

Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis mit foamyviralen Vektoren



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl. Biochem. Nicole Armbruster

aus Marbach am Neckar

Würzburg, 2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis mit foamyviralen Vektoren“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 26.07.2011

Nicole Armbruster

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Rethwilm bedanken, der es ermöglicht hat, dass diese Dissertation unter seiner Betreuung am Institut für Virologie Universität Würzburg angefertigt werden konnte. Ich danke Ihm sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Unterstützung und sein ständiges Interesse und seine Diskussionsbereitschaft, die den Fortgang meiner Arbeit stets begleitet und gefördert haben.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Georg Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich ganz besonders bei PD Dr. Andre Steinert für die Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Stets hat er meine Arbeit mit Interesse, freundlicher Unterstützung sowie Geduld begleitet und so für ein sehr angenehmes und produktives Arbeitsklima gesorgt.

Weiterhin danke ich PD Dr. Carsten Scheller für die praktische Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase und dem Verfassen dieser Arbeit und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts für Virologie und Immunbiologie sowie allen Mitarbeitern des Orthopädischen Zentrum für Muskuloskelettale Forschung (ZMF, König-Ludwig-Haus, Würzburg) für ihre Hilfsbereitschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein weiterer Dank gilt allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Scheller, Koutsilieri, Steinert und Rethwilm für ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere bedanke ich mich bei Kathrin, Tatiana, Bianca, Falko, Jennifer, Anne, Inge, Christa, Conrad, Daniel, Uwe, und Manuela für ihre unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die vielen Ratschläge und ein sehr freundliches Arbeitsklima.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, Micha und seiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Die vorliegende Arbeit wurde aus den Mitteln des IZKF-Projekts „Intra-artikulärer Gentransfer mit foamyviralen Vektoren-Implikationen für Knorpelregeneration und Arthritistherapie“ von PD Dr. med. A. Steinert und Prof. Dr. A. Rethwilm finanziert.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 7 |
| 1.1 | Zusammenfassung | 7 |
| 1.2 | Summary | 8 |
| 2 | Einleitung | 10 |
| 2.1 | Rheumatoide Arthritis | 10 |
| 2.1.1 | Definition und Epidemiologie | 10 |
| 2.1.2 | Gelenkaufbau | 11 |
| 2.1.3 | Pathogenese | 12 |
| 2.2 | Interleukin-1 | 14 |
| 2.3 | Interleukin-1 Rezeptorantagonist, IL1RA | 16 |
| 2.4 | Behandlung der RA | 17 |
| 2.5 | Gentherapie | 18 |
| 2.6 | Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis | 22 |
| 2.7 | Foamyviren | 25 |
| 2.7.1 | Definition | 25 |
| 2.7.2 | Genomorganisation und Morphologie | 27 |
| 2.7.3 | Foamyvirale Vektoren | 29 |
| 2.7.4 | Gentherapie mit FV-Vektoren | 31 |
| 2.8 | Fragestellung | 34 |
| 3 | Material | 35 |
| 3.1 | Geräte | 35 |
| 3.2 | Material | 35 |
| 3.3 | Chemikalien | 36 |
| 3.4 | Computerprogramme und Internetseiten | 36 |
| 3.5 | Enzyme und Reaktionspuffer | 36 |
| 3.6 | Reaktionskomplettausstattungen (Kits) | 37 |
| 3.7 | Größenstandards | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.8 | Puffer und Lösungen..... | 38 |
| 3.9 | Medien..... | 40 |
| 3.10 | Bakterienstämme..... | 42 |
| 3.11 | Zelllinien..... | 43 |
| 3.12 | Vektorplasmide..... | 43 |
| 3.13 | Primer und Oligonukleotide..... | 45 |
| 4 | Methoden..... | 47 |
| 4.1 | Zellbiologische Methoden..... | 47 |
| 4.1.1 | Kultivierung adhärenter Zellen..... | 47 |
| 4.1.2 | Auftauen und Einfrieren von Zellen..... | 47 |
| 4.1.3 | Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) zur Produktion foamyviraler Partikel..... | 48 |
| 4.1.4 | Herstellung virushaltiger Überstände..... | 49 |
| 4.1.5 | Transduktion von Zielzellen mit FV-Vektorpartikeln..... | 49 |
| 4.1.6 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 49 |
| 4.1.7 | Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)..... | 50 |
| 4.1.8 | Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung..... | 51 |
| 4.2 | Mikrobiologische Methoden..... | 51 |
| 4.2.1 | Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen..... | 51 |
| 4.2.2 | Herstellung kompetenter E. coli Bakterien..... | 52 |
| 4.2.3 | Anlegen von Glycerinkulturen..... | 52 |
| 4.2.4 | Transformation..... | 52 |
| 4.3 | Molekularbiologische Methoden..... | 53 |
