

**Retroviraler Gentransfer des Chemotherapie-
Resistenzgens O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
(MGMT) in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der

Universität-GH Essen

vorgelegt von

Michael Jansen
aus Gelsenkirchen

Juni 2000

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden an der Inneren Klinik und Poliklinik (Tumorforschung), Direktor Prof. S. Seeber, der Universität-GH Essen durchgeführt. Ein Teil der Versuche zum murinen *in vivo*-Knochenmarktransplantationsmodell fanden im Labor von Prof. D. A. Williams am Herman B. Wells Center for Pediatric Research, Indiana University, Indianapolis, Indiana, USA statt.

Das Projekt wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der DFG-Forschergruppe „Tumorselektive Therapie und Therapieresistenz“ gefördert.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Historischer Hintergrund der Gentherapie	1
1.2	Vektorsysteme zum Einsatz in der Gentherapie	2
1.2.1	Adenovirale Vektoren	2
1.2.2	Vektoren basierend auf adenoassoziierten Viren (AAV)	3
1.2.3	Herpesvirale Vektoren	3
1.2.4	Vektoren basierend auf murinen TypC-Retroviren	3
1.2.5	Lentivirale Vektoren	4
1.2.6	Vektoren basierend auf Foamy-Viren	4
1.3	Murine Retroviren als Grundlage gentherapeutischer Vektoren	5
1.3.1	Aufbau von Wildtyp-Retroviren	5
1.3.2	Lebenszyklus der Wildtyp-Retroviren	5
1.3.3	Funktionen des retroviralen Genoms	7
1.3.4	Retrovirale Vektoren für die Gentherapie	8
1.4	Produktion viraler Vektoren für die Gentherapie	9
1.4.1	Stabile Verpackungszelllinien	9
1.4.2	Transiente Verpackungszelllinien	10
1.5	Die Blutstammzelle als Zielzelle für die Gentherapie	11
1.6	Retrovirale Transduktion hämatopoetischer Zellen	13
1.7	Transfer von Chemotherapie-Resistenzgenen (CTX-R) in hämatopoetische Zellen	14
1.8	Einsatz der MGMT zum Schutz des Knochenmarks bei myeloablativer Behandlung	15
1.9	Zielsetzung der Arbeit	17
1.9.1	[B1]Alternativen zur Behandlung mit BCNU	17
1.9.2	Testung ausgewählter Vektoren bezüglich ihrer Expressionsstärke in hämatopoetischen Zellen	18
1.9.3	Testung der Reparaturkapazität der MGMT ^{V139F} -Mutante durch die Überexpression der Mutante in einer Zelllinie	18
1.9.4	Optimierung der In-vivo-Selektion MGMT-transduzierter hämatopoetischer Zellen durch den Einsatz einer O ⁶ -Benzylguanin-resistenten MGMT-Mutante	18

2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.2	Geräte	25
2.3	Puffer und Lösungen	27
2.4	Methoden	30
2.4.1	Molekularbiologische Standardmethoden	30
2.4.2	Zellbiologische Standardmethoden	31
2.4.3	Vektorkonstruktion	32
2.4.4	Virusproduktion	34
2.4.5	Titration infektiöser Überstände	35
2.4.6	Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Retronektin®	36
2.4.7	Transduktion muriner Knochenmarkzellen	36
2.4.8	Testung funktionaler MGMT-Expression mittels Zytostatika-Resistenz	37
2.4.9	Klonogene Testsysteme	38
2.4.10	Analyse der retroviralen Transduktionsrate	39
2.4.11	Untersuchungen zur MGMT ^{V139F} -vermittelten Zytostatika-Resistenz in der murinen Leukämiezelllinie L1210	40
2.4.12	In-vivo-Knochenmarktransplantationsmodell zum MGMT ^{P140K} -Gentransfer zum Schutz der Hämatopoese vor chemotherapieinduzierter Zytotoxizität	40
2.4.13	Statistische Analysen	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	MGMT-vermittelte Protektion muriner Vorläuferzellen gegen die zytostatikainduzierte Toxizität verschiedener Medikamente	43
3.2	Überexpression der MGMT mittels verschiedener retroviraler Konstrukte in murinen und humanen hämatopoetischen Zellpopulationen	45
3.2.1	Experimente mit humanen koloniebildenden Zellen	46
3.2.2	Experimente mit murinen <i>High Proliferative Potential-Colony Forming Cells</i> (HPP-CFC)	49
3.3	Einsatz der MGMT^{V139F}-Mutante zum Schutz vor ACNU-induzierter Toxizität in einer murinen Leukämiezelllinie	53
3.4	Untersuchung des Schutzes der Hämatopoese vor chemotherapieinduzierter Zytotoxizität durch MGMT^{P140K}-Gentransfer im In-vivo-Maus-Knochenmarktransplantationsmodell	55

3.4.1	Blutwerte der Versuchstiere	57
3.4.2	Durchflußzytometrische (FACS-) Analysen der Leukozyten	67
3.4.3	Vergleich der Körpergewichte ACNU- und Temozolomid-behandelter Tiere	75
3.4.4	ACNU-Resistenz klonogener Knochenmarkzellen nach Behandlung mit O ⁶ -Benzylguanin plus O ⁶ -alkylierenden Agenzien	76
3.4.5	Knochenmarktransplantationen der zweiten Generation (Sekundärtransplantationen)	77
4	DISKUSSION	83
4.1	Schutz retroviral-transduzierter muriner Vorläuferzellenvor der Zytotoxizität verschiedener Chemotherapeutika	84
4.2	Testung unterschiedlicher Vektorkonstrukte zur Expression der MGMT in hämatopoetischen Zellen	86
4.2.1	Untersuchungen in humanen koloniebildenden Zellen	86
4.2.2	Untersuchungen in murinen <i>High Proliferative Potential-Colony Forming Cells</i> (HPP-CFC)	88
4.3	Expression der MGMT^{V139F}-Mutante in L1210 Zellen	90
4.4	Murines In-vivo-Transplantationsmodell zum Gentransfer der O⁶-Benzylguanin-resistenten MGMT^{P140K}-Mutante	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	LITERATURVERZEICHNIS	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1	Schematischer Aufbau eines Wildtyp-Retrovirus
Abb. 1-2	Replikationszyklus der Wildtyp-Retroviren
Abb. 1-3	Struktur des retroviralen Genoms und abgeleiteter Vektoren
Abb. 1-4	Hierarchie der Hämatopoese
Abb. 2-1	Vektoren für den retroviralen MGMT-Gentransfer
Abb. 2-2	Versuchsablauf des murinen In-vivo-Modells zum MGMT ^{P140K} -Gentransfer
Abb. 3-1	MGMT-vermittelte Zytostatikaresistenz muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen
Abb. 3-2	MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz humaner klonogener Zellen
Abb. 3-3	MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz muriner HPP-CFC
Abb. 3-4	ACNU-Resistenz MGMT ^{V139F} -transfizierter L1210-Klone
Abb. 3-5	Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG plus ACNU-behandelter Tiere
Abb. 3-6	Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG plus BCNU-behandelter Tiere
Abb. 3-7	Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (50 mg/kg)-behandelter Tiere
Abb. 3-8	Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (70 mg/kg)-behandelter Tiere
Abb. 3-9	Zellzahlen im peripheren Blut nicht chemotherapeutisch behandelte Tiere

Abb. 3-10	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten O6-BG plus ACNU-behandelter Tiere
Abb. 3-11	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten O6-BG plus BCNU-behandelter Tiere
Abb. 3-12	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (50 mg/kg)-behandelter Tiere
Abb. 3-13	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (70 mg/kg)-behandelter Tiere
Abb. 3-14	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten bei chemotherapeutisch unbehandelten Tieren
Abb. 3-15	Körpergewichte der Versuchstiere
Abb. 3-16	ACNU-Resistenz klonogener Knochenmarkzellen von Versuchstieren
Abb. 3-17	Zellzahlen im peripheren Blut sekundär transplantiertes Tiere
Abb. 3-18	Anreicherung von GFP ⁺ Leukozyten in sekundär transplantierten Tieren

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1-1	Auswahl von Chemotherapie-Resistenzgenen (CTX-R) für die Gentherapie
Tab. 3-1	MGMT-vermittelte Zytostatika-Resistenz muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen
Tab. 3-2	Titration amphotroper FNX-Überstände
Tab. 3-3	MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz humaner klonogener Zellen
Tab. 3-4	Transduktionsraten humaner klonogener Zellen
Tab. 3-5	MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz muriner HPP-CFC
Tab. 3-6	Transduktionsraten muriner HPP-CFC
Tab. 3-7	ACNU-Resistenz MGMT ^{V139F} -transfizierter L1210-Klone
Tab. 3-8	Übersicht der Versuche zum MGMT ^{P140K} -Gentransfer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluorouracil
ACNU	1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3- nitrosoharnstoff
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCNU	1,3-bis (2-chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff
β-ME	β-Merkaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CCNU	N1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1- nitrosoharnstoff
CENU	Chloroethylnitrosoharnstoffe
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFC	koloniebildende Zelle(n) der Hämatopoese
cfu	koloniebildende Einheit(en) der Virustitration
CTX-R	Chemotherapie-Resistenzgen
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIG	Digoxygenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
env	retrovirale Sequenz der Hüllproteine
EPO	Erythropoetin

FKS	Fötale Kälberserum
G418	Geneticin
gag	Gen für retrovirales Kapsidprotein
GALV	<i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i>
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HPP	Hohes proliferatives Potential
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
KGW	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LD50	halbletale Dosis
L-Glu	L-Glutamin
LTR	Lange terminale Sequenzwiederholung
mAK	monoklonaler Antikörper
MDR1	<i>Multidrug Resistance Gene 1</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MESV	<i>Murine Embryonic Stem Cell Virus</i>
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MW	Mittelwert
ml	Milliliter
MMLV	<i>Molony Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSCV	<i>Murine Stem Cell Virus</i>

mut	mutiert
NEO	Neomycinphosphotransferase
O6-BG	O ⁶ -Benzylguanin
orf	offener Leserahmen
P/S	Penicillin + Streptomycin
PB	peripheres Blut
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBSZ	Stammzellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pgkpr	Promotor der Phosphoglyzeratkinase
pol	Gen der retroviralen reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA- Polymerase)
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SCF	Stammzellefaktor
SDS	Natriumdodezylsulfat
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylamin
U	Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLA	<i>Very Late Antigen</i> -Integrinrezeptor
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
wt	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Historischer Hintergrund der Gentherapie

Eine Reihe von innovativen Behandlungsansätze der heutigen Medizin entwickelte sich im Rahmen der in den 80er Jahren aufkommenden Gentherapie. Durch das Einbringen fremder DNA in Körperzellen (somatische Gentherapie) erhofft man sich neue therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen wie Virusinfektionen (z. B. HIV), Transplantatabstoßung, Herzinfarkt, erblich bedingte Stoffwechselkrankheiten (z. B. Zystische Fibrose, Immundefektsyndrom, Gerinnungsfaktormangel oder Hypercholesterinämie), neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Parkinson) sowie bei Krebserkrankungen [Morgan & Anderson, 1993; Cao et al., 1995]. Die zur Verfügung stehenden Methoden zum Gentransfer sind dabei vielfältig und bedienen sich physiko-chemischer Hilfsmittel wie DNA-beschichteter Edelmetallpartikel, Lipide zur DNA-Transfektion, rezeptorvermittelter DNA-Aufnahme, sowie einer großen Auswahl von Viren. Hierbei sind die viralen Verfahren derzeit die am weitesten fortgeschrittenen Genübertragungssysteme zur Veränderung von Zellen für klinischer Untersuchungen. Ermöglicht wurde diese Entwicklung durch die Fortschritte in der Molekularbiologie und die Aufklärung der Lebenszyklen verschiedener Viren. Die beiden zur Zeit in der klinischen Anwendung am weitesten verbreiteten Transfersysteme benutzen entweder adenovirale oder retrovirale Vektoren für die In-vivo- oder Ex-vivo-Manipulation von Zellen. Die erste klinische Studie mit genetisch veränderten Zellen wurde Anfang der 90er Jahre mit retroviral transduzierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) zur Behandlung von Melanompatienten durchgeführt [Rosenberg et al., 1990]. Seitdem hat sich das Spektrum für den Einsatz der Gentherapie stark erweitert. Zu den bevorzugten Zielzellen zählen Hepatozyten, Muskelzellen, Endothelzellen, Neuronen und hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Hämatopoetische Stammzellen eignen sich insbesondere als Zielzelle für die korrektive Gentherapie, da es sich um pluripotente Zellen handelt, die bei stabiler Integration des Transgens Genexpression über einen langen, möglicherweise lebenslangen Zeitraum erlauben. Zudem sind diese Zellen leicht zugänglich und können aus mehreren Quellen (Knochenmark, Apheresepräparate mit Stammzellen des peripheren Bluts, Nabelschnurblut) gewonnen werden. Erstmals wurden 1993 klinische gentherapeutische Studien mit

hämatopoetischen Zellen durchgeführt. Hierbei wurden autologe Blutstammzellen durch retrovirale Transduktion markiert und anschließend, im Rahmen von Knochenmarktransplantationsprotokollen, den Patienten zurückgegeben [Brenner et al., 1993a, b]. Als „Markierungsgen“ wurde zu dieser Zeit das Gen der Neomycinphosphotransferase (NEO) eingesetzt, das eine Selektion transgener Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin ermöglicht.

Neben den reinen Markierungsstudien zur Verfolgung transgener Zellen *in vivo* werden mittlerweile auch therapeutisch nutzbare Gene in hämatopoetische Stammzellen transferiert. Zu den therapeutisch eingesetzten Genen zählen Suizidgene [Bonini et al., 1997], Zytokingene [Okada et al., 1999], Gene für den korrektiven Gentransfer [Chen et al., 1997; Yanase et al., 1999] und Chemotherapie-Resistenzgene (CTX-R) [Hanania et al., 1996].

1.2 Vektorsysteme zum Einsatz in der Gentherapie

1.2.1 Adenovirale Vektoren

Adenovirale Vektoren für die Gentherapie stammen vom Typ 2 bzw. 5 aus der Gruppe C der Adenoviren. Bei den Vektoren der ersten Generation wurden Sequenzen aus den Regionen E1A, E1B und E3 aus dem ca. 36 kb großen DNA-Genom der Viren deletiert, um therapeutische Transgene bis zu einer Größe von 9 kb in das Virusgenom einfügen zu können [Neering et al., 1996; Watanabe et al., 1996]. Fortschritte im Vektordesign führten in der Folge zu weiteren Deletionen im Vektorgenom, so daß Konstrukte der dritten Generation nur noch minimale viruseigene Sequenzen beinhalten [Clemens et al., 1996]. Adenovirale Vektoren können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen eines breiten Wirtsspektrums infizieren. Sie haben allerdings den Nachteil, daß sie die übertragenen Transgene *in vivo* nur temporär exprimieren, da das virale Genom episomal verbleibt. Ebenfalls nachteilig wirkt sich die Expression residueller viraler Proteine durch die Vektoren aus, durch die eine Immunantwort des Wirts gegen adenoviral transduzierte Zellen ausgelöst werden kann [Tripathy et al., 1996].

1.2.2 Vektoren basierend auf adenoassoziierten Viren (AAV)

Die einzelsträngigen DNA-Parvoviren sind für den Einsatz in der Gentherapie ebenfalls geeignet, da bei Infektion mit dem Wildtyp-Virus bisher keinerlei pathogene Erscheinungen beim Menschen nachgewiesen worden sind und AAV-basierte Vektoren deshalb für den Einsatz am Menschen als sicher erachtet werden. AAV-basierende Vektoren integrieren in das Genom der Wirtszellen, weshalb diese Vektoren *in vivo* über einen langen Zeitraum (>1,5 Jahre) die Transgenexpression in transduzierten Zellen gewährleisten können. Mit geeigneten Methoden können zudem Viruspräparationen mit Titern bis zu 10^{11} Partikeln/ml hergestellt werden. Probleme bereitet aber die Kontamination der Präparationen mit replikationskompetenten, adenoviralen Helferviren. Ein weiterer Nachteil des Systems besteht in der geringen Klonierungskapazität von maximal 5 kb fremder DNA [Fisher-Adams et al., 1996; Ponnazhagan et al., 1997a - c].

1.2.3 Herpesvirale Vektoren

Ein weiteres Vektorsystem für den Einsatz in der Gentherapie leitet sich von den Herpesviren ab. Herpesvirale Vektoren besitzen eine große Klonierungskapazität von mindestens 30 kb [Roizman & Jenkins, 1985], und ein Vorteil dieser Vektoren liegt in der Fähigkeit zur Expression von Transgenen auch in nicht proliferierenden Zellen wie z. B. Neuronen [Leib & Olivo, 1993; Glorioso et al., 1995a, b] sowie in der Möglichkeit zur Generierung hochtitriger Überstände (z. B. durch Konzentrierung mittels Zentrifugation). Das zentrale Problem dieser Vektoren ist jedoch ihre inhärente Toxizität durch die Expression viraler Gene in den Wirtszellen und die Tatsache, daß die Transgenexpression in vielen Fällen nach einigen Wochen bis wenigen Monaten nicht mehr nachweisbar ist [Lokensgard et al., 1994; Chen et al., 1995; Carpenter & Stevens, 1996].

1.2.4 Vektoren basierend auf murinen TypC-Retroviren

Als derzeitiges Standardsystem für die Langzeitexpression von Transgenen nach viraler Transduktion haben sich Retroviren erwiesen, da die Viren nach Infektion in das Wirtsgenom integrieren. Voraussetzung für die erfolgreiche Integration des Prä-Integrationskomplexes ist

jedoch die mitotische Aktivität der infizierten Zielzelle [Roe et al., 1993]. Diese Vektoren besitzen eine Klonierungskapazität von 6 - 9 kb. Mittels geeigneter Sicherheitsverpackungszelllinien können hochtitrige Viruspräparationen (bis $\sim 10^7$ Virionen/ml) hergestellt werden. Die Verpackungszelllinien stellen sämtliche viralen Strukturproteine zur Erzeugung infektiöser Partikel zur Verfügung. Dies ermöglicht die vollständige Deletion der viralen Strukturgene in Vektoren auf der Basis muriner TypC-Retroviren, was sowohl eine Produktion toxischer, viraler Proteine in den Zielzellen verhindert, als auch die Möglichkeit der Entstehung replikationskompetenter Retroviren nahezu ausschließt. Mit Vektoren auf der Basis muriner Retroviren besteht zur Zeit die meiste Erfahrung [McLachlin et al., 1990; Buchsacher & Wong-Staal, 2000 Apr 15].

1.2.5 *Lentivirale Vektoren*

Der größte Nachteil der murinen TypC-basierten Vektoren ist ihre Unfähigkeit, in das Genom mitotisch inaktiver Zellen zu integrieren. Überwunden werden kann diese Problematik durch den Einsatz lentiviraler Vektoren. Diese gehören ebenfalls zur Gruppe der Retroviren, sind jedoch aufgrund des Vorhandenseins von nukleären Lokalisationssequenzen in den RNA-assoziierten Proteinen des viralen Genoms in der Lage, auch in die DNA teilungsinaktiver Zellen zu integrieren [Akkinä et al., 1996; Naldini et al., 1996].

1.2.6 *Vektoren basierend auf Foamy-Viren*

Die Foamy-Viren gehören ebenfalls zur Gruppe der Retroviren. Diese für den Menschen apathogenen RNA-Viren können stabil in das Wirtszellgenom integrieren. Ihre Klonierungskapazität ist mit 9 – 10 kb im Vergleich zu den herpesviralen Vektoren klein. Auf dem Foamy-Virus-basierende Vektoren besitzen den Vorteil, auch nicht teilungsaktive Zellen transduzieren zu können. Gleichzeitig haben sie aber den Nachteil, daß für diese Vektoren noch kein stabiles Verpackungssystem existiert. Dies verhindert zur Zeit die Generierung hochtitriger Überstände, wie sie für die effektive Transduktion der Zielzellen erforderlich ist [Russell & Miller, 1996].

1.3 Murine Retroviren als Grundlage gentherapeutischer Vektoren

1.3.1 Aufbau von Wildtyp-Retroviren

Vektoren auf der Basis von Retroviren waren die ersten Vektoren, mit denen die Transduktion eukaryontischer Zellen gelang [Miller et al., 1993]. Da in den hier vorliegenden Untersuchungen ausschließlich retrovirale Vektoren verwendet wurden, soll im folgenden näher auf den Aufbau und die Entwicklung dieses Vektorsystems eingegangen werden. Das Retrovirion besteht aus einer Phospholipid-Protein-Hülle, die ein Kapsid aus Proteinen umgibt, das zwei Kopien des kodierenden Strangs (+Strang) des RNA-Genoms, sowie mehrere Moleküle der reversen Transkriptase beinhaltet (siehe Abbildung 1-1).

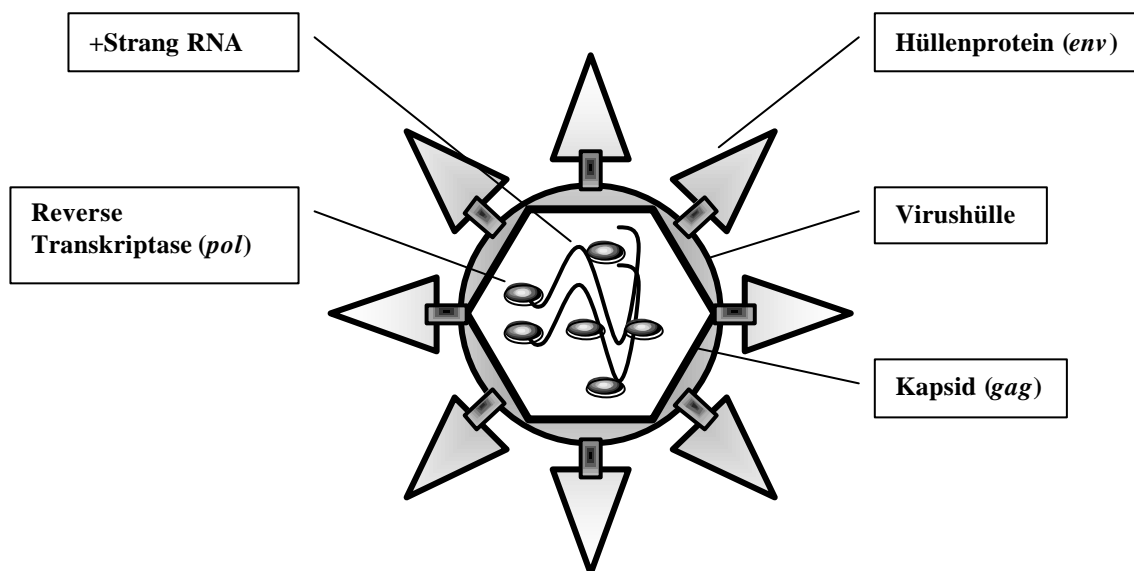


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines Wildtyp-Retrovirus. Die nicht maßstabsgetreue Abbildung zeigt die wichtigsten Strukturelemente der Retroviren.

1.3.2 Lebenszyklus der Wildtyp-Retroviren

Die Infektion der Zielzelle mit dem Retrovirus erfolgt durch die Fusion der Plasmamembran der Zelle mit der Hülle des Virus. Verantwortlich für die Anlagerung des Virus an die Zellmembran ist eine spezifische Interaktion zwischen viralen Hüllproteinen und zellulären Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen, wobei die viralen Hüllproteine die Wirtsspezifität der Virionen bestimmen. Nach dem Freisetzen des viralen Genoms aus dem

Kapsid im Zytoplasma wird die virale RNA durch die reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Der so erzeugte Prä-Integrationskomplex wandert in den Kern und wird stabil in das Wirtszellgenom integriert [Miller, 1990]. Der Integrationsort des Provirus ist dabei zufällig. Die stabile Integration führt zur Vererbung der viralen Sequenzen an alle Tochtergenerationen der transduzierten Zelle. Nach der Integration des Prä-Integrationskomplexes werden die viralen Gene transkribiert und translatiert. Die synthetisierten viralen Proteine wandern zur Zellmembran und integrieren in beziehungsweise binden an diese. Tritt zu diesen Proteinen genomische, virale RNA, so wird diese verpackt (*self-assembly*) und das neu entstandene Virion schnürt sich von der Zellmembran des Wirtes ab (*budding*).

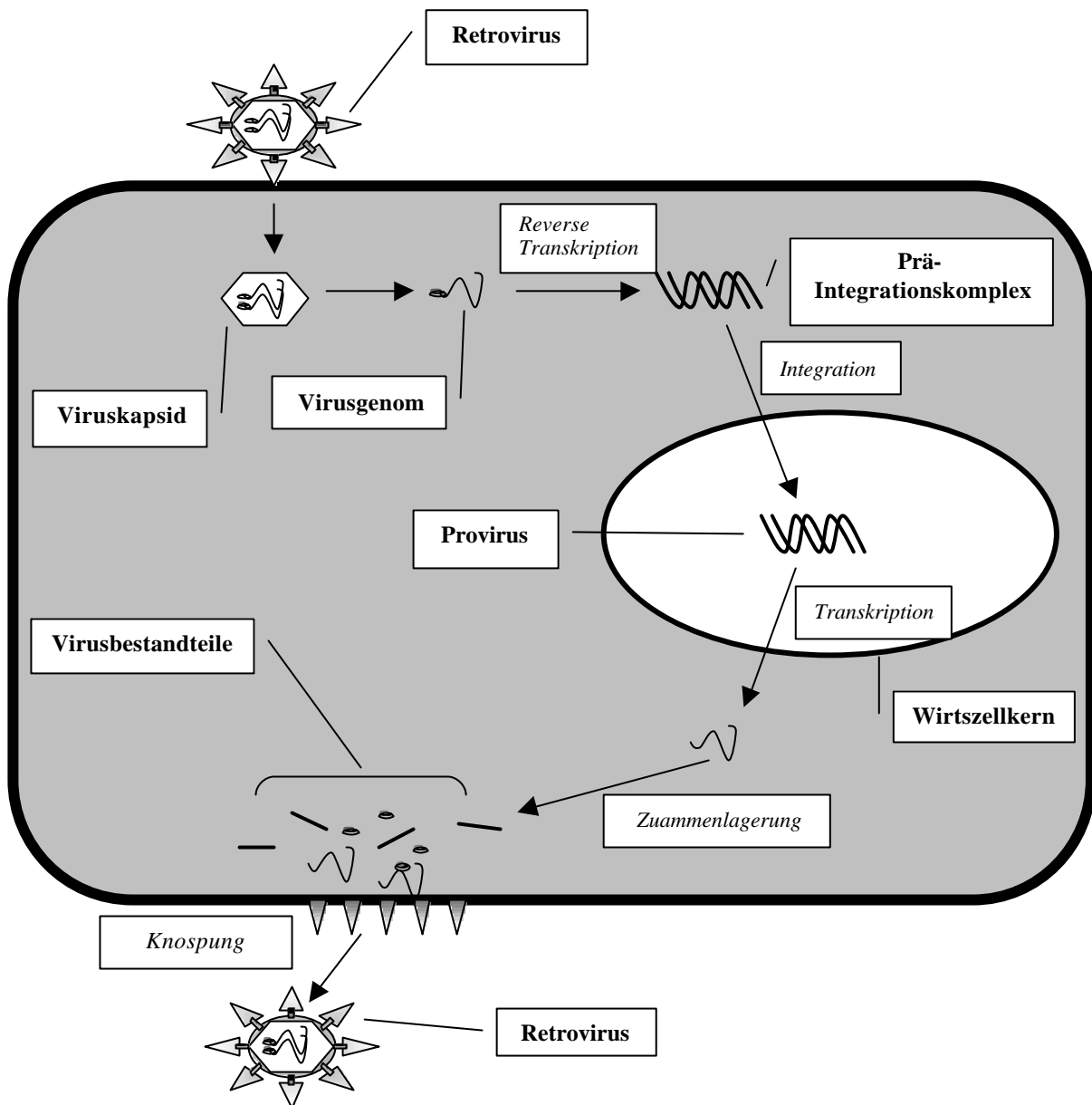


Abbildung 1-2: Replikationszyklus der Wildtyp-Retroviren. Der Zyklus beginnt mit der Infektion der Zielzelle und schließt mit der Produktion neuer Viruspartikel.

1.3.3 Funktionen des retroviralen Genoms

Das retrovirale Genom besteht im wesentlichen aus den drei für die Strukturproteine kodierenden Sequenzen *gag*, *pol* und *env*, die von den sequenzidentischen *long terminal repeats* (LTR) 5' und 3' flankiert werden (siehe Abbildung 1-3). Letztere enthalten die Bindestelle für den t-RNA-Primer als Ursprung für die Umschreibung des +RNA-Stranges in DNA durch die Reverse Transkriptase. Weiterhin sind sie für die Integration des Provirus in die Wirtszell-DNA notwendig. Nach Integration der retroviralen DNA reguliert die Promotorfunktion des 5'LTR des Provirus die Transkription der viralen RNA. Die Sequenzen *gag* und *pol*, sowie die *env*-Sequenz werden transkribiert, als Polyprotein translatiert und durch posttranslationelle Prozessierung in ihre funktionellen Komponenten gespalten. Die *gag*-Sequenz kodiert für die Elemente des Kapsids, während die *env*-Sequenz die Information für die Hüllproteine beinhaltet. Die Sequenz für die reverse Transkriptase wird durch das *pol*-Gen kodiert. Zwischen dem 5'LTR und dem *gag-orf* befindet sich das Verpackungssignal Ψ , das für die Verpackung der genomischen viralen RNA in das Viruskapsid während des *self assembly* verantwortlich ist [Miller, 1990].

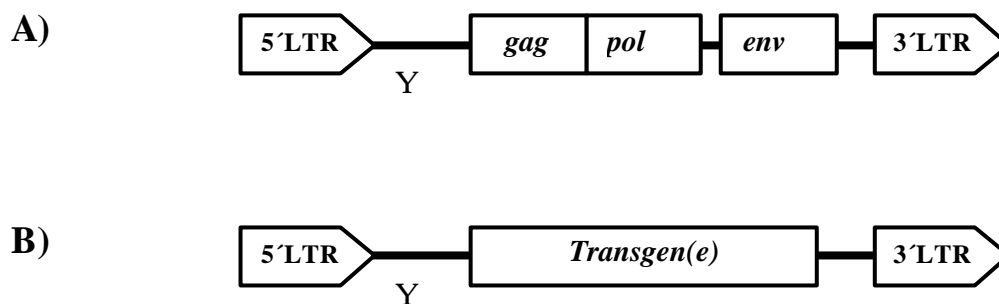


Abbildung 1-3: Struktur des retroviralen Genoms und abgeleiteter Vektoren. Vereinfachte Darstellung des Genoms eines Retrovirus (A) und daraus konstruierter Vektoren für die Gentherapie (B). Abkürzungen: LTR = Long Terminal Repeat, *gag* = kodierende Sequenz der viralen Kapsidproteine, *pol* = kodierende Sequenz der retroviralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), *env* = kodierende Sequenz der Virushüllenproteine, Ψ = Verpackungssignal zur Bindung des viralen Genoms an Kapsidproteine.

1.3.4 Retrovirale Vektoren für die Gentherapie

Bei der Konstruktion retroviraler Vektoren werden große Anteile der Strukturgene des Virus entfernt, lediglich die LTRs und das Verpackungssignal bleiben komplett erhalten. Die Entfernung aller Virus-Strukturgene umgeht das Problem der Entstehung replikationskompetenter Viren und die Toxizität bzw. Immunogenität viraler Proteine, wie sie bei der Transduktion mit Herpes- und adenoviralen Vektoren auftritt [Leib & Olivo, 1993; Tripathy et al., 1996]. Im Gegensatz zu den eben genannten Vektoren integrieren retrovirale Vektoren stabil in das Wirtszellgenom, was theoretisch die Expression der eingebrachten Transgene über die gesamte Lebensdauer der Wirtszelle und deren Tochterzellen ermöglicht. Bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen könnte dies eine permanente Korrektur bestimmter monogenetischer Erkrankungen zur Folge haben. Da durch die Deletion der Strukturgene die Vektoren replikationsdefizient sind, können sie sich nicht selbständig in den Wirtszellen vermehren. Zur Produktion infektiöser Vektorpartikel bedarf es sogenannter Verpackungszelllinien, welche die fehlenden viralen Proteine komplementieren [Miller, 1990]. Frühe Vektoren für die Transduktion hämatopoetischer Zellen basierten auf Sequenzen des *Molony Murine Leukemia*- oder *Harvey Murine Sarcoma*-Virus [McLachlin et al., 1990]. Um eine Verbesserung der Integration und Expression der transduzierten Gene zu erreichen, wurden später auch Sequenzen anderer Viren (z. B. *Murine Embryonic Stem Cell*-Virus, *Spleen Focus Forming*-Virus) eingesetzt [Eckert et al., 1996]. Dadurch ließ sich eine erhöhte Expression der vektorexprimierten Proteine erzielen. Ein weiterer Grund war die Hoffnung, effektive bzw. gewebespezifische LTR-Promotoren identifizieren zu können. Desweiteren besteht die Möglichkeit, die Transgenexpression durch einen 5' gelegenen internen Promotor zu steuern. In letzterem Fall bedient man sich starker, gewebespezifischer Promotoren, Promotoren von ubiquitär aktiven Genen oder Promotoren verschiedener Viren (z. B.: SV 40, CMV) [Malik et al., 1995]. Der Einsatz eines internen Promotors wurde aber des öfteren mit Interferenzen mit den vektoreigenen Promotoren in Verbindung gebracht [Flanagan et al., 1989; Loh et al., 1990; Petersen et al., 1991].

Neben diesen Einzelgenvektoren wurden auch Konstrukte hergestellt, welche die gleichzeitige Expression mehrerer Gene ermöglichten, um entweder mehrere therapeutische Gene oder neben dem therapeutischen Gen einen selektierbaren Marker [Hawley et al., 1994] in den Zielzellen exprimieren zu können. Anfänglich wurde dazu eines der Gene vom Promotor in der 5' LTR exprimiert, während das zweite Gen von einem internen Promotor abgeschrieben wurde [Malik et al., 1995]. Diese Konstellation erwies sich jedoch als unzuverlässig, da häufig die Expression des zweiten Gens niedriger als die des ersten Gens

war [Nakajima et al., 1993]. Teilweise umgangen werden kann diese Problematik durch die Erzeugung einer bicistronischen *messenger*-RNA (mRNA) durch den Einsatz einer *internal ribosomal entry site* (IRES). Diese Sequenz wird zwischen die beiden Transgene gesetzt, und es wird, unter Kontrolle des 5' LTR-Promotors, eine bicistronische mRNA transkribiert, die eine *cap*-unabhängige Translation des 3' gelegenen *orf* ermöglicht [Adam et al., 1991; Aran et al., 1994]. In der vorliegenden Arbeit werden einige der oben angeführten Vektor-Konstruktionen zur Expression von Transgenen in hämatopoetischen Zellen untersucht.

1.4 Produktion viraler Vektoren für die Gentherapie

Um Zielzellen effizient mit retroviralen Vektoren zu infizieren benötigt man hochtitrige Viruspräparationen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Typen von Verpackungszelllinien verwendet. Es handelt sich dabei um stabile beziehungsweise transiente Verpackungszelllinien, die im folgenden vorgestellt werden sollen.

1.4.1 Stabile Verpackungszelllinien

Zur Herstellung stabiler Produzentenzelllinien, die dauerhaft infektiöse Partikel produzieren, wurde die Verpackungszelllinie GP+E86 eingesetzt [Markowitz et al., 1988]. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um gentechnisch modifizierte NIH-3T3-Zellen. Diese Zellen tragen stabil integriert die viralen Sequenzen *gag* und *pol* auf einem, die *env*-Sequenz auf einem weiteren Plasmid. Im Falle der GP+E86-Verpackungszelllinie kodiert die *env*-Sequenz für ein virales Hüllprotein mit ekotroper Wirtsspezifität. Damit beschränkt sich das Spektrum der Zielzellen auf Nagerzellen (siehe auch 1.4.2). Neben der Aufteilung des Wildtyp-Genoms auf zwei verschiedene Plasmide wurden das Verpackungssignal und die LTR-Sequenzen des Wildtyp-Virus eliminiert. Die oben genannten Maßnahmen sollen das Risiko der Produktion replikationskompetenter Viren nach Transfektion der Zellen mit retroviraler Vektor-DNA vermindern. Im Falle der stabilen Produzenten werden nach der Transfektion solche Klone selektiert, welche die transfizierte Vektor-DNA stabil in ihr Genom integriert haben. Diese Klone produzieren dann kontinuierlich infektiöse Viruspartikel. Die so hergestellten Viren können Zielzellen einmalig infizieren. Da die Zielzellen - im Gegensatz zu den

Verpackungszelllinien - die Strukturproteine der Wildtyp-Retroviren nicht zur Verfügung stellen, können sich die rekombinanten Viren in den Zielzellen nicht replizieren (replikationsinkompetente Viren).

1.4.2 *Transiente Verpackungszelllinien*

Die Herstellung stabiler Produzentklone ist mit einem hohen, vor allem zeitlichen, Aufwand verbunden. Eine Möglichkeit, für experimentelle Zwecke kurzfristig kleinere Mengen (bis zu einigen 100 ml) infektiösen Überstands herzustellen, besteht in der Verwendung transienter Verpackungszelllinien. Aus den eben genannten Gründen wurde in dieser Arbeit auch die transienten Verpackungszelllinien FNX zur Überstandsproduktion verwendet [Pear et al., 1993; Kinsella & Nolan, 1996]. Im Unterschied zu den stabilen Produzentzelllinien sezernieren die transienten ekotropen oder amphotropen FNX-Verpackungszelllinien nach Transfektion nur für einige Tage rekombinante Viren, da das transfizierte Vektorkonstrukt vorwiegend episomal vorliegt. Diese Zellen komplementieren ebenfalls die fehlenden Strukturproteine der retroviralen Vektoren, es werden jedoch nicht einzelne Klone selektiert, die die transfizierte DNA stabil integriert haben, sondern der Überstand einer polyklonalen Population von Produzentenzellen wird gewonnen.

Das Wirtsspektrum der sowohl mit stabilen als auch mit transienten Produzentenzellen gewonnenen Überstände wird durch die Wahl der verwendeten *env*-Sequenz bestimmt. Das *env*-Genprodukt vermittelt in einer spezifischen, Rezeptorabhängigen Reaktion die Bindung des Virus an die Wirtszelle. Heutzutage finden zumeist drei verschiedene *envelope*-Proteine Verwendung. Zur Infektion von Nagerzellen werden ecotrope Vektoren hergestellt. Für die Infektion eines breiteren Spektrums von Zellen, darunter auch humane Zellen, bedient man sich hingegen amphotroper Viren [Markowitz et al., 1988]. Als praktikable Alternative für die Transduktion von Primatenzellen hat sich die Verwendung von *Gibbon Ape Leukemia*-Virus (GALV)-pseudotypisierten [Kiem et al., 1997] Vektoren erwiesen. Nützlich erweist sich dies insbesondere bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen, die den amphotropen Rezeptor nur sehr schwach auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [Orlic et al., 1996].

1.5 Die Blutstammzelle als Zielzelle für die Gentherapie

Hämatopoetische Stammzellen bieten sich als Zielzellen für die korrektive Gentherapie an, da sie ein hohes Teilungspotential besitzen und dauerhaft alle unterschiedlichen funktionellen Blutzellen des lympho-hämatopoetischen Systems nachliefern (siehe Abbildung 1-4). Dabei besitzen die Stammzellen ein großes Proliferations- und Selbsterneuerungspotential, und bereits wenige Stammzellen können bei autologer Knochenmarktransplantation die Hämatopoese eines Individuums rekonstituieren, ein Sachverhalt der klinisch beispielsweise im Rahmen der allogenen oder autologen Stammzelltransplantation genutzt wird. Quelle für diese Transplantate, und damit von langzeitrepopulierenden Stammzellen, können dabei Knochenmarkaspirate, Stammzellen des peripheren Bluts (PBSZ) und Nabelschnurblut sein. Die PBSZ werden durch Chemotherapie- und/oder Wachstumsfaktor-Behandlung mit G-CSF/GM-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert und anschließend durch Apherese gewonnen.

Eine ausreichend hohe Expression des Transgens vorausgesetzt, würde die stabile Integration eines therapeutischen Vektors in das Genom von Stammzellen zu einer permanenten Korrektur der zu behandelnden Krankheit (z. B. Hämophilie oder angeborenes Immunmangelsyndrom) führen. Neben diesen günstigen Eigenschaften der Blutstammzellen ergeben sich aber auch Probleme bei der Verwendung dieser Population als Zielzelle für den retroviralen Gentransfer. Bei der hämatopoetischen Stammzelle handelt es sich im allgemeinen um nur langsam proliferierende oder ruhende Zellen, wodurch eine Integration des retroviralen Vektors in das Wirtszellgenom erschwert beziehungsweise verhindert wird. Dies erklärt die zumeist enttäuschenden Transduktionsraten humaner Stammzellen [Nienhuis et al., 1991] in klinischen Studien [Kohn et al., 1995; Hanania et al., 1996; Hesdorffer et al., 1998]. Mögliche Lösungsansätze für diese Problematik werden im nächsten Kapitel neben weiteren Maßnahmen zur Erhöhung der Transfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen beschrieben.

