiale klinische Studie bei der allogenen Transplantation sinnvoll. Sofern diese Probleme jedoch gelöst werden können, erscheint die Überexpression der CDD als eine attraktive Möglichkeit, die Hämatopoese im Rahmen intensiv dosierter Chemotherapiekonzepten vor klinisch hochrelevanten Zytostatika zu schützen.

5 Zusammenfassung

Die Cytidindeaminase (CDD) deaminiert Cytidin und dessen Analoga AraC und Gemcitabin, die als Chemotherapeutika gegen eine Vielzahl unterschiedlicher maligner Erkrankungen eingesetzt werden. Eine wesentliche und häufig dosislimitierende Nebenwirkung beider Substanzen ist die Myelosuppression, die oft eine adäquate Dosierung und somit die Ausschöpfung des therapeutischen Potenzials dieser Substanzen verhindert. Die Überexpression der CDD schützt Zellen vor den toxischen Wirkungen der Cytidinanaloga. Ziel dieser Arbeit war es daher, den durch die Überexpression der CDD mittels retroviralen Gentransfers vermittelten Schutzeffekt in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen.

Für eine effiziente Transduktion hämatopoetischer Zellen werden hochtitrige Viruspräparationen benötigt. Daher wurde im ersten Schritt dieser Arbeit eine neue stabile ecotrope Verpackungszelllinie hergestellt, die es ermöglichte, Viruspräparationen mit infektiösen Titern von bis zu 6 x 10^6 IE/ml zu produzieren. Mit diesen Viruspräparationen ließ sich eine Gentransfereffizienz von bis zu 70 % in primären hämatopoetischen Zellen, sowie ca. 40 % für langzeitrepopulierende Stammzellen, erreichen. Darüber hinaus wurde anhand von In-vitro-Experimenten gezeigt, dass humane hämatopoetische Vorläuferzellen durch die retroviral vermittelte Überexpression der CDD vor der Toxizität nicht nur von AraC sondern auch von Gemcitabin geschützt werden können und dass sich CDD-transduzierte humane hämatopoetische Vorläuferzellen zumindest in vitro mittels AraC selektionieren lassen. Im murinen Knochenmarktransplantationsmodell wurde erstmalig in vivo nachgewiesen, dass nach der Transplantation von CDD-transduzierten Knochenmarkzellen die Hämatopoese vor den zytotoxischen Wirkungen von AraC und Gemcitabin geschützt wird. Selbst 6 Monate nach Transplantation von CDD-transduzierten mononukleären Knochenmarkzellen wurde hierbei noch eine stark erhöhte Enzymaktivität (um das bis zu 149-fache) in Knochenmark- und Milz-Zellen einhergehend mit einer profunden AraC-Resistenz von klonogenen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (bis zu 1000 nM) nachgewiesen. Aufgrund dieses Schutzeffektes und der vorangegangenen erfolgreichen In-vitro-Selektion in humanen Zellen wurde untersucht, ob sich das CDD-Gen auch als In-vivo-Selektionsmarkergen eignet. Allerdings konnten mit den in dieser Arbeit angewandten Applikationsschemata keine Selektion CDD-

transduzierter Zellen mit AraC oder Gemcitabin erreicht werden. Zusätzlich wurde anhand von Langzeitanalysen gezeigt, dass die Überexpression der CDD keinen wesentlichen toxischen Effekt auf das Stammzellkompartiment ausübt. Allerdings wurde auch offensichtlich, dass Überexpression der CDD einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die Lymphopoese und einen schwachen inhibitorischen Effekt auf myeloische Zellen ausübt.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, dass sich die Cytidindeaminase als potentielles Chemotherapie-Resistenzgen im Einsatz gegen klinisch hochrelevante Zytostatika eigenen könnte, womit ein weiterer Schritt in Richtung einer potentiellen klinischen Anwendung des retroviralen CDD-Gentransfers vollzogen wurde.

6 Literatur

Abdel-Aziz, W., Jiang, H. Y., Hickey, R. J., and Malkas, L. H. (2000). Ara-C affects formation of cancer cell DNA synthesome replication intermediates. *Cancer Chemother Pharmacol* 45(4)**,** 312-9.

Abonour, R., Williams, D. A., Einhorn, L., Hall, K. M., Chen, J., Coffman, J., Traycoff, C. M., Bank, A., Kato, I., Ward, M., Williams, S. D., Hromas, R., Robertson, M. J., Smith, F. O., Woo, D., Mills, B., Srour, E. F., and Cornetta, K. (2000). Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6(6)**,** 652-8.

Abratt, R. P., Bezwoda, W. R., Falkson, G., Goedhals, L., Hacking, D., and Rugg, T. A. (1994). Efficacy and safety profile of gemcitabine in non-small-cell lung cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 12(8)**,** 1535-40.

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121(2)**,** 295-306.

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G., and Bordignon, C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296(5577)**,** 2410-3.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774)**,** 193-7.