| 4.3.1 | RNA Isolation aus eukaryotischen Zellen..... | 53 |
| 4.3.2 | Klonierung von DNA-Fragmenten..... | 54 |
| 4.3.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 55 |
| 4.3.4 | Reverse Transkriptions (RT)-PCR (cDNA-Synthese)..... | 59 |
| 4.3.5 | Reinigung von PCR-Produkten..... | 60 |
| 4.3.6 | Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 60 |
| 4.3.7 | Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren..... | 61 |
| 4.3.8 | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien..... | 61 |
| 4.3.9 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 63 |
| 4.3.10 | Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen..... | 63 |
| 4.3.11 | Dephosphorylierung..... | 64 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3.12 | Ligation | 64 |
| 4.4 | Proteinbiochemische Methoden | 64 |
| 4.4.1 | ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) | 65 |
| 4.4.2 | PGE ₂ -Assay | 65 |
| 4.5 | 3D-Pelletkulturen / Chondrogene Differenzierung in vitro | 66 |
| 4.6 | Kultivieren von hMSZ | 66 |
| 4.6.1 | Transduktion von hMSZ mit FV-Vektoren | 66 |
| 4.6.2 | Chondrogene Differenzierung von hMSZ in der Pelletkultur | 66 |
| 4.6.3 | Paraffineinbettung von Pellets | 67 |
| 4.6.4 | Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung | 68 |
| 4.6.5 | Hämalaun&Eosin (H&E) Färbung | 68 |
| 4.6.6 | Alcianblau Färbung | 69 |
| 4.7 | Tierexperimentelle Arbeiten | 69 |
| 4.7.1 | Haltung der Tiere und verwendete Rattenstämme | 70 |
| 4.7.2 | Anästhesie, Operation und Postoperative Versorgung | 70 |
| 4.7.3 | Präparation von Synovialmembranen aus Rattenkniegelenken | 71 |
| 4.7.4 | Organentnahme | 72 |
| 4.7.5 | Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Geweben | 72 |
| 4.7.6 | Organkulturen | 73 |
| 4.8 | Quantitative Analyse und Statistik | 73 |
| 5 | Ergebnisse | 74 |
| 5.1 | Konzentrierung FV-Vektoren durch Zentrifugation | 74 |
| 5.2 | Klonierung von pBF014 (IRES-EGFP): | 75 |
| 5.3 | Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA4 (pBF014-EF-1α) | 75 |
| 5.4 | Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA3 (hIL1β in SJ03) | 77 |
| 5.5 | Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA2 (ratIL1RA in BF014) | 78 |
| 5.6 | <i>In vitro</i> Evaluierung des FV.hIL1RA / NA1 Vektors (hIL1RA in BF014) | 81 |
| 5.6.1 | <i>In vitro</i> Charakterisierung des FV.hIL1RA Vektors mit primären Ratten Synovialfibroblasten | 85 |
| 5.6.2 | <i>In vitro</i> Funktionalität von hIL1RA | 87 |
| 5.6.3 | Langzeitexpression von FV.hIL1RA in MSZ | 88 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.6.4 | NA1-transduzierte Zellen überwinden die IL1 β -induzierte Blockade der chondrogenen Differenzierung | 90 |
| 5.7 | FVV vermittelte Transgenexpression in vivo | 95 |
| 5.7.1 | Experimentelles Design der Gentransferstudien..... | 95 |
| 5.7.2 | Zellkulturen von explantierten Synovialzellen | 96 |
| 5.7.3 | <i>In Vivo</i> Expression von humanem IL1RA in Wistar Ratten | 99 |
| 5.7.4 | <i>In Vivo</i> Expression von humanem IL1RA in <i>nude</i> Ratten | 100 |
| 5.7.5 | Biodistribution..... | 102 |
| 6 | Diskussion | 106 |
| 6.1 | FVV für die Gentherapie der RA..... | 106 |
| 6.2 | <i>In vitro</i> Charakterisierung und Aufbau der Foamyviralen Vektorkonstrukte | 108 |
| 6.3 | Zellbasierter foamyviral vermittelter Gentransfer in Rattenkniegelenke | 113 |
| 6.4 | Therapiesicherheit | 118 |
| 6.5 | Experimentelle Arthritismodelle..... | 121 |
| 6.6 | Foamyvirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen..... | 122 |
| 6.7 | FV.hIL1RA Langzeitexpression in MSZ..... | 124 |
| 6.8 | Ausblick | 125 |
| 7 | Anhang..... | 126 |
| 7.1 | Detaillierte Angaben zu den i.a. hIL1RA-Messungen | 126 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis | 128 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis | 129 |
| 7.4 | Abkürzungsverzeichnis | 130 |
| 7.5 | Publikationsliste | 135 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 136 |

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch anhaltende Gelenkentzündungen gekennzeichnet ist und mit einer fortschreitenden Degradierung des Knorpels und Knochen einhergeht. Ungefähr 2 % der erwachsenen Bevölkerung weltweit sind betroffen und leiden unter erheblichen Gelenkschmerzen und Beeinträchtigungen.

Der intraartikuläre Transfer anti-entzündlicher Gene (z.B. des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten – IL1RA) zeigte signifikante Bedeutung in präklinischen und Phase-I klinischen Studien der RA Therapie. Die meisten dieser Studien verwendeten MLV-basierte orthoretrovirale Vektoren für eine stabile Transgenexpression, tragen aber das Risiko der Insertionsmutagenese.