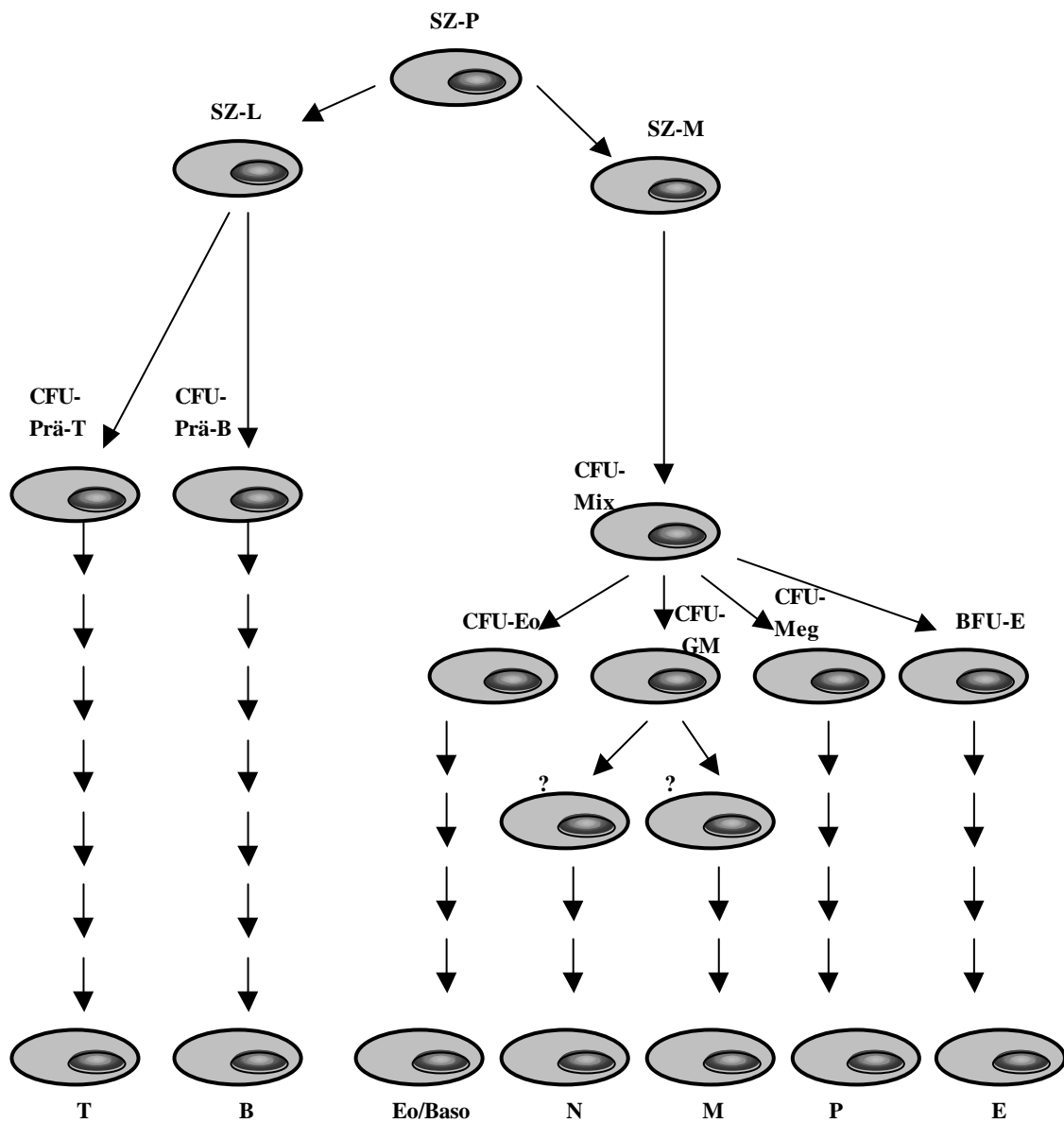


Abbildung 1-4: Hierarchie der Hämatopoese. Die Abbildung zeigt schematisch die Abstammung differenzierter Blutzellen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle. Das Proliferationspotential nimmt in dieser Abbildung von oben nach unten ab. Die terminal differenzierten Zellen am unteren Rand der Abbildung besitzen kein solches Potential mehr. Die Anordnung mehrerer Pfeile hintereinander bedeutet, daß die Differenzierung über mehrere Zwischenstufen verläuft. Fragezeichen in der Abbildung weisen möglicherweise auf noch unbekannte Zellpopulationen hin. Abkürzungen: B = B-Lymphozyt, BFU = *burst forming unit*, CFU = koloniebildende Zelle (*colony forming unit*), E = Erythrozyt/erythrozytär, Eo = eosinophil, G = Granulozyt/granulozytär, GM = granulo-/monozytär, M = Monozyt/monozytär, Meg = megakaryozytär, Mix = gemischte Kolonien, N = Neutrophiler, P = Thrombozyt, SZ-L = lymphatische Stammzelle, SZ-M = myeloische Stammzelle, SZ-P = pluripotente Stammzelle, T = T-Lymphozyt (verändert nach: Klein, 1991)

1.6 Retrovirale Transduktion hämatopoetischer Zellen

Für die erfolgreiche Transduktion von Zellen mit Vektoren, die auf murinen Retroviren basieren, ist es unerlässlich, daß diese proliferieren. Da es sich bei den hämatopoetischen Stammzellen prinzipiell um ruhende Zellen in der G₀-Phase handelt, werden sowohl für In-vivo- als auch In-vitro-Experimente Zytokine eingesetzt, die den Eintritt der hämatopoetischen Zellen in den Zellzyklus fördern. Dieser als Prästimulation bezeichnete Vorgang ist mittlerweile fester Bestandteil der Transduktionsprotokolle [Luskey et al., 1992; Hanenberg et al., 1997]. In den letzten Jahren konnte eine Reihe von solchen Faktoren identifiziert werden, die Blutstammzellen und reifere Zellen in Proliferation, Differenzierung, Funktion und Motilität beeinflussen [Tabbara & Robinson, 1991].

Die Effekte der Zytokine auf hämatopoetische Zellen sind vielfältig, und sie üben ihren proliferationsfördernden Einfluß auf zumeist mehrere unterschiedliche Populationen der Blutzellen aus. Die Wirkung der Wachstumsfaktoren (wie zum Beispiel G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF, IL-6, FLT3-Ligand, Thrombopoietin) kann dabei entweder reifere Zellpopulationen wie Granulozyten-, Makrophagen- oder Megakaryozyten-Vorläuferzellen, oder unreifere, pluripotente Populationen stimulieren. Bei einigen Zytokinen läßt sich die stimulatorische Wirkung durch den kombinierten Einsatz mit weiteren Wachstumsfaktoren aufgrund synergistischer Effekte verstärken [Luskey et al., 1992; Toksoz et al., 1992; Peters et al., 1996; Hennemann et al., 1999].

Nachteilig bei der Ex-vivo-Stimulation von hämatopoetischen Stammzellen mit Zytokinen ist jedoch der differenzierende Einfluß mancher Wachstumsfaktoren auf die Stammzellen, was zu einem Verlust der Langzeitpopulierungskapazität dieser Zelle in letal bestrahlten Empfängermäusen/-tieren führen kann [Peters et al., 1996].

Um Zielzellen und retrovirale Vektoren in den für die Transduktion erforderlichen engen räumlichen Kontakt zu bringen [Haywood, 1994], existieren mehrere Strategien. Bei der Überstandsinfektion werden die Zielzellen mit dem virushaltigen Überstand und Wachstumsfaktoren für mehrere Stunden bis Tage in Zellkulturgefäßen inkubiert. Zur Überwindung der abstoßenden elektrostatischen-, Van-der-Waal's-, Hydratations- und sterischen Kräfte zwischen den Phospholipidmembranen von Virus und Zielzelle [Andreadis & Palsson, 1997] wird ein Polykation, häufig Polybrene oder Protamin, dem Reaktionsansatz zugesetzt. Alternativ kann zur Verbesserung der Infektionsrate auch Fibronectin verwendet werden. Dabei werden die Zellkulturgefäße vor der Transduktion mit Fibronectin oder rekombinanten Fragmenten dieses Proteins der extrazellulären Matrix beschichtet.

Fibronektin besitzt die Eigenschaft, sowohl Zellen über die CS-1-Sequenz der IIICS-Domäne, als auch Retroviren über die C-terminale hochaffine Heparinbindestelle zu binden [Kimizuka et al., 1991; Hanenberg et al., 1996; Moritz et al., 1996]. Die Bindung der Zellen an die CS-1 Sequenz erfolgt dabei über die Integrinrezeptoren VLA-4 beziehungsweise VLA-5. Diese Kolokalisation von Zielzelle und Virus ermöglicht letztendlich die Verbesserung der Transduktionseffizienz [Hanenberg et al., 1997].

Des Weiteren kann die Infektion der Zielzellen durch die Kokultur mit retroviralen Produzentzelllinien erreicht werden. In diesem Fall werden die Zielzellen zusammen mit zellzyklusarretierten Virus-Produzentzellen inkubiert [Luskey et al., 1992].

1.7 Transfer von Chemotherapie-Resistenzgenen (CTX-R) in hämatopoetische Zellen

In vielen Fällen ist die chemotherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen mit einer dosislimitierenden Myelosuppression verbunden. Zur Unterstützung der Hämatopoese von Patienten unter myeloablativer Chemotherapie wird in vielen Fällen eine autologe Knochenmarktransplantation vorgenommen. Eine Resistenzhöhung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gegenüber diesen Substanzen verspricht eine Verminderung der hämatologischen Nebenwirkungen und eine mögliche Dosisintensivierung der Therapie [Maze et al., 1997]. Die Überexpression von Chemotherapie-Resistenzgenen kann in solchen Fällen vor der zytotoxischen Wirkung bestimmter Medikamente schützen. Die hierbei genutzten Resistenzmechanismen sind unterschiedlich. Zum einen können Gene transduziert werden, die für membranständige Effluxpumpen kodieren, die Zytostatika aus den Zellen befördern (MDR1). Andere Genprodukte sind an der Metabolisierung von Zytostatika beteiligt und erreichen auf diese Weise eine Detoxifikation (CDD, ALDH). Eine dritte Gruppe von Proteinen ist an der Reparatur von zytostatikainduzierten DNA-Läsionen beteiligt und bewahrt so die genetische Integrität der Zellen (APE, MGMT). Die Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht der wichtigsten Chemotherapie-Resistenzgene.

Tabell 1-1: Auswahl von Chemotherapie-Resistenzgene (CTX-R) für die Genterapie. Abkürzungen: ALDH = Aldehyd-Dehydrogenase, APE = apurinische/apyrimidinische Endonuclease, GST = Glutathion-S-Transferase, MGMT = O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MDR1 = Multidrug Resistance Gen 1, MnSOD = Magnesium-Natrium-Dismutase, MPG = Methylpurin-DNA-Glykosylase, MRP = Multidrug Resistance Related Protein, DHFR = Dihydrofolat-Reduktase

Gen	Medikamentenresistenz	Resistenzmechanismus des Genprodukts
Zellmembran		
MDR1	Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid, Taxane	Transmembraner Stofftransport via Effluxpumpe
MRP	Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Etoposid, Taxane	Transmembraner Stofftransport via Effluxpumpe
Zytoplasma		
DHFR	Methotrexat, Trimetrexat	mutante Form wird von Medikamenten nicht inhibiert
ALDH	Cyclophosphamid	intrazelluläre Detoxifikation
Cytidin-Deaminase	Cytosin-Arabinosid	intrazelluläre Detoxifikation
GST	Cyclophosphamid	intrazelluläre Detoxifikation
Thymidylat-Synthase	5-Fluorodesoxyuridin	mutante Form wird von Medikamenten nicht inhibiert
Ribonucleotid-Reduktase	Hydroxyharnstoff	mutante Form wird von Medikamenten nicht inhibiert
Tubulin	Vinca-Alkaloide, Taxane	mutante Form wird von Medikamenten nicht inhibiert
Zellkern		
ada	Alkylanzien	repariert O ⁶ -Addukte
MGMT	Alkylanzien	repariert O ⁶ -Addukte
APE	Anthrazykline und Etoposid	repariert AP-Stellen, Alkylierung und oxidative Schäden
MPG	Alkylanzien	entfernt alkylierte Basen
MnSOD	Anthrazykline und Paraquat	schützt vor oxidativen Schäden

1.8 Einsatz der MGMT zum Schutz des Knochenmarks bei myeloablativer Behandlung

Alkylierungen der DNA an der O⁶-Position des Guanins werden z. B. durch chloroethylierende Agenzien und Triazenverbindungen erzeugt. Diese Substanzen finden Anwendung in der Tumorthherapie, insbesondere zur Behandlung von Hirntumoren, Lymphomen, Bronchialkarzinomen und Melanomen [Weiss & Issell, 1982; Newlands et al., 1992]. Die Verwendung dieser alkylierenden Chemotherapeutika wird jedoch durch ihre

erhebliche und oft dosislimitierende Hämatotoxizität stark eingeschränkt. Ihre toxische Wirkung entfalten die chloroethylierenden und methylierenden Substanzen durch die Alkylierung der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA. Unter den vielfältigen Addukten, die durch die Nitrosoharnstoffe und Triazene erzeugt werden, ist die Alkylierung des Guanins an der O⁶-Position besonders toxisch [Gonzaga & Brent, 1989]. Diese Läsion führt im weiteren Verlauf zu einer kovalenten Bindung zwischen den komplementären Stränge der DNA-Doppelhelix (*interstrand crosslinks*) [Tong et al., 1982]. Diese Schädigung behindert die DNA-Replikation der betroffenen Zellen durch die Blockierung der DNA-Polymerase und führt zum Zelltod. Die Myelosuppression wird durch die präferentielle Schädigung der hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks durch O⁶-alkylierende Substanzen verursacht. So zeigten Untersuchungen mit der Substanz BCNU eine deutliche Verminderung von primitiven Vorläuferzellen im Knochenmark BCNU-behandelter Mäuse [Maze et al., 1994]. Die hohe Anfälligkeit hämatopoetischer Stammzellen für O⁶-alkylierende Agenzien resultiert aus der geringen Expression des Reparaturproteins MGMT in diesen Zellen [Gerson et al., 1985; Gerson et al., 1996]. Die MGMT ist ein 207 Aminosäurereste großes Protein, das Alkylierungen an der O⁶-Position von Guaninresten in der DNA entfernt [Pegg et al., 1983]. Dabei wird der Alkylrest von der O⁶-Position des Alkylrestes auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des Proteins übertragen. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um eine stöchiometrische Reaktion, bei der das Protein nach der Übertragung der Alkylgruppe inaktiviert und nachfolgend abgebaut wird (*suicide mechanism*) [Pegg, 1990]. Diese Reaktion der Wildtyp-MGMT (wtMGMT) läßt sich spezifisch durch die Substanz O⁶-Benzylguanin (O6-BG) hemmen [Pegg et al., 1993]. Mittlerweile wurden Mutanten der MGMT (mutMGMT) beschrieben, die mehr oder weniger resistent gegenüber einer Inaktivierung durch diesen Hemmstoff sind [Crone & Pegg, 1993; Crone et al., 1994; Xu-Welliver et al., 1998]. Bei der Verbindung O6-BG handelt es sich um ein Basenanalogen, das mit dem Akzeptor-Cystein des aktiven Zentrums der wtMGMT eine kovalente Bindung eingeht. Diese Reaktion inhibiert irreversibel das Reparaturprotein. Die Resistenz der MGMT^{P140K}-Mutante gegenüber O6-BG beruht auf der Tatsache, daß das Lysin an der Position 140 der Aminosäuresequenz einen Eintritt des O6-BG in das aktive Zentrum des Proteins sterisch verhindert, während die Reaktion mit dem natürlichen Substrat davon unbeeinflusst bleibt. Aufgrund der stöchiometrischen Natur der Reparatur durch die MGMT kann die zelluläre Alkylguanintransferase-Aktivität nach Hemmung durch O6-BG nur durch eine Protein-Neusynthese wiederhergestellt werden. Durch Behandlung mit O6-BG kann selbst die MGMT-Aktivität von wtMGMT-überexprimierenden kultivierten Tumorzellen und

Tumorxenotransplantaten gehemmt und so die Sensitivität der malignen Zellen gegenüber O⁶-alkylierenden Substanzen gesteigert werden [Dolan et al., 1991; Mitchell et al., 1992; Pegg et al., 1993]. Genetisch modifizierte hämatopoetische Zellen, welche die MGMT^{P140K} überexprimieren, wären vor der Toxizität einer kombinierten Therapie mit O⁶-BG plus O⁶-alkylierender Substanz geschützt. Die Transplantation dieser Zellen in Individuen, die anschließend mit kombinierter Chemotherapie behandelt werden, sollte zur Remission des Tumors bei gleichzeitig geschützter Hämatopoese führen.

Aufgrund der hohen Sensitivität der Blutstammzellen gegenüber O⁶-alkylierenden Medikamenten wäre es wünschenswert, die Toleranz dieser Zellen gegenüber eben diesen Zytostatika zu erhöhen, insbesondere da auch der Einsatz von autologer Knochenmarktransplantation bzw. die Verabreichung von rekombinant hergestellten, hämatopoetischen Zytokinen bei der Hochdosischemotherapie nicht immer die gewünschten Ergebnisse erbracht hat [Woll et al., 1995].

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Experimente der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich mit dem retroviralen Transfer der humanen MGMT-cDNA in hämatopoetische Zellen. Dieses Chemotherapie-Resistenzgen vermittelt bei adäquater Expression eine Resistenz gegenüber O⁶-DNA-alkylierenden Agenzien. Im Rahmen dieser Arbeit sollten dabei mehrere Parameter für den Gentransfer der MGMT in hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen optimiert werden.

1.9.1 ^[B2]Alternativen zur Behandlung mit BCNU

Nahezu alle bisherigen Studien zum MGMT-Gentransfer in hämatopoetische Zellen benutzen als funktionellen Test für erfolgreich transduzierte Zellen die Erhöhung der zellulären Resistenz gegenüber BCNU-induzierter Toxizität. Für die Behandlung von Tumorpatienten ist es jedoch wünschenswert, eine größere Auswahl von Medikamenten zur Verfügung zu haben, um zum Beispiel beim Auftreten von Unverträglichkeiten durch nicht-hämatologische Nebenwirkungen (z. B. Lungenfibrosen im Falle des BCNU) auf Alternativen ausweichen zu können. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit die Schutzwirkung der

Überexpression der wtMGMT in murinen Vorläuferzellen vor der Toxizität einer Reihe verschiedener O⁶-alkylierender Substanzen untersucht.

1.9.2 Testung ausgewählter Vektoren bezüglich ihrer Expressionsstärke in hämatopoetischen Zellen

Da es sich bei der DNA-Reparatur durch die MGMT um eine stöchiometrische Reaktion handelt, ist die Expressionshöhe der MGMT in den zu schützenden Zellen direkt mit dem Resistenzfaktor korreliert. Um zu ermitteln, welchen Einfluß das Vektordesign auf die vermittelte Toleranz gegenüber alkylierenden Substanzen hat, wurden vergleichende Experimente mit unterschiedlichen Vektoren durchgeführt. Die Vektoren unterschieden sich dabei in a) der Steuerung der MGMT-Expression durch verschiedene virale Promotoren beziehungsweise einen internen Promotor, b) der Position der MGMT-cDNA im Vektor relativ zur LTR und c) der Expression eines zweiten Gens.

1.9.3 Testung der Reparaturkapazität der MGMT^{V139F}-Mutante durch die Überexpression der Mutante in einer Zelllinie

Die kürzlich beschriebene Mutante der MGMT (MGMT^{V139F}) [Christians & Loeb, 1996] sollte auf ihre Fähigkeit überprüft werden, die ACNU-Resistenz der murinen Leukämiezelllinie L1210 zu erhöhen. Als Referenz diente eine L1210 Zelllinie, die eine O6-BG-resistente Mutante der MGMT (MGMT^{P140A}) [Crone & Pegg, 1993] überexprimiert.

1.9.4 Optimierung der In-vivo-Selektion MGMT-transduzierter hämatopoetischer Zellen durch den Einsatz einer O⁶-Benzylguanin-resistenten MGMT-Mutante

Die MGMT wird von allen somatischen Körperzellen, wenn auch in unterschiedlichem Maße, exprimiert. Vor diesem Hintergrund wird eine Selektion von MGMT-überexprimierenden, hämatopoetischen Zellen erschwert. Dieser Hintergrund läßt sich jedoch eliminieren, wenn für die Transduktion der hämatopoetischen Zellen Mutanten der MGMT eingesetzt werden, die resistent gegenüber einer Hemmung durch den wtMGMT-spezifischen Inhibitor O⁶-

Benzylguanin (O6-BG) sind. Bei Behandlung mit kombinierter Chemotherapie, bestehend aus O6-BG plus O⁶-alkylierenden Agenzien, sollten die mutMGMT-transduzierten hämatopoetischen Zellen einen erheblichen Selektionsvorteil besitzen (siehe 1.8). Für die hier vorgestellten Versuche kam die O6-BG-resistente Mutante MGMT^{P140K} zum Einsatz [Xu-Welliver et al., 1998; Davis et al., 1999b ; Loktionova et al., 1999]. In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten sollte gezeigt werden, daß sich die Hämatopoese von Tieren mit transgenem MGMT^{P140K}-exprimierendem Knochenmark trotz intensiver kombinierter Chemotherapiebehandlung effektiv schützen läßt. Der Schutz der Tiere soll durch eine Anreicherung und Langzeitrepopulierung mit funktionellen, MGMT^{P140K}-exprimierenden Leukozyten demonstriert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Antibiotika

Penicillin/Streptomycin
Geneticin G418

Sigma, Deisenhofen
Life Technologies,
Eggenstein
Life Technologies,
Eggenstein

Ampicillin

Antikörper

α -GR-1 PE mAK

PharMingen,
Heidelberg

α -CD45/B220 PE mAK

PharMingen,
Heidelberg

α -CD3 ϵ PE

PharMingen,
Heidelberg

α -CD4 PerCP mAK

PharMingen,
Heidelberg

α -DIG AP mAK f_{ab} Fragmente

Roche, Mannheim

Bakterien

E. coli DH5 α

Life Technologies,
Eggenstein

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid

Sigma, Deisenhofen

Agarose

Sigma, Deisenhofen

Ammoniumpersulfat

Fluka, Deisenhofen

DMSO

Sigma, Deisenhofen

dNTPs

Roche, Mannheim

EDTA

Fluka, Deisenhofen

Ethidiumbromid

Life Technologies,
Eggenstein

Gelatine Typ A

Sigma, Deisenhofen

Glyzerin

Sigma, Deisenhofen

Heparin (Liquemin)

Roche, Mannheim

Hexadimethrine-bromide (Polybrene)

Sigma, Deisenhofen

N-Laurylsarkosin

Sigma, Deisenhofen

Maleinsäure

Serva, Heidelberg

Methylzellulose

Fluka, Deisenhofen

Mineralöl

Sigma, Deisenhofen

Natriumperchlorat

Fluka, Deisenhofen

Nonidet P40

ICN, Eschwege

O6-BG

Sigma, Deisenhofen

PEG 400/1000	Sigma, Deisenhofen
Phenol (Tris/HCl gesättigt)	Amresco, Solon, Ohio, USA
SDS	Fluka, Deisenhofen
TEMED	Life Technologies, Eggenstein
Tris	Life Technologies, Eggenstein
Triton X100	Fluka, Deisenhofen
Tween 20	ICN, Eschwege
Wright's Lösung	MERCK, Darmstadt

alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Baker, ICN, Life Technologies oder Sigma mit dem Reinheitsgrad p. a. verwendet

DNA-Größenstandards

1kb Leiter	Life Technologies, Eggenstein
100bp Leiter	Life Technologies, Eggenstein
λ -Phage/HindIII	Life Technologies, Eggenstein
Leiter-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Enzyme

Calf Intestine Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm + Puffer	Life Technologies, Eggenstein
T4 DNA Ligase + Puffer	Life Technologies, Eggenstein
Klenow Fragment der DNA-Polymerase + Puffer	Life Technologies, Eggenstein
Lysozym	Roche, Mannheim
Proteinase K	Life Technologies, Eggenstein
Restriktionsenzyme + Puffer	Life Technologies, Eggenstein
RNase A	Roche, Mannheim
RNase H	Roche, Mannheim
RNase T ₁	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase + Puffer	Genecraft, Münster
Trypsin	Sigma, Deisenhofen

Experimentaltiere (Mausstämme)

C3H-Mäuse	Harlan, Borcheln
-----------	------------------

C57 Bl/6-Mäuse

Janvier, Le Genest
St. Isle, Frankreich;
Harlan, Borchon
Jackson
Laboratories, Bar
Harbor, Maine,
USA

Filme

X-OMAT AR
667 (schwarz/weiß)

Kodak, Stuttgart
Polaroid,
Cambridge, MA,
USA

Glaswaren

Kolben, Becher, Flaschen

JENAerGLASS,
Jena

Kits

DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II
NucleonII

Roche, Mannheim
Scotch Lab,
Wiesloch
Quiagen, Hilden
USB, Cleveland,
Ohio

QuiaEx
Sequenase Kit

Membranen

N+Blotting-Membranen

Fluka, Deisenhofen

Oligonukleotide

PCR-Primer

MWG Biotech,
Ebersberg

DIG-konjugierte Oligonucleotide

MWG Biotech,
Ebersberg

Plastikverbrauchsmaterial (steril)

Zellkulturgefäße, Pipetten

Sarstedt,
Nümbrecht; Renner,
Darmstadt;
Becton Dickinson,
Heidelberg

Proteine

BSA
Retronektin[®]

Fluka, Deisenhofen
Bio Whittaker,
Taufkirchen

Puffer

Cell Dissociation Buffer (CDB)

Life Technologies,
Eggenstein
PharMingen,
Heidelberg

PharM Lyse

Transfektionsreagenzien

DAC-30

Eurogentech,
Seraing, Belgien

LipofectAMINE

Life Technologies,
Eggenstein

Lipofectin

Life Technologies,
Eggenstein

Wachstumsfaktoren

rhEPO

Roche, Mannheim
PeproTech, Rocky
Hill, New Jersey,
USA

rmIL-3

rhIL-3

Sandoz, Basel,
Schweiz

rhIL-6

Sandoz, Basel,
Schweiz

rmSCF

PeproTech, Rocky
Hill, New Jersey,
USA

rhSCF

CellGenix, Freiburg

rhG-CSF

Roche, Mannheim

rhGM-CSF

Essex Pharma,
München

rmM-CSF

R&D Systems,
Minneapolis, MN,
USA

rmIL-1 α

R&D Systems,
Minneapolis, MN,
USA

Zelllinien

L1210

ATCC, Manassas,
VA, USA

OMG9

PD Dr. T. Moritz,
Universitäts-
klinikum Essen,
Innere Klinik
(Tumorforschung),
Essen, Deutschland
ATCC, Manassas,
VA, USA

PHOENIX eco/ampho

HeLaS3	PD Dr. J. Thomale, Institut für Zellbiologie, Essen, Deutschland
NIH-3T3	ATCC, Manassas, VA, USA
CI29	Dr. S. Ragg, Riley Hospital, Indianapolis, IN, USA
GP+E86	ATCC, Manassas, VA, USA
<i>Zellkulturmedien</i>	
αMEM	Sigma, Deisenhofen
DMEM (High Glucose)	Sigma, Deisenhofen
IMDM	Sigma, Deisenhofen
RPMI	Sigma, Deisenhofen
<i>Zusätze für Zellkulturmedien</i>	
Penicillin/Streptomycin (P/S) 100-fach	Sigma, Deisenhofen
L-Glu 200 mM	Sigma, Deisenhofen
FKS	Biochrom, Berlin; Sigma, Deisenhofen
<i>Zytostatika</i>	
ACNU	ASTA Medica, Frankfurt
BCNU	Essex Pharma, München
CCNU	medac, Wedel
Temozolomid (TMZ)	Schering Plough
Cisplatin	Bristol-Myers Squibb, München
Thiotepa	Lederle, Münster
Mitomycin C	medac, Wedel
5-FU	medac, Wedel

2.2 Geräte

Sterilbank

NU 4400-600E

NUAIRE,
Plymouth,
Minnesota, USA

Zellkulturinkubatoren

IR AUTOFLOW

NUAIRE,
Plymouth,
Minnesota, USA

Elektrophoreseeinrichtungen

Power Pak

Gelkammern

Biometra, Göttingen
Biometra, Göttingen

Ultraschallspitze

B12

Branson, Danbury,
Connecticut

Zentrifugen

Rotina 46, Universal 32, EBA 12R

CS-6R

5415C

Hettich, Tuttlingen
Beckmann,
München
Eppendorf,
Hamburg

Photoapparat

MP4+

Polaroid,
Cambridge, MA,
USA

Transiluminator

TFX 20M

Vilbert Lourmat,
Marne La Vallée,
Frankreich

Hybridisierungsöfen

OV2

Biometra, Göttingen

Vortexer

L46

GLW, Würzburg

Pipettierhilfen

Mikropipetten
Pipettboy

Gilson, Langenfeld
Hirschmann,
Eberstadt
Eppendorf,
Hamburg

Multistepperpipette

Wasserbad

TWB 22

Julabo, Seelbach

Durchflußzytometer

FACScan

Becton Dickinson,
Heidelberg
Coulter, Hamburg

EPICS XL

Bestrahlungsquellen

Stabilipan (Röntgenquelle)
Cäsiumquelle

Siemens, München
Nordion
International,
Kanata, Canada

Blutbilddifferenzierer

Animal Blood Cell Counter

ABX, Mont Pellier,
Frankreich
Abbott
Laboratories, South
Pasadena, CA, USA

Cell Dyn 3500 hematology analyser

Sequenzierautomat

ALF

Pharmacia, Freiburg

PCR Cycler

TRIO Thermoblock/TRIO Heated Lid

Biometra, Göttingen

pH-Meter

pH537

WTW, Weilheim

Mikroskope

CK2

Olympus, Hamburg

Neubauer Zählkammern

Hämacytometer

GLW, Würzburg

Software
Office 97
DRAW!, PHOTO PAINT

Microsoft, Soest
Corel, Ottawa,
Canada

2.3 Puffer und Lösungen

Detection-Buffer für die Chemilumineszenz-Reaktion

0,1M Tris/HCl
0,1 M NaCl
pH 9,5

FACS-Puffer

PBS + 0,2% BSA

Higuchi-Puffer

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl
2,5 mM MgCl₂
0,01 mg/ml Gelatine
0,45% NP 40
0,45% Tween 20

für die Lyse:

+ 0,6 µl Proteinase K 10 mg/ml

HPP-Agar Lösungen

Unterschicht-Agar:

1-fach αMEM
20% FKS
0,5% Agar
1% P/S 100-fach
4mM L-Glu
2,24 g/l NaHCO₃

Überschicht-Agar:

wie Unterschicht-Agar, aber 0,33% Agar

IMDM/Methylzellulose

1-fach konzentriertes IMDM
2% Methylzellulose

Maleinsäure-Puffer

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,4

PBS (Mg^{2+} - und Ca^{2+} - frei)

8 g/l NaCl
0,2 g/l KCl
1,44 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
0,2 g/l KH_2PO_4
pH 7,4

Puffer für die alkalische Lyse

P1:

50 mM Glucose
25 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM EDTA

P2:

0,2 M NaOH
1% SDS

P3:

3 M Kaliumacetat
5 M Acetat

20-fach SSC

175,3 g/l NaCl
88,2 g/l Na_3 -Citrat * 2 H_2O
pH 7,0

Standard-Hybridisierungspuffer

5x SSC
0,1% N-Laurylsarkosin (w/v)
0,02% SDS /w/v)
1% Blocking Reagent

50-fachTAE

242g/l Tris
57,1 ml/l Eisessig
50 mM EDTA
pH 8,5

20-fach TBE
121 g/l Tris
61,7 g/l Borat
7,44 g/l EDTA

Trypsin/EDTA-Lösung
0,5 g/l Trypsin
0,2 g/l EDTA
in PBS

2.4 Methoden

2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Isolation der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Um aus Bakterienkulturen die Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Methode der alkalischen Lyse [Birnboim, 1983] angewendet. Zur Präparation größerer Mengen DNA wurde die für 1,5 ml Kultur beschriebene Methode volumenmäßig hochgerechnet.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen aus Plasmiden zum Zwecke der Subklonierung von Genen oder Promotoren bzw. zum Nachweis spezifischer Sequenzen wurde ein Standardprotokoll angewendet [Saiki et al., 1988]. Es wurde 10 – 100 ng gereinigte Plasmid-DNA in 50 µl Ansätzen mit 20 pmol je Primer und 2 U Taq DNA-Polymerase bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM in 1-fach Taq-Puffer eingesetzt.

Präparation genomischer DNA

Genomische DNA aus kultivierten Zellen oder Blut wurde mit dem NUCLEON II-Kit nach den Angaben des Herstellers präpariert. Diese Methode wurde gewählt, da hier schnell und ohne den Einsatz von Phenol, ausreichende Mengen genomischer DNA aus Eukaryontenzellen gewonnen werden konnte [Lahiri et al., 1992].

Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Um die erfolgreiche Klonierung von DNA-Fragmenten sowie deren Sequenz und Orientierung im Konstrukt zu überprüfen, wurden die neu erstellten Vektoren mit der Kettenabbruchmethode mittels fluoreszenzmarkierten didesoxy-Nukleotiden sequenziert [Sanger et al., 1977]. Für die Sequenzierreaktionen wurde das Sequenase-Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Auftrennung erfolgte in der Polyacrylamidgelelektrophorese [Sanger & Coulson, 1978] in einer ALF Sequenzierapparatur.

Subklonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

Im Rahmen der Arbeit war die Konstruktion mehrerer Vektoren nötig. Zu diesem Zweck wurden die gewünschten DNA-Fragmente mittels Restriktionsendonukleasenverdau oder PCR-Amplifikation präpariert, in der Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus der Agarose isoliert. Die Elution der Fragmente erfolgte mit dem QiaEx-Kit nach den Angaben des Herstellers [Joly, 1996]. Die gewünschten Fragmente wurden nach der Elution ligiert

[Dugaiczky et al., 1975] und in kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α transformiert (siehe unten).

Transfer von DNA (Diffusionsblot)

Die Immobilisierung von DNA auf Membranen wurde per Diffusionsblot [Southern, 1975] durchgeführt. In Abweichung zum oben genannten Referenzprotokoll wurden die Gele mit der aufgetrennten DNA aus der Elektrophorese direkt für den Diffusionsblot verwendet. Als Transferpuffer diente 0,4 M NaOH. Nach dem Transfer der DNA auf positiv geladene Nylonmembranen über Nacht wurden die Membranen in 2xSSC neutralisiert und luftgetrocknet.

Transformation kompetenter E. coli-Bakterien des Stammes DH5 a

Für die Präparation von Plasmid-DNA der hier verwendeten Vektoren und Konstrukte wurden *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α verwendet. Die Transformation der Bakterien erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 1 – 100 ng DNA bei 4°C vermischt und für 30 Minuten inkubiert. Nach 2 Minuten Hitzeschock der Zellen bei 37°C und anschließender Kühlung auf 4°C wurden die Zellen mit 450 μ l LB-Medium versetzt und bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt. Die Bakterien wurden danach auf LB-Agar Platten mit 50 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen. Sofern die verwendeten Vektoren eine α -Komplementation der β -Galactosidase zuließen, wurde den Platten X-Gal (40 μ l/Platte einer 20 mg/ml Lösung in Dimethylformamid) und IPTG (4 μ l/Platte einer 200 mg/ml Lösung in Wasser) hinzugefügt. Positive Klone wurden nach Inkubation über Nacht bei 37°C isoliert, um Bakterienkulturen für die DNA-Präparation anzulegen.

2.4.2 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. Zellkulturen wurden in speziell für diesen Zweck vorgesehenen Inkubatoren bei 37°C bzw. 32°C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ gehalten. Die folgenden Methoden wurden, mit geringfügigen Modifikationen, entsprechend den Standardprotokollen durchgeführt.

Kryokulturen

Um Zelllinien dauerhaft zu lagern wurden die Zellen in IMDM, 45% FKS, 10% DMSO in einer Dichte von 1×10^5 – 1×10^6 /ml suspendiert und in 1 ml Aliquots in einem Einfrierbehälter auf –80°C abgekühlt. Anschließend wurde die Kryokultur in flüssigen Stickstoff überführt. Das Anlegen von Kulturen aus tiefgefrorenen Zelllinien erfolgte durch Auftauen einer Kryokultur bei 37°C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen mit 5 ml FKS versetzt, gemischt und zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das

Zellpellet in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß pipettiert.

Passagierung adhärenter Zellen

Für die dauerhafte Kultivierung adhärenter Zellen ist eine regelmäßige Überführung der Zellen in ein neues Kulturgefäß nötig, spätestens beim Erreichen der Konfluenz. Dazu wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Durch Zugabe einer den Zellrasen bedeckenden Menge der Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung und einigen Minuten Inkubation bei RT lösen sich die Zellen ab. Der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe einiger Milliliter FKS abgestoppt. Ein Aliquot, typischerweise 1/3 bis 1/20 der Zellen, wurde nach Resuspendierung in ein neues Kulturgefäß mit frischem Kulturmedium überimpft.

2.4.3 Vektorkonstruktion

Eine Übersicht der verwendeten Vektoren zeigt die Abbildung 2-1.

Der Vektor N2/Zip-pgkpr-MGMT entspricht dem bereits beschriebenen Vektor N2/Zip-tkpr-ADA [Apperley et al., 1991] mit dem Unterschied, daß die tkpr-ADA Kasette gegen die pgkpr-MGMT-Sequenz ausgetauscht wurde [Moritz et al., 1995].

Die Konstrukte MSCV-MGMT und MSCV-MGMT-pgkpr-NEO basieren auf dem Vektor MSCV2.1 (Hawley, 1994). Zunächst wurde MSCV2.1, der eine pgkpr-NEO-Kasette enthält, mit BglII und BamHI verdaut und religiert, um die pgkpr-NEO-Kasette zu entfernen. Dies ergab das Konstrukt MSCV- Δ pgkpr-NEO. Sowohl MSCV 2.1 als auch MSCV- Δ pgkpr-NEO wurden mit EcoRI linearisiert. In den linearisierten Vektor wurde die humane wtMGMT-cDNA ligiert. Dazu wurde die MGMT-cDNA mittels Primern amplifiziert, die 5' und 3' des MGMT-*orf* eine EcoRI-Schnittstelle besaßen (5'-Primer: 5' tca ggg aat tca tgg aca agg att gtg aaa tga aac 3', 3'-Primer: 5' tca ggg aat tct cag ttt cgg cca gca ggc ggg gag 3'). Die Amplifikation fand unter folgenden Zyklusbedingungen statt: 45s 95°C, 45s 68°C, 45s 72°C. Das PCR-Produkt wurde *blunt ended* in die SmaI-Schnittstelle des pUC18-Vektors kloniert. Aus diesem Plasmid wurde die MGMT mittels EcoRI-Verdau ausgeschnitten und in den BglII und BamHI-verdauten MSCV 2.1- und MSCV- Δ pgkpr-NEO-Vektor ligiert. Die Orientierung und korrekte Sequenz der humanen MGMT-cDNA wurde durch Sequenzierung überprüft.