Allay, J. A., Dumenco, L. L., Koc, O. N., Liu, L., and Gerson, S. L. (1995). Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* 85(11)**,** 3342-51.

Allay, J. A., Persons, D. A., Galipeau, J., Riberdy, J. M., Ashmun, R. A., Blakley, R. L., and Sorrentino, B. P. (1998). In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med* 4(10)**,** 1136-43.

Andrews, R. G., Singer, J. W., and Bernstein, I. D. (1986). Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67(3)**,** 842-5.

Apperley, J. F., Luskey, B. D., and Williams, D. A. (1991). Retroviral gene transfer of human adenosine deaminase in murine hematopoietic cells: effect of selectable marker sequences on long-term expression. *Blood* 78(2)**,** 310-7.

Aran, J. M., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1994). Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8)**,** 3176-80.

Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M., Sotto, J. J., Fuzibet, J. G., Rossi, J. F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C., and Bataille, R. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 335(2)**,** 91-7.

Bardenheuer, W., Lehmberg, K., Rattmann, I., Brueckner, A., Schneider, A., Sorg, U. R., Seeber, S., Moritz, T., and Flasshove, M. (2005). Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of

cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 19(12), 2281-8.

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(12), 7541-7.

Baum, C., von Kalle, C., Staal, F. J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., Weerkamp, F., Karlsson, S., Wagemaker, G., and Williams, D. A. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* 9(1), 5-13.

Beausejour, C. M., Eliopoulos, N., Momparler, L., Le, N. L., and Momparler, R. L. (2001). Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther* 8(9), 669-76.

Becker, S., Wasser, S., Hauses, M., Hossle, J. P., Ott, M. G., Dinauer, M. C., Ganser, A., Hoelzer, D., Seger, R., and Grez, M. (1998). Correction of respiratory burst activity in X-linked chronic granulomatous cells to therapeutically relevant levels after gene transfer into bone marrow CD34+ cells. *Hum Gene Ther* 9(11), 1561-70.

Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., and Dick, J. E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4(9), 1038-45.

Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., and et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270(5235), 475-80.

Bodine, D. M., McDonagh, K. T., Seidel, N. E., and Nienhuis, A. W. (1991). Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: effects of 5-FU and method of infection. *Exp Hematol* 19(3), 206-12.

Bodine, D. M., Seidel, N. E., and Orlic, D. (1996). Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood* 88(1), 89-97.

Bowtell, D. D., Cory, S., Johnson, G. R., and Gonda, T. J. (1988). Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J Virol* 62(7), 2464-73.

Boyum, A., Lovhaug, D., Seeberg, E., and Nordlie, E. M. (1994). Identification of cytidine deaminase as inhibitor of granulocyte-macrophage colony formation. *Exp Hematol* 22(2), 208-14.

Budak-Alpdogan, T., Alpdogan, O., Banerjee, D., Wang, E., Moore, M. A., and Bertino, J. R. (2004). Methotrexate and cytarabine inhibit progression of human lymphoma in NOD/SCID mice carrying a mutant dihydrofolate reductase and cytidine deaminase fusion gene. *Mol Ther* 10(3), 574-84.

Bunting, K. D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E., and Sorrentino, B. P. (1998). Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 92(7), 2269-79.

Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., and Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy

for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15(6), 2403-13.

Camiener, G. W., and Smith, C. G. (1965). Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem Pharmacol* 14(10), 1405-16.

Capizzi, R. L., White, J. C., Powell, B. L., and Perrino, F. (1991). Effect of dose on the pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of cytarabine. *Semin Hematol* 28(3 Suppl 4), 54-69.

Carmichael, J., and Walling, J. (1997). Advanced breast cancer: investigational role of gemcitabine. *Eur J Cancer* 33 Suppl 1, S27-30.

Casper, E. S., Green, M. R., Kelsen, D. P., Heelan, R. T., Brown, T. D., Flombaum, C. D., Trochanowski, B., and Tarassoff, P. G. (1994). Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 12(1), 29-34.

Catimel, G., Vermorken, J. B., Clavel, M., de Mulder, P., Judson, I., Sessa, C., Piccart, M., Bruntsch, U., Verweij, J., Wanders, J., and et al. (1994). A phase II study of Gemcitabine (LY 188011) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. EORTC Early Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 5(6), 543-7.

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., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288(5466), 669-72.

Chabner, B. A., Johns, D. G., Coleman, C. N., Drake, J. C., and Evans, W. H. (1974). Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. *J Clin Invest* 53(3), 922-31.

Chu, E., Mota, A. C., and Fogarasi, M. C. (2001). Pharmacology of cancer chemotherapy: Antimetabolites. 6 ed. *In* "Cancer" (V. T. J. DeVita, S. Hellman, and S. A. Rosenberg, Eds.), pp. 388-414. 1 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Coffin, J. M. (1996). "Retroviridae, the viruses and their replication." Lippincott-Raven, Philadelphia.