Wir haben foamyvirale Vektoren (FVV) etabliert, welche von apathogenen Elternviren abgeleitet sind und sich durch ein breites Wirtsspektrum und ein vorteilhaftes Integrationsmuster ins zelluläre Genom auszeichnen. In dieser Arbeit wurden IL1RA exprimierende prototypische foamyvirale Vektoren (PFV) generiert, deren chondroprotektives Potential *in vitro* und in einem indirekten Gentransferansatz in Kniegelenken von Wistar und athymischen Nacktratten *in vivo* evaluiert wurde.

PFV Vektoren mit der kodierenden Sequenz für den humanen IL1RA, einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und EGFP wurden generiert und mit Verwendung eines Vier-Plasmidsystem, bestehend aus dem Vektorplasmid (IL1RA-IRES-EGFP) und den Expressionsplasmiden FV-gag, FV-pol und FV-env in 293T Zellen produziert. Ebenso wurden Kontrollvektoren welche nur EGFP exprimieren generiert.

Transduktionsexperimente wurden mit primären humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) aus Knochenmarkaspiraten, der Tert-4 mesenchymalen Stammzelllinie, HT1080 Fibroblasten und primären Ratten Synovialfibroblasten durchgeführt. Die Transgenexpression wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (EGFP), ELISA (IL1RA) und quantitativer *Real-Time* PCR (IL1RA) evaluiert.

Die Funktionalität des IL1RA-Proteins wurde mit einem Prostaglandin E₂ (PGE₂) Assay gezeigt. Dazu wurden FV.IL1RA transduzierte Tert-4 Zellen und unbehandelte Zellen mit 10 ng/ml IL1 β inkubiert. Als *readout* für die IL1-Stimulation dienten die PGE₂ Mengen in den konditionierten Medien. Die Zellkulturüberstände wurden 48 h nach IL1-Gabe auf ihren PGE₂ und IL1RA Gehalt hin untersucht. Die PGE₂ Menge war dabei, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, in den FV.IL1RA transduzierten Zellen signifikant erniedrigt.

Nach der Transplantation von foamyviral transduzierten Synovialfibroblasten in Kniegelenke von Wistar und athymischen Nacktratten, war die intraartikuläre (i.a.) Transgenexpression in

den Wistar Ratten zunächst hoch, fiel jedoch nach ungefähr 3 Wochen ab. Im Gegensatz dazu war die foamyviral vermittelte IL1RA-Expression in den immundefizienten Ratten für 12 Wochen auf sehr hohen Leveln stabil. Ein Maximum wurde an Tag 10 nach i.a. Transplantation mit ca. 450 ng pro Gelenk erreicht.

Untersuchungen zur Biodistribution zeigten keine extraartikuläre Transgenexpression in allen untersuchten Organen (Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Gonaden und Serum). Diese Resultate, zusammen mit dem Ausbleiben von sekundären Erkrankungen, wie bspw. Tumoren, in allen behandelten Tieren, sprechen für die Sicherheit des Ansatzes.

Die Arbeit zeigt, dass FVV verwendet werden können, um primäre Synovialfibroblasten und MSZ effizient mit Markergenen und dem anti-entzündlichen IL1RA Transgen zu transduzieren. Die dabei erzielten Transgenlevel sind in der Lage, die Effekte von hochdosiertem IL1 zu blockieren.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass FVV sehr effiziente Werkzeuge für den *ex vivo* Gentransfer sind und unterstreichen ihr großes Potential für die Bereitstellung anti-entzündlicher Transgene in primären Zellen und Geweben.

Zukünftig soll diese Technologie in Tiermodellen der Arthritis angewendet werden. Das Fernziel der Arbeiten besteht in der Etablierung und Evaluierung eines Gentransfersystems, welches die *in vivo* Applikation am Menschen erlaubt.

1.2 Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with persistent joint inflammation that results in progressive degradation of cartilage and bone. Approximately 2 % of the adult population worldwide are estimated to be affected by RA and suffer from substantial joint pain and disability.

The intra-articular transfer of anti-inflammatory genes (e.g. interleukin receptor antagonist protein – IL1RA) showed significant impact in preclinical and early phase clinical trials for RA therapy. Most of these studies used MLV-based orthoretroviral vectors for stable transgene expression, but carry the risk of insertional mutagenesis. We have established foamyviral vectors (FVV) that are derived from apathogenic parent viruses and are characterized by a broad host range and a favourable integration pattern into the cellular genome. Here we used prototype foamyvirus vectors (PFV) that expressed IL1RA and evaluated their protective effects *in vitro* and in an indirect gene transfer approach in knee joints of Wistar and athymic nude rats *in vivo*.

PFV vectors carrying the coding sequence of the human IL1RA gene, along with EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) linked via an internal ribosomal entry site (IRES), were generated and produced by using a four-plasmid system consisting of the vector plasmid

(IL1RA-IRES-EGFP) and the expression plasmids FV-gag, FV-pol and FV-env in 293T cells. Control vectors were also generated that expressed EGFP only.

Transduction experiments were performed with different cells including human primary mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow-aspirates, the Tert-4 mesenchymal stem cell line, the HT1080 fibroblast cell line and primary rat synovial fibroblasts. The transgene expression was evaluated by fluorescence microscopy (EGFP), flow cytometry (EGFP), ELISA (IL1RA) and realtime polymerase chain reaction (PCR) (IL1RA).