Der Vektor MSCV-MGMT^{V139F}-pgkpr-NEO wurde analog zum Vektor MSCV-MGMT-pgkpr-NEO konstruiert mit dem Unterschied, daß vor der Klonierung des PCR-Produkts in die SmaI-Schnittstelle des Plasmids pUC18 mittels *in vitro*-Mutagenese ein Basenaustausch von G zu T an der Position 1 im Kodon 139 eingeführt wurde. Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Phenylalanin. Die MGMT-cDNA wurde in zwei Segmenten amplifiziert [Higuchi et al., 1988; Ho et al., 1989]. Für die PCR des 5'-Segments wurde ein entsprechend mutierter 3'-Primer (5' gag gat ggg gaa agg att gcc tct c 3') verwendet, der 5'-Primer mit zusätzlicher EcoRI-Schnittstelle wurde bereits oben beschrieben. Bei der Amplifikation des 3'-Fragments enthielt der 5'-Primer (5' gag agg caa tcc ttt ccc cat cct c 3') den Basenaustausch, der 3'-Primer ist identisch mit dem oben beschriebenen Oligonukleotid zur Amplifikation der MGMT-cDNA. Beide mutierten Primer überspannten das Kodon 139, in dem sich die Mutation befinden sollte. Die überlappenden Produkte aus beiden PCR-Reaktionen wurden hybridisiert und mittels Taq Polymerase die

restlichen einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt. Das jetzt doppelsträngige Produkt, welches die komplette Sequenz der MGMT-cDNA enthielt, wurde in den SmaI-linearisierten pUC18-Klonierungsvektor ligiert (siehe oben). Die erfolgreiche Einführung der Basensequenzmutation der MGMT-cDNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

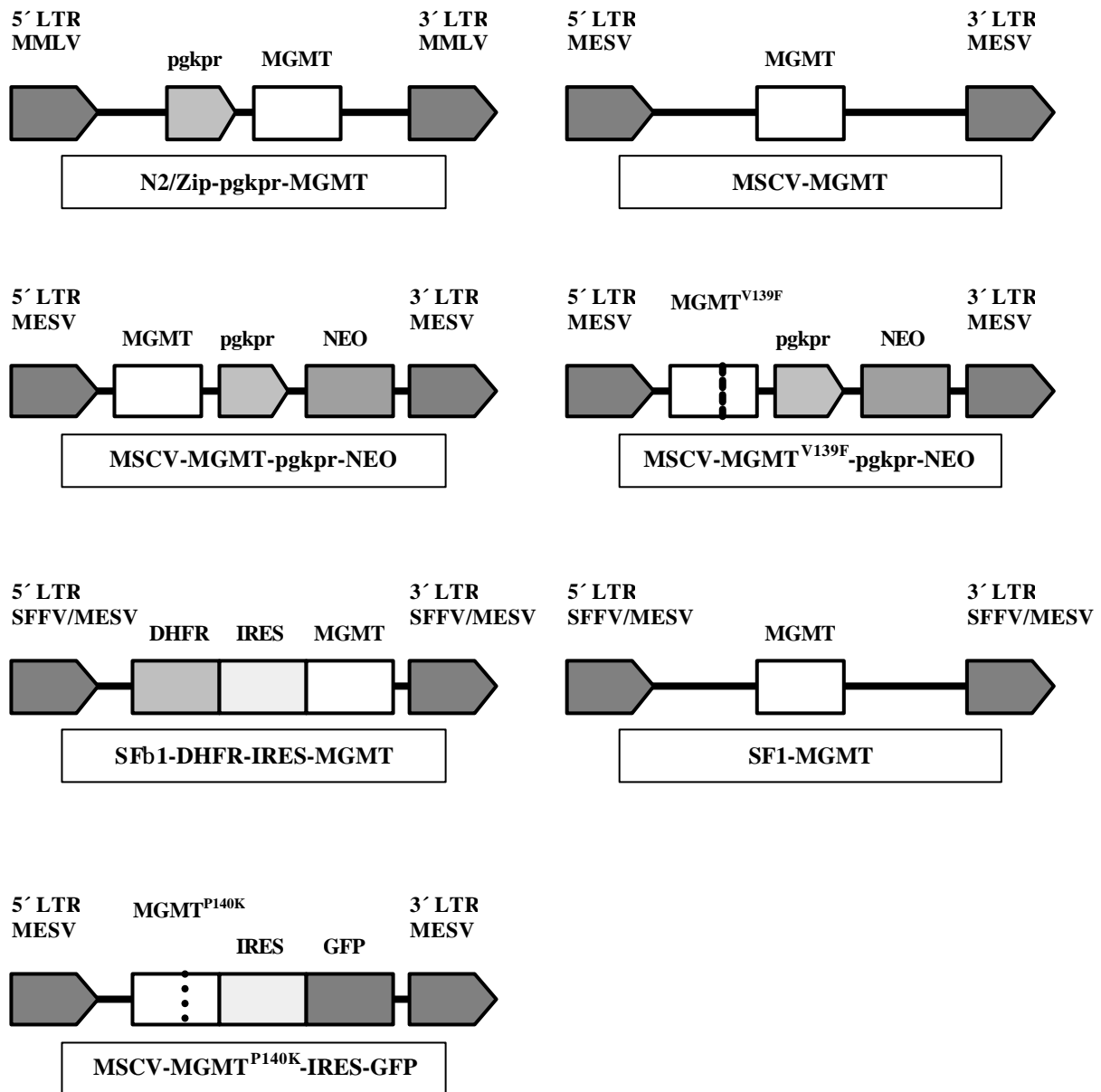


Abbildung 2-1: Vektoren für den retroviralen MGMT-Gentransfer. Schematische Ansicht der proviralen Sequenz der retroviralen, MGMT-exprimierenden Vektoren für Gentransferexperimente in hämatopoetische Zellen. Abkürzungen: LTR = Long Terminal Repeat, GFP = enhanced Green Fluorescence Protein, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus, MSCV = Murine Stem Cell Virus, SFFV = Spleen Focus Forming Virus, pgkpr = Promotor der humanen Phosphoglyzeratkinase, NEO = Gen der Neomycinphosphotransferase, DHFR = cDNA der Serin31-Mutante der humanen Dihydrofolatreduktase, MGMT = falls nicht anders gekennzeichnet Wildtyp cDNA der humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das SF1-MGMT-Konstrukt wurde von Dr. C. Baum und Prof. W. Ostertag (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor beruht auf dem Konstrukt SF-MDR [Baum et al., 1995], wobei die MDR1-cDNA gegen die cDNA der humanen wtMGMT ausgetauscht wurde.

Der rekombinante retrovirale Vektor SF β 1-DHFR-IRES-MGMT entstand aus dem SF β 1-XIY-Vektor, der ebenfalls von Dr. C. Baum und Prof. W. Ostertag zur Verfügung gestellt wurde. SF β 1-XIY-Vektor entstand aus dem Vektor SF1-MIH [Hildinger et al., 1998], indem 5' der Poliovirus-IRES die cDNA des MDR1-Gens und 3' der IRES die cDNA des NEO-Gens entfernt wurden. Zusätzlich enthält das SF β 1-Konstrukt gegenüber dem SF1-MGMT Vektor eine weitere Restriktionschnittstelle für Klonierungszwecke. 5' der IRES des SF β 1-XIY-Konstrukts wurde in die HindIII-Schnittstelle die cDNA der DHFR-Serin31-Mutante einkloniert, während 3' der IRES das oben beschriebene EcoRI-Fragment der MGMT aus pUC18 in die EcoRI-Schnittstelle ligiert wurde. Die erfolgreiche Klonierung der Gene wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Das Konstrukt MSCV-MGMT^{P140K}-IRES-GFP wurde freundlicherweise von Dr. S. Ragg (Wells Center for Pediatric Research, Indianapolis) zur Verfügung gestellt. Der Vektor basiert auf dem MSCV2.1-Konstrukt, bei dem die pgkpr-NEO-Kassette gegen die IRES2-eGFP-Sequenz ausgetauscht wurde. Die Mutante MGMT^{P140K} wurde 5' der IRES2 einkloniert.

2.4.4 Virusproduktion

Verwendung stabiler Produzentenzelllinien

Die stabilen Produzentenzelllinien OMG9, die den Vektor N2/Zip-pgkpr-MGMT produziert, (freundlicherweise von Dr. T. Moritz zur Verfügung gestellt), beziehungsweise des MSCV-MGMT^{P140K}-IRES-GFP-Vektors CI29 (von Dr. S. Ragg freundlicherweise überlassen) basieren auf der ekotropen Verpackungszelllinie GP+E86 [Markowitz et al., 1988] und wurden in DMEM, 10% FKS, 1% P/S kultiviert. Zellen der Linie CI29 wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium gewechselt und die Zellen über Nacht bei 32°C, 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag abgenommen, durch einen 0,45 μ m-Filter filtriert und bei -80°C gelagert. Der Titer der Überstände wurde durch Testung auf NIH-3T3-Zellen bestimmt (siehe unten). Für Kokulturrexperimente mit murinen Knochenmarkzellen des Mausstammes C3H wurden OMG9-Zellen auf 10 cm-Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Mediumwechsel mit frischem Kulturmedium vorgenommen und 7 μ g/ml Mitomycin C zugesetzt. Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Vor der Kokultur mit den murinen Zellen wurden die Produzentenzellen zweimal mit PBS gewaschen.

Verwendung transienter Produzentenzelllinien

Die transienten Verpackungszelllinie FNX ekotrop und amphotrop [Grignani et al., 1998] wurden zur Generierung transienter, retroviraler Überstände eingesetzt. Für die Kultivierung der Zellen wurde DMEM, 10% FKS, 1% P/S benutzt. Zwecks Überstandproduktion wurden 4x10⁶ Zellen auf je eine 10 cm-Kulturschale an Tag 1 in 10 ml frischem Kulturmedium

ausplattiert. An Tag 2 erfolgte die Transfektion der retroviralen Vektor-DNA. Dazu wurden 10 µg DNA mit 30 µg des Transfektionsreagenz DAC-30 nach den Angaben des Herstellers für die sechsstündige Transfektion verwendet. Nach erfolgter Transfektion wurde das Medium gewechselt. Vierundzwanzig Stunden nach Ende der Transfektion erfolgte ein weiterer Mediumwechsel und die Zellen wurden für 24 Stunden bei 32°C, 5% CO₂ inkubiert. Zum Zeitpunkt t = 48 Stunden nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen, filtriert, gelagert (-80°C) und die Zellen für weitere 24 Stunden mit frischem Medium bei 32°C, 5% CO₂ kultiviert, um zum Zeitpunkt t = 72 Stunden ein weiteres Mal Überstand zu ernten.

2.4.5 Titration infektiöser Überständen

Titration stabiler, ekotroper Überstände auf NIH 3T3-Zellen

Um Aussagen über die Anzahl viraler Partikel im Überstand der stabilen Produzentenzelllinie Cl29 machen zu können, wurden die Überstände dieser Zellen auf NIH-3T3-Zellen titriert. Dazu wurden 2×10^5 NIH 3T3-Zellen an Tag 1 auf je eine 60 mm-Petrischale in DMEM, 10% FKS, 1% P/S ausplattiert. Die Infektion mit 1 ml Überstand, in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Kulturmedium mit 8 µg/ml Polybrene, sowie einer Kontrolle die nur Kulturmedium mit 8 µg/ml Polybrene enthielt, erfolgte für 3 Stunden bei 32°C, 5% CO₂. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde parallel die Zellzahl einer Petrischale der NIH-3T3-Zellen mittels Auszählen in einer *Neubauer*-Kammer bestimmt. Nach der Infektion wurde der Überstand gegen frisches Kulturmedium gewechselt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Mittels Durchflußzytometrie wurde dann der Anteil der fluoreszierenden (GFP⁺) Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen einer Petrischale bestimmt. Für jede Verdünnung wurde der Titer wie folgt berechnet:

Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion x Anteil der GFP⁺ Zellen x Verdünnung = Titer des retroviralen Überstands (infektiöse Einheiten/ml)

Titration transienter, amphotroper Überstände auf MGMT-defizienten HeLaS3-Zellen

Zur Bestimmung der Konzentration koloniebildender Einheiten (*colony forming units*, cfu) je Milliliter transienter retroviraler Überstände wurden 2×10^4 MGMT-defizienter HeLaS3-Zellen in Kulturmedium (DMEM, 10% FKS, 1% P/S) je Vertiefung auf 6-Loch Platten an Tag 1 ausgesät. An Tag 2 erfolgte die Infektion der Zellen in 0,5 ml Überstand in den Verdünnungsstufen 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ bzw. Kulturmedium (mock-Kontrolle) mit 8 µg/ml Polybrene über 3 Stunden bei 32°C, 5% CO₂. Nach der Infektion wurde der Überstand gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. An Tag 4, 7 und 10 wurden die MGMT überexprimierenden Zellen mit Kulturmedium + 6 µg/ml ACNU selektioniert. Die koloniebildenden Zellen wurden an Tag 12 - 14 mit 1,5 ml Wright's Lösung je Schale für 1 Stunde gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit PBS ausgezählt. Der Titer als cfu/ml ergab sich aus folgender Formel:

Summe der Kolonien aus den Parallelansätzen x Volumen des zur Transduktion verwendeten Überstands in ml x Verdünnungsfaktor / Anzahl der Parallelansätze.

Parallel wurden HeLaS3-Zellen nach Infektion mit transientem, amphotropen Überstand des MSCV-MGMT-pgkpr-NEO-Vektors an Tag 4 mit Geneticin-haltigem (0,75 mg/ml aktives Protein) Medium selektiert [Markowitz et al., 1988], um den ACNU-Titer dieses Überstandes mit einem NEO-Titer vergleichen zu können.

2.4.6 Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Retronektin^a

Zur Optimierung der Transfereffizienz in hämatopoetische Zellen wurden humane und murine hämatopoetische Zellen auf Retronektin-beschichteten Plastikoberflächen transduziert. Retronektin ist ein rekombinantes Fibronektin-Fragment mit virus- und zellbindenden Domänen [Moritz et al., 1996]. Die Beschichtung von Kulturgefäßen, die nicht für die Gewebekultur vorbehandelt waren, mit Retronektin ($4\mu\text{g}/\text{cm}^2$) erfolgte für 2 Stunden bei RT in PBS. Nach der Beschichtung wurden die Gefäße einmal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung noch freier Bindestellen auf den Oberflächen folgte eine 20 minütige Inkubation mit PBS + 2% BSA. Nach 2 Waschschritten mit PBS wurden die so beschichteten Gefäße für Transduktionsexperimente eingesetzt.

2.4.7 Transduktion muriner Knochenmarkzellen

Transduktion durch Kokultivierung

Für In-vitro-Experimente zum MGMT-Gentransfer wurden Knochenmarkzellen des Mausstammes C3H verwendet. Die Isolation der Zellen erfolgte aus den Tibiae und Femura der Tiere durch Spülen der Markhöhle der Knochen mit PBS. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden in IMDM, 20% FKS, 1% P/S mit 1 ng/ml rm IL-3, 1000 U/ml rh G-CSF und 6 U/ml rh EPO prästimuliert. Für die Transduktion mittels Kokultur [Luskey et al., 1992] wurden OMG9-Produzentenzellen auf 10 cm-Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Die OMG9-Produzentenzellen wurden durch Behandlung mit Mitomycin C (siehe 2.4.4) im Zellzyklus arretiert. Nach 2 Waschungen mit PBS wurden $0,5$ bis 1×10^7 Knochenmarkzellen mit obigen Produzentenzellen in 10 ml IMDM, 20% FKS, 1% P/S mit Zytokinen und $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene für 24 h bei 32°C , 5% CO_2 inkubiert. Als negative Kontrollen, im folgenden als mock-Kontrollen bezeichnet, wurden Zellen mit Medium und Polybrene unter identischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die hämatopoetischen Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren und Spülen der adhären wachsenden Produzentenzellen mit PBS zurückgewonnen.

Transduktion auf rekombinantem Fibronektinfragment (Retronektin)

Experimente mit *High Proliferative Potential-Colony forming Cells* (HPP-CFC) wurden mit Knochenmarkzellen des Mausstammes C57 Bl/6 durchgeführt. Die Transduktion folgte größtenteils einem bereits beschriebenen Protokoll [Moritz et al., 1994]. Den Spendertieren wurde 72 h vor der Ernte der Zellen 150 mg/kg 5-FU i. p. injiziert. Die Knochenmarkzellen wurden wie oben beschrieben aus Femur und Tibia gewonnen und mit 100 U/ml rhIL-6 und 50 ng/ml rmSCF für 48 Stunden in α -MEM, 20% FKS, 2 mM L-Glu, 1% P/S prästimuliert.

Für die Infektion der Zellen wurden Retronektin-beschichtete 6-Loch Platten mit 1,5 ml transientem, retroviralem Überstand für 30 - 60 Minuten bei 32°C, 5% CO₂ vorgeladen. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt. Auf die so beladenen Schalen wurden je 1 – 2x10⁶ Zellen in 1,5 ml retroviralem Überstand mit IL-6 und SCF pipettiert. Die Zellen wurden an Tag 1 (t = 0h) für 4 h bei 32°C, 5% CO₂ transduziert. Mock-transduzierte Kontrollen wurden durch Transduktion der hämatopoetischen Zellen mit Zellkulturüberstand der transienten ekotropen Verpackungszelllinie FNX hergestellt. Anschließend wurde der Überstand gegen frisches Kulturmedium mit Wachstumsfaktoren 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 adhärennten Zellen zuerst mit Zelldissoziationspuffer (CDB) inkubiert und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Zuletzt wurden die verbleibenden, adhärennten Zellen mittels eines sterilen Zellschabers geerntet.

Für die *in vivo* Experimente, die eine Transduktion muriner C57 Bl/6 Knochenmarkzellen mit dem MSCV-MGMT^{P140K}-IRES-GFP-Vektor mit anschließender Transplantation in letal bestrahlte Rezipienten voraussetzten (siehe 2.4.12), wurde im Prinzip das soeben beschriebene Protokoll benutzt. Verändert wurde jedoch, daß die Transduktion auf größeren (10 cm), Retronektin-beschichteten Kulturschalen stattfand mit 3 – 5 x 10⁷ Zellen/Schale in einem größeren Volumen (8 ml) Überstand mit Zytokinen. Mock-Kontrollen wurden dem hochtitrigen Überstand einer Produzentenzelllinie, die einen β -Galaktosidase-exprimierenden Vektor sezerniert, transduziert. Die von diesen Produzentenzellen sezernierten Virionen sind im hier untersuchten Zusammenhang therapeutisch irrelevant und können keine Resistenz gegen DNA-alkylierende Substanzen vermitteln [Clapp et al., 1995].

Transduktion humaner Vorläuferzellen

Ausgangsmaterial für die Experimente mit humanen Zellen waren a) Knochenmarkproben gesunder Spender oder b) periphere Blutstammzellen (PBSZ) von Tumorpatienten. Aus diesen Proben wurden mononukleäre Zellen durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach Prästimulation der Zellen über 2 Tage in IMDM, 20% FKS, 1% P/S mit 100 U/ml rhIL-3, 20 ng/ml rhSCF, 100 ng/ml rhGM-CSF und 6 U/ml rhEPO wurden jeweils 1 – 2x10⁶ Zellen an Tag 1 (t = 0 h) in 1,5 ml transientem retroviralem Überstand mit Zytokinen resuspendiert und in eine Vertiefung einer Retronektin-beschichteten 6-Loch Platte gegeben. Nach 2 Stunden (t = 2 h) wurden je Schale abermals 1,5 ml infektiöser Überstand mit Wachstumsfaktoren zugegeben. Zum Zeitpunkt t = 4 h wurde der Überstand durch frisches Kulturmedium mit Zytokinen ersetzt. Der Infektionsvorgang der hämatopoetischen Zellen wurde am Tag 2 zweimalig (t = 24 h und 26 h) wiederholt. Die Zellernte erfolgte an Tag 3, wie bereits für murine C57 Bl/6-Knochenmarkzellen beschrieben.

2.4.8 *Testung funktionaler MGMT-Expression mittels Zytostatika-Resistenz*

Vor dem Inkubieren muriner C3H-Knochenmarkzellen in semisolidem Medium wurden mock- und N2/Zip-pgkpr-MGMT-transduzierte Zellen 2 Stunden bei 37°C in IMDM mit 0,3 – 3 μ g/ml ACNU, 10 – 80 μ M BCNU, 0,2 – 5 μ g/ml CCNU, 100 – 300 μ g/ml Temozolomid, 0,3

– 10 µg/ml Thiotepa oder 0,1 – 10 µg/ml Cisplatin inkubiert. Die Zellen wurden vor dem Einsatz im klonogenen Testsystem zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in die unter 2.4.9 beschriebenen Methylzellulose-Test zum Nachweis muriner klonogener Zellen eingesetzt.

2.4.9 Klonogene Testsysteme

Methylzellulosekultur zum Nachweis muriner klonogener Vorläuferzellen

Die Methode wurde basierend auf einer zuvor beschriebenen Standardverfahren ausgeführt [Toksoz et al., 1992]. Für diese Versuche wurden 2×10^4 mononukleäre Zellen in einem Milliliter IMDM/Methylzellulose (1%), 35% FKS, 1 ng/ml rmIL-3, 1000 U/ml rhG-CSF, 6 U/ml rhEPO und 10^{-5} M β -ME in 35 mm-Petrischalen ausplattiert. Die Schalen wurden in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ für 7 – 10 Tage inkubiert. Die Auszählung der Kolonien (>50 Zellen) erfolgte unter einem Phasenkontrast-Inversionsmikroskop. Zur Berechnung der halblethalen Dosis der eingesetzten Medikamente für klonogene Zellen wurden aus jeder Überlebenskurve die jeweiligen benachbarten Meßpunkte bestimmt, bei denen das prozentuale Überleben der Zellen gerade größer als 50% beziehungsweise kleiner als 50% war. Mittels einer Geraden durch diese beiden Punkte wurde jene Konzentration des jeweiligen Zytostatikums bestimmt, bei der 50% der Kolonien überlebten.

Methylzellulosekulturen zum Nachweis humaner klonogener Vorläuferzellen

Die Kultivierung humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen erfolgte weitestgehend nach dem für murine Vorläuferzellen beschriebenen Protokoll. Der IMDM/Methylzellulose wurden jedoch andere Zytokine zugesetzt: 100 U/ml rhIL-3, 100 ng/ml rhGM-CSF, 20 ng/ml rhSCF und 6 U/ml rhEPO. Zudem enthielt das IMDM/Methylzellulose-Kulturmedium 2 – 16 µg/ml ACNU. Das Auszählen der Kolonien erfolgte am Tag 14.

Doppelschichtiger Agartest zum Nachweis muriner HPP-CFC

Der aus zwei Agarschichten bestehende Assay zum Nachweis muriner HPP-CFC wurde nach einem Standardprotokoll [Bradley & Hodgson, 1979] mit geringfügigen Modifikationen in 35 mm Schalen durchgeführt. Die untere Agarschicht bestand aus 1 ml α -MEM, 0,5% Agar, 20% FKS, 1% P/S, 1 mM L-Glu, 100 ng/ml rmSCF, 200 U/ml rmIL-3, 1000 U/ml rhM-CSF, 1000 U/ml rmIL-1 α und 3 – 100 µg/ml ACNU. Dieser Agar wurde mit 0,5 ml α -MEM, 0,33% Agar, 20% FKS, 1% P/S, 1 mM L-Glutamin mit 5×10^3 transduzierten, murinen, hämatopoetischen Zellen überschichtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂. Nach 14 Tagen Inkubation wurden die kompakten, dichten Kolonien (>0,5 mm Durchmesser) als HPP-CFC mikroskopisch ausgezählt.

2.4.10 Analyse der retroviralen Transduktionsrate

Der Nachweis der Integration von retroviralen Vektoren in das Genom von hämatopoetischen Zellen wurde nach einem etablierten Protokoll [Flasshove et al., 1999] mit geringfügigen Veränderungen durchgeführt. Individuelle Kolonien wurden aus der Methylzellulose bzw. dem Agar ausgestochen und in 1ml PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen zur Freisetzung der DNA erfolgte in 100 µl Higuchi-Puffer mit 6 µg/ml Proteinase K für 1 Stunde bei 56°C. Zur Inaktivierung der Proteinase K folgte eine Inkubation bei 95°C für 10 Minuten. Das Lysat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für jede der Kolonien wurden im weiteren zwei PCR-Reaktionen durchgeführt: a) eine Kontroll-PCR zum Nachweis amplifizierbarer, genomischer DNA im Kolonielysat, b) eine PCR zum Nachweis der humanen MGMT-cDNA.

Für murine Zellen dienten spezifische Primer (5' Primer: 5' caa agt tgt cat gga tga cc 3', 3' Primer: 5' cca tgg aga agg ctg ggg 3') zur Amplifikation eines Teils der genomischen Sequenz der Glutaraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle. Die Amplifikation des 195 bp großen spezifischen Produkts erfolgte unter folgenden Bedingungen: 95°C 45s, 55°C 45s, 72°C 45s für 40 Zyklen. Analog wurden für humane Kolonien Primer (5' Primer: 5' gtc ctt aat gct acg cac gat ttc 3', 3' Primer: 5' gtg ggg cgc ccc agg cac ca 3') mit einer Spezifität für die genomische Sequenz des β -Aktins eingesetzt. Unter den folgenden Bedingungen wurde ein 540 bp großes, spezifisches Produkt amplifiziert: 95°C 45s, 68°C 45s, 72°C 45s für 40 Zyklen. Jeweils 20 µl der PCR-Ansätze wurden in einem 2,5%igen Agarose/TAE-Gel aufgetrennt.

Die Bedingungen und Primer für die MGMT-spezifische PCR entsprechen den unter 2.4.3 beschriebenen Angaben zur Herstellung des MSCV-MGMT-Vektors.

Zum Nachweis der spezifische Vektorsequenzen (MGMT-cDNA-PCR) wurden für die Experimente mit murinen HPP-CFC und humanen Progenitoren die Produkte der MGMT-spezifischen PCR-Produkte auf N⁺-Membranen übertragen (siehe 2.4.1). Zum Nachweis der MGMT-cDNA Sequenz wurde das DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II der Firma Roche, Mannheim, entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers verwendet [Feinberg & Vogelstein, 1983; Gebeyehu et al., 1987]. Nach einstündiger Prähybridisierung der Membranen mit Standard-Hybridisierungspuffer + 1% Blocking Reagent bei 68°C wurden die Blots mit 10 pmol/ml 5'-DIG konjugierter Oligonukleotidsonde (Sonde: 5' DIG-atg ccg tgg agg tcc cag ccc ccg 3') über Nacht bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung dekantiert und die Membranen zweimal mit 2xSSC + 0,2% SDS bei RT gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte mit 0,5xSSC + 0,2% SDS bei 68°C entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Im Anschluß wurden die Membranen mit Maleinsäurepuffer + 0,2% Tween 20 äquilibriert und danach in Maleinsäurepuffer + 1% Blocking Reagenz bei RT 30 Minuten inkubiert. Die Markierung gebundener Sondenmoleküle auf den Blots erfolgte 30 Minuten in Maleinsäurepuffer + 1% Blocking Reagent + 20 mU/ml α -DIG f_{ab}-Fragmenten, AP-konjugiert bei RT. Nach zweimaligen Waschen der Membranen mit Maleinsäurepuffer + 0,2% Tween 20 für 15 Minuten, wurden die Membranen in Detection Buffer für 5 Minuten äquilibriert, um danach für 15 Minuten mit 1:30 in Detection Buffer verdünnter CSPD-Lösung zu inkubieren. Diese Chemilumineszenzreaktion wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur und die restlichen 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die Membranen wurden anschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und 5 Minuten bis über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert. Die belichteten Filme wurden in einem automatischen Röntgenfilmentwickler entwickelt.

2.4.11 *Untersuchungen zur MGMT^{V139F}-vermittelten Zytostatika-Resistenz in der murinen Leukämiezelllinie L1210*

Untersuchungen zur MGMT^{V139F}-Mutante [Christians & Loeb, 1996] wurden mit der murinen Leukämie-Zelllinie L1210 durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI1640, 15% FKS, 1% P/S kultiviert. Zur Herstellung MGMT^{V139F}-exprimierender Zellen wurden L1210-Zellen mit dem Vektor MSCV-MGMT^{V139F} transfiziert. Dazu wurden L1210-Zellen mit Hilfe von Lipofektamin nach dem Standardprotokoll des Herstellers transfiziert [Felgner et al., 1987; Ponder et al., 1991]. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 0,5 Zellen/Vertiefung auf Mikrotiterplatten vereinzelt und individuelle Klone expandiert. Die Zellen wurden 14 Tage unter 10 µg/ml ACNU kultiviert. Die erfolgreiche Transfektion wurde durch eine MGMT-cDNA spezifische PCR an individuellen Klonen sichergestellt (siehe 2.4.10). MGMT^{V139F}-transfizierte Klone wurden unter steigenden Konzentrationen von ACNU für 2 Stunden in RPMI1640 bei 37°C inkubiert (siehe 2.4.7). Auf gleiche Weise wurden Kontrollzellen, welche die MGMT^{P140A}-Mutante exprimieren, behandelt (Klon freundlicherweise von Dr. D. A. Williams, Indianapolis zur Verfügung gestellt). Als Negativkontrolle diente die parentale L1210-Zelllinie. Je ACNU-Konzentration wurden Triplikate mit 2×10^2 Zellen/ml im IMDM/Methylzellulosestest für murine Progenitoren (ohne Zytokine, siehe 2.4.8) ausplattiert und nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ ausgezählt.

2.4.12 *In-vivo-Maus-Knochenmarktransplantationsmodell zum MGMT^{P140K}-Gentransfer zum Schutz der Hämatopoese vor chemotherapieinduzierter Zytotoxizität*

Zur Demonstration des effektiven Schutzes der Hämatopoese vor O6-BG und ACNU, BCNU beziehungsweise Temozolomid durch Selektion MGMT^{P140K}-überexprimierender Stammzellen wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell etabliert. Die Grundlagen dieses Modells sind bereits früher beschrieben worden [Maze et al., 1994]. Einen schematischen Überblick des Versuchsablaufes gibt die Abbildung 2-2. Lethal bestrahlten (7 und 4 Gy, fraktionierte Ganzkörperbestrahlung in 3 Stunden Abstand) Rezipienten wurden je Tier (Mäuse des Stammes C57 Bl/6) $1,5 \times 10^6$ mock beziehungsweise MSCV-MGMT^{P140K}-IRES-GFP-transduzierte, syngene Knochenmarkzellen transplantiert. Diese Tiere werden im folgenden als mock- beziehungsweise MGMT-transplantierte Tiere bezeichnet. Die Zellen wurden in 200 µl Gesamtvolumen i. v. injiziert.

Sechszwanzig Tage nach der Transplantation wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen, um die Ausgangswerte für die Zellzahlen der Gesamtleukozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten zu bestimmen. Zusätzlich wurde mittels durchflußzytometrischer Analyse der Anteil fluoreszierender (GFP⁺) Zellen im peripheren Blut bestimmt. Am Tag 28 wurde der 1. Zyklus Chemotherapie verabreicht (siehe Abb. 2-2). Die Therapie wurde wöchentlich über insgesamt 5 Zyklen fortgesetzt. Die Injektionen der kombinierten Chemotherapie erfolgten damit an den Tagen 35, 42, 49 und 56. Blutproben wurden jeweils an den Tagen 26, 33, 40, 47, 54, 61 und 89 entnommen. Ein Kurs der kombinierten Chemotherapie bestand aus der i. p. Injektion von 30 mg/kg KGW O6-BG in 40% PEG + 60% NaCl Lösung (0,9% ig). Darauf folgte nach einer Stunde die i. p. Applikation der verschiedenen Chemotherapeutika: 10 mg/kg KGW BCNU in 4% Ethanol + 96% NaCl Lösung (0,9% ig), 6 mg/kg KGW ACNU in 0,9% iger NaCl oder 50 bzw. 70 mg/kg KGW Temozolomid in 10% DMSO + 90% Saline (0,9% ig). Neben diesen Versuchsgruppen dienten chemotherapeutisch unbehandelte Tiere als Vergleichsgruppe. Diesen Tieren wurde an denselben Tagen Blut entnommen, jedoch wurde keine Chemotherapie verabreicht.

Blutproben wurden zur Bestimmung der Blutwerte mit einem Blutdifferenzierungsautomaten analysiert, der über ein mausspezifisches Meßprogramm verfügte.

Für die Analyse mittels Durchflußzytometrie wurden die peripheren Blutproben mit einem granulozytenspezifischen, PE-konjugierten α -GR-1 monoklonalen Antikörper (mAK) bzw. mit den lymphozytenspezifischen mAK α -B220 PE und dem α -CD3 ϵ PE mAK nach den Empfehlungen des Herstellers gefärbt. Nach Lyse der Erythrozyten mit PharMLyse-Puffer wurden die Leukozyten im Durchflußzytometer gemessen. Am Tag 89, vier Wochen nach dem letzten Zyklus Chemotherapie, wurde den überlebenden Tieren die letzte Blutprobe entnommen und die Tiere anschließend euthanasiert. Den Tieren wurde das Knochenmark und die Milz entnommen. Analog zum peripheren Blut wurde das Knochenmark mit den mAK α -GR-1, α -B220 und α -CD3 ϵ im Durchflußzytometer (FACS) analysiert. Aus der Milz wurden die Zellen isoliert und durch ein 70 μ m-Zellsieb filtriert. Für die nachfolgende FACS-Analyse wurden die Zellen mit α -B220 PE und α -CD4 PerCP bzw. α -CD3 ϵ PE und α -CD4 PerCP gefärbt.

Knochenmarkszellen euthanasierter Tiere, wurden für die erneute Transplantation in letal bestrahlte Empfängermäuse aufbereitet (Sekundärtransplantationen). Die Empfängertiere wurden wie oben beschrieben bestrahlt und mit 2 - 3×10^6 Zellen je Maus transplantiert. Nach vierwöchigem *Engraftment* durchliefen die Tiere vier Zyklen des obigen Chemotherapieprotokolls. Blutproben wurden an den Tagen 26, 33, 40, 47 und 54 aus den Schwanzvenen entnommen. Die letzte Blutprobe wurde vier Wochen nach dem 4. und letzten Kurs an Tag 82 entnommen. Abschließend wurden die Tiere euthanasiert und Analysen des Knochenmarks und der Milzzellen wurden durchgeführt.

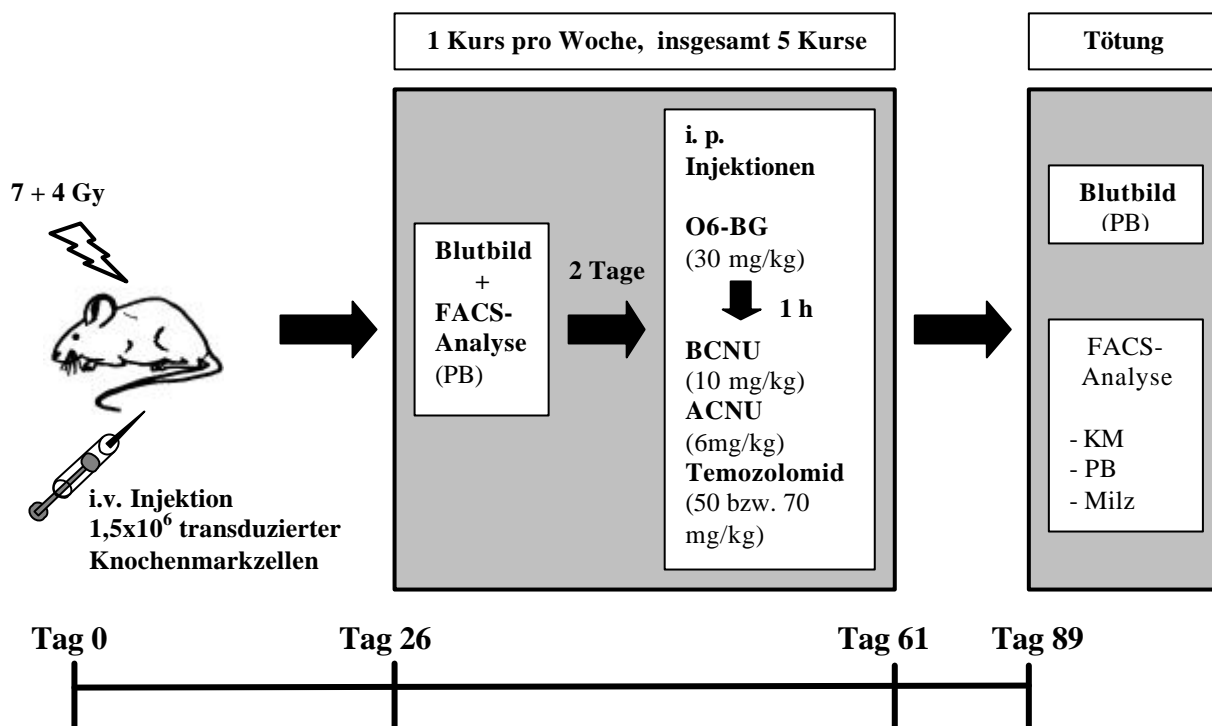


Abbildung 2-2: Versuchsablauf des murinen In-vivo-Modells zum MGMT^{P140K}-Gentransfer.

2.4.13 *Statistische Analysen*

Zur Ermittlung signifikanter (p -Wert $< 0,05$) Unterschiede zwischen beispielsweise den LD50-Werten verschiedener Versuchsgruppen wurde der Student's t-Test benutzt.

3. ERGEBNISSE

3.1 MGMT-vermittelter Schutz muriner Vorläuferzellen vor zytostatikainduzierter Toxizität verschiedener Medikamente

Um die Resistenz MGMT-transduzierter hämatopoetischer Zellen gegenüber O⁶-alkylierenden Substanzen zu testen, wurden N2/Zip-pgkpr-MGMT sowie mock-transduzierte Knochenmarkzellen mit steigenden Konzentrationen der Medikamente ACNU, BCNU, CCNU und Temozolomid (TMZ) inkubiert. Als Kontrollsubstanzen dienten Cisplatin und Thiotepa, die kein oder nur ein sehr geringes O⁶-Alkylierungspotential besitzen. Die Versuche wurden an murinen koloniebildenden Vorläuferzellen durchgeführt.

In der Abbildung 3-1 sind beispielhaft Einzelerperimente für jede der verwendeten Substanzen dargestellt. Dabei ließ sich beobachten, daß transduzierte Zellen bei Konzentrationen oberhalb 10 µM BCNU, 0,3 µg/ml ACNU, 0,2 µg/ml CCNU und 100 µg/ml TMZ im Vergleich zu mock-Kontrollen eine höhere Resistenz gegenüber diesen Substanzen zeigten. Erst bei 40 µM BCNU, 30 µg/ml ACNU, 5 µg/ml CCNU und 300 µg/ml TMZ ging dieser Schutz transduzierter Vorläuferzellen wieder verloren. Für die Kontrollsubstanzen zeigte sich über den getesteten Konzentrationsbereich (0,1 bis 5 µg/ml Cisplatin beziehungsweise 0,3 bis 10 µg/ml Thiotepa) kein Unterschied zwischen der mock- und der MGMT-transduzierten Zellpopulation. Je Substanz wurden drei – sechs Einzelerperimente durchgeführt. Die Unterschiede im Überleben von N2/Zip-pgkpr-MGMT-transduzierten Zellen versus mock-Kontrollen waren statistisch signifikant. Um die Ergebnisse für die einzelnen Zytostatika zusammenfassend vergleichen zu können, wurde aus den Kurven für jedes Experiment die für 50% der klonogenen Vorläuferzellen letale Dosis für mock (LD50_{mock}) und MGMT-transduzierte (LD50_{transduziert}) Kolonien errechnet (siehe Tabelle 3-1). Der Quotient von LD50_{transduziert} zu LD50_{mock} wurde als Maß für die Effektivität der Protektion der transduzierten Zellen vor der zytostatikainduzierten Toxizität verwendet. Je höher dieser Quotient war, desto effizienter wurden die Zellen durch die Überexpression der MGMT vor der Zytotoxizität des entsprechenden Medikaments geschützt. Der höchste Wert für diesen Schutzfaktor ergab sich bei CCNU mit 5,0, gefolgt von ACNU (4,7), BCNU (3,1) und TMZ (1,6). Ein Wert von 1 für den Schutzfaktor bedeutete hierbei, daß keinerlei

Protektion durch die Überexpression der MGMT in den Zellen erreicht wurde. Diesem Wert kamen die Resistenzfaktoren für Cisplatin (0,9) und Thiotepa (1,0) erwartungsgemäß sehr nahe.