Colly, L. P., Peters, W. G., Richel, D., Arentsen-Honders, M. W., Starrenburg, C. W., and Willemze, R. (1987). Deoxycytidine kinase and deoxycytidine deaminase values correspond closely to clinical response to cytosine arabinoside remission induction therapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 14(2 Suppl 1), 257-61.

Cormier, Y., Eisenhauer, E., Muldal, A., Gregg, R., Ayoub, J., Goss, G., Stewart, D., Tarasoff, P., and Wong, D. (1994). Gemcitabine is an active new agent in previously untreated extensive small cell lung cancer (SCLC). A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 5(3), 283-5.

Danos, O. (1991). Construction of retroviral packaging cell lines. *In* "Methods in Molecular Biology" (M. Collins, Ed.), Vol. 8. The Humana Press Inc., Clifton, NJ.

Davis, B. M., Koc, O. N., and Gerson, S. L. (2000). Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* 95(10), 3078-84.

De Felipe, P., and Izquierdo, M. (2000). Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 11(13), 1921-31.

de Felipe, P., Martin, V., Cortes, M. L., Ryan, M., and Izquierdo, M. (1999). Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy. *Gene Ther* 6(2), 198-208.

Demontis, S., Terao, M., Brivio, M., Zanotta, S., Bruschi, M., and Garattini, E. (1998). Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochim Biophys Acta* 1443(3)**,** 323-33.

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(1)**,** 379-87.

Dumontet, C., Fabianowska-Majewska, K., Mantincic, D., Callet Bauchu, E., Tigaud, I., Gandhi, V., Lepoivre, M., Peters, G. J., Rolland, M. O., Wyczechowska, D., Fang, X., Gazzo, S., Voorn, D. A., Vanier-Viornery, A., and MacKey, J. (1999). Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol* 106(1)**,** 78-85.

Eckert, H. G., Stockschlader, M., Just, U., Hegewisch-Becker, S., Grez, M., Uhde, A., Zander, A., Ostertag, W., and Baum, C. (1996). High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood* 88(9)**,** 3407-15.

Eliopoulos, N., Al-Khaldi, A., Beausejour, C. M., Momparler, R. L., Momparler, L. F., and Galipeau, J. (2002). Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther* 9(7)**,** 452-62.

Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Le, N. L., Momparler, L. F., Greenbaum, M., Letourneau, S., Cournoyer, D., and Momparler, R. L. (1998a). Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice. *Gene Ther* 5(11)**,** 1545-51.

Eliopoulos, N., Cournoyer, D., and Momparler, R. L. (1998b). Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 42(5)**,** 373-8.

Engels, B., Cam, H., Schuler, T., Indraccolo, S., Gladow, M., Baum, C., Blankenstein, T., and Uckert, W. (2003). Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14(12)**,** 1155-68.

Fehse, B., Kustikova, O. S., Li, Z., Wahlers, A., Bohn, W., Beyer, W. R., Chalmers, D., Tiberghien, P., Kuhlcke, K., Zander, A. R., and Baum, C. (2002). A novel 'sort-suicide' fusion gene vector for T cell manipulation. *Gene Ther* 9(23)**,** 1633-8.

Fehse, B., Richters, A., Putimtseva-Scharf, K., Klump, H., Li, Z., Ostertag, W., Zander, A. R., and Baum, C. (2000). CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1(5 Pt 1)**,** 448-56.

Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., and Greaves, M. F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75(12)**,** 2417-26.

Flasshove, M., Banerjee, D., Mineishi, S., Li, M. X., Bertino, J. R., and Moore, M. A. (1995). Ex vivo expansion and selection of human CD34+ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *Blood* 85(2)**,** 566-74.

Flasshove, M., Bardenheuer, W., Schneider, A., Hirsch, G., Bach, P., Bury, C., Moritz, T., Seeber, S., and Opalka, B. (2000). Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(7)**,** 391-9.

Flasshove, M., Frings, W., Schroder, J. K., Moritz, T., Schutte, J., and Seeber, S. (1999). Transfer of the cytidine deaminase cDNA into hematopoietic cells. *Leuk Res* 23(11)**,** 1047-53.

Flasshove, M., Moritz, T., Bardenheuer, W., and Seeber, S. (2003). Hematoprotection by transfer of drug-resistance genes. *Acta Haematol* 110(2-3), 93-106.

Fossella, F. V., Lippman, S. M., Shin, D. M., Tarassoff, P., Calayag-Jung, M., Perez-Soler, R., Lee, J. S., Murphy, W. K., Glisson, B., Rivera, E., and Hong, W. K. (1997). Maximum-tolerated dose defined for single-agent gemcitabine: a phase I dose-escalation study in chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15(1), 310-6.

Fram, R. J., and Kufe, D. W. (1982). DNA strand breaks caused by inhibitors of DNA synthesis: 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and aphidicolin. *Cancer Res* 42(10), 4050-3.

Galmarini, C. M., Mackey, J. R., and Dumontet, C. (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 15(6), 875-90.