Functionality of the IL1RA protein was shown by using a Prostaglandin E₂ (PGE₂) Assay. For this, FV.IL1RA transduced Tert-4 cells and untreated Tert-4 cells were incubated with 10 ng/ml IL1 β . As a readout for the IL1 stimulation, levels of PGE₂ in conditioned media were determined. Cell culture supernatants were assayed 48 hours later for their PGE₂ and IL1RA levels. The PGE₂ levels were statistically significantly lower in the FV.IL1RA transduced cells in comparison to untreated controls.

After the transplantation of foamyviral-transduced synovial fibroblasts in knee joints of Wistar and athymic nude rats, the intra-articular transgene expression in Wistar rats was initially high and declined after approximately 3 weeks. In contrast, foamyviral-mediated expression of human IL1RA was found to persist for at least 12 weeks at very high levels in immunocompromised rats, with a maximum value of approximately 450 ng human IL1RA per joint at day 10 after intra-articular transplantation.

Biodistribution experiments were also performed and revealed the absence of extra-articular transgene expression in all organs analyzed (brain, heart, lung, liver, kidney, spleen, gonad and serum). This finding, along with the nonappearance of secondary disorders such as tumors in all animals treated, argue for the safety of the approach.

Here we show that FV vectors can be used to efficiently transduce primary synovial fibroblasts as well as primary MSCs with marker genes as well as the anti-inflammatory IL1RA transgene at levels that were functional to block the effects of high doses of IL1 β .

The results indicate that FV vectors are very efficient tools for *ex vivo* gene transfer and underscore their high value for delivering antiinflammatory transgenes to primary cells and tissues. In future experiments we aim to apply this technology in animal models of disease. The ultimate goal of this research is the establishment and evaluation of a gene transfer system that allows the application in humans.

2 Einleitung

2.1 Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündlich systemische Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich durch die chronische Entzündung der Gelenke sowie Destruktion des Gelenkknorpels gekennzeichnet ist. Vorwiegend sind dabei die Gelenke der Extremitäten betroffen, wobei u.a. auch Augen, Haut, Sehnenscheiden, Schleimbeutel, Blutgefäße und andere innere Organe betroffen sein können. Die Prävalenz der RA liegt bei ca. 0,5 - 1 % weltweit (Gabriel, 2001; Scott et al., 2010).

Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten und hat einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr, wobei Frauen 2-3 mal häufiger betroffen sind als Männer (Sangha et al., 2000; Symmons, 2002). Die entzündlichen Veränderungen äußern sich in Gelenkschwellungen, wobei es beim schwerem Verlauf zu einer typischen Deformationen und zunehmendem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke kommt. Die irreversible Schädigung des Knorpels, sowie damit einhergehende Schädigungen des gelenknahen Knochens, die sich bereits innerhalb weniger Jahre manifestieren, gehen oft mit Behinderung und Invalidisierung einher (Pollard et al., 2005). Die Folgeerscheinungen bergen eine immense sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft. Neben den hohen Kosten für das Gesundheitswesen sind die gängigen Behandlungsmethoden zudem nur teilweise wirksam und sehr aufwendig (Scott et al., 2010).

Im späten Krankheitsverlauf kann es neben den Gelenkmanifestationen zusätzlich zu systemischen und extraartikulären Manifestationen kommen. Dazu können u.a. Rheumaknoten, Osteoporose, chronische Anämie, Vaskulitis, Serositis, Amyloidose, Neuropathien und kardiopulmonale Komplikationen gehören (Young und Koduri, 2007).

Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist trotz intensiver Forschung bislang noch weitgehend unklar (Silman und Pearson, 2002). Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Modellvorstellungen entwickelt von denen im Folgenden die beiden wichtigsten dargestellt werden sollen. Die Detektion von Autoantikörpern im Serum von RA-Patienten, die gegen den Fc-Teil von Immunglobulin G (IgG) gerichtet sind, sog. Rheumafaktoren (RF), führten zunächst zur sogenannten Immunkomplextheorie. Diese geht von einer Autoimmunerkrankung als Ursache der RA aus. Die RF sind jedoch nicht bei allen Patienten nachweisbar. Neben Risikofaktoren wie Umweltbelastungen und Hormonen (Scott et al., 2010) wird auch eine genetische Disposition vermutet, da die RA familiär gehäuft auftritt.

Auch zahlreiche genetische Polymorphismen für Zytokine, die an der Pathogenese der RA beteiligt sind, wurden beschrieben, wie z.B. für $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\alpha/\beta$, IL1RA , IL4 , IL6 und IL10 (Cantagrel et al., 1999; Verweij, 1999). Deren präzise Rolle ist bislang allerdings noch unklar. Des Weiteren werden virale und auch bakterielle Infektionen als Auslöser der RA diskutiert. So wurde z.B. der Nachweis von viralen Antigenen im Zusammenhang mit der RA für das Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B und C Virus, Parvovirus B19 und HTLV-1 (humanes T-lymphotropes Virus 1) (Vassilopoulos und Calabrese, 2008). publiziert.