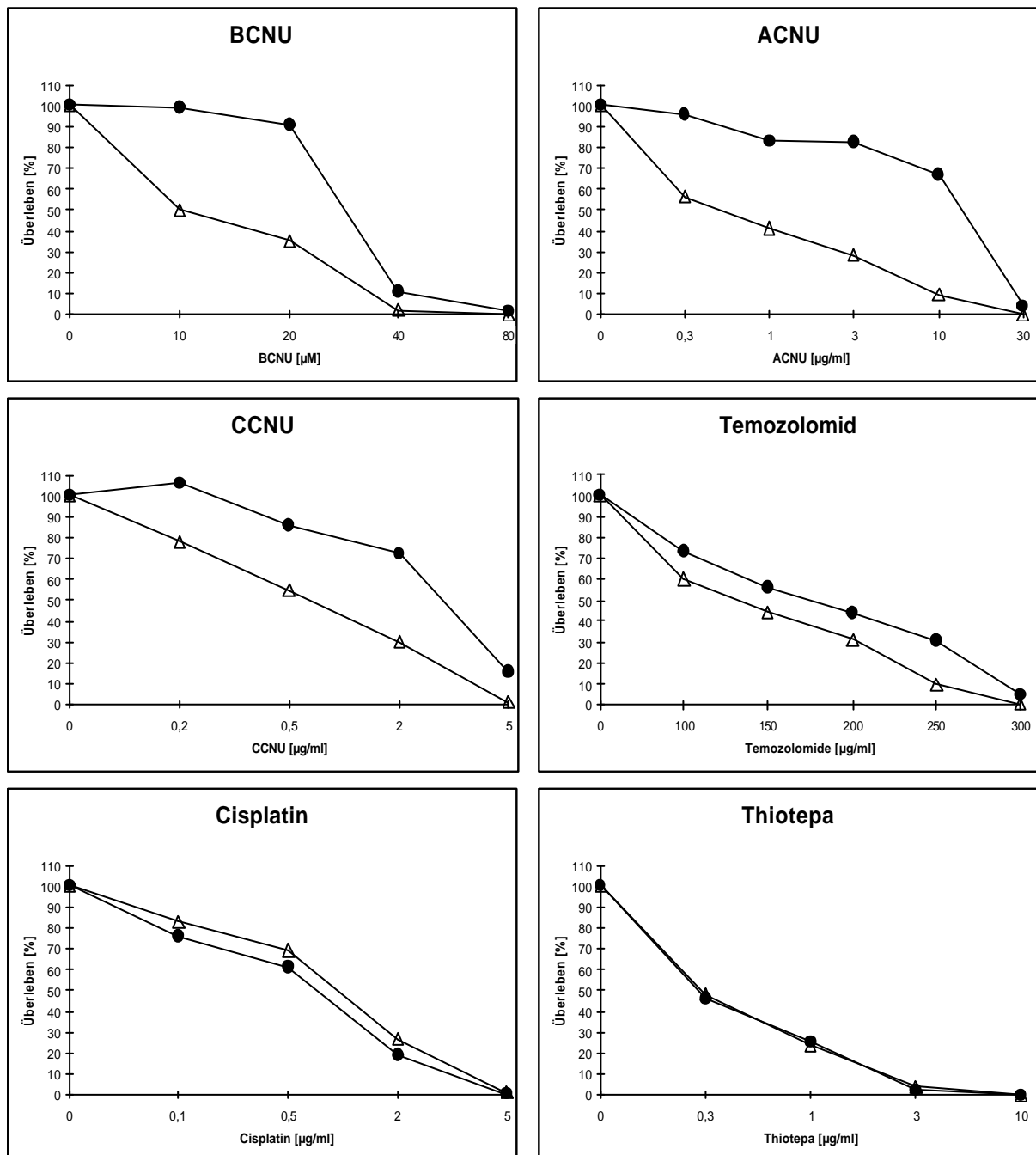


Abbildung 3-1: MGMT-vermittelte Zytostatika-Resistenz muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen. Dargestellt ist das Überleben mock- (offene Dreiecke) und N2/Zip-pgkpr-MGMT-transduzierter (geschlossene Kreise) muriner Knochenmarkzellen im klonogenen Assay nach Inkubation mit steigenden Zytostatikakonzentrationen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Einzelexperiment für jede getestete Substanz.

Tabelle 3-1: MGMT-vermittelte Zytostatikaresistenz muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen. LD50 ist die Zytostatika-Dosis, bei der 50% der klonogenen Zellen abgetötet wurden. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Stichprobe (SA) angegeben.

Zytostatikum	mock [LD 50]	N2/Zip-pgkpr-MGMT [LD50]	LD50 _{transduziert} / LD50 _{mock}	t-Test [p-Wert]
BCNU [μ M]; n=4	13,0 \pm 3,8	40,6 \pm 26,3	3,1	0,049
ACNU [μ g/ml]; n=6	2,2 \pm 1,7	10,4 \pm 5,8	4,7	0,007
CCNU [μ g/ml]; n=3	0,4 \pm 0,3	2,1 \pm 1,0	5,0	0,024
Temozolomid [μ g/ml]; n=3	116,2 \pm 16,3	183,3 \pm 39,8	1,6	0,045
Thiotepa [μ g/ml]; n=5	5,2 \pm 0,7	5,3 \pm 2,6	1,0	0,391
Cisplatin [μ g/ml]; n=3	0,9 \pm 0,3	0,8 \pm 0,6	0,9	0,400

3.2 Überexpression der MGMT mittels verschiedener retroviraler Konstrukte in murinen und humanen hämatopoetischen Zellpopulationen

Bei einer stöchiometrischen Reaktion wie der Reparatur von O⁶-Alkylierungen der DNA durch die MGMT sollte die Expressionshöhe des Proteins direkt mit dem Grad der Resistenz der Zellen gegen die chemotherapieinduzierte Toxizität korreliert sein. Dabei kann die MGMT-Expression in hämatopoetischen Zellen erheblich von der Wahl des verwendeten retroviralen Grundgerüsts und der Wahl des Promotors, der die MGMT-Expression steuert, beeinflusst werden. Daher sollte aus einer Auswahl von Vektoren jenes Konstrukt ermittelt werden, das die MGMT möglichst hoch in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Als Zielzellen wurden zwei unterschiedliche Zellpopulationen gewählt: a) humane klonogene Vorläuferzellen und b) murine *High Proliferative Potential-Colony Forming Cells* (HPP-CFC), die pluripotente, *in vitro* meßbare Vorläuferzellen im murinen System darstellen.

Als retrovirale Grundgerüste dienten Sequenzen aus dem *Moloney Murine Leukemia-Virus* (MMLV), *Murine Embryonic Stem Cell-Virus* (MESV) und dem *Spleen Focus Forming-Virus* (SFFV). Die MGMT wurde dabei entweder unter die Kontrolle eines internen Promotors (MMLV-basierter Vektor) oder der viralen Promotor/Enhancer-Einheit in der 5' LTR des Vektors (MSCV-, SFFV-basierte Vektoren) gestellt (siehe Abbildung 2-1).

3.2.1 Experimente mit humanen koloniebildenden Zellen

Die Versuche zur Expression der MGMT mittels unterschiedlicher Vektoren wurden zunächst an humanen Vorläuferzellen, die im klonogenen Methylzellulose-Testsystem gemessen werden konnten, durchgeführt. Als Quelle der humanen hämatopoetischen Zellen dienten Aliquots von Knochenmarkproben gesunder Spender sowie Aliquots von Aphereseprodukten des peripheren Bluts, die von Tumorpatienten nach Mobilisierung der Stammzellen mittels Chemotherapie und Wachstumsfaktoren gewonnen wurden.

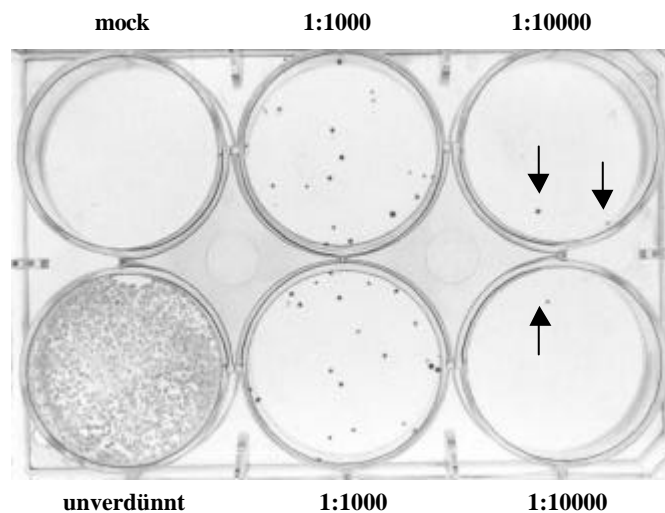
Zur Transduktion der humanen Zellen wurden Überstände der amphotropen FNX-Verpackungszelllinie eingesetzt, da auf diese Weise zeitsparend ausreichend Überstand für experimentelle Zwecke gewonnen werden konnte. Um die Qualität der für die Transduktion der Vorläuferzellen eingesetzten infektiösen Überstände zu überprüfen, wurde zunächst eine Titration der Überstände auf den MGMT-defizienten HeLa S3-Zellen [Foote et al., 1983] durchgeführt. Die Ergebnisse der Titrationen sind in der Tabelle 3-2 aufgeführt. Der Titer wurde anhand der durch die Transduktion erworbenen ACNU-Resistenz MGMT-defizienter HeLaS3-Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen vier Stunden mit dem Überstand transduziert und 48 Stunden nach Transduktion MGMT-exprimierende Zellen mittels 6 µg/ml ACNU selektioniert. Die Titer wurden als Anzahl koloniebildender Einheiten je Milliliter (cfu/ml) angegeben. Die Titer der für die Transduktion der humanen Vorläuferzellen eingesetzten Überstände reichte von minimal 8×10^3 cfu/ml (SFβ1-DHFR-IRES-MGMT-Vektor, 48h) bis maximal 9×10^4 cfu/ml (N2/ZIP-pgkpr-MGMT-Konstrukt, 72h). Der parallel auf den HeLaS3-Zellen titrierte 48h Überstand des Vektors MSCV-MGMT-pgkpr-NEO wies einen Geneticin (G418)-Titer von 1×10^5 cfu/ml auf und lag somit eine Größenordnung über dem ACNU-Titer. Der Unterschied zeigte gleichzeitig die Abhängigkeit des errechneten Titers von dem jeweils verwendeten Testsystem.

Tabelle 3-2: Titration amphotroper FNX-Überstände. **A)** Titer der transienten amphotropen FNX-Überstände. Als Zielzelle für die Transduktion diente die humane, MGMT-defiziente Zervix-Karzinom Zelllinie HeLaS3. Für die Selektion wurde ACNU (6 µg/ml) eingesetzt. Gleichzeitig dazu wurde für den 48 h Überstand des MSCV-MGMT-pgkpr-NEO-Vektors ein G418-Titer, der auf der Expression des Antibiotika-Resistenzgens Neomycinphosphotransferase (NEO) beruhte, ermittelt. Die Spalte „Zeit nach Transfektion“ gibt an, wieviele Stunden nach Transfektion der Produzentenzelllinie FNX der retrovirale Überstand gesammelt wurde. **B)** Darstellung des Ergebnisses der Titration des transienten, amphotropen FNX-Überstandes (48h) des N2/Zip-pgkpr-MGMT-Vektors. Mock-transduzierte Zellen starben unter ACNU-Selektion. Die meisten Kolonien überlebten bei Transduktion mit unverdünntem Überstand. Je stärker die Verdünnung, desto weniger Kolonien überlebten.

A)

Vektor	Zeit nach Transfektion [h]	ACNU-Titer [cfu/ml]
MSCV-MGMT-pgkpr-NEO	48	$1 \cdot 10^4$
	72	$2 \cdot 10^4$
N2/ZIP-pgkpr-MGMT	48	$3 \cdot 10^4$
	72	$9 \cdot 10^4$
MSCV-MGMT	48	$1 \cdot 10^4$
	72	$3 \cdot 10^4$
SF1-MGMT	48	$2 \cdot 10^4$
	72	$3 \cdot 10^4$
SFb1-DHFR-IRES-MGMT	48	$8 \cdot 10^3$
	72	$2 \cdot 10^4$

B)



Die humanen Zellen wurden nach Prästimulation auf Retronektin-beschichteten Zellkulturgefäßen viermal mit transientem, amphotropen FNX-Überstand transduziert (jeweils abwechselnd mit 48h- und 72h-Überstand) und anschließend in Gegenwart steigender ACNU-Konzentrationen in der Methylzellulose ausplattiert. Die Abbildung 3-2 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperimentes.

Ab einer ACNU-Konzentration von 2 µg/ml war der prozentuale Anteil der MGMT-transduzierten klonogenen Vorläuferzellen höher als bei mock-Kontrollen.

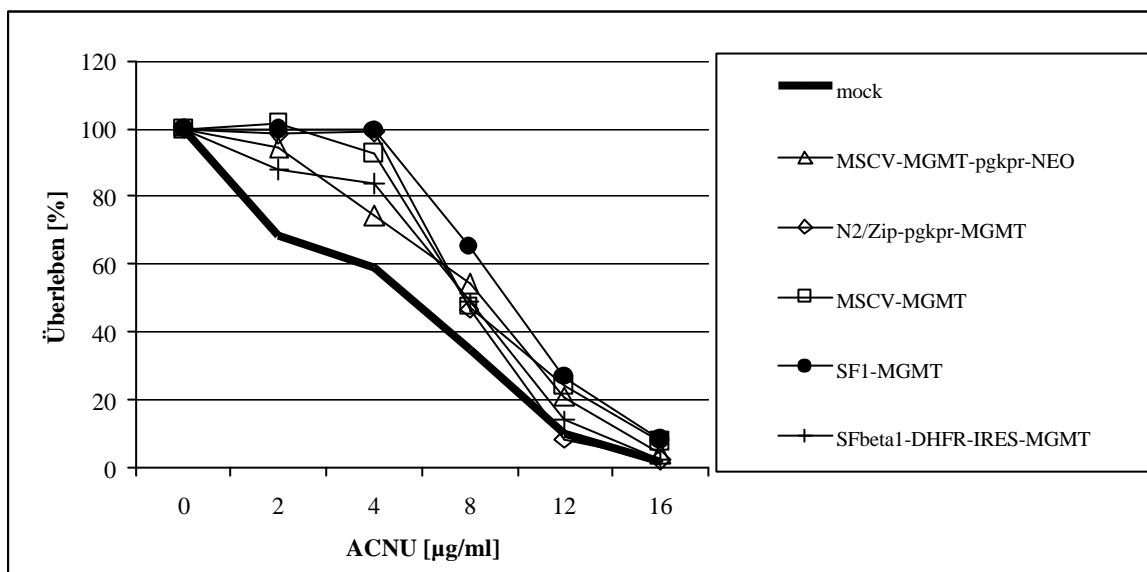


Abbildung 3-2: MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz humaner klonogener Zellen. Repräsentatives Einzelexperiment zur Expression der wtMGMT in humanen klonogenen Zellen. Die Abbildung zeigt das prozentuale Überleben humaner Vorläufer, die mit unterschiedlichen MGMT-exprimierenden Vektoren transduziert wurden, in steigenden Konzentrationen des Zytostatikums ACNU.

Diese vermehrte Resistenz ging erst bei höheren ACNU-Konzentrationen (>12 µg/ml) wieder verloren. Bei den beiden höchsten Konzentrationen konnte kein substanzieller Schutz der transduzierten Zellen beobachtet werden.

Die Tabelle 3-3 faßt die Ergebnisse zur ACNU-Resistenz transduzierter humaner Vorläuferzellen zusammen. Der Unterschied zwischen den prozentualen Überlebensraten MGMT-transduzierter Zellen und den mock-Kontrollen war für alle Vektoren statistisch signifikant. Das SF1-MGMT-Konstrukt vermittelte bei allen Konzentrationen von ACNU die höchste Resistenz. Im Gegensatz dazu war das Überleben SFβ1-DHFR-IRES-MGMT-transduzierter Zellen für alle getesteten Vektoren am niedrigsten. Die anderen Vektoren lieferten Überlebensraten zwischen diesen beiden Extremen, wobei die beiden MSCV-basierenden Vektoren tendenziell höhere Resistenz vermittelten als das MMLV-basierende Konstrukt N2/Zip-pgkpr-MGMT mit dem internen Phosphoglyzeratkinase-Promotor, wie sich

in den Mittelwerten der LD50 der transduzierten Zellen widerspiegelte. Allerdings ließen sich diese Unterschiede nicht statistisch absichern. Statistisch signifikant ($p = 0,028$) war nur der Unterschied in der vermittelten ACNU-Resistenz zwischen SF1-MGMT- und SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-transduzierten Zellen.

Tabelle 3-3: MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz humaner klonogener Zellen. Übersicht der Ergebnisse zur MGMT-Überexpression in humanen Vorläuferzellen mittels verschiedener retroviraler Grundgerüste. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA der Überlebensraten mock- bzw. MGMT-transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen unter steigenden ACNU-Konzentrationen aus vier Experimenten sowie die Mittelwerte \pm SA der LD50-Konzentrationen. Der p_{LD50} -Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der Unterschiede zwischen den LD50-Werten von mock- und MGMT-transduzierten Zellen an.

Vektor	ACNU [$\mu\text{g/ml}$]					LD50 [$\mu\text{g/ml}$]	P_{LD50}
	2	4	8	12	16		
mock	78,6 \pm 14,9	62,3 \pm 11,8	35,2 \pm 5,5	13,7 \pm 4,9	2,4 \pm 2,2	5,6 \pm 1,2	
MSCV-MGMT-pgkpr-NEO	96,0 \pm 7,0	84,4 \pm 11,5	57,4 \pm 11,6	27,6 \pm 10,0	10,3 \pm 10,7	9,0 \pm 1,3	0,0002
N2/Zip-pgkpr-MGMT	95,1 \pm 10,7	87,3 \pm 17,3	46,8 \pm 9,5	21,2 \pm 12,2	6,9 \pm 7,6	7,9 \pm 0,9	0,0197
MSCV-MGMT	97,3 \pm 3,4	81,0 \pm 7,8	52,1 \pm 12,5	27,1 \pm 12,3	11,8 \pm 11,0	8,3 \pm 1,4	0,0266
SF1-MGMT	98,6 \pm 4,2	93,1 \pm 5,1	75,2 \pm 8,5	54,5 \pm 30,2	14,1 \pm 9,9	11,5 \pm 1,9	0,0163
SF β 1-DHFR-IRES-MGMT	95,3 \pm 7,1	79,9 \pm 11,7	46,0 \pm 5,0	20,8 \pm 11,5	7,6 \pm 10,1	7,5 \pm 0,7	0,0155

Die mittels Einzelkolonie-PCR ermittelten Transduktionsraten bei den Experimenten sind für zwei der Versuche in Tabelle 3-4 aufgelistet. Dabei war die Transduktionseffizienz einheitlich für die einzelnen Vektoren und Versuche und schwankte zwischen 27,3% und 34,3%. Lediglich der Überstand mit dem Vektor N2/Zip-pgkpr-MGMT resultierte mit 18,2% in einer leicht erniedrigten Transferrate.

3.2.2 Experimente mit murinen High Proliferative Potential-Colony Forming Cells (HPP-CFC)

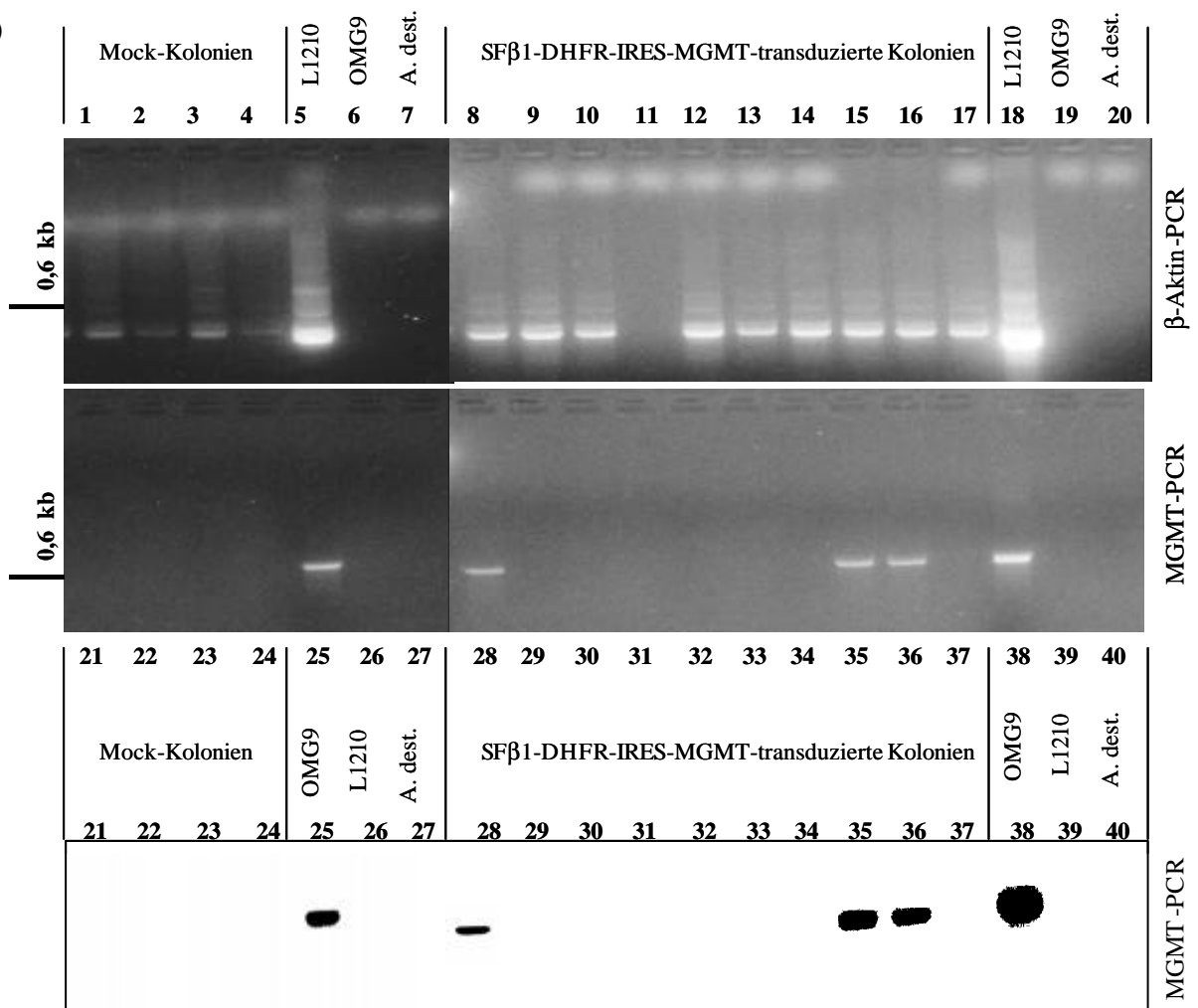
Ziel der Experimente mit murinen HPP-CFCs war es, die Effektivität des durch die unterschiedlichen retroviralen Konstrukte vermittelten Schutzes auch für diese, im Vergleich mit den klonogenen Vorläuferzellen weniger differenzierte, stammzellnahe Population nachzuweisen. Die Experimente wurden weitgehend analog zu den Versuchen mit humanen koloniebildenden Zellen durchgeführt.

Tabelle 3-4: Transduktionsraten humaner klonogener Zellen. Analyse der Transduktionseffizienz humaner klonogener Vorläuferzellen mittels Einzelkolonie-PCR. **A)** Ergebnisse der MGMT-cDNA-spezifischen PCR aus zwei Experimenten. **B)** Beispiele für die PCR-Analyse einzelner Kolonien. Der obere Teil zeigt die β -Aktin-Gen spezifische Kontroll-PCR. Es wurde ein 540 bp großes Fragment der genomischen Sequenz amplifiziert. Alle mock-Kolonien (vier von vier) sind positiv für die β -Aktin-PCR, während die PCR an neun von zehn MGMT-transduzierten Kolonien ein spezifisches Produkt amplifiziert (obere Reihe). Keine der mock-Kolonien erweist sich positiv für die MGMT-cDNA-spezifische PCR. Drei von neun β -Aktin positiven, MGMT-transduzierten Kolonien zeigen in der MGMT-cDNA-spezifischen PCR ein spezifisches Produkt (mittlere Reihe). Eine Hybridisierung der auf Nylon-Membran übertragenen MGMT-PCR-Produkte der mittleren Reihe mit einer MGMT-spezifischen Sonde bestätigt dieses Ergebnis in einer Chemilumineszenzreaktion (untere Reihe).

A)

Vektor	Experiment #2		Experiment #3		Summe	
	positive Kolonien	[%]	positive Kolonien	[%]	positive Kolonien	[%]
mock	0/9	0	0/9	0	0/18	0
MSCV-MGMT-pgkpr-NEO	3/19	15,8	6/12	50	9/31	29,0
N2/Zip-pgkpr-MGMT	3/18	16,7	3/15	20	6/33	18,2
MSCV-MGMT	5/20	25	6/18	33,3	11/38	28,9
SF1-MGMT	5/20	25	4/13	30,8	9/33	27,3
S Fb 1-DHFR-IRES-MGMT	6/18	33,3	6/17	35,3	12/35	34,3

B)



Im Unterschied zu den humanen Vorläuferzellen fand dieser Test in einer zweilagigen Agarkultur statt, bei dem das Zytostatikum sich in der unteren Agarschicht befindet. Das Transduktionsprotokoll beinhaltete nur geringfügige Modifikationen im Vergleich zu dem Protokoll für die humanen Zellen. Für die Transduktion der murinen Zellen wurden die Retronektin-beschichteten Oberflächen mit virushaltigem Überstand vorinkubiert, dagegen wurde nach 2 bzw. 26 Stunden dem Transduktionsansatz kein frischer Überstand zugeführt. Wie aus Abbildung 3-3 ersichtlich ist, zeigte sich bei den Experimenten bereits bei einer ACNU-Konzentration von 1 µg/ml ein deutlicher Schutz MGMT-transduzierter Zellen mit allen verwendeten Vektoren. Bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml ACNU zeigten nur noch SF1-MGMT-transduzierte Zellen substantielle Resistenz zeigen.

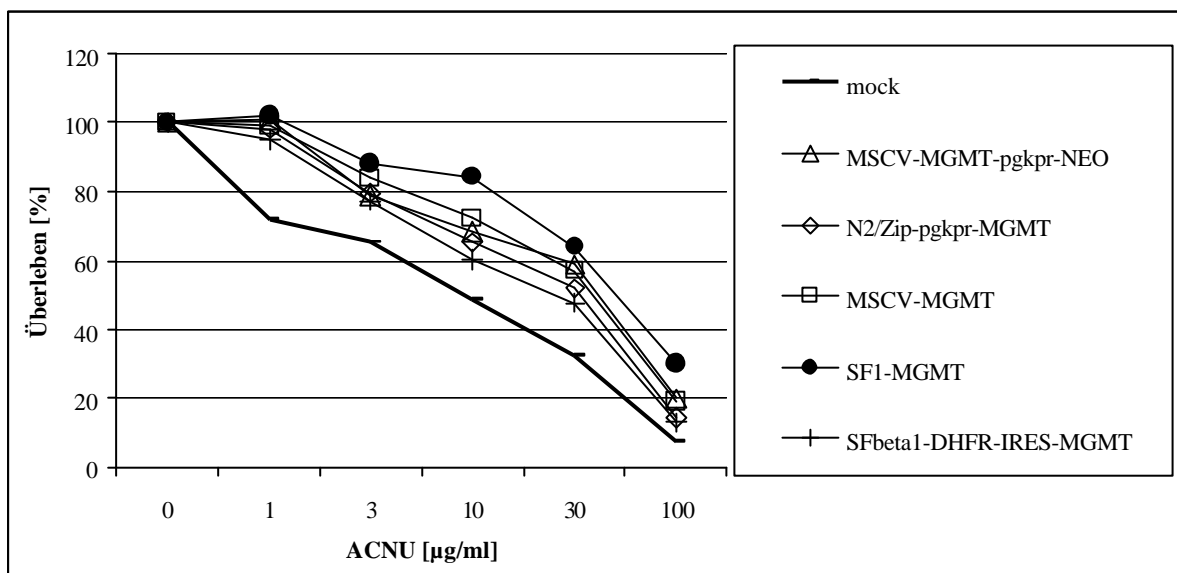


Abbildung 3-3: MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz muriner HPP-CFC. Repräsentatives Einzelexperiment zur Expression der wtMGMT in murinen klonogenen HPP-CFC nach Transduktion mit verschiedenen MGMT-exprimierenden Vektoren. Die Abbildung zeigt das Überleben muriner HPP-CFC, die mit unterschiedlichen MGMT-exprimierenden Vektoren transduziert wurden, in steigenden ACNU-Konzentrationen.

Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus drei Experimenten in der Tabelle 3-5 zeigt, daß für die ACNU-Konzentrationen 10 und 30 µg/ml die Unterschiede der mit verschiedenen Vektoren transduzierten Zellen zu den Kontrollzellen am größten waren. Wiederum vermittelte in allen Versuchen die Transduktion mit dem SF1-MGMT-Vektor bei allen Konzentrationen die höchste ACNU-Resistenz, wie an den Mittelwerten des prozentualen Überlebens transduzierter klonogener Zellen zu sehen war. Übereinstimmend mit den Versuchen an humanen Vorläuferzellen zeigten SFβ1-DGFR-IRES-MGMT-

transduzierte HPP-CFC, verglichen mit den anderen getesteten Vektoren, die niedrigsten Überlebensraten.

Aus den Daten ließ sich wiederum eine Einteilung der verschiedenen Vektoren hinsichtlich der von ihnen vermittelten Resistenz vornehmen. Die Klassifizierung glich dabei jener für humane CFC. Das SF1-MGMT-Konstrukt vermittelte den höchsten Schutz unter steigenden ACNU-Konzentrationen. Die niedrigste Protektion fand man bei den SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-transduzierten Zellen. Die Mittelwerte für die restlichen Vektoren lagen zwischen diesen maximalen/minimalen Werten. Wiederum vermittelte die Transduktion mit MSCV-abgeleiteten Vektoren eine höhere Resistenz als das MMLV-basierte Grundgerüst. Diese Reihenfolge spiegelte sich ebenfalls in den LD50-Mittelwerten wider. Statistisch signifikant war aber auch bei diesen Resultaten nur der Unterschied zwischen Zellen, die mit dem SF1-MGMT-Vektor und Zellen die mit dem SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-Konstrukt ($p = 0,004$) transduziert worden waren.

Tabelle 3-5: MGMT-vermittelte ACNU-Resistenz muriner HPP-CFC. Ergebnisse zur MGMT-Überexpression in murinen HPP-CFC mittels verschiedener retroviraler Grundgerüste. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA der Überlebensraten [%] mock- bzw. MGMT-transduzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen unter steigenden ACNU-Konzentrationen aus drei Experimenten, sowie die Mittelwerte \pm SA der LD50-Konzentrationen. Der p_{LD50} -Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der Unterschiede zwischen den LD50-Werten von mock- und MGMT-transduzierten Zellen an. *es lagen nur zwei Meßwerte vor, * *k. D. = keine Daten, t-Test nicht durchführbar

Vektor	ACNU [μ g/ml]				LD50 [μ g/ml]	p_{LD50}
	3	10	30	100		
mock	68,5 \pm 3,1	52,3 \pm 10,5	34,1 \pm 2,1	8,3 \pm 4,9	12,3 \pm 5,9	
MSCV-MGMT-pgkpr-NEO	84,4 \pm 4,8	71,3 \pm 5,6	60,3 \pm 4,5	17,6 \pm 3,7	46,7 \pm 6,3	0,0006
N2/Zip-pgkpr-MGMT	82,4 \pm 2,3	68,8 \pm 7,0	54,7 \pm 8,8	19,7 \pm 13,0	41,6 \pm 19,6	0,0332
MSCV-MGMT	86,6 \pm 2,8	74,6 \pm 5,0	65,0 \pm 7,2	16,4*	47,6*	k. D.**
SF1-MGMT	91,3 \pm 3,5	84,7 \pm 3,5	70,4 \pm 6,1	31,8 \pm 3,5	66,6 \pm 8,3	0,0010
SF β 1-DHFR-IRES-MGMT	78,4 \pm 2,0	64,4 \pm 7,3	52,3 \pm 6,7	17,2 \pm 4,7	34,6 \pm 12,2	0,0135

Die Transduktionsraten für murine HPP-CFC in den einzelnen Experimenten sind in Tabelle 3-6 aufgelistet. Die Transduktionsraten für die einzelnen MGMT-exprimierenden Vektoren in den Versuchen variierte lediglich zwischen durchschnittlich 27,6% und 34,5%.

Tabelle 3-6: Transduktionsraten muriner HPP-CFC. Aufgeführt ist die Transduktionseffizienz ACNU-unbehandelter HPP-CFC nach Transduktion mit Überständen der unterschiedlichen, MGMT-exprimierenden Vektoren. Angegeben ist der Prozentsatz von Kolonien, bei denen in der PCR provirale MGMT-cDNA nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle für das Vorhandensein amplifizierbarer, genomischer DNA in den einzelnen Proben wurde ein 195 bp großes Fragment des genomischen murinen GAPDH-Gens amplifiziert.

Vektor	Experiment	#1	Experiment	#2	Experiment	#3	Summe	
	Positive Kolonien	[%]	Positive Kolonien	[%]	Positive Kolonien	[%]	Positive Kolonien	[%]
mock	0/10	0	0/9	0	0/10	0	0/29	0
MSCV-MGMT-pgkpr-NEO	6/19	31,6	5/19	26,3	8/20	40	19/58	32,8
N2/Zip-pgk-MGMT	6/19	31,6	7/20	35	7/19	36,8	20/58	34,5
MSCV-MGMT	7/20	35	4/18	22,2	5/20	25	16/58	27,6
SF1-MGMT	6/19	31,6	7/20	35	5/20	25	18/59	30,5
SFb1-DHFR-IRES-MGMT	5/19	26,3	6/19	31,6	7/20	35	18/58	31,0

3.3 Einsatz der MGMT^{V139F}-Mutante zum Schutz vor ACNU-induzierter Toxizität in einer murinen Leukämiezelllinie

Eine 1996 beschriebene Mutante der MGMT (MGMT^{V139F}) vermittelte bei Überexpression in *ada* (Prokaryonten-Homolog der MGMT)-defizienten Bakterien, einen besseren Schutz gegen die Toxizität alkylierender Agenzien als die wtMGMT [Christians & Loeb, 1996]. Es sollte untersucht werden, ob diese Mutante bei Überexpression in der murinen Leukämie-Zelllinie L1210 den klonogenen Zellen eine höhere ACNU-Resistenz vermittelt.

Als negative Kontrolle wurde die parentale L1210-Zelllinie verwendet. Die L1210-Zelllinie stammt von myeloischen Zellen ab und besitzt eine niedrige Alkyltransferaseaktivität; deshalb sind diese Zellen besonders sensitiv gegenüber ACNU-induzierter Zytotoxizität. Der Vergleichbarkeit halber sollte die MGMT^{V139F}-Mutante einer anderen Mutante gegenüber gestellt werden, von der bekannt war, daß sie eine dem Wildtyp-Protein entsprechende Reparaturaktivität besitzt. Daher diene als positive Kontrolle (Referenzzelllinie) die L1210^{MGMT^{P140A}}-Zelllinie vergleichend eingesetzt, die stabil eine weitere Mutante der MGMT exprimiert. Diese MGMT^{P140K}-Mutante besitzt eine verminderte Sensitivität gegenüber dem

wtMGMT spezifischen Hemmstoff O6-BG, verfügt aber über eine vergleichbare Aktivität bezogen auf das wtMGMT-Protein [Crone & Pegg, 1993].

Zur Expression der MGMT^{V139F}-Mutante in L1210-Zellen wurde der MSCV-MGMT^{V139F}-pgkpr-NEO-Vektor stabil transfiziert. Die Anwesenheit des Provirus in einzelnen Klonen wurde mittels MGMT-cDNA-spezifischer PCR an aufgereinigter DNA überprüft.

Die Abbildung 3-4 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Austestungen von zwei der zehn isolierten MGMT^{V139F}-transfizierten L1210-Klone bezüglich ihrer Resistenz gegenüber ACNU im klonogenen Testsystem.

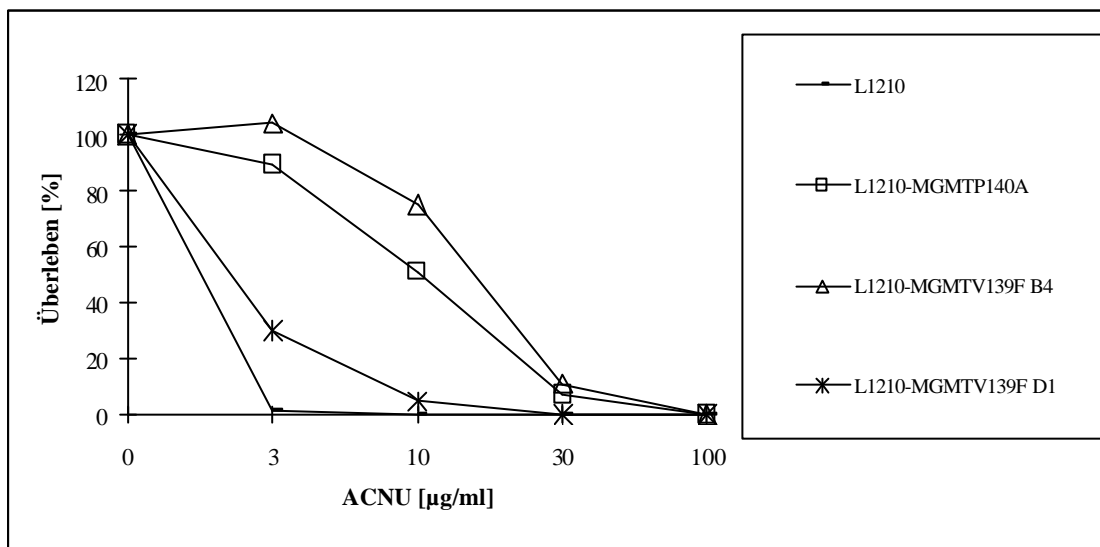


Abbildung 3-4: ACNU-Resistenz MGMT^{V139F}-transfizierter L1210-Klone. Repräsentatives Einzelexperiment mit zwei L1210^{MGMTV139F}-Klonen. Gezeigt ist der Prozentsatz überlebender Klone unter steigenden ACNU-Konzentrationen im klonogenen Test. Als Negativkontrolle ist die parentale L1210-Zelllinie, als Positivkontrolle die L1210^{MGMTP140K}-Zelllinie gezeigt.

Ein Großteil der parentalen L1210-Zellen wurde bereits bei 3 µg/ml ACNU abgetötet. Bei 10 µg/ml ACNU bildten die L1210-Zellen keine Kolonien mehr. Im Gegensatz dazu wurde die Proliferation der L1210^{MGMTP140A}-Zelllinie durch 3 mg/ml ACNU nicht inhibiert. Erst bei einer ACNU-Konzentration von 30 µg/ml sank das prozentuale Überleben dieser Zellen unter 20%, und bei 100 µg/ml wurde keine Proliferation mehr beobachtet. Unter steigenden Konzentrationen von ACNU zeigte der Klon L1210^{MGMTV139F} D1 eine Überlebensrate, die geringfügig höher war als jene der parentalen L1210-Kontrollzelllinie. Der durch die MGMT^{V139F}-Expression vermittelte Selektionsvorteil war bei 3 µg/ml ACNU besonders deutlich zu beobachten. Hier überlebten annähernd 30% mehr MGMT^{V139F}-transfizierte Kolonien, verglichen mit L1210-Zellen, doch bereits bei 10 µg/ml ACNU betrug der

Unterschied bereits weniger als 10%, bevor sämtliche Zellen des Klons D1 bei 30 µg/ml abgetötet wurden. Im Vergleich dazu war der Klon B4 durch die Transfektion mit dem MSCV-MGMT^{V139F}-Vektor effektiver vor der ACNU-induzierten Zytotoxizität in diesem Experiment geschützt und zeigte selbst bei 3, 10 und 30 µg/ml eine höhere ACNU-Resistenz als die Referenzzelllinie L1210^{MGMTP140A}. Von den 10 getesteten L1210^{MGMTV139F}-Klonen wurden jene fünf mit den höchsten LD50-Werten für weitere Versuche ausgewählt. Alle diese mehrfach getesteten Klone besaßen, verglichen mit der L1210-Zelllinie, eine statistisch signifikante erhöhte Toleranz gegenüber ACNU.

Aus der Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 3-7 ergibt sich jedoch, daß durch die Transfektion der L1210-Zellen mit dem Vektor MSCV-MGMT^{V139F} keine reproduzierbar signifikante Erhöhung der LD50, im Vergleich mit der MGMT^{P140A}-überexprimierenden Zelllinie, zu erreichen war.

Tabelle 3-7: ACNU-Resistenz MGMT^{V139F}-transfizierter L1210-Klone. Dargestellt sind die LD50-Mittelwerte der L1210^{MGMTV139F}-Klone mit den höchsten LD50-Werten aus den initialen Experimenten. Die Spalte p_{LD50} gibt das Ergebnis des Student's t-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den LD50-Werten der L1210^{MGMTV139F}-Klone und der parentalen L1210-Zelllinie an.