Ge, Y., Jensen, T. L., Stout, M. L., Flatley, R. M., Grohar, P. J., Ravindranath, Y., Matherly, L. H., and Taub, J. W. (2004). The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res* 64(2), 728-35.

Gmeiner, W. H. (2002). Antimetabolite incorporation into DNA: structural and thermodynamic basis for anticancer activity. *Biopolymers* 65(3), 180-9.

Gran, C., Boyum, A., Johansen, R. F., Lovhaug, D., and Seeberg, E. C. (1998). Growth inhibition of granulocyte-macrophage colony-forming cells by human cytidine deaminase requires the catalytic function of the protein. *Blood* 91(11), 4127-35.

Green, B. J., and Rasko, J. E. (2002). Rapid screening for high-titer retroviral packaging cell lines using an in situ fluorescence assay. *Hum Gene Ther* 13(9), 1005-13.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58(1), 14-9.

Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J., and Wilson, J. M. (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6(4), 335-41.

Gunji, Y., and Suda, T. (1995). "Characterization and Enrichment of Human Hematopoietic Stem Cells." Hematopoietic Stem Cell (D. Levitt, and R. Mertelsmann, Eds.) Marcel Dekker, Inc.1995.

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., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644), 415-9.

Halene, S., and Kohn, D. B. (2000). Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum Gene Ther* 11(9), 1259-67.

Hande, K. R., and Chabner, B. A. (1978). Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase from human leukemic blast cells. *Cancer Res* 38(3), 579-85.

Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W., and Baum, C. (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73(5), 4083-9.

Hildinger, M., Fehse, B., Hegewisch-Becker, S., John, J., Rafferty, J. R., Ostertag, W., and Baum, C. (1998). Dominant selection of hematopoietic progenitor cells with retroviral MDR1 co-expression vectors. *Hum Gene Ther* 9(1)**,** 33-42.

Ho, D. H. (1973). Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res* 33(11)**,** 2816-20.

Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B., and Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51(22)**,** 6110-7.

Jahns-Streubel, G., Reuter, C., Auf der Landwehr, U., Unterhalt, M., Schleyer, E., Wormann, B., Buchner, T., and Hiddemann, W. (1997). Activity of thymidine kinase and of polymerase alpha as well as activity and gene expression of deoxycytidine deaminase in leukemic blasts are correlated with clinical response in the setting of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based priming before and during TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 90(5)**,** 1968-76.

Jansen, M., Bardenheuer, W., Sorg, U. R., Seeber, S., Flasshove, M., and Moritz, T. (2001). Protection of hematopoietic cells from O(6)-alkylation damage by O(6)-methylguanine DNA methyltransferase gene transfer: studies with different O(6)-alkylating agents and retroviral backbones. *Eur J Haematol* 67(1)**,** 2-13.

Jansen, M., Sorg, U. R., Ragg, S., Flasshove, M., Seeber, S., Williams, D. A., and Moritz, T. (2002). Hematoprotection and enrichment of transduced cells in vivo after gene transfer of MGMT(P140K) into hematopoietic stem cells. *Cancer Gene Ther* 9(9)**,** 737-46.

Johnson, S. A. (2000). Clinical pharmacokinetics of nucleoside analogues: focus on haematological malignancies. *Clin Pharmacokinet* 39(1)**,** 5-26.

Kaufmann, M., and von Minckwitz, G. (1997). Gemcitabine in ovarian cancer: an overview of safety and efficacy. *Eur J Cancer* 33 Suppl 1**,** S31-3.

Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., and Miller, A. D. (1994). Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15)**,** 7071-5.

Kiem, H. P., Darovsky, B., von Kalle, C., Goehle, S., Stewart, D., Graham, T., Hackman, R., Appelbaum, F. R., Deeg, H. J., Miller, A. D., and et al. (1994). Retrovirus-mediated gene transduction into canine peripheral blood repopulating cells. *Blood* 83(6)**,** 1467-73.

Kinsella, T. M., and Nolan, G. P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7(12)**,** 1405-13.

Kirch, H. C., Schroder, J., Hoppe, H., Esche, H., Seeber, S., and Schutte, J. (1998). Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp Hematol* 26(5)**,** 421-5.

Knipper, R., Kuehlcke, K., Schiedlmeier, B., Hildinger, M., Lindemann, C., Schilz, A. J., Fauser, A. A., Fruehauf, S., Zeller, W. J., Ostertag, W., Eckert, H. G., and Baum, C. (2001). Improved post-transcriptional processing of an MDR1 retrovirus elevates expression of multidrug resistance in primary human hematopoietic cells. *Gene Ther* 8(3)**,** 239-46.

Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91(5)**,** 661-72.

Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87(1)**,** 1-13.

Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J., and May, W. S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84(3)**,** 691-701.

Kufe, D., Spriggs, D., Egan, E. M., and Munroe, D. (1984). Relationships among Ara-CTP pools, formation of (Ara-C)DNA, and cytotoxicity of human leukemic cells. *Blood* 64(1)**,** 54-8.