Eine weitere Theorie ist die des sogenannten „*shared epitope*“, ein Modell das den T-Zell-vermittelten Anteil am Ursprung der RA illustriert (Gorman und Criswell, 2002). Eine signifikante Häufung der Expression bestimmter HLA-DRB1-Allele, welche eine bekannte Sequenz von fünf Aminosäuren in der hypervariablen Region der β -Kette im HLA-Molekül kodieren, das sog. „*shared epitope*“, wurde interessanterweise bei 80-90 % aller kaukasischen RA-Patienten gefunden. Eine Beteiligung bei der Antigenpräsentation an CD4^+ T-Zellen oder die Bindung eines exogenen Peptids wurde diskutiert. Ein daraus resultierendes RA-spezifisches T-Zell-Repertoire konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Und auch im Synovium und der Synovialflüssigkeit konnten keine großen Mengen an spezifischen T-Zell-Zytokinen, wie z.B. IL2 und $\text{IFN-}\gamma$ nachgewiesen werden, dagegen überwogen die von Makrophagen und Fibroblasten sezernierten Zytokine, wie z.B. IL1 , IL6 und $\text{TNF-}\alpha$. Diese Gegebenheit und die vermehrt auftretende Proliferation der synovialen Fibroblasten (SF) (synoviale Hyperplasie) führte zu der Theorie dass möglicherweise die SF sämtliche weiteren Krankheitsprozesse auslösen könnten (Burkhardt und Möller, 2003; Firestein 2003).

2.1.2 Gelenkaufbau

Die RA manifestiert sich wie bereits erwähnt hauptsächlich in den Gelenken (Lat: *Articulatio*). Man unterscheidet in der Anatomie zwischen sog. „echten“ (engl. *diarthrodial*) Gelenken, welche mit einem flüssigkeitsgefüllten Spalt versehen sind und den *unechten Gelenken* (z.B. knorpelige oder bindegewebige Knochenverbindungen, die keinen Gelenkspalt besitzen. Der Gelenkspalt zwischen den knorpelüberzogenen Gelenkflächen enthält die Synovialflüssigkeit (Synovia), die der Ernährung des gefäßlosen Gelenkknorpels dient und neben der „Schmierung“ der Gelenkflächen auch zur Stoßdämpfung in den Gelenken beiträgt (Wong und Carter, 2003; Neu et al., 2008). Die Synovia ist eine klare viskose Flüssigkeit, die in der Zusammensetzung fast identisch zum Blutplasma ist, mit Ausnahmen wie Fibrinogen und großen Globulinen, die von den Synovialkappillarwänden ganz oder teilweise zurückgehalten werden. Die Synovia kann vom Plasma weiterhin durch die Präsenz von Hyaluronsäure und Lubricin unterschieden werden. Diese zwei Komponenten sind auch hauptverantwortlich für

die Viskosität der Synovia. Das Volumen der Synovialflüssigkeit beträgt beim Menschen nur 0,2 - 0,5 ml und ist einem kontinuierlichen Umsatz durch den transsynovialen Fluss in die Lymphgefäße unterworfen. Wasser und Proteine werden dadurch bspw. innerhalb von zwei Stunden ersetzt (Simkin und Pizzorno, 1974). In RA Gelenken wird dem Entzündungsgrad entsprechend mehr niedrig visköse Synovialflüssigkeit produziert, dessen Volumen 100 ml auch übersteigen kann. Dabei sind auch Proteinaufnahme und Ausscheidungsrate um ein vielfaches erhöht (Owen et al., 1994).

Die Gelenkkapsel umschließt das Gelenk, deren Außenseite bildet die aus Kollagenfasern aufgebaute *Membrana fibrosa*. An der Innenseite befindet sich die Gelenkinnenhaut / Synovialmembran (*Membrana synovialis*), die das Gelenk fast vollständig auskleidet. In der Synovialmembran liegt keine klare Trennung zwischen verschiedenen Zellschichten vor. Von der kollagenhaltigen, stabilen Gelenkkapsel ausgehend schließt sich eine Schicht aus verstreut liegenden Fibroblasten, Adipozyten, Blutgefäßen und lockerem Bindegewebe an („*sublining*“). Zum Gelenkspalt hin befindet sich die sog. synoviale Deckzellschicht (*lining layer*). Diese besteht im gesunden Gelenk aus etwa ein bis drei Zellschichten synovialer Deckzellen (Synoviozyten). Die Zellen dieser Schicht bestehen hauptsächlich aus zwei Zelltypen, den synovialen Makrophagen (Synoviozyten Typ A) und den synovialen Fibroblasten (SF; Synoviozyten Typ B). Die synovialen Makrophagen mit Ihren phagozytotischen Eigenschaften dienen in erster Linie zur Beseitigung von Zelltrümmern, toten Zellen und eingedrungenen Mikroorganismen (Smith et al., 2003). Die SF sind u.a. für den kontinuierlichen Umbau der Matrix verantwortlich, dieser ist notwendig, um die durch ständige Bewegung und Belastung der Gelenke auftretenden geringfügigen Destruktionen des Knorpels auszugleichen. Sie setzen kontrolliert matrixabbauende Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinasen (MMP)), und deren Inhibitoren (z.B. TIMP; *tissue inhibitors of metalloproteinases*), sowie Matrixkomponenten wie z. B. Kollagen und Hyaluronsäure frei (Mor et al., 2005; Abeles und Pillinger, 2006). Die Synovialmembran von RA Patienten ist verdickt und weist eine Infiltration von Immunzellen auf, was uns zu den Pathomechanismen der RA führt.