		LD50 [µg/ml ACNU]	p _{LD50}
L1210 (neg. Kontr.)	n = 6	1,4 ± 0,4	
L1210 ^{MGMTP140A} (pos. Kontr.)	n = 6	12,0 ± 4,2	0,0006
L1210 ^{MGMTV139F} A2	n = 4	5,8 ± 2,7	0,02
L1210 ^{MGMTV139F} B4	n = 3	12,0 ± 4,9	0,03
L1210 ^{MGMTV139F} D12	n = 3	5,1 ± 1,8	0,03
L1210 ^{MGMTV139F} F9	n = 3	6,8 ± 1,3	0,005
L1210 ^{MGMTV139F} H6	n = 4	8,0 ± 5,3	0,04

3.4 Untersuchungen des Schutzes der Hämatopoese vor chemotherapieinduzierter Zytotoxizität durch MGMT^{P140K}-Gentransfer im In-vivo-Maus-Knochenmarktransplantationsmodell

In Ergänzung zu den bisher dargestellten In-vitro-Daten sollen im folgenden Abschnitt In-vivo-Experimente zum Gentransfer der O6-BG-resistenten MGMT^{P140K}-Mutante beschrieben

werden. Ziel der Versuche war die Rekonstituierung der Hämatopoese in den MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren, die vor der Hämatotoxizität einer hochdosierten Chemotherapie aus O6-BG und O⁶-alkylierenden Medikamenten geschützt sein sollten. Der Einsatz der kombinierten Chemotherapie mit O6-BG wurde durch die Expression der MGMT^{P140K} in den transduzierten hämatopoetischen Stammzellen ermöglicht. Während das Wildtyp-Protein mit O6-BG eine kovalente Bindung am Akzeptor-Cystein eingeht, verhindert die Mutation am Kodon 140 den Zugang des O6-BG zur Bindestelle im aktiven Zentrum des Proteins [Davis et al., 1999b]. Auf diese Weise wird eine Inhibition der Reparatur von O⁶-Alkylierungen der DNA durch O6-BG unterbunden, eine gewisse Stärke der Expression der MGMT^{P140K} vorausgesetzt (siehe auch 1.8).

Letal bestrahlten Mäusen wurde Knochenmark transplantiert, das zuvor *ex vivo* mit einem Vektor transduziert worden war, der sowohl die MGMT^{P140K}-Mutante als auch das Markergen GFP exprimiert. Nach dem Anwachsen (*Engraftment*) des Transplantats erhielten die Tiere fünf Zyklen einer Chemotherapie. Nach jedem Zyklus sowie vier Wochen nach dem letzten Zyklus wurden Blutproben zur Kontrolle der Blutwerte und Bestimmung des Anteils fluoreszierender (GFP⁺) Zellen im peripheren Blut entnommen, um den Einfluß der Chemotherapie auf das hämatopoetische System zu quantifizieren. Abschließend wurde auch der Anteil GFP⁺ weißer Blutzellen in Milz und Knochenmark bestimmt (siehe Abb. 2-2).

Um den Einfluß der Chemotherapie auf das Blutbild und die Anreicherung GFP-exprimierender Zellen im peripheren Blut, Knochenmark und der Milz zu kontrollieren, wurden MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere ohne chemotherapeutische Behandlung zu gleichen Zeitpunkten wie behandelte Tiere der Analyse des Blutbilds und der Anreicherung GFP-positiver Zellen unterzogen.

Als Kontrollgruppe (mock) in diesen Versuchen dienten Tiere, die Knochenmark, das mit einem β -Galaktosidase-exprimierenden Vektor [Clapp et al., 1995] transduziert worden war, transplantiert wurden. Die Kontrolltiere wurden einer identischen Behandlung unterzogen.

Die Tabelle 3-8 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche und die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere. Bei der Auswertung der Experimente werden im folgenden, soweit nicht anders erwähnt, für die MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren nur die Daten derjenigen Tiere berücksichtigt, die bis zum Tag 89 überlebten.

Tabelle 3-8: Übersicht der Versuche zum MGMT^{P140K}-Gentransfer. Die Zahlen geben die initial eingesetzte Tierzahl an. In Klammern ist die Anzahl der Tiere vermerkt, die das gesamte Protokoll bis Tag 89 durchlaufen haben. Von den mit * gekennzeichneten Tieren wurden sekundäre Transplantationen durchgeführt. # Bei den Tieren dieser Gruppe handelt es sich um die sekundär transplantierte Tiere, deren Transplantate aus den mit * gekennzeichneten Tieren aus den Versuchen I und II stammten.

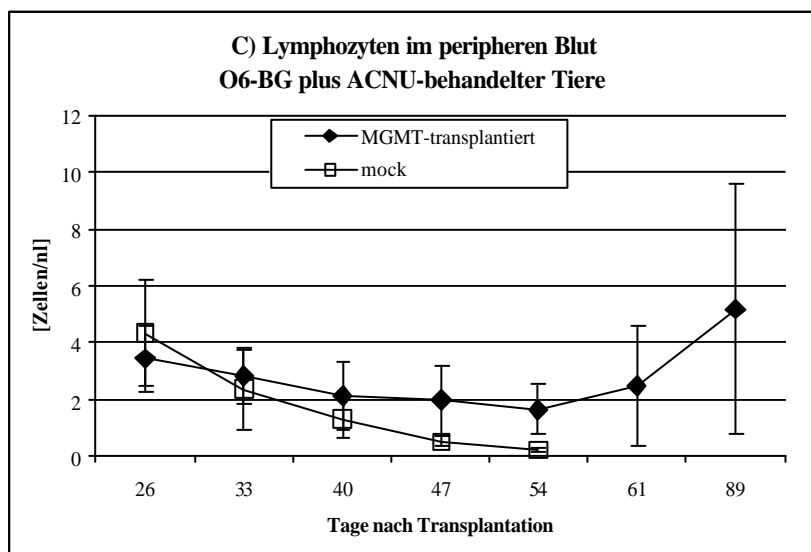
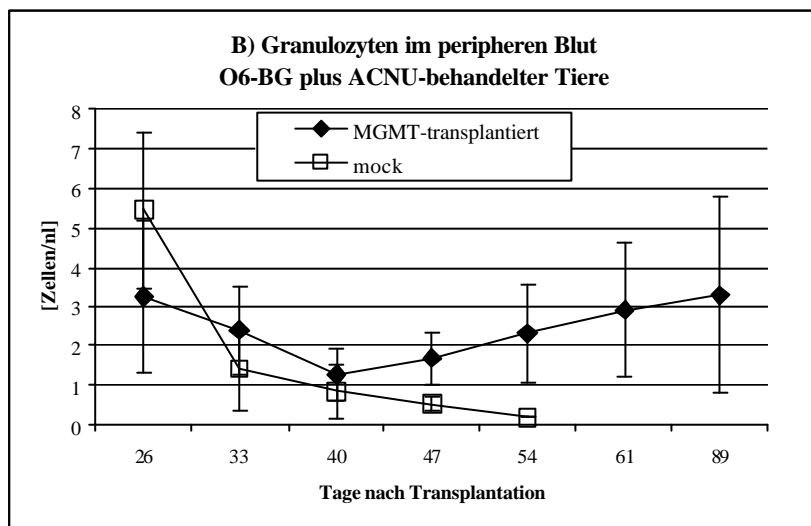
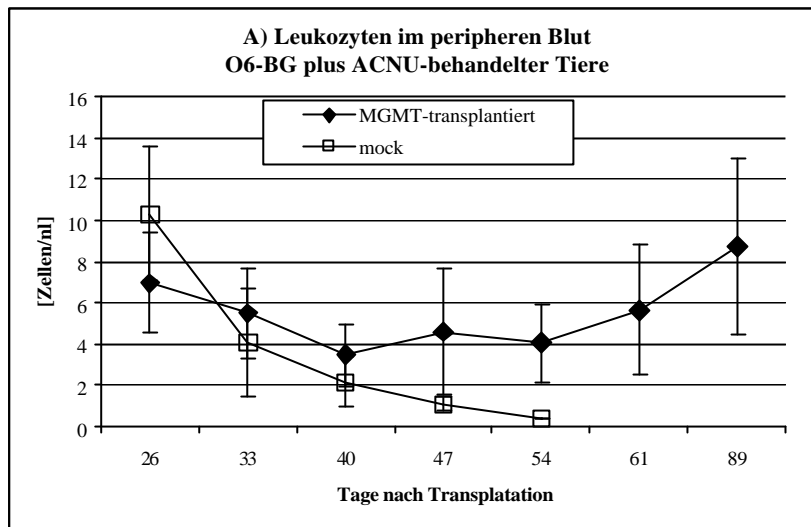
Substanz	Transduktion	Experiment Nr.							Summe
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
ACNU (6 mg/kg)	mock			6 (0)	4 (0)	3 (0)			13 (0)
	MGMT ^{P140K}	2 (1*)	5 (0)	6 (0)	4 (2)	6 (5)	5 (5)	6 (6) [#]	34 (19)
BCNU (10 mg/ml)	mock			6 (0)					6 (0)
	MGMT ^{P140K}	3 (0)	5 (1*)	6 (1)			5 (5)		19 (7)
TMZ (50 mg/kg)	mock			4 (4)					4 (4)
	MGMT ^{P140K}			4 (4)					4 (4)
TMZ (70 mg/kg)	mock				3 (0)	4 (0)			7 (0)
	MGMT ^{P140K}				4 (4)	6 (6)			10 (10)
unbehandelt	MGMT ^{P140K}			3 (3)	1 (1)	3 (3)			7 (7)

3.4.1 Blutwerte der Versuchstiere

Versuche zur Behandlung mit O6-BG plus ACNU:

Erwartungsgemäß führte die Myelotoxizität der Therapie bei allen Versuchstieren (MGMT^{P140K}- und mock-transplantiert) zu einer Erniedrigung der Werte für Gesamtleukozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten im peripheren Blut. Bei den Tieren, die mit MGMT^{P140K}-transduzierten Zellen transplantiert wurden, nahmen die Leukozyten von 7,0/nl vor der Behandlung auf 3,5/nl nach dem zweiten Zyklus ab und erreichten zu diesem Zeitpunkt ihren Nadir (siehe Abbildung 3-5). Noch während der weiteren chemotherapeutischen Behandlung nahm die Leukozytenzahl dann wieder zu. Dabei übertraf vier Wochen nach dem letzten Zyklus die Zahl der weißen Blutkörperchen den Ausgangswert vor der Behandlung (8,7/nl). Ein ähnlicher Verlauf ergab sich für die Anzahl der Granulozyten. Die Werte sanken von 3,2/nl auf 1,3/nl nach dem zweiten Kurs der Chemotherapie und erholten sich vier Wochen nach der letzten i. p. Injektion wieder (3,3/nl). Die Lymphozytenzahlen des peripheren Blutes zeigten einen ähnlichen Verlauf. Allerdings nahmen die Werte vom Ausgangswert 3,4/nl bis zum vierten Zyklus ab (1,7/nl), um vier Wochen nach der letzten Behandlung auf 5,2/nl anzusteigen. Die Thrombozytenzahlen

betragen 860/nl vor Behandlung, fielen auf einen Nadir von 443/nl nach dem dritten Zyklus ab und stiegen nach Abschluß des Versuchs wieder auf 693/nl an.



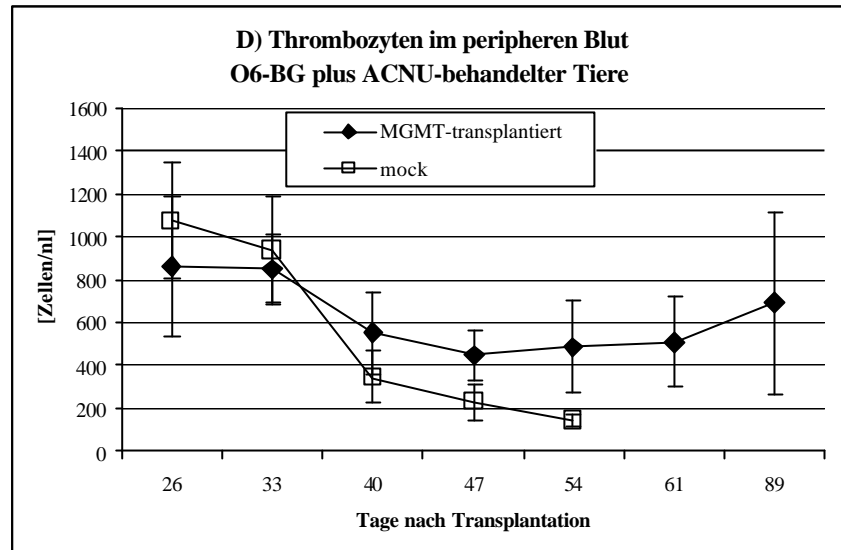


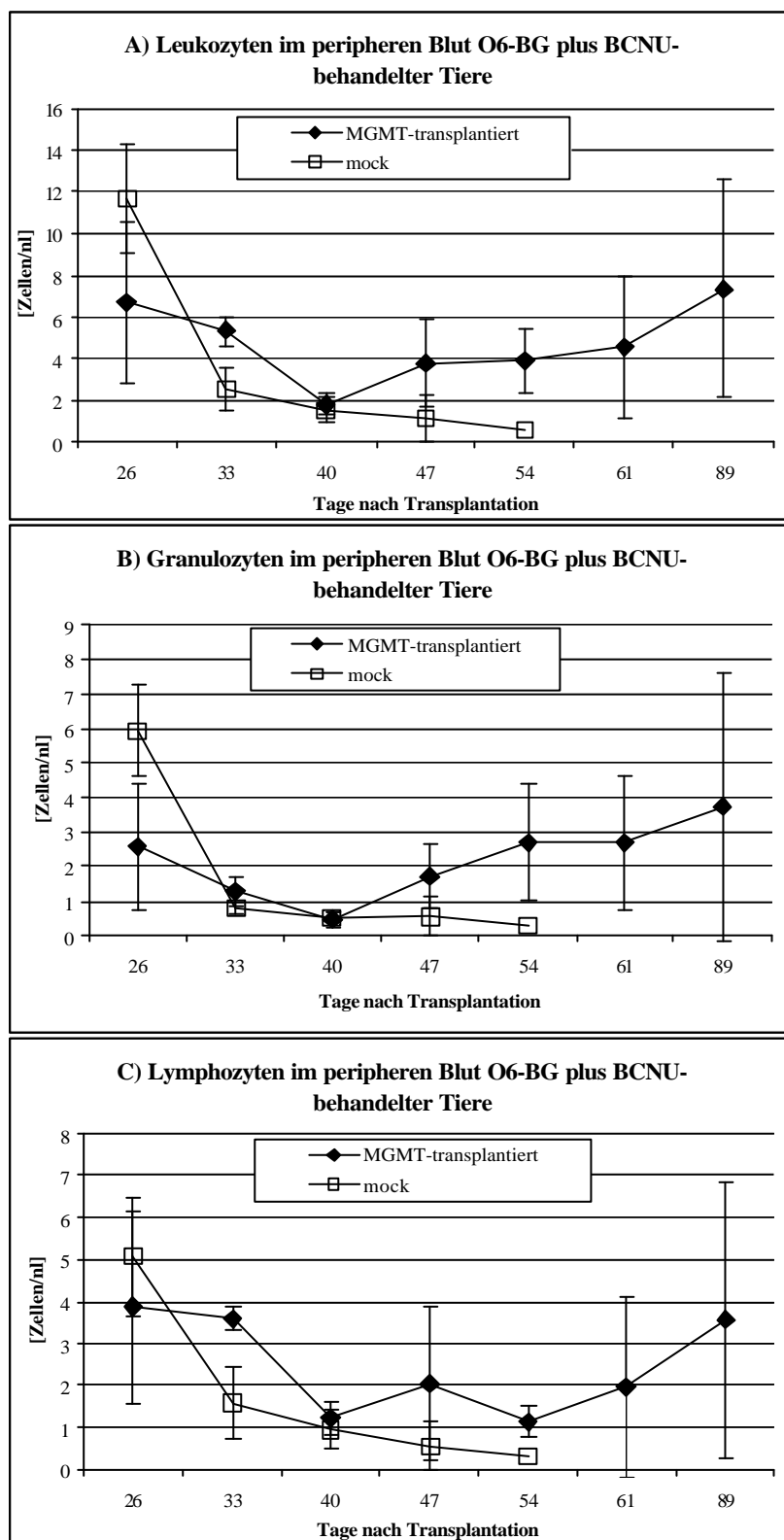
Abbildung 3-5: Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG plus ACNU-behandelter Tiere. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten von Tieren, die mit mock- (offene Quadrate) und MGMT^{P140K}- (gefüllte Rauten) transduziertem Knochenmark transplantiert und anschließend mit O6-BG (30 mg/kg) und ACNU (6 mg/kg) behandelt wurden.

Im Gegensatz dazu fielen sämtliche Blutwerte ACNU-behandelter Tiere, die mit mock-transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, kontinuierlich ab, und sämtliche Tiere starben vor der für Tag 61 geplanten Blutentnahme.

Auch ein Teil der MGMT^{P140K}-transplantierten Tiere (15 von 34) verstarb während der Behandlung. Bei diesen Tieren nahmen die Blutwerte unter der Therapie stetig ab. Die letzten Tiere verstarben allerdings später als Tiere mit mock-transduzierten Knochenmarkszellen, nämlich zwischen Tag 61 und 89.

Therapie mit O6-BG plus BCNU:

Analog zur Behandlung mit der Nitrosoharnstoffverbindung ACNU entwickelten sich die peripheren Blutwerte von Tieren, denen mock- beziehungsweise MGMT^{P140K}-transduzierte Zellen transplantiert wurden, unter Behandlung mit O6-BG plus BCNU (siehe Abbildung 3.6). Die Zellzahlen für Leukozyten, Granulozyten und Thrombozyten MGMT^{P140K}-transplantiertes Tiere durchliefen nach zwei Zyklen Chemotherapie einen Nadir, erholten sich zum Ende der Experimente wieder und erreichten Werte über dem Ausgangswert vor Behandlungsbeginn. Die niedrigsten Lymphozytenzahlen der Tiere wurden nach dem vierten Kurs gemessen. Gegen Ende der Behandlung (Tag 89) lagen die Lymphozytenzahlen geringfügig unterhalb des Ausgangswertes.



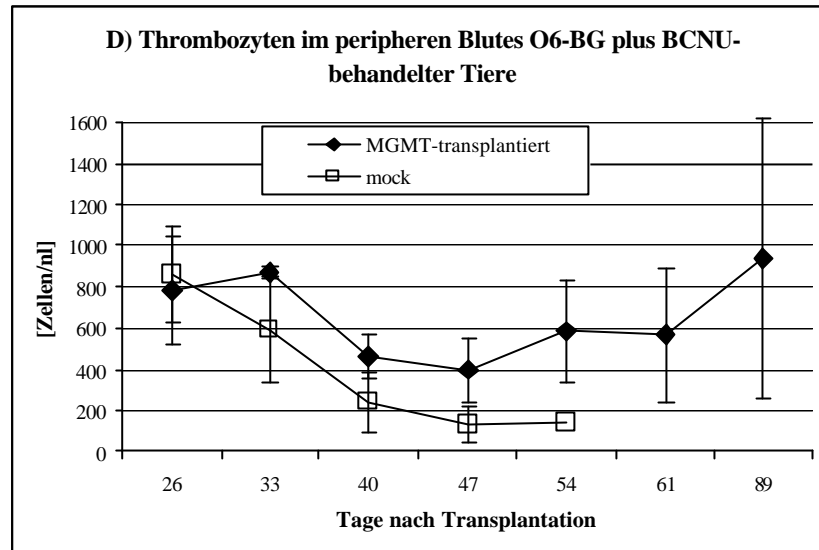


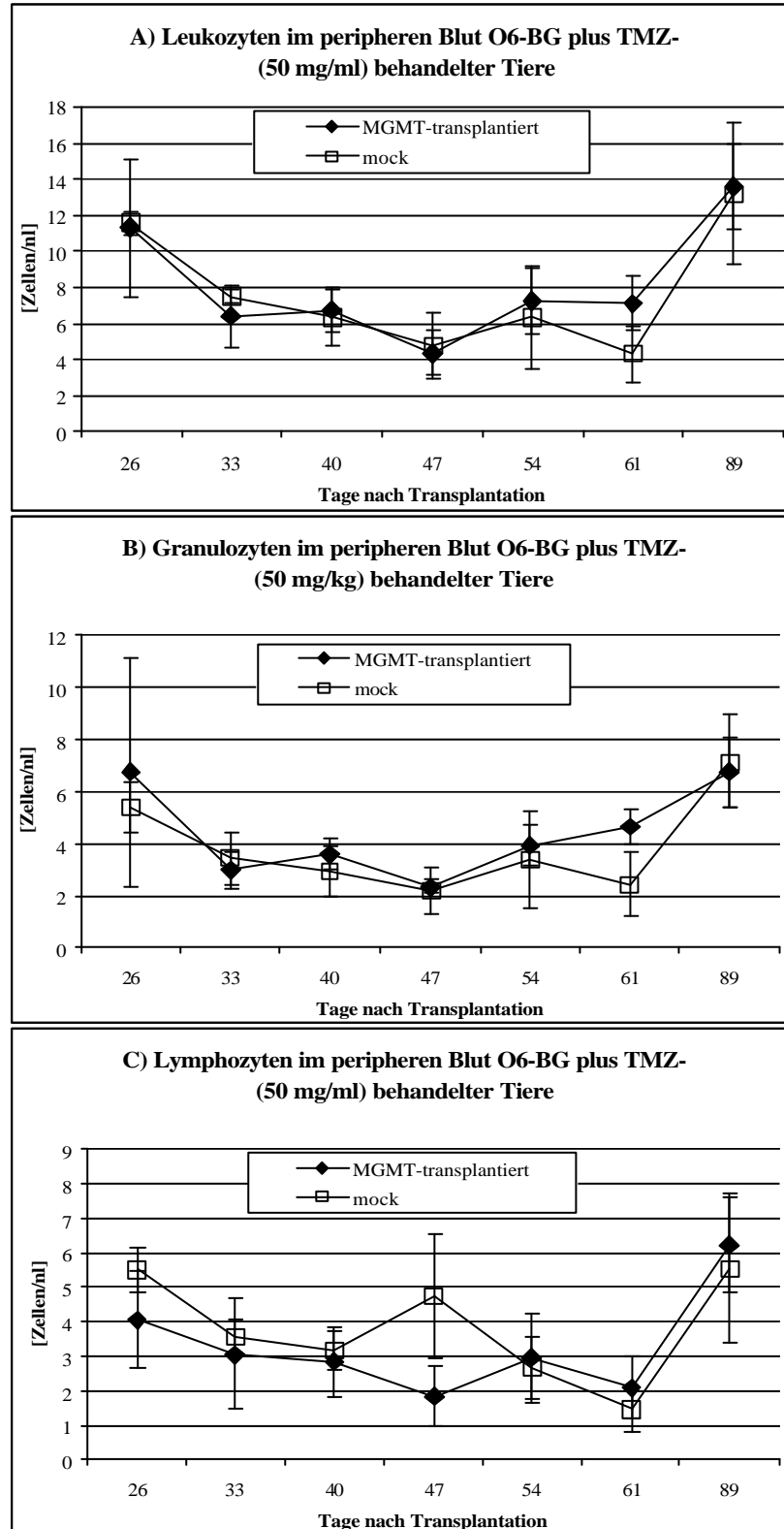
Abbildung 3-6: Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG plus BCNU-behandelter Tiere. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten von Tieren, die mit mock- (offene Quadrate) und MGMT^{P140K}- (gefüllte Rauten) transduziertem Knochenmark transplantiert und anschließend mit O6-BG (30 mg/kg) und BCNU (10 mg/kg) behandelt wurden.

Mock-transplantierte Tiere verstarben ebenfalls spätestens nach vier Zyklen, wobei die Blutwerte stetig abnahmen. MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere (12 von 19), die vor Tag 89 verstarben, zeigten ähnlich wie mock-transplantierte Tiere eine fortschreitende Panzytopenie. Die Werte erreichten 0,9 Leukozyten/nl, 0,6 Granulozyten/nl, 0,4 Lymphozyten/nl und 242 Thrombozyten/nl, bevor die letzten Tiere dieser Gruppe zwischen Tag 61 und 89 verstarben.

Behandlung mit O6-BG plus TMZ (50 mg/kg):

Bei dem Einzelexperiment mit der kombinierten Gabe von O6-BG plus 50 mg/kg TMZ überlebten sowohl mock- als auch MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere bis Tag 89 (siehe Abbildung 3-7). Die Werte für Leukozyten und Granulozyten erreichten für beide Versuchsgruppen nach dem dritten Kurs (Tag 47) einen Nadir, um an Tag 89 Zellzahlen oberhalb des Tag 26-Wertes zu erreichen. Allerdings war der hier beobachtete Nadir nicht so ausgeprägt wie bei der Therapie mit O6-BG plus ACNU beziehungsweise O6-BG plus BCNU. Die Lymphozytenzahlen der Tiere mit MGMT^{P140K}-transduzierten Knochenmarkszellen zeigten einen ähnlichen Verlauf, während die Lymphozytenzahlen von Tieren, die mock-transduzierte Transplantate erhalten hatten, zwischen Tag 40 und Tag 47 zunahm. Anschließend erreichten die Lymphozytenzahlen an Tag 61 ihren Tiefstwert und stiegen bis Tag 89 wieder auf das Ausgangsniveau an. Die Thrombozytenwerte der Tiere mit

MGMT^{P140K}-transduzierten Transplantaten stiegen während der Beobachtungsdauer kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu fiel dieser Wert bei den Kontrolltieren zunächst ab, um nachfolgend wieder knapp über den Wert von Tag 26 anzusteigen.



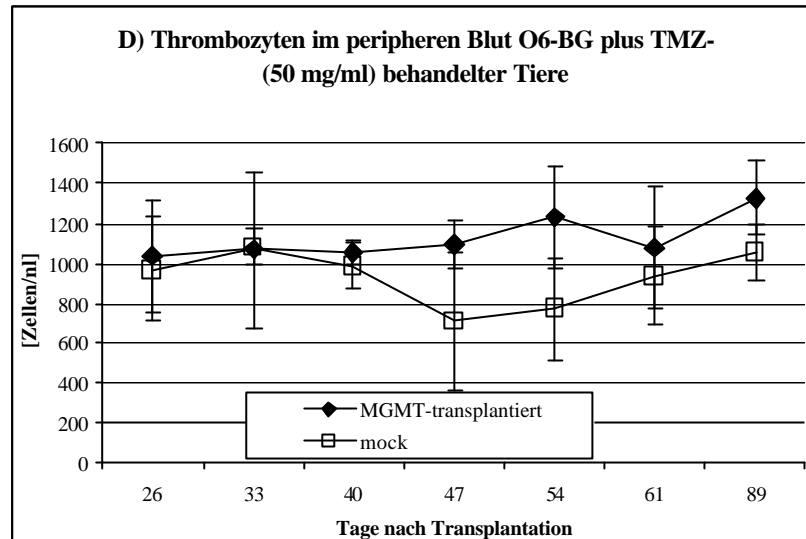
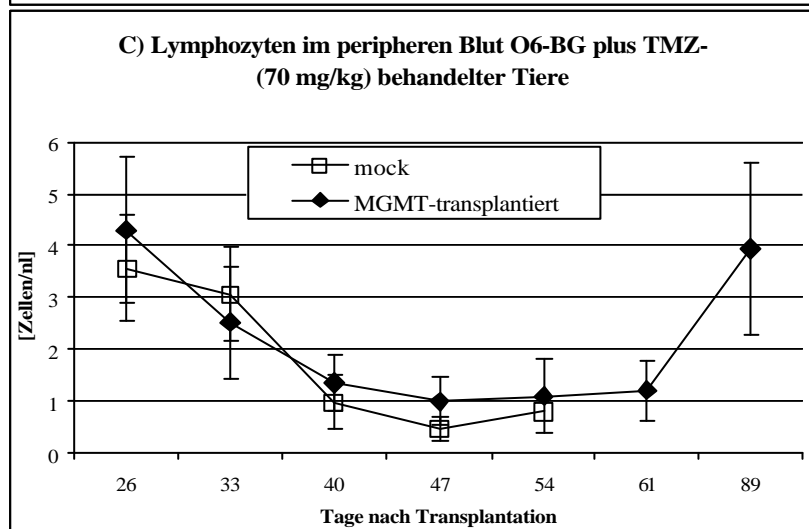
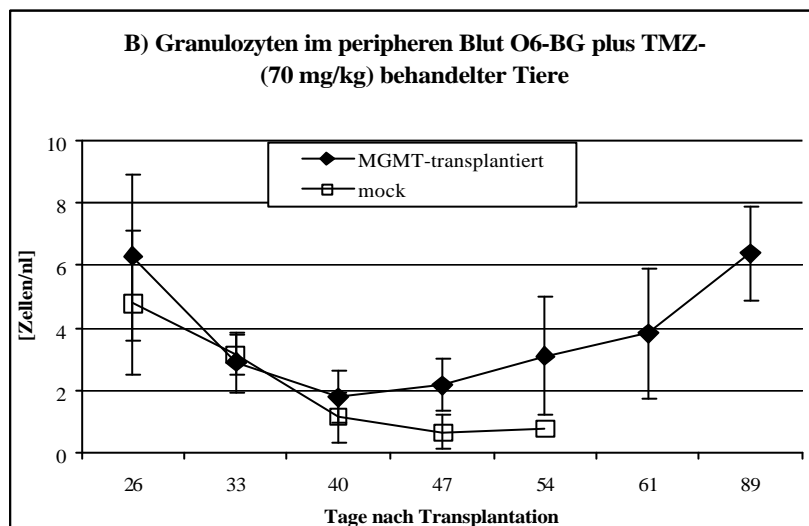
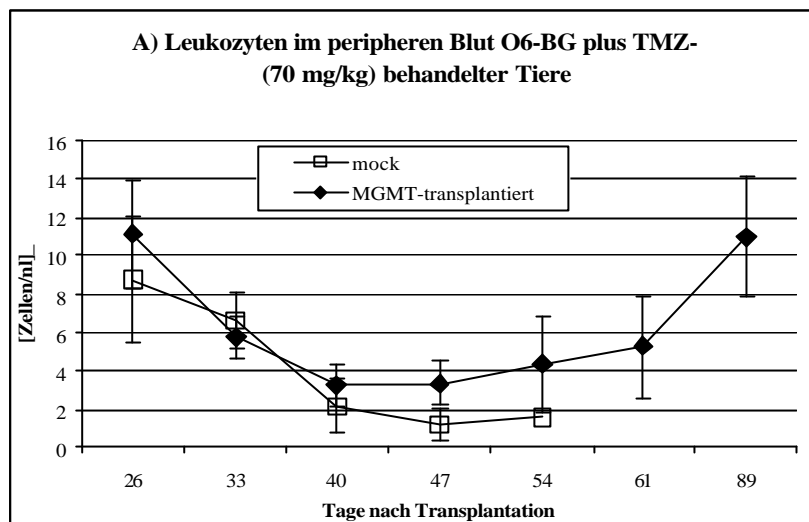


Abbildung 3-7: Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (50 mg/kg)-behandelter Tiere. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten von Tieren die mit mock- (offene Quadrate) und MGMT^{P140K}- (gefüllte Rauten) transduziertem Knochenmark transplantiert und anschließend mit O6-BG (30 mg/kg) und TMZ (50 mg/kg) behandelt wurden.

Behandlung mit O6-BG plus TMZ (70 mg/kg):

In den folgenden Experimenten bei einer Behandlung mit O6-BG plus TMZ wurde die Dosis von 50 auf 70 mg/kg angehoben, da mit der niedrigeren Dosis a) die peripheren Blutwerte beider Versuchsgruppen identisch verliefen, b) sämtliche Kontrolltiere die Therapie überlebten und c) nur eine geringe Anreicherung von GFP⁺ Zellen im peripheren Blut, Knochenmark und Milz bei Tieren mit MGMT^{P140K}-transduziertem Transplantaten nachgewiesen werden konnte. Bei Erhöhung der TMZ-Dosis auf 70 mg/kg ergab sich für die zuletzt genannten Tieren bei allen peripheren Blutwerten ein ähnlich ausgeprägter Nadir wie bei Tieren unter O6-BG plus ACNU- beziehungsweise BCNU-Therapie (siehe Abbildung 3-8). Die Zellzahlen erreichten nach zwei (Granulozyten, Leukozyten) beziehungsweise drei Behandlungen (Lymphozyten) mit O6-BG und TMZ ihren Tiefpunkt und stiegen anschließend wieder annähernd auf die Werte von Tag 26 an. Im Unterschied zur Behandlung mit O6-BG und Nitrosoharnstoff fielen die Thrombozytenwerte von anfänglich 1100/nl auf 574/nl an Tag 40 ab. Eine ausgeprägte Erholung der Zellzahl war nicht zu beobachten, so daß die Thrombozytenzahlen an Tag 89 nur bei 618/nl lag. Wiederum übereinstimmend zur kombinierten Behandlung mit Nitrosoharnstoffen stellte sich bei mock-transplantierten Tieren eine progressive Panzytopenie ein, die spätestens nach dem vierten Zyklus der Chemotherapie zum Tod der Tiere führte.



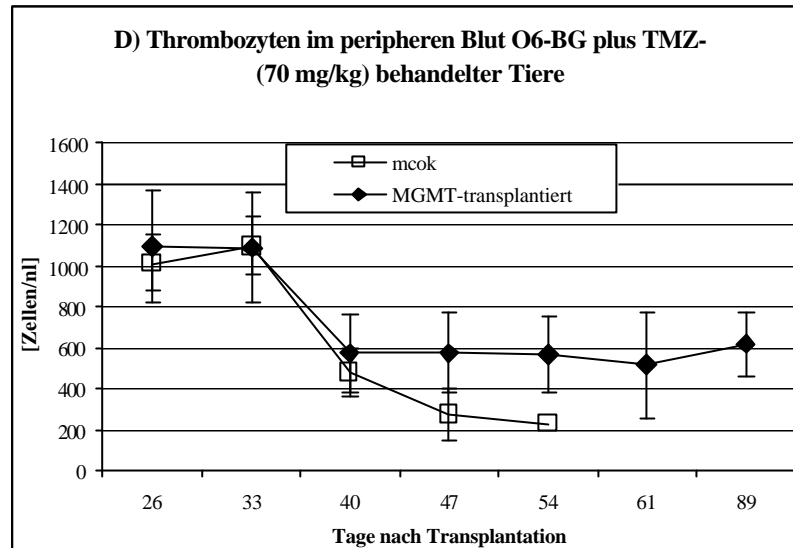
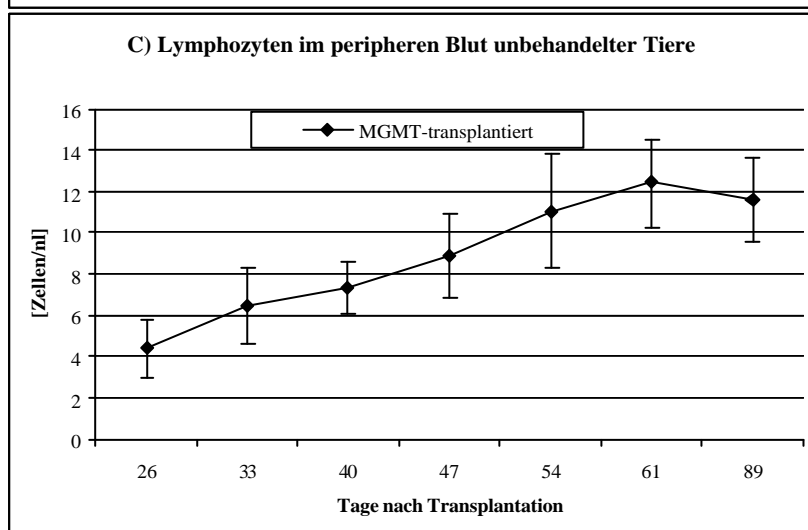
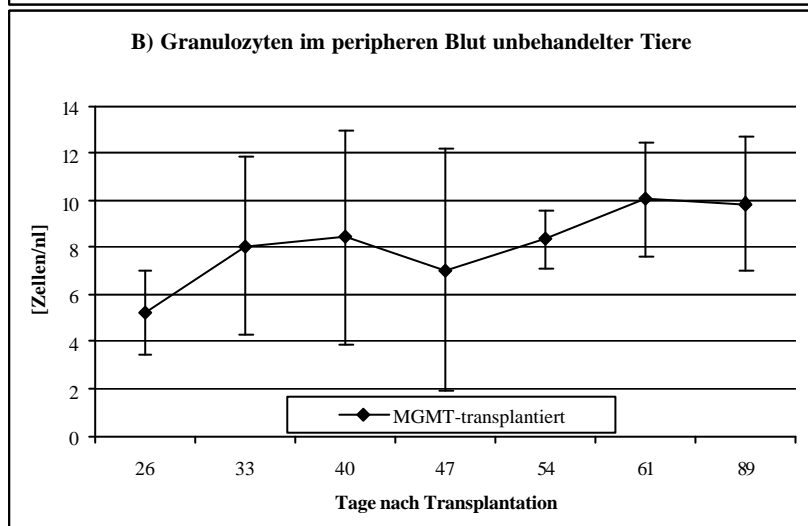
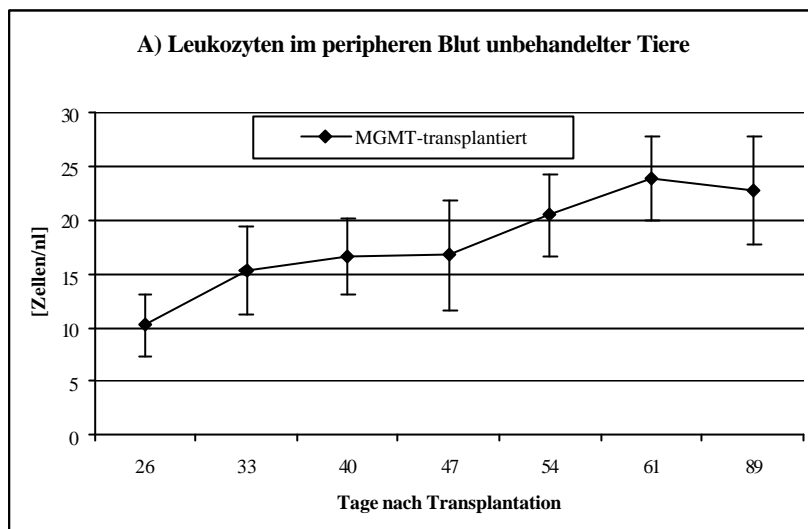


Abbildung 3-8: Zellzahlen im peripheren Blut O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (70 mg/kg)-behandelter Tiere. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten von Tieren, die mit mock- (offene Quadrate) und MGMT^{P140K}- (gefüllte Rauten) transduziertem Knochenmark transplantiert und anschließend mit O6-BG (30 mg/kg) und TMZ (70 mg/kg) behandelt wurden.

Nicht chemotherapeutisch behandelte Tiere (Kontrollen):

Die Abbildung 3-9 zeigt, daß die peripheren Blutwerte von Tieren, denen MGMT^{P140K}-transduziertes Knochenmark transplantiert wurde, jedoch nicht mit kombinierter Chemotherapie behandelt wurden, ausgehend von Tag 26 (10,2 Leukozyten/nl, 5,2 Granulozyten/nl, 4,4 Lymphozyten/nl und 1003 Thrombozyten/nl) bis Tag 61 stetig anstiegen (23,9 Leukozyten/nl, 10,0 Granulozyten/nl, 12,4 Lymphozyten/nl und 1467 Thrombozyten/nl), bevor sie bis zum Ende des Versuchs (Tag 89), mit Ausnahme der Thrombozyten die noch bis auf 1565/nl anstiegen, weitgehend konstant blieben. Somit konnte gezeigt werden, daß die bei den mock-Kontrolltieren beobachtete kontinuierliche Abnahme der Zellzahlen und das anschließende Versterben der Tiere durch die chemotherapeutische Behandlung verursacht wurde. Aus selbigem Grund nahmen bei Tieren, die MGMT^{P140K}-transduziertes Knochenmark transplantiert bekamen, die Zellzahlen im peripheren Blut bis zum zweiten/dritten Zyklus ab.



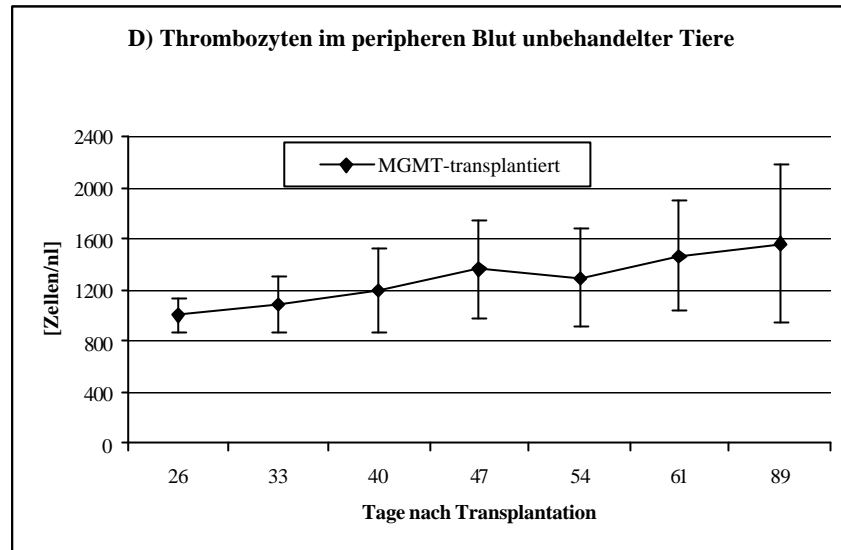


Abbildung 3-9: Zellzahlen im peripheren Blut nicht chemotherapeutisch behandelter Tiere. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Zellzahlen der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten von MGMT^{P140K}-transplantierten (gefüllte Rauten) Tieren, die keinerlei Behandlung mit kombinierter Chemotherapie erhielten.