Kufe, D. W., and Spriggs, D. R. (1985). Biochemical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside. *Semin Oncol* 12(2 Suppl 3)**,** 34-48.

Kuhn, K., Bertling, W. M., and Emmrich, F. (1993). Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 190(1)**,** 1-7.

Kummar, S., Noronha, V., and Chu, E. (2005). Antimetabolites. 7th ed. *In* "Cancer: Principles & Practice of Oncology" (V. T. De Vita, Jr., S. Hellman, and S. A. Rosenberg, Eds.), Vol. 1, pp. 358-374. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Laliberte, J., and Momparler, R. L. (1994). Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res* 54(20)**,** 5401-7.

Landis, D. M., Heindel, C. C., and Loeb, L. A. (2001). Creation and characterization of 5-fluorodeoxyuridine-resistant Arg50 loop mutants of human thymidylate synthase. *Cancer Res* 61(2)**,** 666-72.

Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D. E., and Dick, J. E. (1992). Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255(5048)**,** 1137-41.

Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A., and Dick, J. E. (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2(12)**,** 1329-37.

Liliemark, J. O., Plunkett, W., and Dixon, D. O. (1985). Relationship of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in plasma to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate levels in leukemic cells during treatment with high-dose 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 45(11 Pt 2)**,** 5952-7.

Lister, T. A., Rohatiner, A. Z., Bassan, R., Gregory, W., Willis, L., Barnett, M. J., Waxman, J., Richards, M. A., Ganesan, T. S., Tucker, J., and et al. (1987). Conventional dose cytosine arabinoside in combination chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 14(2 Suppl 1)**,** 53-4.

Lund, B., Hansen, O. P., Theilade, K., Hansen, M., and Neijt, J. P. (1994). Phase II study of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) in previously treated ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 86(20)**,** 1530-3.

Magli, M. C., Iscove, N. N., and Odartchenko, N. (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature* 295(5849)**,** 527-9.

Mancini, W. R., and Cheng, Y. C. (1983). Human deoxycytidylate deaminase. Substrate and regulator specificities and their chemotherapeutic implications. *Mol Pharmacol* 23(1)**,** 159-64.

Mann, R., Mulligan, R. C., and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33(1)**,** 153-9.

Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62(4)**,** 1120-4.

Mastrianni, D. M., Tung, N. M., and Tenen, D. G. (1992). Acute myelogenous leukemia: current treatment and future directions. *Am J Med* 92(3)**,** 286-95.

Matsuda, A., and Sasaki, T. (2004). Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci* 95(2)**,** 105-11.

Matsunaga, T., Sakamaki, S., Kuga, T., Kuroda, H., Kusakabe, T., Akiyama, T., Konuma, Y., Hirayama, Y., Kobune, M., Kato, J., Sasaki, K., Kogawa, K., Koyama, R., and Niitsu, Y. (2000). GST-pi gene-transduced hematopoietic progenitor cell transplantation overcomes the bone marrow toxicity of cyclophosphamide in mice. *Hum Gene Ther* 11(12)**,** 1671-81.

Maze, R., Carney, J. P., Kelley, M. R., Glassner, B. J., Williams, D. A., and Samson, L. (1996). Increasing DNA repair methyltransferase levels via bone marrow stem cell transduction rescues mice from the toxic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, a chemotherapeutic alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1)**,** 206-10.

Meisel, R., Bardenheuer, W., Strehblow, C., Sorg, U. R., Elmaagacli, A., Seeber, S., Flasshove, M., and Moritz, T. (2003). Efficient protection from methotrexate toxicity and selection of transduced human hematopoietic cells following gene transfer of dihydrofolate reductase mutants. *Exp Hematol* 31(12)**,** 1215-22.

Miller, A. D. (1990). Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1(1)**,** 5-14.

Miller, A. D. (1997). "Development and applications of retroviral vectors." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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(5)**,** 2220-4.

Milsom, M. D., Woolford, L. B., Margison, G. P., Humphries, R. K., and Fairbairn, L. J. (2004). Enhanced in vivo selection of bone marrow cells by retroviral-mediated coexpression of mutant O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and HOXB4. *Mol Ther* 10(5)**,** 862-73.

Modlich, U., Kustikova, O. S., Schmidt, M., Rudolph, C., Meyer, J., Li, Z., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Kuehlcke, K., Bunting, K. D., Schmidt, S., Deichmann, A., von Kalle, C., Fehse, B., and Baum, C. (2005). Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 105(11)**,** 4235-46.

Momparler, R. L., Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Letourneau, S., Greenbaum, M., and Cournoyer, D. (1996a). Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther* 3(5)**,** 331-8.

Momparler, R. L., Laliberte, J., Eliopoulos, N., Beausejour, C., and Cournoyer, D. (1996b). Transfection of murine fibroblast cells with human cytidine deaminase cDNA confers resistance to cytosine arabinoside. *Anticancer Drugs* 7(3)**,** 266-74.