2.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese der RA stellt ein komplexes Krankheitsgeschehen dar und ist wie bereits erwähnt noch nicht vollständig verstanden (Weyand, 2000; Arend, 2001b). Die drei Hauptmerkmale Entzündung, eine abnorme Immunantwort und ein verändertes Wachstum, werden durch die Interaktion mehrerer Zelltypen und vieler verschiedener Faktoren vermittelt. Die bekannten Pathomechanismen wurden von Firestein et al. in ein hypothetisches mehrstufiges Krankheitsmodell integriert. Demnach stimulieren unbekannte

Faktoren die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren, die eine Synovitis hervorrufen. Durch diese können bei entsprechender genetischer Disposition autoimmune Mechanismen provoziert werden, woraufhin spezifische Immunzellen zur treibenden Kraft im Geschehen werden. Die Entzündung richtet sich nun gegen autologe Antigene und wird chronisch. Pro-inflammatorische Mediatoren werden nun konstitutiv freigesetzt. Nach Infiltration mononukleärer Zellen (Entzündungszellen / immunkompetente Zellen; T-, B-Zellen, Makrophagen, Leukozyten, natürliche Killer-Zellen (NK)), kommt es ausgehend von der anfänglichen synovialen Hyperplasie letztlich zur Formierung des sog. Pannusgewebes (Firestein et al., 2003). Der Pannus ist ein proliferationsaktiver, aggressiv wachsender Zellverband, der in das umgebende Knorpel- und Knochengewebe vordringt (Müller-Ladner et al., 2005; Karouzakis et al., 2006).

Im Krankheitsgeschehen der RA spielen Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Neutrophile, Chondrozyten und Osteoklasten, vor allem aber auch aktivierte SF eine wichtige Rolle (Gravallese, 2002; Skapenko et al., 2005; Ma und Pope, 2005; Müller-Ladner et al., 2007). So konnten neben einem aggressiven Wachstumsverhalten, monoklonale Expansionen innerhalb der Synoviozytenpopulation und Störungen im DNA-Reparatursystem nachgewiesen werden (Inazuka et al., 2000). Bereits 1983 wurde gezeigt, dass rheumatoide Synovialfibroblasten (RASf) erhebliche Veränderungen in Hinsicht auf Morphologie und Proliferation im Vergleich zu normalen artikulären Fibroblasten aufweisen (Fassbender et al., 1983). Durch Sezernierung von Chemokinen, Wachstumsfaktoren, pro-inflammatorischer und matrixdestruktiver Mediatoren beeinflussen sie viele Prozesse die das Krankheitsgeschehen aufrechterhalten (Pap et al., 2000a; Pap et al., 2002b; Ritchlin, 2000). Die RASf adhärieren zudem am Gelenkknorpel, was zur Invasion und Degradation und letztlich zur Destruktion der Knorpelmatrix und des darunterliegenden Knochens führt (Buckley et al., 2001; Huber et al., 2006; Abeles und Pillinger, 2006). Die Überexpression von Proto-Onkogenen, wie z.B. *c-myc*, *fos* und *ras* (Müller-Ladner et al., 1995) sowie die verminderte oder gar fehlende Expression von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. p53 oder PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Müller-Ladner und Nishioka, 2000; Cha et al., 2006) und eine verringerte Apoptose durch Expression anti-apoptotischer Faktoren (z. B. bcl-2) führt zur verlängerten Lebensspanne der Zellen, die akkumulieren und zur Hyperplasie beitragen (Korb et al., 2009). Eine gesteigerte Zytokinsynthese, vor allem des pro-inflammatorischen IL1 ist ebenso zu verzeichnen wie die Aktivierung von Osteoklasten und Beeinträchtigung der Chondrozytenfunktion (Smith und Haynes, 2002).

Physiologisch sind Zink-abhängige Endopeptidasen an Reparatur- und Umbauprozessen des Knorpels beteiligt. In der RA spielen sie jedoch neben Serinproteasen (wie z.B. Trypsin) und Aggrekanasen die zentrale Rolle bei der Destruktion des Knorpels. Die Sezernierung Matrix-degradierender Enzyme ermöglichen den RASf eine signifikant erhöhte

Invasionsfähigkeit zudem sind vor allem Collagenase-1 (Matrixmetalloproteinase-1, MMP-1) und Collagenase-3 (MMP-13) dominierend am Kollagen II Abbau beteiligt (Pap et al., 2000b; Burrage et al., 2006). Des Weiteren findet durch die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen, zusammen mit der zunehmenden Vaskularisierung, eine gesteigerten Einwanderung von Entzündungszellen in das betroffene Synovialgewebe statt (Neidhart et al., 2000; Müller-Ladner, 1996).