3.4.2 Durchflußzytometrische (FACS-) Analysen der Leukozyten

Zum Nachweis der MGMT^{P140K}-transduzierten Knochenmarkszellen und deren Tochterzellen *in vivo* wurden die Granulozyten und Lymphozyten des peripheren Bluts, des Knochenmarks und der Milz einer durchflußzytometrischen Analyse unterzogen. Durch die gekoppelte Expression der MGMT^{P140K} mit dem *green fluorescent protein* vom verwendeten bicistronischen Vektorkonstrukt lassen sich MGMT^{P140K}-exprimierende Zellen identifizieren. Dieses Markierungsgen aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*, beziehungsweise die hier eingesetzte, für den Einsatz in Säugerzellen optimierte Variante (*enhanced green fluorescent protein*, GFP), läßt sich ohne zusätzliche Färbemethoden der Zellen in einem Durchflußzytometer (FACS) detektieren [Bierhuizen et al., 1997; Limon et al., 1997].

Versuche zur Behandlung mit O6-BG plus ACNU:

Der Anteil GFP-exprimierender (GFP⁺) Granulozyten im peripheren Blut 26 Tage nach der Transplantation und damit vor dem ersten Zyklus Chemotherapie betrug im Mittel 4,8% (siehe Abbildung 3-10). Dieser Wert stieg nach drei Zyklen auf 70,9% und auf 88,4% nach dem fünften Zyklus. Der Wert blieb bei 86,9% während der nächsten vier Wochen (Tag 89) auch ohne Selektionsdruck durch weitere Chemotherapie annähernd konstant.

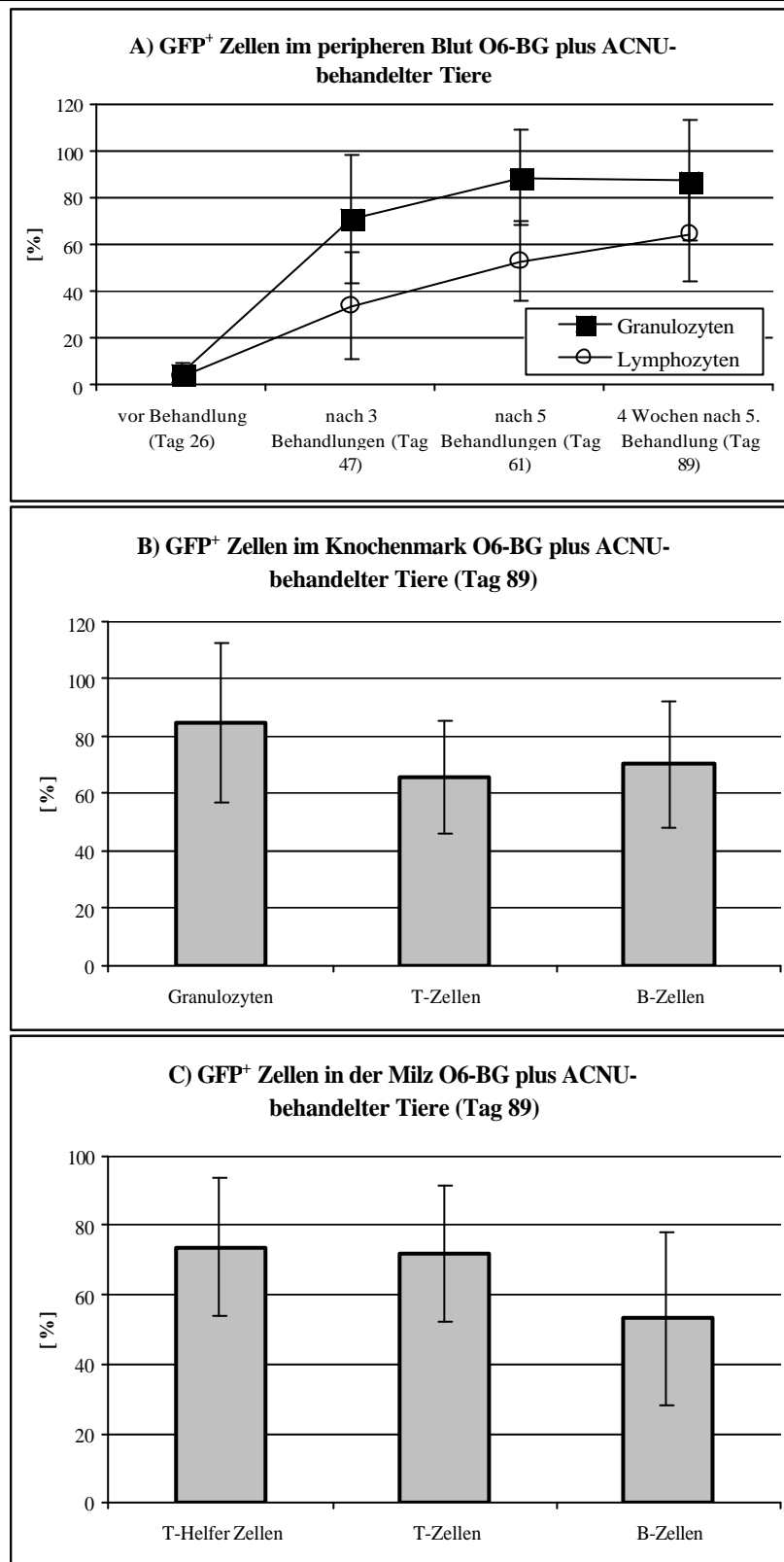


Abbildung 3-10: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten O6-BG plus ACNU-behandelter Tiere. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten (gefüllte Quadrate) und Lymphozyten (offene Kreise) unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und ACNU (6 mg/kg). In B) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 89 dargestellt. C) zeigt die Verhältnisse in der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 19 für MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere).

Zu denselben Zeitpunkten betragen die Prozentwerte der GFP⁺ Lymphozyten im peripheren Blut 3,8% (vor Behandlung, Tag 26), 33,5% (3. Zyklus), 52,8% (5. Zyklus) beziehungsweise 64,5% (Tag 89).

Somit war die Anreicherung MGMT^{P140K}-transgener Lymphozyten im peripheren Blut geringer als die für transduzierte Granulozyten. Die Selektion GFP⁺ Zellen im peripheren Blut zeigte sich auch bei den Leukozyten des Knochenmarks und der Milz. Im Knochenmark waren am Tag 89 84,7% der Granulozyten GFP⁺ und 66,0% der T-Zellen beziehungsweise 70,0% der B-Zellen GFP⁺ (siehe Abbildung 3.10). Die Anreicherung in der Milz betrug an Tag 89 71,9% (Gesamt-T-Zellen), 73,8% (T-Helfer Zellen) und 53,0% (B-Zellen).

Die Tiere, die trotz Transplantation von MGMT^{P140K}-transduziertem Knochenmark vor Ablauf des Versuchs starben (15 von 34), zeigten ebenfalls eine Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten. In dieser Gruppe stieg der Wert an GFP⁺ Granulozyten im peripheren Blut von durchschnittlich 1,4% (Tag 26) auf 78,9% (Tag 61), während die GFP-exprimierenden Lymphozyten von 1,5% auf 25,1% im selben Zeitraum anstiegen. Die letzten Tiere dieser Gruppe verstarben zwischen Tag 61 und 89, wie oben erwähnt.

Therapie mit O6-BG plus BCNU:

Im Verlauf der Chemotherapie stieg, wie die Abbildung 3-11 veranschaulicht, der Anteil der GFP⁺ Granulozyten im peripheren Blut von durchschnittlich 6,6% vor der Behandlung (Tag 26), auf 69,3% an Tag 47 bzw. 80,3% nach dem fünften Kurs (Tag 61). An Tag 89 betrug der Anteil der GFP⁺ Granulozyten 87,8%. Die Prozentzahlen für GFP⁺ Lymphozyten betragen 5,6% (Tag 26), 40,9% (Tag 47), 46,4% (Tag 61) und 53,9% an Tag 89. Auch hier lag, wie schon bei der Behandlung mit O6-BG plus ACNU, die Selektionsrate für transgene Granulozyten höher als für die entsprechenden Lymphozyten. Die an Tag 89 durchgeführten FACS-Analysen des Knochenmarks ergaben im Mittel 84,0% GFP⁺ Granulozyten, 53,8% GFP⁺ T-Lymphozyten und 60,9% GFP⁺ B-Lymphozyten. Für die Milz lag die Anreicherung von GFP⁺ B-Zellen bei 51,2%, während GFP⁺ T-Helfer und Gesamt-T-Zellen 68,5% beziehungsweise 64,0% ausmachen.

Wie bereits oben für ACNU beschrieben, überlebten auch hier nicht alle Versuchstiere bis zum Abschluß des Versuchs. Auch Tiere, die vor Tag 89 verstarben (12 von 19), zeigten wie bei ACNU plus O6-BG Behandlung im peripheren Blut eine Anreicherung GFP⁺ Leukozyten. Der initiale Anteil von GFP⁺ Granulozyten betrug 2,7% und nahm bis auf 44,0% an Tag 61 zu, die GFP-positiven Lymphozyten stiegen von 1,5% auf 14,6% an.

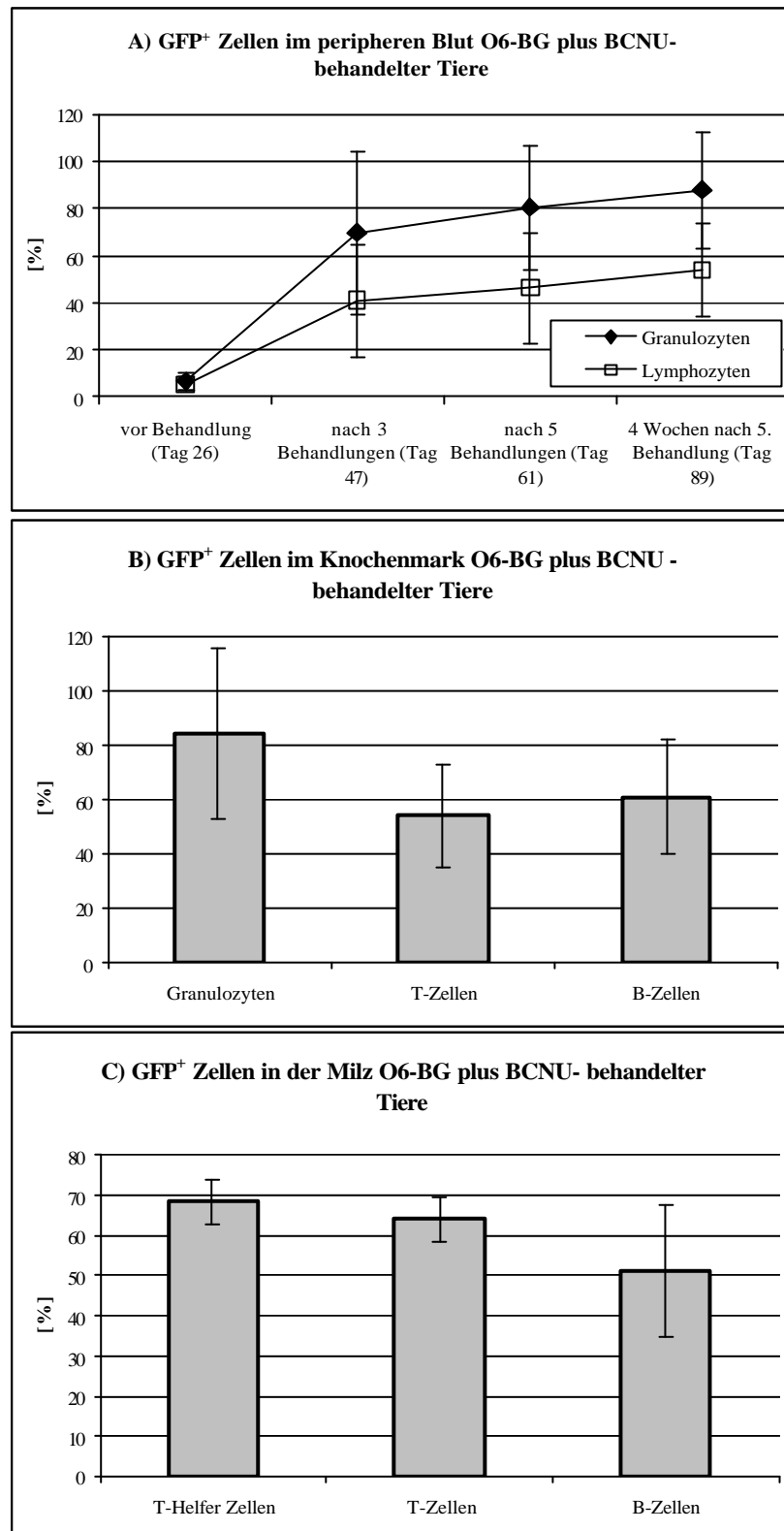


Abbildung 3-11: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten O6-BG plus BCNU-behandelter Tiere. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten (gefüllte Quadrate) und Lymphozyten (offene Kreise) unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und BCNU (10 mg/kg). In B) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 89 dargestellt. C) zeigt die Verhältnisse in der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 7 für MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere).

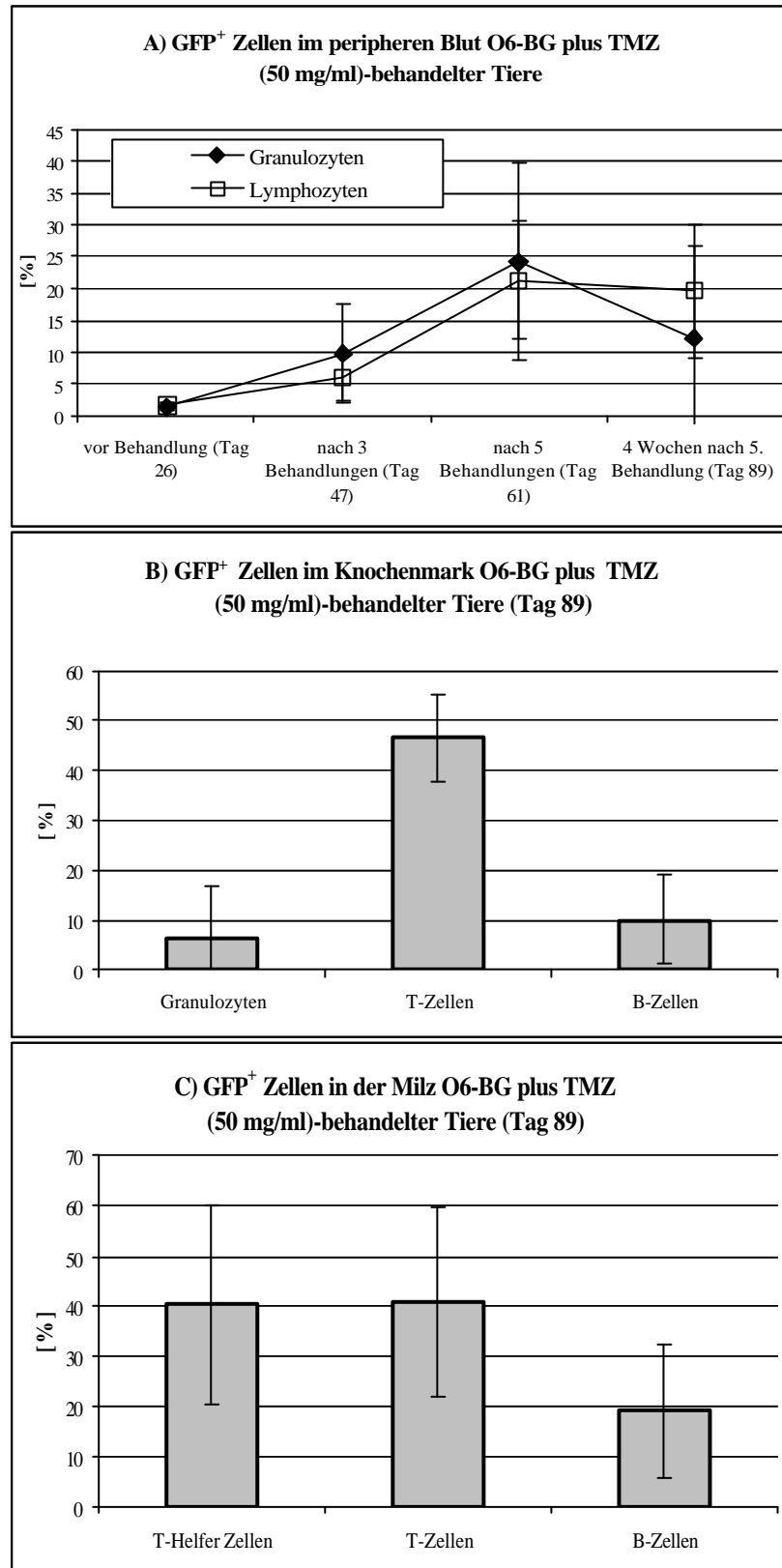


Abbildung 3-12: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (50 mg/kg)-behandelter Tiere. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten (gefüllte Quadrate) und Lymphozyten (offene Kreise) unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und TMZ (50 mg/kg). In B) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 89 dargestellt. C) zeigt die Verhältnisse in der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 4 für MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere).

Behandlung mit O6-BG plus TMZ (50 mg/kg):

Ausgehend von 1,4 % (Granulozyten) beziehungsweise 1,7% (Lymphozyten) GFP⁺ Zellen vor Zytostatikagabe, stieg der Anteil transduzierter Zellen im peripheren Blut nach dem fünften Zyklus Chemotherapie auf 24,3% respektive 21,3% an, wie in Abbildung 3-12 zu sehen ist. Der Wert blieb vier Wochen nach dem Absetzen der Chemotherapie mit 19,6% für die Lymphozyten annähernd konstant, während der Mittelwert für die Granulozyten auf 12,2% fiel. Im Knochenmark lagen die Werte für GFP-exprimierende Zellen für Granulozyten und B-Zellen unter denen des peripheren Blutes (6,5% bzw. 10,1%), während die GFP⁺ T-Zellen eine Anreicherung auf 46,5% zeigten. In der Milz entsprachen die Mittelwerte für GFP⁺ B-Zellen mit 19,2% den Zahlen des peripheren Blutes, während T-Helferzellen und Gesamt-T-Zellen mit 40,3% und 40,8% ähnlich stark angereichert waren wie im Knochenmark.

Behandlung mit O6-BG plus TMZ (70 mg/kg):

Wegen der unbefriedigenden Selektion GFP-positiver Zellen bei der Gabe von 50 mg/kg TMZ in Verbindung mit O6-BG wurden die Tiere in der Folge mit einer höheren Dosis TMZ (70 mg/kg) behandelt. Die Ergebnisse unterschieden sich deutlich von den Daten, die mit der niedrigeren TMZ Dosis erhobenen Daten. Vor Beginn der Chemotherapie befanden sich im peripheren Blut der Tiere 1,7% GFP⁺ Granulozyten (siehe Abbildung 3-13). Dieser Anteil erhöhte sich unter Behandlung auf 62,2% (nach dem 3. Kurs), erreichte 83,5% nach der fünften Behandlung und blieb auch vier Wochen nach der letzten Zytostatikagabe auf diesem Wert (83,6%). Bei den peripheren Lymphozyten nahm der Anteil GFP⁺ Zellen von 1,8% auf 21,9% (Tag 47) und auf 50,7% (Tag 61) zu und erreichte seinen Höchstwert an Tag 89 mit 76,7%. Eine erfolgreiche Selektion GFP⁺ Leukozyten wurde an Tag 89 auch im Knochenmark (Granulozyten 75,6%, T-Zellen 56,8% und B-Lymphozyten 82,0%), sowie in der Milz (Gesamt-T-Zellen 63,2%, T-Helferzellen 62,7% und B-Zellen 73,5%) nachgewiesen.

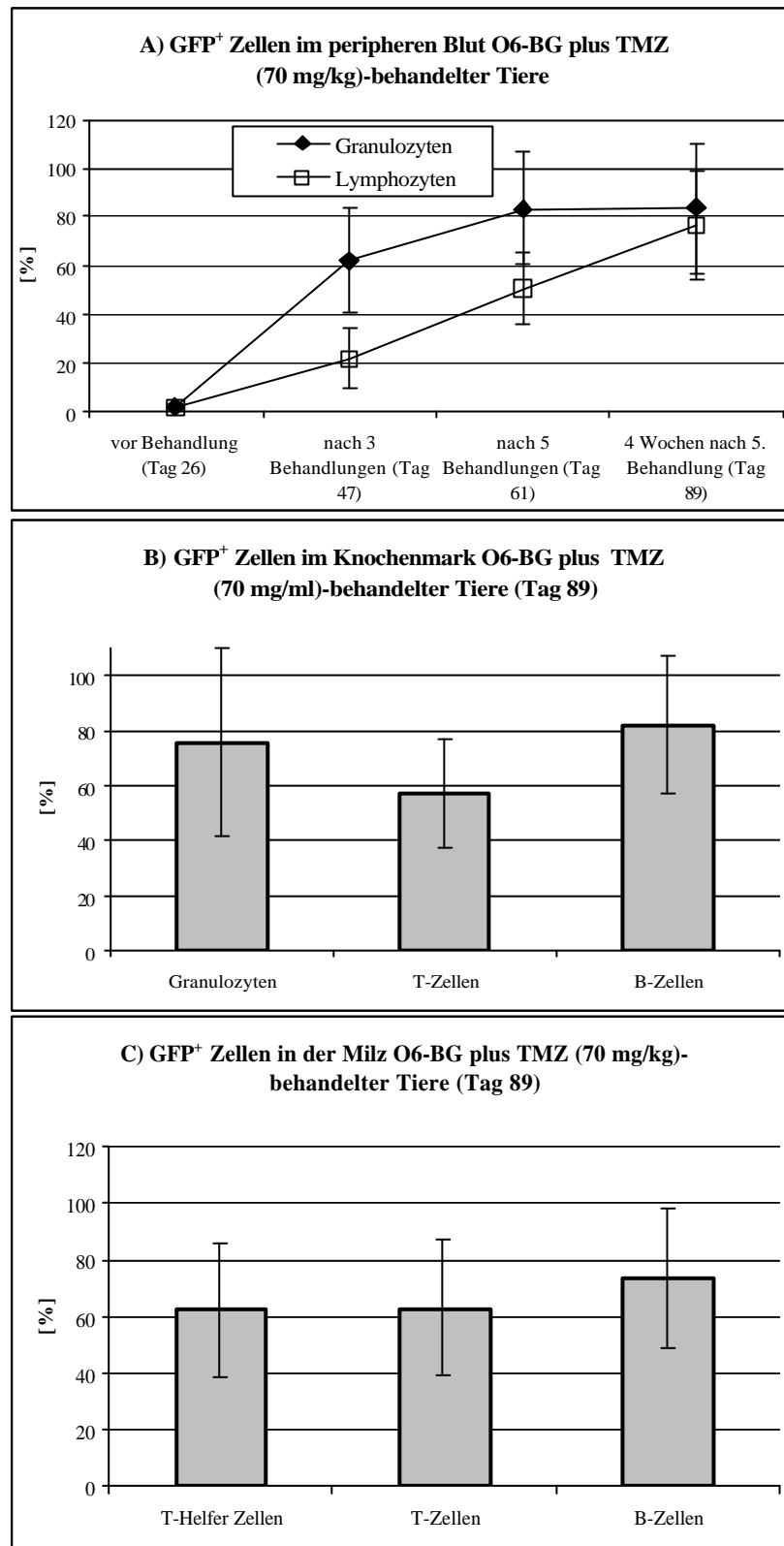


Abbildung 3-13: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten O6-BG (30 mg/kg) plus TMZ (70 mg/ml)-behandelter Tiere. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten (gefüllte Quadrate) und Lymphozyten (offene Kreise) unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und TMZ (70 mg/kg). In B) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 89 dargestellt. C) zeigt die Verhältnisse in der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 10 für MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere).

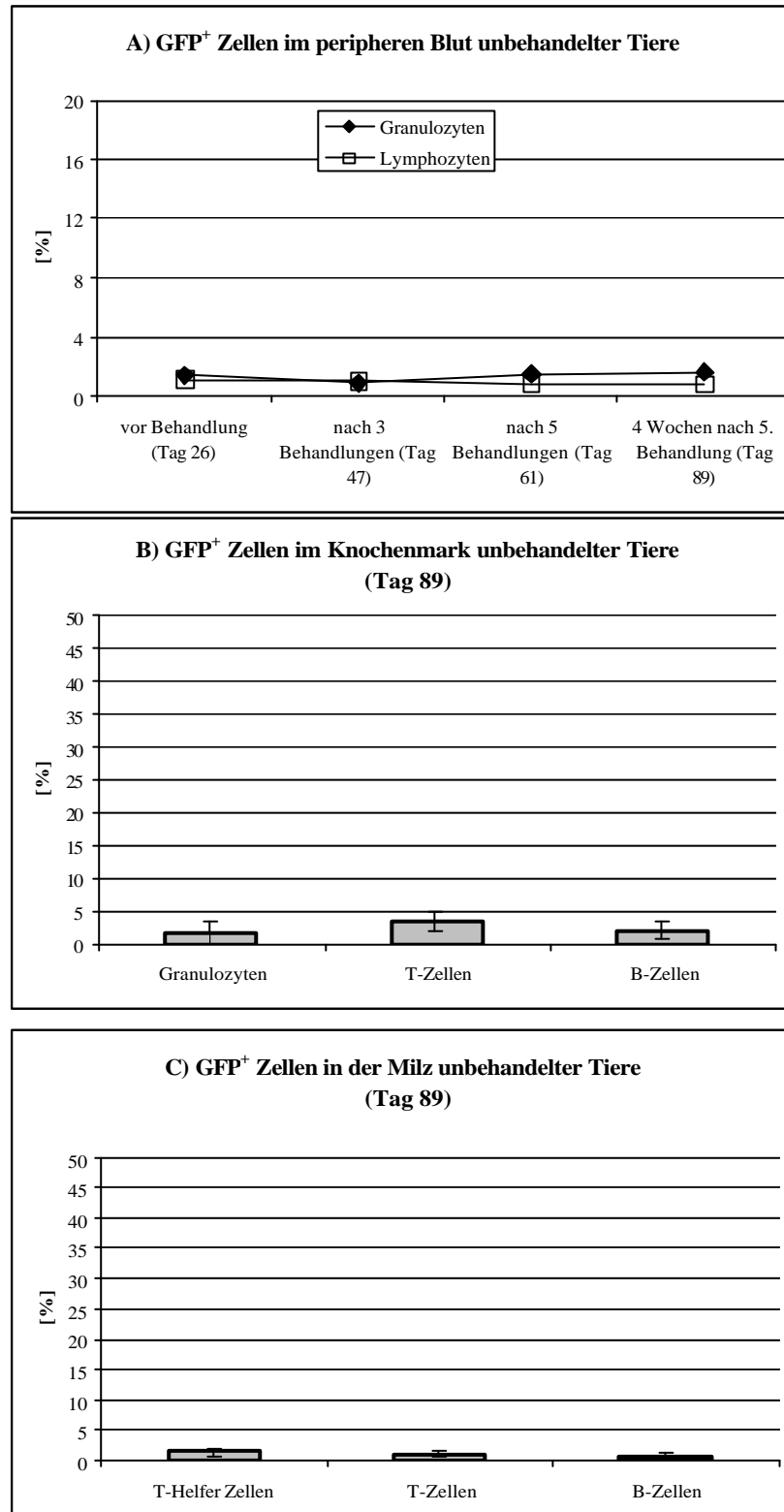


Abbildung 3-14: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten bei chemotherapeutisch unbehandelten Tieren. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten (gefüllte Quadrate) und Lymphozyten (offene Kreise) von Tieren ohne Behandlung mit kombinierter Chemotherapie. In B) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 89 dargestellt. C) zeigt die Verhältnisse in der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 7 für MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere).

Nicht chemotherapeutisch behandelte Tiere:

MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere, denen keinerlei Chemotherapie verabreicht wurde, zeigten keine großen Änderungen im Anteil GFP⁺ Leukozyten des peripheren Bluts zwischen Tag 26 und 89 (siehe Abbildung 3-14). Von initial 1,4% GFP exprimierenden Granulozyten änderte sich der Wert auf 0,9% (Tag 47), 1,5% (Tag 61) und abschließend 1,6%. Für die Lymphozyten ergab sich ein ähnlicher Verlauf. Hier lagen die Werte zwischen 1,1% (Tag 26) und 0,8% (Tag 89). Auch im Knochenmark und in der Milz ließ sich an Tag 89 keine Anreicherung von GFP⁺ Zellen beobachten. Im Knochenmark lagen die Werte bei Abschluß des Experiments (Tag 89) für GFP-transgene Zellen bei 1,7% (Granulozyten), 3,4% (T-Zellen) und 2,1% (B-Zellen). Etwas niedriger lagen die Werte in der Milz mit 1,0% GFP⁺ Gesamt-T-Zellen, 1,4% GFP⁺ T-Helferzellen und 0,7% GFP⁺ B-Zellen.

3.4.3 *Vergleich der Körpergewichte ACNU- und TMZ-behandelter Tiere*

Neben der dosislimitierenden Hämatotoxizität zeigte eine intensive Chemotherapie, wie sie hier an den Tieren durchgeführt wurde, weitere Organtoxizitäten, zum Beispiel im Bereich des Darms. Diese Nebenwirkungen führten unter anderem zu einer Reduktion des Körpergewichts. Während unbehandelte Tiere von Tag 26 bis Tag 89 eine leichte Zunahme des Körpergewichts von durchschnittlich 20,1g auf 21,0g zeigten, nahm das Gewicht ACNU-behandelter Tiere im selben Zeitraum von 19,5g kontinuierlich auf 16,5g ab (siehe Abbildung 3-15). TMZ-behandelte Tiere (70 mg/kg) nahmen von Tag 26 von 19,2g bis auf 17,8g an Tag 42 ab, um anschließend wieder auf durchschnittlich 18,9g an Tag 89 zuzunehmen.

BCNU-behandelte Tiere wurden hier nicht berücksichtigt, da keine Daten zum Verlauf des Körpergewichts von Tieren aus dieser Gruppe erfaßt wurden.

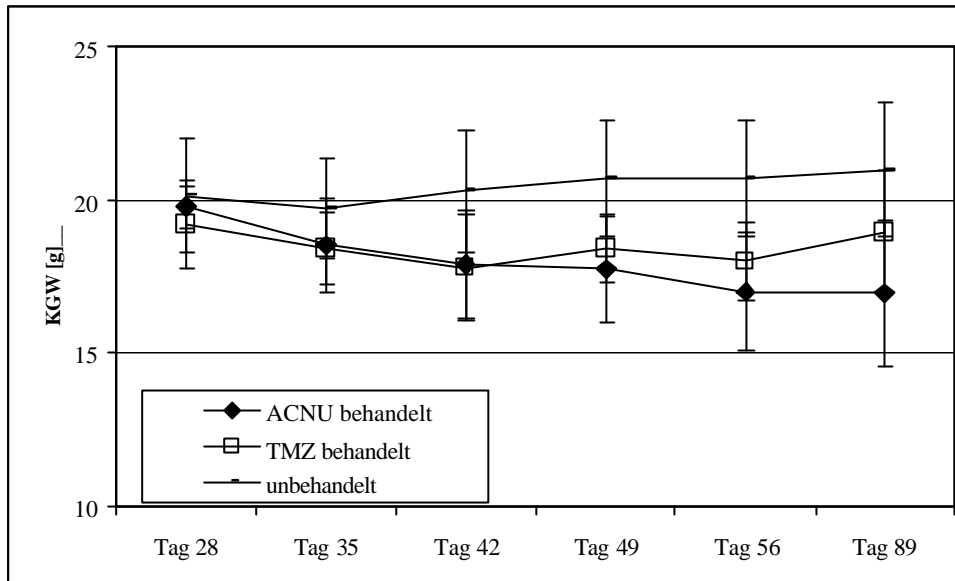


Abbildung 3-15: Körpergewichte der Versuchstiere. Im Diagramm ist die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere aufgetragen, die mit 30 mg/kg O6-BG und 6 mg/kg ACNU (gefüllt Rauten, n = 8) oder 30 mg/kg O6-BG und 70 mg/kg TMZ (offene Quadrate, n = 10) behandelt wurden. Als Kontrolle sind die Gewichte von MGMT^{P140K}-transplantierten und chemotherapeutisch unbehandelten Tieren (kurze Balken, n = 7) abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA.

3.4.4 ACNU-Resistenz klonogener Knochenmarkszellen nach Behandlung mit O⁶-Benzylguanin plus O⁶-alkylierenden Agenzien

Zur Überprüfung der funktionellen Aktivität der MGMT^{P140K} in den transgenen Zellen der Versuchstiere wurde von Knochenmarkszellen, die am Tag 89 aus Tieren des Versuchs #V (siehe Tabelle 3-8) gewonnen wurden zum Nachweis klonogener hämatopoetischer Zellen Methylzellulosekulturen angesetzt. Die Zellen der Tiere wurden dabei in steigenden Konzentrationen der Substanz ACNU inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Knochenmarkszellen aus einem MGMT^{P140K}-transplantierten, aber chemotherapeutisch unbehandeltem Tier.

Bei den Kontrollen betrug die Überlebensrate der Vorläuferzellen 78,7% bei 3 μ g/ml ACNU, 38,7% bei 10 μ g/ml und 2,7% bei 30 μ g/ml, wie aus der Abbildung 3-16 zuentnehmen ist. Demgegenüber zeigten die hämatopoetischen Zellen von O6-BG plus ACNU-beziehungsweise O6-BG plus TMZ (70 mg/kg)-behandelten Tieren, mit Anreicherungen von 34,8% - 96,3% GFP⁺ Zellen im Knochenmark, eine höhere ACNU Resistenz. Die Unterschiede sind am deutlichsten bei ACNU-Konzentrationen zwischen 10 beziehungsweise

30 µg/ml zu beobachten. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in der LD50 wider. Während der Wert für klonogene Zellen des Knochenmarks der Negativkontrollen bei 8,0 µg/ml lag, wurde die LD50 bei den anderen Zellen erst zwischen 13,7 und 20,0 µg/ml erreicht.

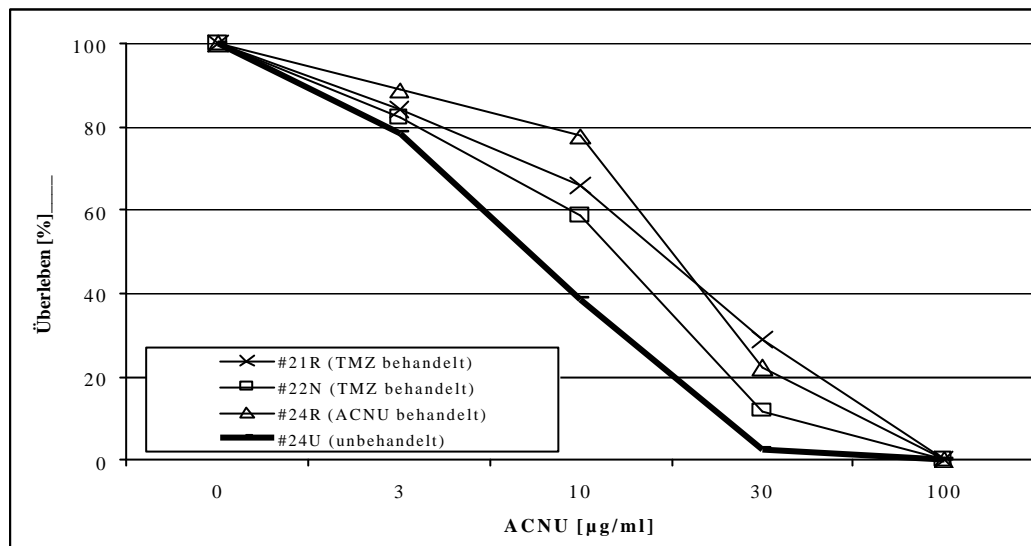


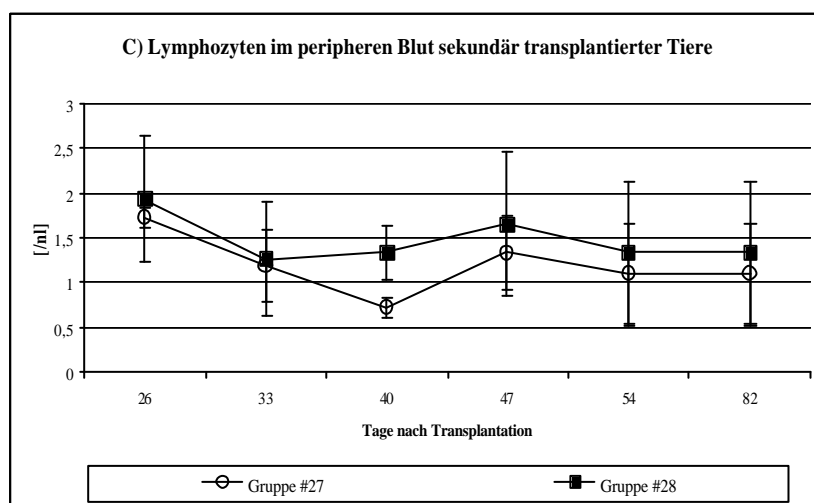
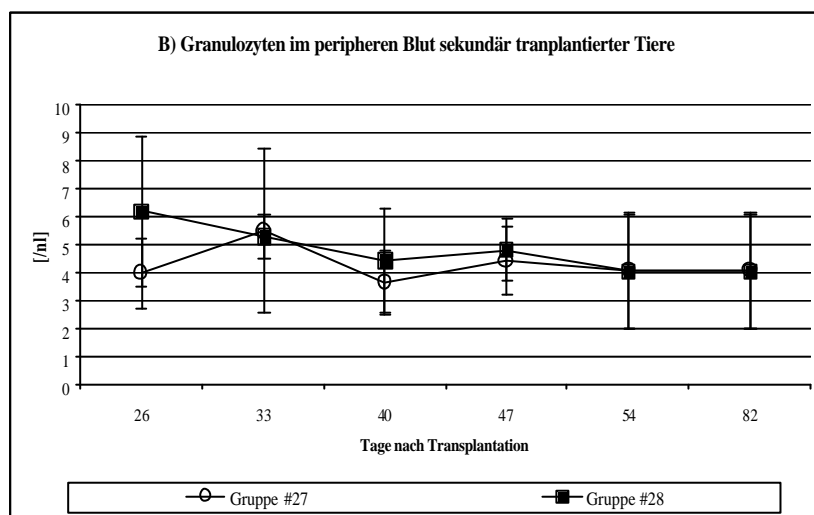
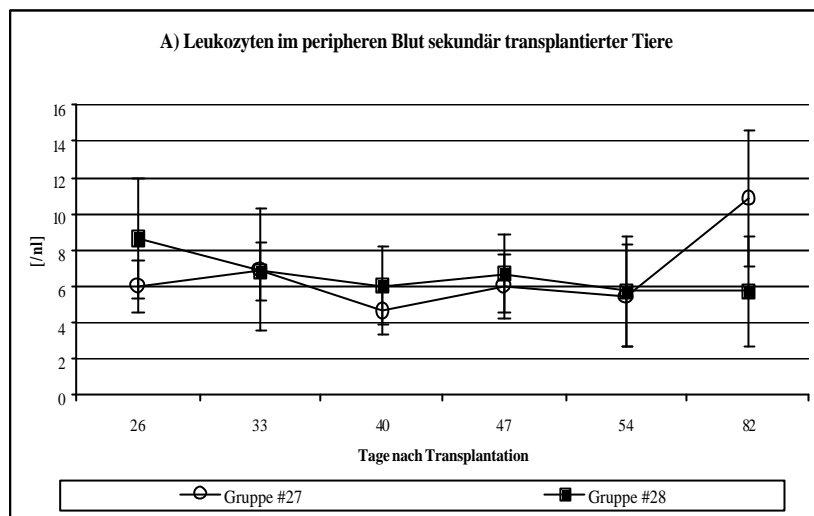
Abbildung 3-16: ACNU-Resistenz klonogener Knochenmarkzellen von Versuchstieren. Dargestellt ist die ACNU-Toleranz klonogener Knochenmarkzellen, die an Tag 89 aus drei chemotherapeutisch behandelten Tieren und einem unbehandelten Kontrolltier isoliert wurden. Allen Tieren wurden an Tag 0 MGMT^{P140K}-transduzierte Knochenmarkzellen transplantiert.