Moore, M. A. (1991). Review: Stratton Lecture 1990. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 78(1)**,** 1-19.

Morgan, R. A., Couture, L., Elroy-Stein, O., Ragheb, J., Moss, B., and Anderson, W. F. (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 20(6)**,** 1293-9.

Moritz, T., Dutt, P., Xiao, X., 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(3)**,** 855-62.

Moritz, T., Mackay, W., Glassner, B. J., Williams, D. A., and Samson, L. (1995). Retrovirus-mediated expression of a DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res* 55(12)**,** 2608-14.

Moritz, T., and Williams, D. A. (1998a). Methods for Gene Transfer: Genetic Manipulation of Hematopoietic Stem Cells, pp. 79-88.

Moritz, T., and Williams, D. A. (1998b). Methods of gene transfer: genetic manipulation of hematopoietic stem cells. *in press*.

Moritz, T., and Williams, D. A. (2001). Marrow protection - transduction of hematopoietic cells with drug resistance genes. *Cytotherapy* 3(2)**,** 67-84.

Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260(5110)**,** 926-32.

Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D., and Chang, A. E. (1993). Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23)**,** 11307-11.

Neben, S., Hellman, S., Montgomery, M., Ferrara, J., Mauch, P., and Hemman, S. (1993). Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 21(1)**,** 156-62.

Neff, T., Beard, B. C., and Kiem, H. P. (2006). Survival of the fittest: in vivo selection and stem cell gene therapy. *Blood* 107(5)**,** 1751-60.

Neff, T., Beard, B. C., Peterson, L. J., Anandakumar, P., Thompson, J., and Kiem, H. P. (2005). Polyclonal chemoprotection against temozolomide in a large-animal model of drug resistance gene therapy. *Blood* 105(3)**,** 997-1002.

Neff, T., and Blau, C. A. (1996). Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol* 24(11)**,** 1340-6.

Neff, T., Horn, P. A., Peterson, L. J., Thomasson, B. M., Thompson, J., Williams, D. A., Schmidt, M., Georges, G. E., von Kalle, C., and Kiem, H. P. (2003). Methylguanine methyltransferase-mediated in vivo selection and chemoprotection of allogeneic stem cells in a large-animal model. *J Clin Invest* 112(10)**,** 1581-8.

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(3)**,** 119-27.

Ott, M. G., Grez, M., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Kuehlcke, K., Schmidt, M., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Hassan, M., von Kalle, C., Trasher, A., Seger, R., and Hoelzer, D. (2005). Long-Term Follow-Up of Patients Treated by Gene Therapy for X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *ASH Annual Meeting Abstracts* 106(11)**,** 194-.

Paira, S., Roverano, S., Rillo, O., Barrionuevo, A., Mahieu, S., and Millen, N. (2005). Cytidine deaminase in polymyalgia rheumatica and elderly onset rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 24(5)**,** 460-3.

Paukovits, W. R., Moser, M. H., and Paukovits, J. B. (1993). Pre-CFU-S quiescence and stem cell exhaustion after cytostatic drug treatment: protective effects of the inhibitory peptide pGlu-Glu-Asp-Cys-Lys (pEEDCK). *Blood* 81(7)**,** 1755-61.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18)**,** 8392-6.

Persons, D. A., Allay, E. R., Sabatino, D. E., Kelly, P., Bodine, D. M., and Nienhuis, A. W. (2001). Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia: implications for human gene therapy. *Blood* 97(10)**,** 3275-82.

Peters, W. G., Willemze, R., and Colly, L. P. (1987). Intermediate and high-dose cytosine arabinoside-containing regimens for induction and consolidation therapy for patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma: the Leyden experience and review of the literature. *Semin Oncol* 14(2 Suppl 1)**,** 86-91.

Peters, W. P. (1995). High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for the treatment of breast cancer: yes. *Important Adv Oncol***,** 215-30.

Philip, T., Guglielmi, C., Hagenbeek, A., Somers, R., Van der Lelie, H., Bron, D., Sonneveld, P., Gisselbrecht, C., Cahn, J. Y., Harousseau, J. L., Coiffier, B., Biron, P., Mandelli, F., and Chauvin, F. (1995). Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 333(23)**,** 1540-5.

Plagemann, P. G., Marz, R., and Wohlhueter, R. M. (1978). Transport and metabolism of deoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. *Cancer Res* 38(4)**,** 978-89.

Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z., Heinemann, V., Grunewald, R., and Gandhi, V. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. *Semin Oncol* 22(4 Suppl 11)**,** 3-10.

Plunkett, W., Liliemark, J. O., Estey, E., and Keating, M. J. (1987). Saturation of ara-CTP accumulation during high-dose ara-C therapy: pharmacologic rationale for intermediate-dose ara-C. *Semin Oncol* 14(2 Suppl 1)**,** 159-66.