Die Synovialzellen, die in dieser Arbeit aus den Kniegelenken präpariert und für die Transplantation verwendet wurden, sind also jene, die am Krankheitsgeschehen maßgeblich beteiligt sind (Firestein et al., 1996; Mor et al., 2005).

2.2 Interleukin-1

Pro-inflammatorische Zytokine sind in der RA für die Initiierung und Aufrechterhaltung entzündlicher Vorgänge von zentraler Bedeutung (Dinarello und Thompson, 1991; Choy und Panayi 2001; Dinarello, 1994b). Die drei Mitglieder der IL1-Familie, IL1 α , IL1 β und der IL1RA, die von verschiedenen Genen kodiert werden, liegen beim Menschen in einem *cluster* auf Chromosom 2 (2q14-q21) und sind bei der Ratte auf Chromosom 3 lokalisiert (Nicklin et al., 2002; Dinarello, 1994a). IL1 α liegt größtenteils intrazellulär bzw. membranassoziiert vor. IL1 β wird als Vorläuferprotein (Pro-IL1 β) synthetisiert, durch das Enzym Caspase-1 (*Interleukin-1 Converting Enzyme* = ICE) in die aktive Form überführt und in Mikrovesikeln sezerniert (Wilson et al., 1994). Die pleiotropen Effekte von IL1 werden über den IL1-Rezeptor Typ I (IL1RI) vermittelt. Die extrazelluläre IL1-Bindung induziert die Bildung eines trimolekularen Komplexes mit dem IL1R akzessorischen Protein (Wesche, 1997). Mehrere Signalwege werden aktiviert, wobei letztlich die Aktivierung von NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) zur Induktion pro-inflammatorischer Proteine führt (Dower et al., 1986). Daneben gibt es noch den IL1-Rezeptor Typ II (IL1RII), der eine verkürzte cytoplasmatische Domäne (60 kD), im Gegensatz zur 80 kD großen cytoplasmatischen Domäne des IL1RI, aufweist. Er fungiert als löslicher oder membranassoziiertes „*decoy*“-Rezeptor und kann aktives IL1 abfangen, ohne eine Signaltransduktion zu induzieren (Arend, 1991; Colotta et al., 1993).

Eine Überproduktion an pro-inflammatorischen Zytokinen aus Synoviozyten, Makrophagen und T-Zellen führt zum krankheitstypischen Zytokinungleichgewicht in der RA. Mehrere Therapiestrategien verfolgen deswegen die selektive Hemmung zentraler pro-inflammatorischer Mediatoren. Hauptmediatoren des Entzündungsgeschehens sind hierbei vor allem TNF α und IL1 β (Arend, 2001a; Feldmann et al., 1996; Evans et al., 1998a). TNF α findet sich überwiegend in den frühen Krankheitsstadien, während IL1 β in allen Krankheitsstadien nachgewiesen werden kann (Ulfgren et al., 2000; van den Berg, 2000; van den Berg et al., 1999).

TNF α und IL1 β haben überlappende pro-inflammatorische Effekte, sie stimulieren die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie die Produktion proteolytischer Enzyme. IL1 β stimuliert u.A. Monozyten, rekrutiert Entzündungszellen ins Gelenk und induziert die Sekretion knorpeldegradierender Faktoren (Dinarello, 1996). Die eigenständige Rolle von IL1 β wurde im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis deutlich, in dem die Neutralisierung von IL1 β zur Prävention der Knochenzerstörung führte. Wohingegen die Hemmung von TNF α zwar zur Verbesserung der Entzündung, nicht aber zur Verhinderung der Erosionen beitrug (Joosten et al., 1999; van den Berg et al., 1994; Zwerina et al., 2007). Ein detaillierter Überblick über die von IL1 β in der RA vermittelten Effekte ist in Abb. 1 dargestellt (Kay und Calabrese, 2004).