3.4.5 Knochenmarktransplantationen der zweiten Generation (Sekundärtransplantationen)

Neben der Verwendung in klonogenen Versuchen wurden die Knochenmarkzellen an Tag 89 von Tieren, die alle fünf Zyklen der Chemotherapie erhalten hatten, erneut in letal bestrahlte (sekundäre) Rezipienten transplantiert. Diese Experimente sollten weiteren Aufschluß darüber geben, ob es sich bei den transduzierten, repopulierenden Zellen aus den primären Tieren um „echte“ Stammzellen handelt, welche die Fähigkeit zur Langzeitrepopulierung besitzen, wie dies bereits für DHFR-transduzierte Knochenmarkzellen demonstriert wurde [Corey et al., 1990]. Den sekundären Empfängern wurden 3×10^6 (Gruppe #27, n = 3) beziehungsweise $2,5 \times 10^6$ (Gruppe #28, n = 3) Knochenmarkzellen je Tier i.v. injiziert. Im Unterschied zu den primären Versuchstieren erhielten die sekundär transplantierten Tiere aus Gründen der Zeitersparnis nur vier Zyklen der kombinierten Chemotherapie bei ansonsten unverändertem Versuchsablauf.

Blutwerte der Versuchstiere:

Während bei Gruppe #28 eine Abnahme der Anzahl weißer Blutzellen im peripheren Blut von 8,7/nl auf 5,7/nl über den Zeitraum der Versuchsdauer zu verzeichnen war, stiegen die Mittelwerte der Leukozytenzahlen der Gruppe #27 auf 10,9/nl und lagen damit oberhalb des Ausgangswertes von 6/nl (siehe Abbildung 3-17). Die Abnahme der Gesamtzellzahl der Leukozyten der Gruppe #28 spiegelte sich auch in den Populationen der Granulozyten und Lymphozyten wider. Die Zahl der Granulozyten sank im Verlauf des Versuchs von 6,2/nl auf 4,0/nl. Im selben Zeitraum sank der mittlere Lymphozytenwert von 1,9/nl auf 1,3/nl. In der Gruppe #27 blieb die Zahl der Granulozyten während des Beobachtungszeitraums nahezu konstant mit 4,0/nl an Tag 26 (vor der ersten Behandlung) beziehungsweise 4,0/nl vier Wochen nach der letzten Chemotherapie. Die Zahl der Lymphozyten nahm aber, wie bei Gruppe #28, von durchschnittlich 1,7/nl auf 1,1/nl ab. Nahezu identisch war die Entwicklung der Thrombozytenzahlen innerhalb beider Gruppen. Nach anfänglicher Zunahme der Werte gegenüber dem Ausgangswert vor der Behandlung, fallen die Blutplättchenzahlen nach Tag 40 (nach der 2. i.p. Injektion) wieder ab und sanken mit 657/nl (Gruppe #27) beziehungsweise 694/nl (Gruppe #28) an Tag 54 auf Zellzahlen unterhalb der Ausgangswerte. Vier Wochen nach dem 4. und letzten Kurs der Chemotherapie war jedoch eine Erholung auf Werte von 872/nl bei der Gruppe #27 beziehungsweise 986/nl bei Gruppe #28 zu beobachten. Somit nahmen die Zellzahlen im peripheren Blut sekundär-transplantierte Tiere unter Chemotherapie nicht so stark ab, wie dies bei den primär-transplantierten Versuchstieren beobachtet werden konnte.



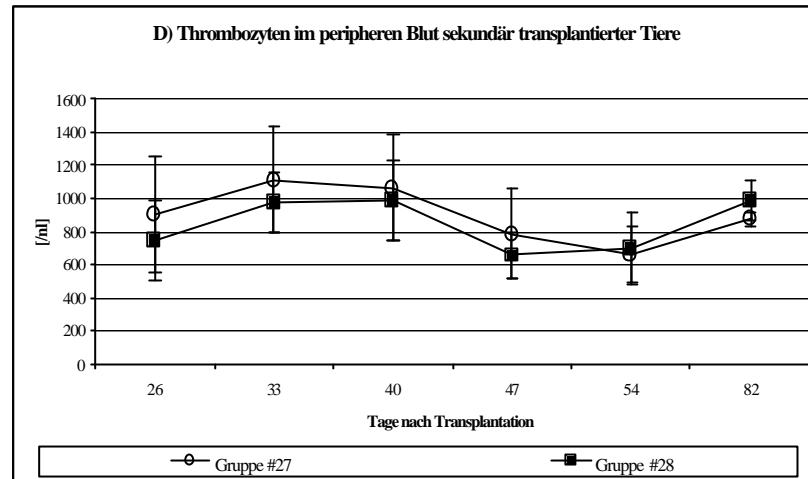


Abbildung 3-17: Zellzahlen im peripheren Blut sekundär transplantiertes Tiere. Die Tiere wurden mit O6-BG plus ACNU behandelt. Die Daten demonstrieren den Verlauf der A) Leukozyten, B) Granulozyten, C) Lymphozyten und D) Thrombozyten zweier Gruppen sekundär MGMT^{P140K}-transplantiertes Tiere unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und ACNU (6 mg/kg). Jede Gruppe besteht aus n = 3 Tieren und repräsentiert die Sekundärtransplantationen von einem primären-transplantiertes Versuchstier. Dargestellt sind Mittelwerte ± SA.

Durchflußzytometrie des peripheren Blutes, des Knochenmarks und der Milz der Versuchstiere:

Die Analyse der Granulozyten des peripheren Blutes über die Versuchsdauer zeigte ausgehend von Werten über 80% eine weitere stetige Anreicherung GFP⁺ Zellen (siehe Abbildung 3-18). In der Gruppe #27 stieg der Anteil GFP-exprimierender Granulozyten von durchschnittlich 83,0% auf 96,9%, in der Gruppe #28 von 95,3% auf 99,0% an. Ebenso ließ sich in beiden Gruppen eine weitere Anreicherung für die Lymphozyten des peripheren Blutes beobachten. Während die Anzahl GFP⁺ Lymphozyten in der Gruppe #27 initial von 11,9% auf 66,9% vier Wochen nach der letzten i.p. Injektion zunahm, stieg dieser Anteil in der Gruppe #28 von 43,8% auf 76,7%. Die an Tag 82 vorgenommenen Untersuchungen am Knochenmark der Tiere bestätigten diese sehr hohen Werte für die Anreicherung GFP⁺ Zellen und lagen sogar noch geringfügig höher als im peripheren Blut. In der Gruppe #27 waren 99,5% der Granulozyten, 78,2% der T-Zellen und 91,9% der B-Lymphozyten GFP⁺, in Gruppe #28 waren 99,4% der Granulozyten, 85,3% der T-Lymphozyten und 96,0% der B-Zellen GFP⁺. Die Selektion GFP-produzierender Zellen in den lymphoiden Zellpopulationen der Milz an Tag 82 lag im Bereich der Werte, die für das periphere Blut ermittelt wurden.

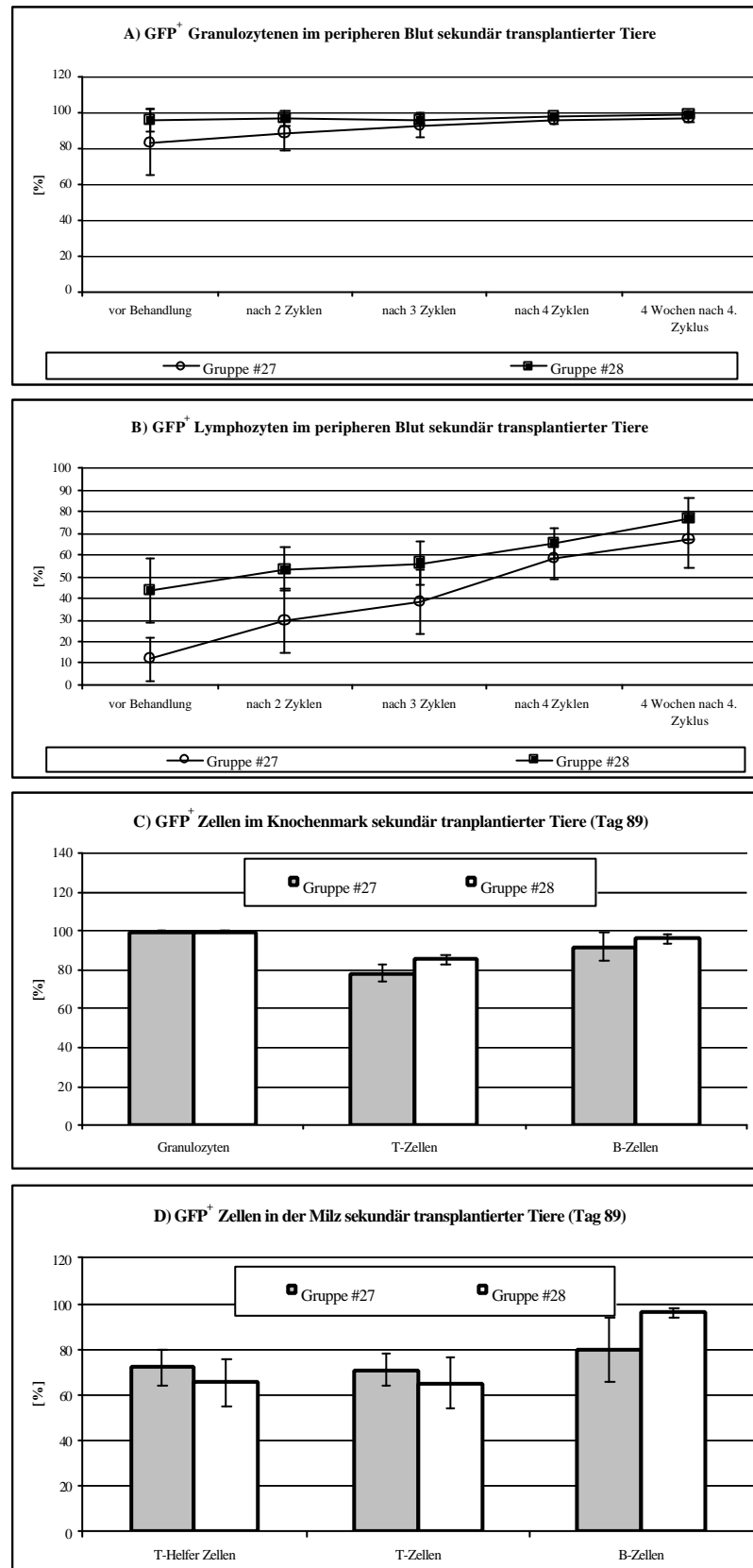


Abbildung 3-18: Anreicherung von GFP⁺ Leukozyten in sekundär transplantierten Tieren. Die Tiere wurden mit O6-BG plus ACNU behandelt. Teil A) der Abbildung zeigt die Anreicherung GFP⁺ Granulozyten im peripheren Blut. Die Abbildung B) zeigt die Selektion von transgenen Lymphozyten unter Behandlung mit O6-BG (30 mg/kg) und ACNU (6 mg/kg) im peripheren Blut auf. In C) ist der Anteil GFP-exprimierender Leukozytenpopulationen im Knochenmark an Tag 82 dargestellt. D) zeigt die analogen Werte für die Lymphozyten der Milz zum selben Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA (n = 3 je Gruppe).

Die Mittelwerte für T-Helferzellen, T-Zellen und B-Lymphozyten der Gruppe #27 lagen bei 72,0%, 70,9% und 79,4%, beziehungsweise für Gruppe #28 bei 65,2%, 65,0% und 95,9%. Es zeigte sich, daß die sekundär-transplantierten Tiere bereits vor Beginn der Chemotherapie einen hohen Prozentsatz GFP⁺ Zellen im peripheren Blut besaßen. Unter Chemotherapie ließ sich dieser Wert noch steigern, so daß im Falle der Granulozyten nahezu 100% der Zellen GFP exprimierten. Die hohe Anreicherung GFP⁺ Blutzellen konnte ebenfalls im Knochenmark und in der Milz beobachtet werden.

4 DISKUSSION:

Eine wichtige und häufig dosislimitierende Komplikation der chemotherapeutischen Behandlung von Tumorpatienten ist die Hämatotoxizität der verwendeten Zytostatika. Bei Hochdosischemotherapien werden aus diesem Grund bereits routinemäßig autologe Stammzelltransplantate sowie die Applikation hämatopoetischer Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der Hämatopoese eingesetzt [Boogaerts et al., 1996]. Ein alternativer Ansatz, der zur Zeit in diesem Zusammenhang untersucht wird, ist die Ex-vivo-Transduktion hämatopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen mit Chemotherapie-Resistenzgenen. Die so veränderten Zellen sollen nach Transplantation das blutbildenden Systems mit einer erhöhter Chemotherapieresistenz ausstatten. Die prinzipielle Durchführbarkeit dieser Methode wurde im Mausmodell mit den Resistenzgenen *mutDHFR* und *MDR1* bereits belegt [Corey et al., 1990; Sorrentino et al., 1992; May et al., 1995; Eckert et al., 1996]. In der hier vorliegenden Dissertation wurden nun Untersuchungen zum Transfer des DNA-Reparaturproteins MGMT in hämatopoetische Zellen zum Schutz vor zytostatikainduzierter Toxizität durchgeführt.

Die dosislimitierende Toxizität der Chlorethylnitrosoharnstoffe (CENU) ist eine verzögert auftretende Myelosuppression, die insbesondere die Myelozyten und Thrombozyten betrifft und dadurch entscheidend zur Morbidität und Mortalität bei der Behandlung mit Medikamenten dieser Gruppe beiträgt [Spiro et al., 1999]. Verursacht wird diese Toxizität durch die Alkylierung der O⁶-Position von Guaninresten in der DNA. Addukte dieses Typs werden auch von monofunktionalen Medikamenten wie den Triazenderivaten Dacarbazin, Procarbazin und Temozolomid verursacht. Die Behandlung mit diesen Agenzien ist ebenfalls mit einer schweren Hämatotoxizität assoziiert [Newlands et al., 1992]. Die Reparatur von O⁶-Guaninaddukten wird durch die niedrige endogene Expression des DNA-Reparaturproteins MGMT in hämatopoetischen Zellen eingeschränkt [Gerson et al., 1985]. Im Gegensatz zu anderen Geweben lässt sich die endogene MGMT-Expression in hämatopoetischen Zellen auch nicht durch Alkylierungsschäden oder durch Proliferation induzieren [Pegg, 1990]. Aus diesem Grunde erschien es erstrebenswert zu untersuchen, ob sich durch Überexpression der MGMT in hämatopoetischen Zellen die Toleranz dieser Zellen gegenüber den Medikamenten ACNU, BCNU, CCNU und Temozolomid steigern lässt.

4.1 Schutz retroviral-transduzierter muriner Vorläuferzellen vor der Zytotoxizität verschiedener Chemotherapeutika

Die Experimente wurden *in vitro* mit murinen klonogenen Zellen durchgeführt. Hierbei überlebten mehr MGMT-transduzierte Zellen bei Inkubation mit den unterschiedlichen DNA-alkylierenden Substanzen als mock-transduzierte Kontrollzellen, so daß für alle der alkylierenden Medikamente von einem Schutz der klonogenen hämatopoetischen Zellen durch die MGMT-Überexpression auszugehen ist. Diese Protektion war am stärksten gegenüber Substanzen aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU und CCNU). Im mittleren Konzentrationsbereich der getesteten Substanzen betrug die Differenz der Überlebensraten zwischen MGMT- und mock-transduzierten Zellen zwischen 30 und 40%. Zumindest für diesen Anteil der Zellen wurde somit eine funktionell wirksam erhöhte MGMT-Aktivität in den Zellen erreicht, auch wenn der Anteil erfolgreich transduzierter Zellen höher lag (ca. 70- 90%).

Eine erfolgreiche Transduktion der Zellen ist also nicht zwingend mit einer Expression des Transgens verbunden. So ist beschrieben, daß die Integration des Provirus in einem transkriptionell inaktivem Bereich erfolgen kann oder fremde DNA-Sequenzen durch Methylierung inaktiviert werden können [Di Ianni et al., 1999].

Im Vergleich zu den Nitrosoharnstoffen war der vermittelte Schutz im Falle der Triazenverbindung Temozolomid (TMZ) weniger stark ausgeprägt. Im Unterschied zu den chloroethylierenden Nitrososharnstoffen ist Temozolomid eine monofunktionale, methylierende Triazenverbindung [Tentori et al., 1995]. Aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus von Temozolomid und Nitrosoharnstoffen mag das Spektrum der verursachten DNA-Addukte variieren. Eine mögliche Erklärung der geringeren Protektion gegenüber Temozolomid durch MGMT-Überexpression mag auch in der Tatsache begründet sein, daß die Toxizität von Temozolomid nicht prädominant durch O⁶-Alkylierung ausgelöst wird. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, daß die durch TMZ verursachten Methylierungen effektiver von den Zellen repariert werden können als die durch Nitrosoharnstoffe verursachten Chloroethylierungen. Eventuell führen aber auch Chloroethylierungen an der O⁶-Position des Guanins in der Folge schneller zur Vernetzung der DNA-Stränge als Methylierungen an derselben Position.

Erwartungsgemäß wurde kein Unterschied im Überleben zwischen mock- beziehungsweise N2/Zip-pgkpr-MGMT-transduzierten Zellen für die Substanzen Cisplatin und Thiotepa

beobachtet. Diese ebenfalls DNA-schädigenden Substanzen verfügen über kein O⁶-Alkylierungspotential und wurden deshalb als Kontrollsubstanzen gewählt.

Aus diesen Beobachtungen ließ sich schließen, daß hämatopoetische Vorläuferzellen sich durch Überexpression der MGMT vor der Zytotoxizität verschiedener alkylierender Substanzen schützen ließen. Aus *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten ist bekannt, daß eine Überexpression der MGMT in murinen hämatopoetischen Zellen diese vor BCNU induzierter Hämatotoxizität *in vitro* schützen kann [Allay et al., 1995; Moritz et al., 1995; Jelinek et al., 1996]. Vielversprechender sind noch die Ergebnisse aus Studien an humanen CD34⁺ Zellen, die nach Transduktion mit einer O⁶-BG resistenten MGMT-Mutante bei anschließender Behandlung mit O⁶-BG in Kombination mit BCNU eine 5,6-fach erhöhte Resistenz gegenüber nicht transduzierten Zellen aufwiesen [Reese et al., 1999].

Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß im murinen System die Transplantation von *ex vivo* MGMT-transduzierten hämatopoetischen Zellen zu einer verminderten Sterblichkeit bei Tieren unter BCNU-Behandlung führte [Maze et al., 1997].

Bisherige Studien zum MGMT-Gentransfer haben sich wie erwähnt zumeist auf die Untersuchung der Substanz BCNU beschränkt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß MGMT-Überexpression hämatopoetische Zellen auch vor der Hämatotoxizität anderer Zytostatika effektiv schützte. Folglich steht bei einer klinischen Anwendung des MGMT-Gentransfers eine erweiterte Auswahl an Medikamenten zur Verfügung. Dies ist von Bedeutung, da gerade bei Behandlung im Rahmen von Hochdosisprotokollen neben der Hämatotoxizität auch andere Organtoxizitäten auftreten können. Für BCNU sind unter anderem Lungenfibrosen, sowie Leber- und Nierenprobleme beschrieben worden [Weiss & Poster, 1982; Weiss & Trush, 1982]. Alternative Medikamente mit einem modifizierten Nebenwirkungsspektrum, wie ACNU und CCNU, stellen hier in vielen Situationen eine therapeutische Alternative dar. Möglicherweise läßt sich so auch das Spektrum der Tumorentitäten, die für einen Einsatz der MGMT-Gentherapie in Frage kommen, erweitern. Während Nitrosoharnstoffe aufgrund ihrer Liquorgängigkeit insbesondere bei der Therapie von Gehirntumoren Verwendung finden [Maze et al., 1994], werden Triazenderivate wie das TMZ darüber hinaus auch bei der Behandlung von malignen Melanomen eingesetzt [Newlands et al., 1992]. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, daß der Schutz MGMT-transduzierter Zellen für Temozolomoid deutlich geringer ist als bei den Nitrosoharnstoffverbindungen. Dies legt die Vermutung nahe, daß TMZ im Vergleich weniger Läsionen an der O⁶-Position des Guanins in der DNA erzeugt als Nitrosoharnstoffe. Dieses Problem läßt sich jedoch durch die Verwendung von MGMT-Mutanten, die insensitiv

gegenüber dem wtMGMT spezifischen Inhibitor O6-BG sind, überkommen [Davis et al., 1999a ; Loktionova et al., 1999]. Durch die Verabreichung von O6-BG läßt sich die endogene Aktivität der MGMT der Tumorzellen effektiv hemmen [Dolan et al., 1993]. Dies führt zu einer Potenzierung der Zytotoxizität parallel verabreichter alkylierender Chemotherapeutika [Chinnasamy et al., 1997]. Einzig mutMGMT-transduzierte Knochenmarkzellen wären vor der Toxizität der Behandlung geschützt .

4.2 Testung verschiedener Vektorkonstrukte zur Expression der MGMT in hämatopoetischen Zellen

Da es sich bei der Reparatur von DNA-Alkylierungen durch die MGMT um eine stöchiometrische Reaktion handelt, ist für eine optimale Protektion in den hämatopoetischen Zielzellen eine möglichst hohe Expression der MGMT erforderlich. Zur Optimierung der Expression von Transgenen durch retrovirale Konstrukte existieren mehrere Strategien (siehe 1.3.4). Die unten diskutierten Experimente sollten aus einer Auswahl von verschiedenen Vektoren jenes Grundgerüst ermitteln, das die höchste Expression der MGMT, entweder als Einzelgen oder in Kombination mit einem zweiten Gen, in hämatopoetischen Vorläuferzellen vermittelt. Dabei wurde die funktionelle Expression der MGMT in retroviral transduzierten Zellen durch das Ausmaß der vermittelten ACNU-Resistenz gemessen. Die Experimente wurden an humanen Vorläuferzellen durchgeführt, um sich dem menschlichen System anzunähern. Darüberhinaus wurden für die Versuche ebenfalls murinen HPP-CFC eingesetzt, um die Ergebnisse aus den Vorläuferzellen mit den Resultaten für eine unreifere, pluripotente Zellpopulation vergleichen zu können.

4.2.1 Untersuchungen an humanen koloniebildenden Zellen

Der N2/Zip-pgkpr-MGMT-Vektor basiert auf den Sequenzen des MMLV und exprimiert die cDNA der humanen wtMGMT unter Kontrolle des internen Promotors der humanen

Phosphoglyzeratkinase (pgkpr). MSCV-MGMT and MSCV-MGMT-pgkpr-NEO exprimieren die humane wtMGMT vom 5' LTR des MSCV, während der MSCV-MGMT-pgkpr-NEO Vektor zusätzlich die cDNA der Neomycinphosphotransferase (NEO) vom internen Phosphoglyzeratkinase-Promotor (pgkpr) transkribiert. Dies ermöglicht die Untersuchung des Einflusses einer zweiten Expressionskassette auf die Expression der MGMT. In den SFFV-basierenden Konstrukten wird die Expression der humanen wtMGMT-cDNA von den 5' SFFV-LTRs reguliert. Während die MGMT im SF1-MGMT-Vektor als Einzelgen beschrieben wird, erzeugt der SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-Konstrukt ein bicistronisches Transkript, bei dem die MGMT-cDNA stromabwärts der IRES des Poliovirus positioniert ist. Verglichen mit mock-transduzierten Kontrollzellen vermittelten alle Vektoren einen bestimmten Resistenzfaktor gegenüber ACNU-induzierter Toxizität. Die ACNU-Resistenz der transduzierten humanen Zellen bei den beiden höchsten ACNU-Konzentrationen fiel gering aus. Tendenziell zeigten aber in diesem Konzentrationsbereich Zellen nach Transduktion mit den beiden MSCV-basierten Vektoren beziehungsweise mit dem SF1-MGMT-Konstrukt eine höhere Resistenz. Im Vergleich mit den drei genannten Vektoren vermittelten der SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-Vektor und das N2/Zip-pgkpr-MGMT-Konstrukt geringere Resistenz gegen ACNU-induzierte Toxizität.

Der Unterschied zwischen SF1-MGMT-vermittelter ACNU-Resistenz und der Resistenz hämatopoetischer Zellen nach Transduktion mit dem Konstrukt SF β 1-DHFR-IRES-MGMT war signifikant. Beide Vektoren exprimieren die MGMT unter Kontrolle des 5' LTR, jedoch ist die Expressionshöhe der MGMT unterschiedlich. Verursacht wurde der Effekt der niedrigeren Expression der MGMT mittels des SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-Vektors durch die Position der MGMT-cDNA stromabwärts zur IRES. Eine niedrige Expression von Proteinen mittels bicistronischer Transkripte wurde bereits schon früher beobachtet [Hsieh et al., 1995]. Eine Verbesserung verspricht die Verwendung der optimierten Version der IRES des Encephalo Myocarditis Virus (EMCV), wie sie bei den weiter unten beschriebenen In-vivo-Versuchen zum Einsatz kam.

Daß der im Vergleich mit anderen Vektoren höhere Schutz gegen ACNU-induzierte Toxizität durch den SF1-MGMT-Vektor nicht durch höhere Transduktionsraten der Zielzellen erreicht wurde, konnte mittels Einzelkolonie-PCR ausgeschlossen werden.

Keinen signifikanten Einfluß auf die Expression der MGMT in transduzierten Zellen schien die Anwesenheit einer zweiten Expressionskassette (pgkpr-NEO) zu haben, wie an den nahezu identischen Ergebnissen für den MSCV-MGMT- beziehungsweise den MSCV-MGMT-pgkpr-NEO-Vektor ersichtlich war. Es scheint also kein negativer Einfluß des

internen Promotors auf die Expression der MGMT durch den in der 5' LTR gelegenen Promotor zu bestehen.

Mit Ausnahme des SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-Vektors vermittelte die Transduktion der Vorläuferzellen mit allen anderen hier getesteten Konstrukten eine höhere ACNU-Resistenz als die Transduktion mit dem N2/Zip-pgkpr-MGMT-Vektor. Eine mögliche Erklärung ist die effektivere Initiation der Transkription der MGMT-cDNA durch die MESV- beziehungsweise SFFV-LTR-Promotoren in hämatopoetischen Zellen. In diesem Fall wären MESV- beziehungsweise SFFV-basierte Vektoren für den Einsatz in hämatopoetischen Zellen zu bevorzugen. Ähnlich erfolgreiche Ergebnisse mit SFFV-basierenden Vektoren wurden auch von anderen Gruppen beschrieben [Baum et al., 1995; Baum et al., 1996]

Die relativ geringen prozentualen Überlebensunterschiede zwischen mock- und MGMT-transduzierten Zellen in diesen Experimenten, verglichen mit den Unterschieden aus den oben beschriebenen Versuchen zur Transduktion mit stabilen Produzentenzellen (siehe 3.1), resultierten zum größten Teil aus der geringeren Transduktionseffizienz der humanen Zellen (18,5 – 40%). Begründen läßt sich dies mit den geringeren ACNU-Titern der für diese Versuchsreihe eingesetzten transienten Überstände ($0,8 - 9 \times 10^4$ cfu/ml nach Titration auf MGMT-defizienten HeLa S3-Zellen).

Entscheidend ist auch die Tatsache, daß sich humane Zellen mit amphotropen Viren wesentlich ineffizienter transduzieren lassen als murine Zellen mit ekotropen Überständen gleichen Titers, da die Zahl der amphotropen Rezeptoren auf den humanen Zellen wesentlich niedriger ausfällt als jene der ecotropen Rezeptoren auf den murinen Zielzellen [Orlic et al., 1996].

4.2.2 Untersuchungen an murinen High Proliferative Potential-Colony Forming Cells (HPP-CFC)

Bei den oben beschriebenen Untersuchungen mit humanen klonogenen Vorläuferzellen wurde eine bereits teilweise differenzierte Population der hämatopoetischen Zellen betrachtet. Da für die längerfristige hämatopoetische Repopulierung nach Stammzelltransplantation unreifere Populationen verantwortlich sind und diese von der O⁶-alkylierenden Chemotherapie in besonderem Maße geschädigt werden [Neben et al., 1993], wurden zusätzlich die unreiferen hämatopoetischen HPP-CFC untersucht. Für diese Zellen wurde im murinen System Stammzeleigenschaften beschrieben [Bradley & Hodgson, 1979; Peters et al., 1996].

Im wesentlichen wurden hierbei die Ergebnisse aus den humanen Zellen bestätigt. Wiederum zeigte sich in allen Experimenten, daß der SF1-MGMT-Vektor die höchste MGMT-Expression, gemessen als ACNU-Resistenz, erlaubte. Ebenfalls bestätigt wurde die Bedeutung der Position der MGMT-cDNA im retroviralen Konstrukt. Auch hier überlebten SF β 1-DHFR-IRES-MGMT-transduzierte Zellen signifikant schlechter als SF1-MGMT-transduzierte HPP-CFC. Auch in diesem Testsystem wurde das höhere Überleben SF1-MGMT transduzierter HPP-CFC nicht durch eine im Vergleich mit den anderen Überständen effektivere Transduktion erzielt, wie aus den PCR-Analysen einzelner Kolonien ersichtlich ist. Im Mittel liegen die Transduktionsraten für murine HPP-CFC geringfügig höher als jene für humane Vorläuferzellen, was auf die höhere Zahl ekotroper Rezeptoren auf den murinen Zellen zurückzuführen sein könnte. Die höhere Transfereffizienz mag auch der Grund dafür sein, daß bei den Experimenten mit murinen HPP-CFC über den gesamten Konzentrationsbereich, besonders aber bei den höchsten getesteten ACNU-Konzentrationen (30 bzw. 100 μ g/ml), substantieller Schutz der Zellen vor ACNU-induzierter Zytotoxizität, insbesondere durch Transduktion mit dem SF1-MGMT-Konstrukt, nachgewiesen werden konnte.

Übereinstimmend mit den Experimenten mit humanen CFC konnte kein hemmender Einfluß einer zweiten Expressionskassette, bei ansonsten identischen MSCV-basierten Vektoren, auf die MGMT-Expression von der 5' LTR in HPP-CFC festgestellt werden. Somit besteht für die getesteten Zellpopulationen bei MSCV-Vektoren keine negative Interferenz zwischen dem internen Promotor und dem Promotor im 5' LTR der Grundgerüste. Der umgekehrte Fall der negativen Beeinflußung der Expression vom internen Promotor durch den Promotor im 5' LTR wurde hier nicht untersucht, stellt aber ein bereits bekanntes Problem dar [Nakajima et al., 1993].

Bestätigt wurde auch, daß von den Vektoren, welche die MGMT-cDNA als Einzelgen exprimieren, MESV- und SFFV-basierte Vektoren dem MMLV-basierten Konstrukt bei der Resistenzvermittlung gegen ACNU überlegen waren. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen ebenfalls andere Arbeitsgruppen [Eckert et al., 1996; Wang et al., 1996], jedoch wurde in diesen Studien zum Teil andere Gene (MDR1) transferiert.

Zusammenfassend läßt sich sowohl für humane koloniebildende Vorläuferzellen als auch für hämatopoetische Stammzellen folgern, daß für die effiziente Expression der MGMT in diesen Zellen die Wahl des Grundgerüsts, des Promotors und die Position der MGMT-cDNA im Vektor von entscheidender Bedeutung ist. Die besten Ergebnisse wurden für beide Zellpopulationen in diesem Ansatz mit SFFV/MESV-basierenden Hybridvektoren erzielt, bei

denen die MGMT-cDNA direkt vom 5' LTR exprimiert wird. Konstrukte dieser Art waren in den hier vorgestellten Untersuchungen den Vektoren auf der Basis des MMLV oder MSCV zumindest tendenziell überlegen.

Die hier erreichten Resistenzen sind jedoch für klinische Anwendungen nicht ausreichend, da die LD50 der vektortransduzierten Zellen im Vergleich zu mock-Kontrollen nur um den Faktor 1,4 bis 2,2 angehoben werden konnten. Diese Steigerung der Resistenz kann von MGMT-überexprimierenden Tumoren ebenfalls erreicht oder sogar übertroffen werden [Preuss et al., 1996]. Eine Verbesserung würde hier möglicherweise der Einsatz noch stärkerer Promotoren bringen. Ein weiterer möglicher Ansatz wäre die Transduktion der hämatopoetischen Stammzellen mit O6-BG resistenten MGMT-Mutanten. Dies würde die Hemmung der Aktivität der endogen exprimierten wtMGMT des Tumors durch den spezifischen Hemmstoff O6-BG ermöglichen. Bei zusätzlicher Verabreichung O⁶-alkylierender Zytostatika könnten so Tumorzellen abgetötet werden, während die mutMGMT-exprimierenden hämatopoetischen Zellen vor der Toxizität der Therapie geschützt wären. Experimente in dieser Richtung wurden bereits durchgeführt [Davis et al., 1997; Koc et al., 1999] und eigene Untersuchungen zu diesem Ansatz werden weiter unten diskutiert.

4.3 Expression der MGMT^{V139F}-Mutante in L1210 Zellen

Entscheidend für die effektive Reparatur von O⁶-Alkyladdukten ist zum einen die Anzahl der MGMT-Moleküle je Zelle. Darüber hinaus muß die Reparatur hinreichend schnell erfolgen, da nachfolgende Reaktionen der O⁶-Addukte irreparabler Schädigungen der DNA erzeugen [Tong et al., 1982]. Um eine Progression der O6-Addukte zu *interstrand crosslinks* zu unterbinden, ist eine Reparatur der Alkylierungen innerhalb von acht Stunden erforderlich [Gonzaga et al., 1992]. Die Gewährleistung einer effizienten Reparatur entsprechender Läsionen in *ada*-defizienten Bakterien durch eine Mutante der MGMT (MGMT^{V139F}) wurde vor kurzem beschrieben [Christians & Loeb, 1996]. Zur Überprüfung dieser Aussage für eukaryontische Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit die murine leukämische Zelllinie L1210 mit dem MSCV-MGMT^{V139F}-pgkpr-NEO-Vektor transfiziert, einzelne Klone wurden isoliert und die Zellen dieser Klone in semisolidem Medium auf ihre ACNU-Resistenz getestet.

Keiner der zehn getesteten Klone zeigte reproduzierbar eine höhere ACNU-Resistenz gegenüber der L1210^{MGMT^{P140A}} Zelllinie (Positivkontrolle), oder höhere LD50-Werte. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre, daß die Dauer des Zellzyklus der L1210-Zellen auch einer „normal“ aktiven Wildtyp-MGMT ausreichend Zeit zur Reparatur von O⁶-Alkylierungen bietet. Folglich würde man ein gleiches Überleben bei L1210^{MGMT^{P140A}}- und L1210^{MGMT^{V139F}}-Zellen erwarten. Das schlechtere Überleben mancher L1210^{MGMT^{V139F}}-Klone unter ACNU-Inkubation, verglichen mit der L1210^{MGMT^{P140A}}-Zelllinie, ist am ehesten durch eine unterschiedliche Expression der MGMT in den einzelnen L1210^{MGMT^{V139F}}-Klonen zu erklären. Zusätzlich könnte eine geringere Halbwertszeit und/oder Stabilität des Proteins eine Rolle spielen, wie bereits für andere Mutanten der MGMT beschrieben [Davis et al., 1999a].

Die Feststellung der verbesserten Reparatoreigenschaften der MGMT^{V139F} erfolgte im bakteriellen System. Aufgrund der unterschiedlichen Physiologie zwischen Pro- und Eukaryontenzellen ergeben sich eventuell unterschiedliche Eigenschaften des mutierten Proteins. Beispielsweise könnte die nukleäre Lokalisation der MGMT^{V139F} durch die eingeführte Mutation negativ beeinflußt sein, wie dies für die nukleäre Lokalisation des *ada*-Genprodukt, dem bakterielle Homolog der MGMT, in Eukaryontenzellen beschrieben worden ist [Dumenco et al., 1989]. Den hier gewonnenen Ergebnissen zufolge ist ein Einsatz der MGMT^{V139F}-Variante gegenüber anderen MGMT-Mutanten wie MGMT^{P140A} nicht vorzuziehen.

4.4 Murines In-vivo-Transplantationsmodell zum Gentransfer der O⁶-Benzylguanin-resistenten MGMT^{P140K}-Mutante

Die durch den Transfer der wtMGMT erreichte Erhöhung der LD50 gegenüber nicht-transduzierten Kontrollzellen bewegte sich zwischen 1,6 und 5,0. Diese Steigerungen der Chemotherapieresistenz kann jedoch auch von MGMT-überexprimierenden Tumoren erreicht werden [Friedman et al., 1992; Guo et al., 1999]. Damit wäre die Wirksamkeit der hier erzielten Protektion durch die wtMGMT-Überexpression hinfällig. Um diese Problematik zu umgehen, bietet sich die kombinierte Behandlung mit O6-BG, einem wirkungsvollen,

spezifischen Hemmstoff der wtMGMT, und O⁶-alkylierenden Substanzen an [Wedge & Newlands, 1996]. Voraussetzung für diese kombinierte Therapie ist der Einsatz O6-BG resistenter MGMT-Mutanten für die Transduktion der hämatopoetischen Zellen, die vor kurzem beschrieben wurden [Crone & Pegg, 1993; Crone et al., 1994; Xu-Welliver et al., 1998]. Auf diese Weise ließe sich die endogen exprimierte MGMT von Tumorzellen hemmen und die malignen Zellen könnten durch die nachfolgende Gabe von Zytostatika getötet werden. Dagegen sollten mutMGMT-überexprimierende Knochenmarkzellen gegenüber der Hemmung durch O6-BG resistent sein und aufgrund dieses Selektionsvorteils gegenüber der Hämatotoxizität der Chemotherapie geschützt sein. Bei myeloablativer Therapie ließe sich durch Transplantation mutMGMT-transduzierter Stammzellen eine geschützte Hämatopoese bei Tumorpatienten unter kombinierter Chemotherapie rekonstituieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese *in vivo* sollte die gleichzeitige Anreicherung transduzierter Zellen und die Protektion der Hämatopoese bei kombinierter Chemotherapie in einem prä-klinischen Modell demonstriert werden. Dazu wurde das unter 2.4.12 beschriebene, murine Transplantationsmodell angewendet. Die Identifizierung transgener Zellen in peripherem Blut, Knochenmark und Milz der Tiere war durch die Kopplung der Expression von MGMT^{P140K} mit dem Markergen GFP möglich.

Unter hochdosierter Behandlung mit O6-BG und alkylierenden Medikamenten nahmen bei MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren zunächst die Zellzahlen der Gesamtleukozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten ab, um nach durchschreiten eines Nadir zwischen dem zweiten bis dritten Zyklus wieder zuzunehmen. Die Abnahme der Zellzahlen war bei kombinierter Therapie mit ACNU, BCNU und der hohen TMZ-Dosis (70 mg/kg) annähernd gleich, nur bei niedrig dosierter TMZ-Behandlung (50 mg/kg) fielen die Zellzahlen weniger stark ab. Bei mock-transplantierten Tieren nahmen die Werte des peripheren Blutes kontinuierlich ab bis die Tiere schließlich an progressiver Panzytopenie verstarben. Einzige Ausnahme bildete die Gruppe mock-transplantierte Tiere, die mit niedrig dosierter TMZ-Chemotherapie behandelt wurde. Hier überlebten alle Tiere die Behandlung, und es wurde kein Unterschied im Verlauf der Blutwerte zwischen mock- und MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren beobachtet. MGMT^{P140K}-transplantierte Tier, die keiner chemotherapeutischen Behandlung ausgesetzt waren, zeigten einen konstanten Anstieg der Zellzahlen im peripheren Blut.

Gleichzeitig zu diesem Verlauf reicherten sich während der Versuchsdauer in den chemotherapeutisch behandelten MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren im peripheren Blut, Knochenmark und Milz GFP-exprimierende Leukozytenpopulationen stark an, während diese

Selektion auf transgene Zellen in den chemotherapeutisch unbehandelten Tieren nicht beobachtet werden konnte. Hier verblieb der Anteil GFP⁺ Zellen auf einem konstant niedrigem Niveau. Eine weniger starke Selektion auf GFP⁺ Zellen wurde, verglichen mit O6-BG plus CENU oder O6-BG plus hoher TMZ-Dosis, bei der kombinierten Therapie mit der niedrigen TMZ-Dosis gemessen.