Pollok, K. E., Hartwell, J. R., Braber, A., Cooper, R. J., Jansen, M., Ragg, S., Bailey, B. J., Erickson, L. C., Kreklau, E. L., and Williams, D. A. (2003). In vivo selection of human hematopoietic cells in a xenograft model using combined pharmacologic and genetic manipulations. *Hum Gene Ther* 14(18)**,** 1703-14.

Pourquier, P., Gioffre, C., Kohlhagen, G., Urasaki, Y., Goldwasser, F., Hertel, L. W., Yu, S., Pon, R. T., Gmeiner, W. H., and Pommier, Y. (2002). Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res* 8(8)**,** 2499-504.

Pourquier, P., Takebayashi, Y., Urasaki, Y., Gioffre, C., Kohlhagen, G., and Pommier, Y. (2000). Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4)**,** 1885-90.

Ragg, S., Xu-Welliver, M., Bailey, J., D'Souza, M., Cooper, R., Chandra, S., Seshadri, R., Pegg, A. E., and Williams, D. A. (2000). Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* 60(18)**,** 5187-95.

Rappa, G., Lorico, A., Hildinger, M., Fodstad, O., and Baum, C. (2001). Novel bicistronic retroviral vector expressing gamma-glutamylcysteine synthetase and the multidrug resistance protein 1 (MRP1) protects cells from MRP1-effluxed drugs and alkylating agents. *Hum Gene Ther* 12(14)**,** 1785-96.

Saccone, S., Besati, C., Andreozzi, L., Della Valle, G., Garattini, E., and Terao, M. (1994). Assignment of the human cytidine deaminase (CDA) gene to chromosome 1 band p35-p36.2. *Genomics* 22(3)**,** 661-2.

Sandrin, V., Russell, S. J., and Cosset, F. L. (2003). Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 281**,** 137-78.

Sauerbrey, A., McPherson, J. P., Zhao, S. C., Banerjee, D., and Bertino, J. R. (1999). Expression of a novel double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase

fusion gene confers resistance to both methotrexate and cytosine arabinoside. *Hum Gene Ther* 10(15)**,** 2495-504.

Sawai, N., Zhou, S., Vanin, E. F., Houghton, P., Brent, T. P., and Sorrentino, B. P. (2001). Protection and in vivo selection of hematopoietic stem cells using temozolomide, O6-benzylguanine, and an alkyltransferase-expressing retroviral vector. *Mol Ther* 3(1)**,** 78-87.

Schiedlmeier, B., Schilz, A. J., Kuhlcke, K., Laufs, S., Baum, C., Zeller, W. J., Eckert, H. G., and Fruehauf, S. (2002). Multidrug resistance 1 gene transfer can confer chemoprotection to human peripheral blood progenitor cells engrafted in immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 13(2)**,** 233-42.

Schroder, J. K., Kirch, C., Flasshove, M., Kalweit, H., Seidelmann, M., Hilger, R., Seeber, S., and Schutte, J. (1996). Constitutive overexpression of the cytidine deaminase gene confers resistance to cytosine arabinoside in vitro. *Leukemia* 10(12)**,** 1919-24.

Schroder, J. K., Seidelmann, M., Kirch, H. C., Seeber, S., and Schutte, J. (1998). Assessment of resistance induction to cytosine arabinoside following transfer and overexpression of the deoxycytidylate deaminase gene in vitro. *Leuk Res* 22(7)**,** 619-24.

Sheridan, P. L., Bodner, M., Lynn, A., Phuong, T. K., DePolo, N. J., de la Vega, D. J., Jr., O'Dea, J., Nguyen, K., McCormack, J. E., Driver, D. A., Townsend, K., Ibanez, C. E., Sajjadi, N. C., Greengard, J. S., Moore, M. D., Respess, J., Chang, S. M., Dubensky, T. W., Jr., Jolly, D. J., and Sauter, S. L. (2000). Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer. *Mol Ther* 2(3)**,** 262-75.

Sobecks, R. M., and Vogelzang, N. J. (1999). High-dose chemotherapy with autologous stem-cell support for germ cell tumors: a critical review. *Semin Oncol* 26(1)**,** 106-18.

Somasekaram, A., Jarmuz, A., How, A., Scott, J., and Navaratnam, N. (1999). Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J Biol Chem* 274(40)**,** 28405-12.

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(4)**,** 628-33.

Sorrentino, B. P., Brandt, S. J., Bodine, D., Gottesman, M., Pastan, I., Cline, A., and Nienhuis, A. W. (1992). Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 257(5066)**,** 99-103.

Southern, P. J., and Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1(4)**,** 327-41.

Spangrude, G. J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J., and Weissman, I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 78(6)**,** 1395-402.

Stadler, W. M., Kuzel, T. M., Raghavan, D., Levine, E., Vogelzang, N. J., Roth, B., and Dorr, F. A. (1997). Metastatic bladder cancer: advances in treatment. *Eur J Cancer* 33 Suppl 1**,** S23-6.

Steuart, C. D., and Burke, P. J. (1971). Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat New Biol* 233(38)**,** 109-10.

Stryckmans, P., De Witte, T., Bitar, N., Marie, J. P., Suciu, S., Solbu, G., Debusscher, L., Bury, J., Peetermans, M., Andrien, J. M., and et al. (1987). Cytosine arabinoside for induction, salvage, and consolidation therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol* 14(2 Suppl 1)**,** 67-72.

Takebe, N., Nakahara, S., Zhao, S. C., Adhikari, D., Ural, A. U., Iwamoto, M., Banerjee, D., and Bertino, J. R. (2000). Comparison of methotrexate resistance conferred by a mutated dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA in two different retroviral vectors. *Cancer Gene Ther* 7(6)**,** 910-9.

Takebe, N., Xu, L. C., MacKenzie, K. L., Bertino, J. R., and Moore, M. A. (2002). Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34(+) cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene. *Cancer Gene Ther* 9(3)**,** 308-20.

Takebe, N., Zhao, S. C., Adhikari, D., Mineishi, S., Sadelain, M., Hilton, J., Colvin, M., Banerjee, D., and Bertino, J. R. (2001). Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene. *Mol Ther* 3(1)**,** 88-96.

Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M., and Loken, M. R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77(6)**,** 1218-27.

Thompson, P. W., Jones, D. D., and Currey, H. L. (1986). Cytidine deaminase activity as a measure of acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 45(1)**,** 9-14.

Till, J. E., and McCulloch, E. A. (1972). The 'f-factor' of the spleen-colony assay for hemopoietic stem cells. *Ser Haematol* 5(2)**,** 15-21.

Valtieri, M., Schiro, R., Chelucci, C., Masella, B., Testa, U., Casella, I., Montesoro, E., Mariani, G., Hassan, H. J., and Peschle, C. (1994). Efficient transfer of selectable and membrane reporter genes in hematopoietic progenitor and stem cells purified from human peripheral blood. *Cancer Res* 54(16)**,** 4398-404.

Vincenzetti, S., Cambi, A., Neuhard, J., Garattini, E., and Vita, A. (1996). Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* 8(2)**,** 247-53.

Vincenzetti, S., Mariani, P. L., Cammertoni, N., Polzonetti, V., Natalini, P., Quadrini, B., Volpini, R., and Vita, A. (2004). Isoenzymatic forms of human cytidine deaminase. *Protein Eng Des Sel* 17(12)**,** 871-7.

Vormoor, J., Lapidot, T., Pflumio, F., Risdon, G., Patterson, B., Broxmeyer, H. E., and Dick, J. E. (1994). Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 83(9)**,** 2489-97.

Vose, J. M. (1996). Dose-intensive ifosfamide for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 23(3 Suppl 6)**,** 33-7.

Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A., and Kabat, D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352(6337)**,** 729-31.

Wang, J. C., Doedens, M., and Dick, J. E. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89(11)**,** 3919-24.

Weiss, R. B. (1999). Introduction: dose-intensive therapy for adult malignancies. *Semin Oncol* 26(1)**,** 1-5.

Williams, D. A., Hsieh, K., DeSilva, A., and Mulligan, R. C. (1987). Protection of bone marrow transplant recipients from lethal doses of methotrexate by the generation of methotrexate-resistant bone marrow. *J Exp Med* 166(1)**,** 210-8.

Yang, S., Delgado, R., King, S. R., Woffendin, C., Barker, C. S., Yang, Z. Y., Xu, L., Nolan, G. P., and Nabel, G. J. (1999). Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther* 10(1)**,** 123-32.

Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., and Flake, A. W. (1995). Retention and multilineage expression of human hematopoietic stem cells in human-sheep chimeras. *Stem Cells* 13(2)**,** 101-11.

Zhou, Y., Aran, J., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1998). Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Hum Gene Ther* 9(3)**,** 287-93.

Zielske, S. P., Reese, J. S., Lingas, K. T., Donze, J. R., and Gerson, S. L. (2003). In vivo selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning. *J Clin Invest* 112(10)**,** 1561-70.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. T. Moritz für die Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit im „Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie“ der Inneren Klinik (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen

- Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Flasshove für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit und seiner Unterstützung bei der Durchführung

- Herrn Prof. Dr. B. Opalka für seine zahlreichen Anregungen und die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu bewerten

- Frau Dr. U. R. Sorg für die Einführung in die tierexperimentellen Arbeiten und für ihre hilfreichen Ratschläge

- allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Moritz/Flasshove und der Arbeitsgruppe Opalka für eine produktive und außerordentlich angenehme Zusammenarbeit und insbesondere Frau A. Feldmann und Herrn M. Möllmann für ihre tatkräftige Hilfe

- Herrn Dr. W. Bardenheuer für die Klonierung des in dieser Arbeit verwendeten Vektors

- Herrn K. Lennartz, Herrn W. Stellberg und Herrn M. Seiffert für die Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen und Herrn M. Grubert für die Durchführung der HPLC-Analysen

- meinem Mann Ingo