Die Anreicherung GFP-exprimierender Zellen im Blut beruhte auf der Zytotoxizität der Chemotherapie, die nahezu alle nicht-MGMT^{P140K}-exprimierenden Zellen nach mehreren Kursen Chemotherapie abtötet hatte, wie bei den mit mock-transduzierten Zellen transplantierten Tieren zu sehen war. Dies war auch ursächlich für die anfängliche Reduktion der Zellzahlen im peripheren Blut MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere verantwortlich. Im peripheren Blut MGMT^{P140K}-transplantierte Tiere verblieben hauptsächlich die geschützten GFP⁺ Zellen, deren Zahl im Verlauf des Versuchs zunahm, da transduzierte Vorläufer- und Stammzellen weitere GFP⁺ Leukozyten produzierten. Die verglichen mit den Granulozyten geringere Anreicherung der Lymphozyten im peripheren Blut hatte ihren Ursprung wahrscheinlich in der stark unterschiedlichen mittleren Lebensdauer von Granulozyten und Lymphozyten. Granulozyten unterliegen einer schnellen Umsatzrate mit einer mittleren Lebensdauer von ca. vier Tagen. Die mittlere Lebensspanne der Lymphozyten beträgt hingegen ca. 120 Tage. Deshalb wurden GFP⁺ Granulozyten bereits kurz nach *Engraftment* der transduzierten Stammzellen im Knochenmark ins periphere Blut entlassen. Die GFP-negativen (GFP⁻) Lymphozyten des peripheren Blutes stammten größtenteils noch aus dem intravenös injizierten Transplantat. Die Zytotoxizität der verwendeten Medikamente wirkt sich erst bei mitotischer Aktivität der Zellen aus. Da terminal differenzierte Lymphozyten nicht mehr proliferieren und eine große mittlere Lebensspanne besitzen, können diese Zellen noch lange Zeit im peripheren Blut der Tiere nachgewiesen werden. Aufgrund der kurzen mittleren Lebensdauer der Granulozyten wurden die aus dem Transplantat stammenden Granulozyten kurze Zeit nach der i. v. Injektion aus dem peripheren Blut eliminiert. Die unter der Chemotherapie ins Blut entlassenen Granulozyten stammten zumeist von transduzierten Vorläufer- oder Stammzellen ab, was zu der beobachteten, nahezu vollständigen Selektion auf GFP⁺ Granulozyten führte. Eine ähnlich hohe Selektion wurde für die Behandlung mutMGMT transplantierte Tiere unter O6-BG plus BCNU Behandlung erzielt [Davis et al., 1997].

Einige der MGMT-transplantierte Tiere unter Behandlung mit O6-BG plus BCNU beziehungsweise O6-BG plus ACNU verstarben vor Ablauf der Versuchsdauer. Bei diesen Tieren fand ebenfalls eine Selektion auf GFP⁺ Zellen statt, doch die Tiere verstarben aufgrund

einer fortschreitenden Panzytopenie. Eine mögliche Erklärung für diesen Verlauf war, daß in dieser Gruppe der Versuchstiere keine transgenen Zellen ins Knochenmark eingewandert waren, die ein ausreichendes Langzeitrepopulierungspotential besaßen. In diesem Fall wären die angewachsenen Vorläuferzellen zwar in der Lage gewesen differenzierte, GFP⁺ Nachkommen zu produzieren, doch ihre Teilungsaktivität erschöpfte sich bereits nach wenigen Wochen. Dies führte zu der beobachteten Panzytopenie und anschließend zum Ableben der Tiere.

Im Gegensatz dazu überlebten Tiere bis zum Tag 89, bei denen sich erfolgreich transduzierte und Stamm- beziehungsweise sehr unreife Vorläuferzellen im Knochenmark angesiedelt hatten, die eine Langzeitrepopulierung mit terminal differenzierten Leukozyten aufgrund ihres ausgeprägten Proliferationspotentials ermöglichten. Diese transgenen Stammzellen trugen im weiteren Verlauf des Versuchs die Hämatopoese der Tiere. Das hier durchgeführte Behandlungsprotokoll übte somit einen Selektionsdruck auf das Stammzellkompartiment des Knochenmarks aus, wobei dieser Selektionsdruck bei Behandlung mit der niedrigen TMZ-Dosis als geringer zu bewerten war als in den anderen Behandlungsprotokollen, da hier eine deutlich geringere Selektion GFP-positiver Zellen stattfand. Diese Beobachtung der Stammzelltoxizität wurde bereits früher für BCNU-Behandlung beschrieben [Neben et al., 1993]. Ermöglicht wird dadurch eine effektive Langzeitrepopulierung mit einem vor der Hämatotoxizität der Chemotherapie geschützten hämatopoetischen System. Der vermittelte Schutz blieb auch nach Absetzen der Behandlung, zumindest für einen gewissen Zeitraum, erhalten. Belegt wurde dies durch die konstante oder gar zunehmende Zahl GFP⁺ Granulozyten beziehungsweise Lymphozyten im peripheren Blut selbst nach Beendigung der Chemotherapie.

Um zu kontrollieren, daß die obigen Beobachtungen keine Artefakte der Bestrahlung der Tiere und der nachfolgenden Transplantation sind, wurden als Kontrolle Tiere mit MGMT^{P140K}-transduzierten Knochenmarkszellen transplantiert und keiner Chemotherapie unterzogen. Es zeigte sich, daß unter diesen Versuchsbedingungen eine Anreicherung GFP⁺ Zellen weder im peripheren Blut noch im Knochenmark oder der Milz festgestellt wurde. Der Anteil blieb nahezu konstant zwischen ca. 1 und 4%. Der Verlauf der zellulären Blutwerte wies keinen Nadir auf. Die Zellzahl der Leukozyten und Thrombozyten nahm kontinuierlich zu. Die stete Zunahme der Zellzahlen war wahrscheinlich auf eine Überkompensation des Knochenmarks aufgrund der 5-FU-Behandlung und der Bestrahlung der Empfänger-Tiere zurückzuführen. Zu überprüfen wäre allerdings, ob durch die Transduktion keine Leukämie in den Tieren entsteht, die zu einer Zunahme der Zellzahlen im peripheren Blut führt. Hinweise

auf diese Möglichkeit wurden in einer Studie zum Gentransfer des Chemotherapie-Resistenzgens MDR1 beschrieben [Bunting et al., 1998]. Dies ist ein wesentlicher Aspekt zur Sicherheit des hier vorgestellten prä-klinischen Modells und bedarf weiterer Untersuchung.

Abschließend läßt sich jedoch feststellen, daß die Erholung der zellulären Werte des peripheren Blutes unter der Chemotherapie ein Effekt der Anreicherung MGMT^{P140K}-transgener Zellen in den Tieren war, was zu einer Protektion der Hämatopoese dieser Tiere vor chemotherapieinduzierter Toxizität führte.

Die Knochenmarkzellen aus O6-BG plus ACNU beziehungsweise O6-BG plus Temozolomid behandelte Tiere wurden in klonogenen Methylzellulosekulturen auf ihre Resistenz gegenüber steigenden Konzentrationen von ACNU getestet. Verglichen mit den Knochenmarkzellen aus Tieren, die MGMT^{P140K}-transduziertes Knochenmark transplantiert bekamen, aber keiner Chemotherapie unterzogen wurden, zeigten die Vorläuferzellen aus behandelten Tieren eine erhöhte Toleranz gegenüber ACNU. Dabei konnten keine profunden Unterschiede zwischen Knochenmarkzellen aus Tieren mit ACNU- oder TMZ- Behandlung festgestellt werden, was möglicherweise auf eine annähernd gleiche Expressionshöhe der MGMT^{P140K} in den koloniebildenden Zellen der unterschiedlichen Knochenmarkproben hindeutet.

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Parallelen zwischen O6-BG plus Nitrosoharnstoff-Behandlung und der Therapie mit O6-BG plus Temozolomid, schien letztere Form der Behandlung bei den Tieren zu geringerem Gewichtsverlust während der Chemotherapie zu führen. Das Körpergewicht O6-BG plus ACNU-behandelter Tiere nahm während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich ab. Das Körpergewicht O6-BG plus Temozolomid-behandelter Tiere nahm nach der letzten i. p. Injektion bereits wieder zu. Die Schlußfolgerung aus dieser Beobachtung sind die geringere Organtoxizität, insbesondere im Gastrointestinalbereich, des Temozolomids verglichen mit ACNU. Ein weiteres Indiz der besseren Verträglichkeit der TMZ-Behandlung mögen die fehlenden Todesfälle unter den MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren unter O6-BG plus TMZ (hohe Dosis)-Therapie, verglichen mit O6-BG plus CENU-behandelten MGMT^{P140K}-transplantierten Tieren, sein. Somit wäre bei einer klinischen Anwendung des MGMT^{P140K}-Gentransfers eine Behandlung mit O6-BG plus Temozolomid zu bevorzugen, da eine Behandlung mit diesem Medikament mit weniger Nebenwirkungen verbunden zu sein scheint, falls sich diese Daten auf den Menschen übertragen lassen.

Ein weiterer Vorteil der O6-BG plus Temozolomid-Therapie scheint die effektivere Selektion transduzierter Stammzellen zu sein. Trotz geringerer mittlerer Zahl transgener peripherer

Leukozyten vor dem ersten Zyklus verstarben hier keine Tiere die mit MGMT^{P140K}-transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, vor Ende der Versuchsdauer. Somit muß sich in allen diesen Tieren mindestens ein Stammzellklon erfolgreich etabliert haben.

Zur Klärung der Qualität der repopulierenden Stammzellen der MGMT^{P140K}-transplantierten Tiere wurde Knochenmark vom Tag 89 aus primären Versuchstieren in sekundäre Tiere retransplantiert. Nach Etablierung des sekundären Transplantats wurden diese Tiere (Sekundärtransplantationen) mit vier Zyklen Chemotherapie behandelt. Trotz der Tatsache, daß den Tieren bereits geschütztes Knochenmark transplantiert wurde, beobachtete man bei den Leukozyten, Granulozyten und Lymphozyten eine Abnahme der Zellzahlen im peripheren Blut. Dieses Absinken der Zellzahlen war aber bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den primär-transplantierten Versuchstieren. Die Zahl der Thrombozyten nahm trotz erneuter Behandlung mit O6-BG und ACNU zunächst zu, um sich später auf einen niedrigeren nahezu konstanten Mittelwert stabilisieren.

Gegen Ende der Versuchsdauer besaßen alle Sekundärtransplantationen eine geschützte Hämatopoese mit fast 100% GFP⁺ Granulozyten und ca. 70% GFP⁺ Lymphozyten im peripheren Blut. Für das Knochenmark und die Milz lagen die Selektionswerte für die Lymphozyten sogar bei bis zu 96%.

Die Abnahme der Zellzahlen im peripheren Blut resultierte möglicherweise aus der fehlenden Expression der MGMT^{P140K} in den differenzierten Zellen des peripheren Blutes. Die Knochenmarkzellen der sekundär transplantierten Tiere waren bis zum Start des ersten Zyklus bei diesen Tieren für etwa zwei Monate keiner Selektion ausgesetzt. Diese fehlende Selektion durch die Chemotherapie mag zu einer reduzierten bis fehlenden MGMT^{P140K}-Expression in den Leukozyten geführt haben. Die Folge war eine abgeschwächte bis fehlende Toleranz gegenüber der Hämatotoxizität der Therapie, die in einer leichten Abnahme der Zellzahlen im peripheren Blut führte.

Dieselbe Argumentation würde auch die Abnahme des Anteils von GFP⁺ Zellen in den sekundär transplantierten Tieren vor Beginn der chemotherapeutischen Behandlung erklären. Zudem schien der Effekt der Einstellung/Reduktion der Transgenexpression zwischen den verschiedenen Zelltypen zu variieren. Während der Anteil von GFP⁺ Granulozyten nur marginal abnahm, exprimierten im Extremfall nur noch ca. 12% der Lymphozyten der sekundär transplantierten Tiere das GFP-Transgen. Wesentlich effektiver schienen jedoch die Thrombozytenvorläufer vor Chemotherapie-induzierter Toxizität, trotz der fehlenden Selektion durch Chemotherapie, geschützt zu sein, da hier keine Abnahme der Zellzahl der

Thrombozyten im peripheren Blut gemessen werden konnte. Durch die erneute Selektion stieg der Anteil GFP⁺ Lymphozyten und Granulozyten jedoch wieder stark an und erreicht ebenso hohe beziehungsweise höhere Werte verglichen mit den primär-transplantierten Tieren.

Die Schlußfolgerungen aus diesen Beobachtungen sind, daß durch die Behandlung in den primär-transplantierten Tieren Stammzellen selektiert worden waren, die mindestens über einen Zeitraum von 171 (89 + 82) Tagen in der Lage sind letal bestrahlte Rezipienten zu repopulieren. Dabei konnten aus einem primären Versuchstier an Tag 89 ausreichend Knochenmarkstammzellen isoliert werden, um mindestens drei sekund-transplantierte Tiere für einen weiteren Zeitraum von 82 Tagen inklusive vier Zyklen Chemotherapie mit einer geschützten Hämatopoese zu versehen.

Die grundsätzliche Möglichkeit zur Langzeit-Rekonstitution einer geschützten Hämatopoese während hochdosierter Chemotherapie durch Transplantation MGMT^{P140K}-transduzierter Knochenmarkzellen wurde in diesem Tiermodell demonstriert. Inwieweit die aus den primären Versuchstieren isolierten Stammzellen in der Lage sind, auch weiterhin letal bestrahlte Empfängertiere zu repopulieren wird zur Zeit durch serielle Transplantation des Knochenmarks der sekundär-transplantierten Tiere in tertiär-transplantierte Rezipienten geklärt.

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich mit prä-klinischen Modellen zum MGMT-Gentransfer in vivo [Allay et al., 1995; Allay et al., 1997; Davis et al., 1997; Maze et al., 1997]. In keiner der Untersuchungen wurde bis dato die vergleichende Therapie mit mehreren Zytostatika aus unterschiedlichen Substanzklassen in Kombination mit O6-BG beschrieben oder zeigte den zeitlichen Verlauf der Selektion transgener Zellen unter repetitiv verabreichter Chemotherapie in den Versuchstieren auf. Zum erstenmal beschrieben ist hier auch eine Testung der Langzeitrepopulierungskapazität MGMT-transduzierter Stammzellen durch serielle Transplantation. Ähnliche Experimente wurden bisher nur für Methotrexat-resistente Knochenmarkzellen beschrieben [Corey et al., 1990].

Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation erarbeiteten Resultate zeigen Möglichkeiten zur klinischen Anwendung des MGMT-Gentransfers in hämatopoetische Zellen auf. Die Resultate sind in gleicher Weise für die weiteren experimentellen und klinischen Ansätze

relevant. Es bleibt zu hoffen, daß die erzielten positiven Ergebnisse, besonders jene aus den In-vivo-Experimenten, sich auch im humanen System bestätigen lassen und damit eine Verbesserung des Langzeitüberlebens, der Lebensqualität und der Heilungsraten von Tumorpatienten erzielt werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des retroviralen Transfers des Chemotherapie-Resistenzgens für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) zum Schutz der Hämatopoese vor chemotherapieinduzierter Myelosuppression sollten wesentliche Parameter als Vorbereitung zum klinischen Einsatz untersucht werden. Die Experimente beinhalteten sowohl *in vitro* Versuche an klonogenen hämatopoetischen Zellen, als auch *in vivo* Untersuchungen in einem prä-klinischen murinen Transplantationsmodell

Murine klonogene Vorläuferzellen konnten durch Transduktion mit dem *Moloney Murine Leukemia* Virus-basierenden N2/Zip-pgkpr-MGMT-Vektor effektiv vor der Zytotoxizität verschiedener Chemotherapeutika im Methylzellulosestest geschützt werden. Die wtMGMT-vermittelte Resistenz schützte sowohl vor der Toxizität verschiedener chloroethylierender Substanzen als auch vor der Triazenverbindung Temozolomid.

In weiteren Experimenten wurde die Fähigkeit unterschiedlicher retroviraler Vektoren untersucht, wtMGMT in determinierten humanen Vorläuferzellen und pluripotenten unreiferen murinen *High Proliferative Potential-Colony Forming Cells* (HPP-CFC) zu exprimieren. Dabei vermittelten Vektoren, welche die wtMGMT-Expression direkt vom viralen Promotor in der 5' LTR steuerten, die höchste ACNU-Resistenz. Die besten Resultate wurden in diesen Experimenten mit *Murine Embryonic Stem Cell* Virus-basierenden- und insbesondere hybriden *Spleen Focus Forming Virus/Murine Embryonic Stem Cell* Virus-basierenden-Vektoren erzielt. Dies legt die Verwendung speziell für den hämatopoetischen Gentransfer optimierter Vektoren nahe, um optimale Transgenexpression in weitgehend determinierten und frühen Vorläuferzellen zu erreichen.

Die Ergebnisse einer zuvor beschriebenen erhöhten Resistenz gegenüber DNA-alkylierenden Substanzen durch die Expression der MGMT^{V139F}-Mutante in Bakterien, die einen genetisch bedingten Defekt im Reparaturmechanismus von O⁶-Alkylierung des Guanin besitzen,

verglichen mit der Wildtyp-MGMT, konnte für die murine Leukämiezelllinie L1210 nicht bestätigt werden. Im Vergleich der vermittelten Resistenz gegenüber ACNU schnitten MGMT^{V139F}-transfizierte Zellklone im Durchschnitt in keinem Fall besser ab als eine Zelllinie, die die MGMT^{P140A}-Mutante exprimierte.

In einem murinen Knochenmarktransplantationsmodell zum MGMT^{P140K}-Gentransfer wurden letal bestrahlten Empfängertieren Knochenmarkzellen transplantiert, die mit einem MGMT^{P140K}- und *green fluorescent protein* (GFP)-exprimierenden Vektor transduziert worden waren. Bei der MGMT^{P140K}-Mutante handelt es sich um eine gegen O⁶-Benzylguanin resistente Variante. Die Verbindung O⁶-Benzylguanin ist ein spezifischer Hemmstoff der Wildtyp-MGMT. Unter Therapie mit O⁶-Benzylguanin plus ACNU/BCNU beziehungsweise Temozolomid konnte bei diesen Tieren eine neue Hämatopoese etabliert werden, die vor der Myelotoxizität der chemotherapeutischen Behandlung geschützt war, so daß sich die Zellzahlen im peripheren Blut noch während der Chemotherapie erholten. Die Repopulierung der Versuchstiere erfolgte größtenteils mit transgenen geschützten, funktionellen Blutzellen, deren Anreicherung sowohl im peripheren Blut, dem Knochenmark und der Milz durch Nachweis des Markergens GFP nachweisbar war.

Sollten die murinen Ergebnisse sich auf das humane System übertragen lassen, empfiehlt sich für eine klinische Anwendung der MGMT-Gentherapie der Einsatz des Medikaments Temozolomid in Kombination mit O⁶-Benzylguanin aufgrund seiner geringeren sekundären Organtoxizitäten, verglichen mit den Nitrosoharnstoffen. Außerdem ermöglicht die Behandlung mit O⁶-Benzylguanin plus Temozolomid in diesem Protokoll eine effektive Selektion auf transduzierte Stammzellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adam MA, Ramesh N, Miller AD, Osborne WR (1991) Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions. *J Virol* 65: 4985-4990.

Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70: 2581-2585.

Allay JA, Davis BM, Gerson SL (1997) Human alkyltransferase-transduced murine myeloid progenitors are enriched in vivo by BCNU treatment of transplanted mice. *Exp Hematol* 25: 1069-1076.

Allay JA, Dumenco LL, Koc ON, Liu L, Gerson SL (1995) Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* 85: 3342-3351.

Andreadis S, Palsson BO (1997) Coupled effects of polybrene and calf serum on the efficiency of retroviral transduction and the stability of retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 8: 285-291.

Apperley JF, Luskey BD, Williams DA (1991) Retroviral gene transfer of human adenosine deaminase in murine hematopoietic cells: effect of selectable marker sequences on long-term expression. *Blood* 78: 310-317.

Aran JM, Gottesman MM, Pastan I (1994) Drug-selected coexpression of human glucocerebrosidase and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3176-3180.

Baum C, Eckert HG, Stockschlader M, Just U, Hegewisch-Becker S, Hildinger M, Uhde A, John J, Ostertag W (1996) Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection. *J Hematother* 5: 323-329.

Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W (1995) Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69: 7541-7547.

Bierhuizen MF, Westerman Y, Visser TP, Wognum AW, Wagemaker G (1997) Green fluorescent protein variants as markers of retroviral-mediated gene transfer in primary hematopoietic cells and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 371-375.

Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100: 243-255.

Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276: 1719-1724.

Boogaerts MA, Brugger W, Carella AM, Cortes-Funes H, Fibbe WE, Hows J, Khayat D, Linch DC, Link H, Moore MA, Testa NG (1996) Peripheral blood progenitor cell transplantation: where do we stand? Chairman's Summary of the European School of Oncology Task Force meeting Peripheral Blood progenitor cell's held September 29-30, 1995. *Ann Oncol* 7 Suppl 2: 1-4.

Bradley TR, Hodgson GS (1979) Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. *Blood* 54: 1446-1450.

Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN (1993a) Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 342: 1134-1137.

Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro J, Jr., Anderson WF, Ihle JN (1993b) Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 341: 85-86.

Buchsacher GL, Jr., Wong-Staal F (2000 Apr 15) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95: 2499-2504.

Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP (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: 2269-2279.

Cao L, Zheng ZC, Zhao YC, Jiang ZH, Liu ZG, Chen SD, Zhou CF, Liu XY (1995) Gene therapy of Parkinson disease model rat by direct injection of plasmid DNA-lipofectin complex. *Hum Gene Ther* 6: 1497-1501.

Carpenter DE, Stevens JG (1996) Long-term expression of a foreign gene from a unique position in the latent herpes simplex virus genome. *Hum Gene Ther* 7: 1447-1454.

Chen L, Perlick H, Morgan RA (1997) Comparison of retroviral and adeno-associated viral vectors designed to express human clotting factor IX. *Hum Gene Ther* 8: 125-135.

Chen X, Schmidt MC, Goins WF, Glorioso JC (1995) Two herpes simplex virus type 1 latency-active promoters differ in their contributions to latency-associated transcript expression during lytic and latent infections. *J Virol* 69: 7899-7908.

Chinnasamy N, Rafferty JA, Hickson I, Ashby J, Tinwell H, Margison GP, Dexter TM, Fairbairn LJ (1997) O6-benzylguanine potentiates the in vivo toxicity and clastogenicity of temozolomide and BCNU in mouse bone marrow. *Blood* 89: 1566-1573.

Christians FC, Loeb LA (1996) Novel human DNA alkyltransferases obtained by random substitution and genetic selection in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6124-6128.

Clapp DW, Freie B, Srour E, Yoder MC, Fortney K, Gerson SL (1995) Myeloproliferative sarcoma virus directed expression of beta-galactosidase following retroviral transduction of murine hematopoietic cells. *Exp Hematol* 23: 630-638.

Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, Chan S, Chen HH, Campbell KP, Caskey CT (1996) In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther* 3: 965-972.

Corey CA, DeSilva AD, Holland CA, Williams DA (1990) Serial transplantation of methotrexate-resistant bone marrow: protection of murine recipients from drug toxicity by progeny of transduced stem cells. *Blood* 75: 337-343.

Crone TM, Goodtzova K, Edara S, Pegg AE (1994) Mutations in human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase imparting resistance to O6-benzylguanine. *Cancer Res* 54: 6221-6227.

Crone TM, Pegg AE (1993) A single amino acid change in human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase decreasing sensitivity to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res* 53: 4750-4753.

Davis BM, Reese JS, Koc ON, Lee K, Schupp JE, Gerson SL (1997) Selection for G156A O6-methylguanine DNA methyltransferase gene-transduced hematopoietic progenitors and protection from lethality in mice treated with O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 57: 5093-5099.

Davis BM, Koc ON, Reese JS, Gerson SL (1999a) O6-benzylguanine-resistant mutant MGMT genes improve hematopoietic cell tolerance to alkylating agents. *Prog Exp Tumor Res* 36: 65-81.

Davis BM, Roth JC, Liu L, Xu-Welliver M, Pegg AE, Gerson SL (1999b) Characterization of the P140K, PVP(138-140)MLK, and G156A O6-methylguanine-DNA methyltransferase mutants: implications for drug resistance gene therapy. *Hum Gene Ther* 10: 2769-2778.

Di Ianni M, Terenzi A, Perruccio K, Ciurnelli R, Lucheroni F, Benedetti R, Martelli MF, Tabilio A (1999) 5-Azacytidine prevents transgene methylation in vivo. *Gene Ther* 6: 703-707.

Dolan ME, Mitchell RB, Mummert C, Moschel RC, Pegg AE (1991) Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res* 51: 3367-3372.

Dolan ME, Pegg AE, Moschel RC, Grindey GB (1993) Effect of O6-benzylguanine on the sensitivity of human colon tumor xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem Pharmacol* 46: 285-290.

Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96: 171-184.

Dumenco LL, Warman B, Hatzoglou M, Lim IK, Abboud SL, Gerson SL (1989) Increase in nitrosourea resistance in mammalian cells by retrovirally mediated gene transfer of bacterial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res* 49: 6044-6051.

Eckert HG, Stockschrader M, Just U, Hegewisch-Becker S, Grez M, Uhde A, Zander A, Ostertag W, Baum C (1996) High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood* 88: 3407-3415.

- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7417.
- Fisher-Adams G, Wong KK, Jr., Podsakoff G, Forman SJ, Chatterjee S (1996) Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood* 88: 492-504.
- Flanagan JR, Krieg AM, Max EE, Khan AS (1989) Negative control region at the 5' end of murine leukemia virus long terminal repeats. *Mol Cell Biol* 9: 739-746.
- Flasshove M, Frings W, Schroder JK, Moritz T, Schutte J, Seeber S (1999) Transfer of the cytidine deaminase cDNA into hematopoietic cells. *Leuk Res* 23: 1047-1053.
- Foote RS, Pal BC, Mitra S (1983) Quantitation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in HeLa cells. *Mutat Res* 119: 221-228.
- Friedman HS, Dolan ME, Moschel RC, Pegg AE, Felker GM, Rich J, Bigner DD, Schold SC, Jr. (1992) Enhancement of nitrosourea activity in medulloblastoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 84: 1926-1931.
- Gebeyehu G, Rao PY, SooChan P, Simms DA, Klevan L (1987) Novel biotinylated nucleotide--analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res* 15: 4513-4534.
- Gerson SL, Miller K, Berger NA (1985) O6 alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human myeloid cells. *J Clin Invest* 76: 2106-2114.
- Gerson SL, Phillips W, Kastan M, Dumenco LL, Donovan C (1996) Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU. *Blood* 88: 1649-1655.
- Glorioso JC, Bender MA, Goins WF, Fink DJ, DeLuca N (1995a) HSV as a gene transfer vector for the nervous system. *Mol Biotechnol* 4: 87-99.
- Glorioso JC, DeLuca NA, Fink DJ (1995b) Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 49: 675-710.
- Gonzaga PE, Brent TP (1989) Affinity purification and characterization of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase complexed with BCNU-treated, synthetic oligonucleotide. *Nucleic Acids Res* 17: 6581-6590.
- Gonzaga PE, Potter PM, Niu TQ, Yu D, Ludlum DB, Rafferty JA, Margison GP, Brent TP (1992) Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA. *Cancer Res* 52: 6052-6058.

Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Grignani F, Lanfrancone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG (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: 14-19.

Guo W, Liu X, Lee S, Park NH (1999) High O6-methylguanine methyl transferase activity is frequently found in human oral cancer cells with p53 inactivation. *Int J Oncol* 15: 817-821.

Hanania EG, Giles RE, Kavanagh J, Fu SQ, Ellerson D, Zu Z, Wang T, Su Y, Kudelka A, Rahman Z, Holmes F, Hortobagyi G, Claxton D, Bachier C, Thall P, Cheng S, Hester J, Ostrove JM, Bird RE, Chang A, Korbling M, Seong D, Cote R, Holzmayer T, Deisseroth AB, et al. (1996) Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplant hematopoietic recovery following intensive systemic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15346-15351.

Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, Williams DA (1997) Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8: 2193-2206.

Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2: 876-882.

Hawley RG, Lieu FH, Fong AZ, Hawley TS (1994) Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* 1: 136-138.

Haywood AM (1994) Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J Virol* 68: 1-5.

Hennemann B, Conneally E, Pawliuk R, Leboulch P, Rose-John S, Reid D, Chuo JY, Humphries RK, Eaves CJ (1999) Optimization of retroviral-mediated gene transfer to human NOD/SCID mouse repopulating cord blood cells through a systematic analysis of protocol variables. *Exp Hematol* 27: 817-825.

Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C, Garrett T, Fetell M, Reiss R, Bank A, Antman K (1998) Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 16: 165-172.

Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16: 7351-7367.

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

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.

Hsieh CL, Chen BF, Wang CC, Liu HH, Chen DS, Hwang LH (1995) Improved gene expression by a modified bicistronic retroviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 910-917.

Jelinek J, Fairbairn LJ, Dexter TM, Rafferty JA, Stocking C, Ostertag W, Margison GP (1996) Long-term protection of hematopoiesis against the cytotoxic effects of multiple doses of nitrosourea by retrovirus-mediated expression of human O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Blood* 87: 1957-1961.

Joly E (1996) Purification of DNA fragments from agarose gels using glass beads. *Methods Mol Biol* 58: 237-240.

Kiem HP, Heyward S, Winkler A, Potter J, Allen JM, Miller AD, Andrews RG (1997) Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90: 4638-4645.

Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, Titani K (1991) Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* 110: 284-291.

Kinsella TM, Nolan GP (1996) Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7: 1405-1413.

Koc ON, Reese JS, Davis BM, Liu L, Majczenko KJ, Gerson SL (1999) DeltaMGMT-transduced bone marrow infusion increases tolerance to O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and allows intensive therapy of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human colon cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 10: 1021-1030.

Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM, Hanley ME, Annett G, Brooks JS, el-Khourey A, et al. (1995) Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1: 1017-1023.

Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Jr., Hodes ME, Crisp M (1992) A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods* 25: 193-205.

Leib DA, Olivo PD (1993) Gene delivery to neurons: is herpes simplex virus the right tool for the job? *Bioessays* 15: 547-554.

Limon A, Briones J, Puig T, Carmona M, Fornas O, Cancelas JA, Nadal M, Garcia J, Rueda F, Barquinero J (1997) High-titer retroviral vectors containing the enhanced green fluorescent protein gene for efficient expression in hematopoietic cells. *Blood* 90: 3316-3321.

Loh TP, Sievert LL, Scott RW (1990) Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 10: 4045-4057.

Lokensgard JR, Bloom DC, Dobson AT, Feldman LT (1994) Long-term promoter activity during herpes simplex virus latency. *J Virol* 68: 7148-7158.

Loktionova NA, Xu-Welliver M, Crone TM, Kanugula S, Pegg AE (1999) Protection of CHO cells by mutant forms of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase from killing by 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) plus O6-benzylguanine or O6-benzyl-8-oxoguanine. *Biochem Pharmacol* 58: 237-244.

Luskey BD, Rosenblatt M, Zsebo K, Williams DA (1992) Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* 80: 396-402.

Malik P, Krall WJ, Yu XJ, Zhou C, Kohn DB (1995) Retroviral-mediated gene expression in human myelomonocytic cells: a comparison of hematopoietic cell promoters to viral promoters. *Blood* 86: 2993-3005.

Markowitz D, Goff S, Bank A (1988) A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62: 1120-1124.

Markowitz D, Goff S, Bank A (1988) Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167: 400-406.

May C, Gunther R, McIvor RS (1995) Protection of mice from lethal doses of methotrexate by transplantation with transgenic marrow expressing drug-resistant dihydrofolate reductase activity. *Blood* 86: 2439-2448.

Maze R, Kapur R, Kelley MR, Hansen WK, Oh SY, Williams DA (1997) Reversal of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-induced severe immunodeficiency by transduction of murine long-lived hemopoietic progenitor cells using O6-methylguanine DNA methyltransferase complementary DNA. *J Immunol* 158: 1006-1013.

Maze R, Moritz T, Williams DA (1994) Increased survival and multilineage hematopoietic protection from delayed and severe myelosuppressive effects of a nitrosourea with recombinant interleukin-11. *Cancer Res* 54: 4947-4951.

McLachlin JR, Cornetta K, Eglitis MA, Anderson WF (1990) Retroviral-mediated gene transfer. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 38: 91-135.

Miller AD (1990) Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1: 5-14.

Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM (1993) Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217: 581-599.

Mitchell RB, Moschel RC, Dolan ME (1992) Effect of O6-benzylguanine on the sensitivity of human tumor xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and on DNA interstrand cross-link formation. *Cancer Res* 52: 1171-1175.

Morgan RA, Anderson WF (1993) Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 62: 191-217.

Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, Williams DA (1996) Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood* 88: 855-862.

Moritz T, Mackay W, Glassner BJ, Williams DA, 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: 2608-2614.

Moritz T, Patel VP, Williams DA (1994) Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J Clin Invest* 93: 1451-1457.

Nakajima K, Ikenaka K, Nakahira K, Morita N, Mikoshiba K (1993) An improved retroviral vector for assaying promoter activity. Analysis of promoter interference in pIP211 vector. *FEBS Lett* 315: 129-133.

Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.

Neben S, Hellman S, Montgomery M, Ferrara J, Mauch P, Hemman S (1993) Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 21: 156-162.

Neering SJ, Hardy SF, Minamoto D, Spratt SK, Jordan CT (1996) Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. *Blood* 88: 1147-1155.

Newlands ES, Blackledge GR, Slack JA, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, Quarterman CP, Hoffman R, Stevens MF, Brampton MH, et al. (1992) Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045; M&B 39831; NSC 362856). *Br J Cancer* 65: 287-291.

Nienhuis AW, McDonagh KT, Bodine DM (1991) Gene transfer into hematopoietic stem cells. *Cancer* 67: 2700-2704.

Okada H, Giezeman-Smits KM, Tahara H, Attanucci J, Fellows WK, Lotze MT, Chambers WH, Bozik ME (1999) Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 plus HSVtk tumor vaccine. *Gene Ther* 6: 219-226.

Orlic D, Girard LJ, Jordan CT, Anderson SM, Cline AP, Bodine DM (1996) The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11097-11102.

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392-8396.

Pegg AE (1990) Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 50: 6119-6129.

Pegg AE, Boosalis M, Samson L, Moschel RC, Byers TL, Swenn K, Dolan ME (1993) Mechanism of inactivation of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O⁶-benzylguanine. *Biochemistry* 32: 11998-12006.

Pegg AE, Wiest L, Foote RS, Mitra S, Perry W (1983) Purification and properties of O6-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J Biol Chem* 258: 2327-2333.

Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ (1996) Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 87: 30-37.

Petersen R, Kempler G, Barklis E (1991) A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol Cell Biol* 11: 1214-1221.

Ponder KP, Dunbar RP, Wilson DR, Darlington GJ, Woo SL (1991) Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum Gene Ther* 2: 41-52.

Ponnazhagan S, Mukherjee P, Wang XS, Qing K, Kube DM, Mah C, Kurpad C, Yoder MC, Srour EF, Srivastava A (1997a) Adeno-associated virus type 2-mediated transduction in primary human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells: donor variation and correlation of transgene expression with cellular differentiation. *J Virol* 71: 8262-8267.

Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, Wang XS, Zhou SZ, Kaplan J, Wadsworth S, Srivastava A (1997b) Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 190: 203-210.

Ponnazhagan S, Yoder MC, Srivastava A (1997c) Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of murine hematopoietic cells with long-term repopulating ability and sustained expression of a human globin gene in vivo. *J Virol* 71: 3098-3104.

Preuss I, Haas S, Eichhorn U, Eberhagen I, Kaufmann M, Beck T, Eibl RH, Dall P, Bauknecht T, Hengstler J, Wittig BM, Dippold W, Kaina B (1996) Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev* 20: 130-136.

Reese JS, Davis BM, Liu L, Gerson SL (1999) Simultaneous protection of G156A methylguanine DNA methyltransferase gene-transduced hematopoietic progenitors and sensitization of tumor cells using O6-benzylguanine and temozolomide. *Clin Cancer Res* 5: 163-169.

Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12: 2099-2108.

Roizman B, Jenkins FJ (1985) Genetic engineering of novel genomes of large DNA viruses. *Science* 229: 1208-1214.

Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. (1990) Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323: 570-578.

Russell DW, Miller AD (1996) Foamy virus vectors. *J Virol* 70: 217-222.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695.
- Sanger F, Coulson AR (1978) The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett* 87: 107-110.
- Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW (1992) Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 257: 99-103.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Spiro TP, Gerson SL, Liu L, Majka S, Haaga J, Hoppel CL, Ingalls ST, Pluda JM, Willson JK (1999) O6-benzylguanine: a clinical trial establishing the biochemical modulatory dose in tumor tissue for alkyltransferase-directed DNA repair. *Cancer Res* 59: 2402-2410.
- Tabbara IA, Robinson BE (1991) Hematopoietic growth factors. *Anticancer Res* 11: 81-90.
- Tentori L, Graziani G, Gilberti S, Lacal PM, Bonmassar E, S DA (1995) Triazene compounds induce apoptosis in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient leukemia cell lines. *Leukemia* 9: 1888-1895.
- Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA (1992) Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7350-7354.
- Tong WP, Kirk MC, Ludlum DB (1982) Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* 42: 3102-3105.
- Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2: 545-550.
- Wang S, Beattie GM, Hayek A, Levine F (1996) Development of a VSV-G protein pseudotyped retroviral vector system expressing dominant oncogenes from a lacO-modified inducible LTR promoter. *Gene* 182: 145-150.
- Watanabe T, Kuszynski C, Ino K, Heimann DG, Shepard HM, Yasui Y, Maneval DC, Talmadge JE (1996) Gene transfer into human bone marrow hematopoietic cells mediated by adenovirus vectors. *Blood* 87: 5032-5039.

Wedge SR, Newlands ES (1996) O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. *Br J Cancer* 73: 1049-1052.

Weiss RB, Issell BF (1982) The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treat Rev* 9: 313-330.

Weiss RB, Poster DS (1982) The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Treat Rev* 9: 37-56.

Weiss RB, Trush DM (1982) A review of the pulmonary toxicity of cancer chemotherapeutic agents. *Oncol Nurs Forum* 9: 16-21.

Woll PJ, Hodgetts J, Lomax L, Bildet F, Cour-Chabernaud V, Thatcher N (1995) Can cytotoxic dose-intensity be increased by using granulocyte colony-stimulating factor? A randomized controlled trial of lenograstim in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 13: 652-659.

Xu-Welliver M, Kanugula S, Pegg AE (1998) Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res* 58: 1936-1945.

Yanase K, Sugimoto Y, Andoh T, Tsuruo T (1999) Retroviral expression of a mutant (Gly-533) human DNA topoisomerase I cDNA confers a dominant form of camptothecin resistance. *Int J Cancer* 81: 134-140.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. T. Moritz für seine exzellente Anleitung bei den hier vorgestellten Arbeiten, die im Labor „Experimentelle Hämatologie und Gentransfer“ an der Inneren Klinik (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt wurden, und die ausgezeichnete Einführung in das Thema der Gentherapie.

Des weiteren bin ich Herrn Dr. M. Flaßhove für seine stete Diskussionsbereitschaft sowie Anregungen zur Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Herrn PD Dr. B. Opalka danke ich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung sowie für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors „Experimentelle Hämatologie und Gentransfer“, insbesondere Herrn Dr. W. Bardenheuer, Herrn Dr. C. Bury, Frau I. Demirer, Frau A. Ingensand, Herrn Dr. A. Schneider, Frau H. Steiniger, Frau M. Stuhl, Frau Dr. T. Trarbach, ohne deren tatkräftigen Einsatz und Anregungen die Labortätigkeit nicht in dieser Form möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. D. A. Williams und Frau Dr. S. Ragg danke ich für die herausragende Betreuung während meines Aufenthaltes am Herman B. Wells Center for Pediatric Research in Indianapolis. Ihnen ist die erfolgreiche Etablierung des murinen *in vivo* Knochenmarktransplantationsmodells maßgeblich zu verdanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn W. Stellberg für seine Unterstützung bei der Durchführung der durchflußzytometrischen Analysen bedanken.

Abschließend danke ich Frau C. Wartchow für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskriptes.

LEBENS LAUF

Name: Michael Jansen

Anschrift: Hansering 148
58339 Breckerfeld

Geburtsdatum: 26.03.1969

Geburtsort: Gelsenkirchen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975-1979 Grundschule
1979-1988 Gymnasium

Schulabschluß: Abitur

Studium: 1989-1995 Ruhr-Universität Bochum
Diplomstudiengang Biologie

Studienabschluß: Dipl.-Biologe

Wehrpflicht: 1988-1989 Grundwehrdienstleistender

Berufstätigkeit 1993-1994 studentische Hilfskraft
1995 wissenschaftlicher Mitarbeiter

ERKLÄRUNGEN

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Retroviraler Gentransfer des Chemotherapie-Resistenzgens O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Michael Jansen befürworte.

Essen, den

PD Dr. B. Opalka

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und mich keiner anderen als der erwähnten Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Dipl.-Biol. M. Jansen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Dipl.-Biol. M. Jansen

Seite: 1
[B1]
Seite: 17
[B2]