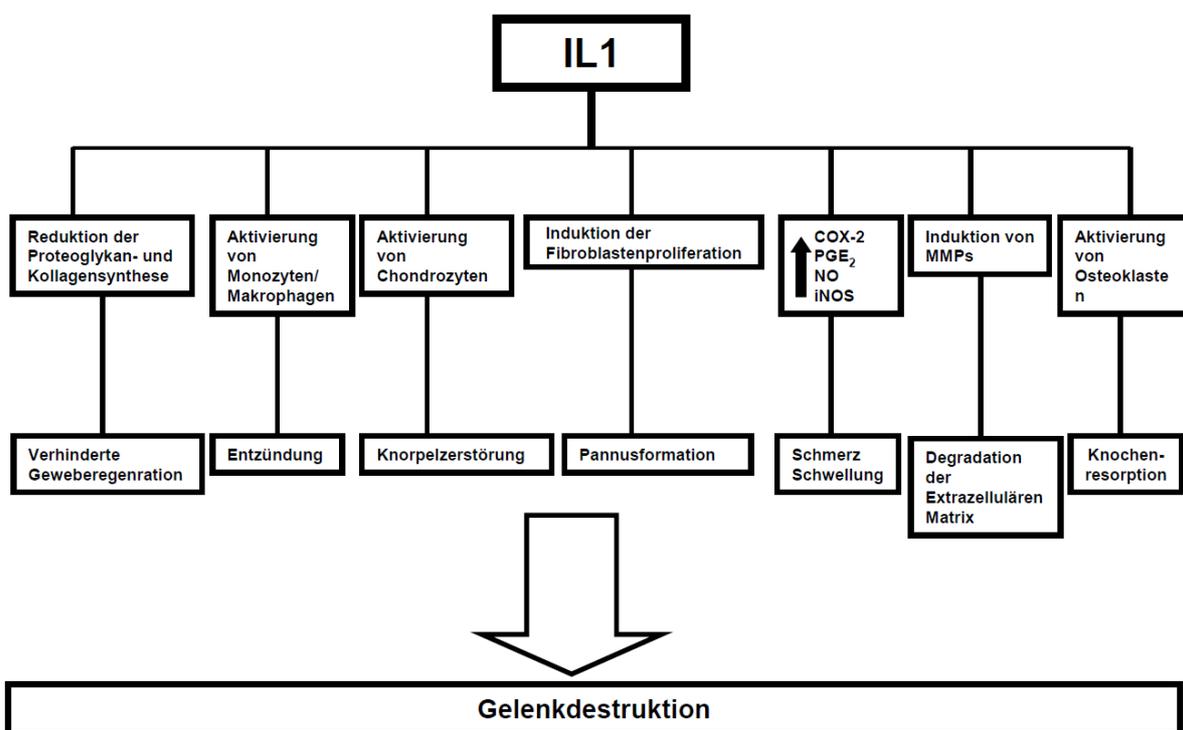


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der durch Interleukin-1 vermittelten Effekte und klinischen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis. COX-2 = Cyclooxygenase-2; PGE₂ = Prostaglandin E₂; NO = Stickstoffoxid; iNOS = *inducible nitric oxide synthase*, MMP = Matrixmetalloproteinase; Pfeil nach oben = Induktion der Synthese (Abbildung nach <http://www.kineret-eu.com>)

Patienten mit RA weisen zudem stark erhöhte IL1 β Konzentrationen im Plasma und in der Synovialflüssigkeit auf, wobei die Konzentration mit der Aktivität der Krankheit korreliert (Fong et al., 1994; Eastgate et al., 1988).

Die bedeutende Rolle von IL1 im Entzündungsgeschehen wurde auch in mehreren tierexperimentellen Studien belegt. So induziert die wiederholte intraartikuläre Injektion von

IL1 β eine chronische Arthritis in Ratten, was bereits vor 20 Jahren gezeigt wurde (Chandrasekhar et al., 1990; Hom et al., 1988; Hom et al., 1990; Feige et al., 1989). Ebenso konnte durch den *ex vivo* Gentransfer von IL1 β ins Kniegelenk von Kaninchen eine Arthritis-ähnliche Pannusformation sowie die Entstehung von Erosionen gezeigt werden, die nach dem Verlust der IL1-Expression zudem reversibel waren (Ghivizzani et al., 1997a). IL1 transgene Mäuse entwickelten bereits im Alter von vier Wochen einen akuten polyarthritischen Phänotyp (Niki et al., 2001).

2.3 Interleukin-1 Rezeptorantagonist, IL1RA

Der dritte Vertreter der IL1 Familie, der IL1RA ist ein selektiver und spezifischer endogener Rezeptorantagonist ohne bekannte intrinsische Aktivität, der die Wirkung von IL1 α und IL1 β kompetitiv hemmt (Arend et al., 1991; Arend, 1991; Arend, 1993; Evans und Robbins, 1994b). Er wird von fast allen Zellen, die IL1 exprimieren, gebildet. Da der IL1RA nur eine Rezeptorbindungsstelle im Gegensatz zu IL1 β besitzt, löst er keine Reaktion am Rezeptor aus (Eisenberg et al., 1990; Arend et al., 1998; Arend, 1993).

Neben drei intrazellulären Isoformen ist die sezernierte Form des IL1RA (Isoform 1) für die Hemmung des IL1-Rezeptors von Bedeutung. Sie wird nach Reifung im Golgi-Komplex mittels Vesikeln aus der Zelle sezerniert und kommt als 17 kDa sowie in unterschiedlich glykosylierter Form vor (22 - 25 kDa) (Haskill et al., 1991).

Ein biologischer Effekt von IL1 wird beobachtet, auch wenn weniger als 5 % aller IL1-Rezeptoren besetzt sind (Dinarello, 1996). Deswegen braucht es einen 10- bis 100-fachen molaren Überschuss an IL1RA, um 50 % der biologischen Effekte von IL1 zu blockieren (Bresnihan et al., 1998; Arend und Gabay, 2000). So genügten in einem Ratten Krankheitsmodell konstante Serumlevel von 1 μ g/ml für anti-erosive Effekte. 5 μ g/ml waren jedoch notwendig um die inflammatorischen Prozesse signifikant zu inhibieren (Bendele et al., 1999). Therapeutische Effekte konnten dabei nur mit dem Einsatz osmotischer Pumpen erreicht werden.

Anakinra ist die rekombinate Form des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (Kineret®) und seit 2002 auf dem Markt (Rubbert-Roth und Perniok, 2003). Abgesehen von der fehlenden Glykosylierung und einem zusätzlichen Methioninrest ist es mit dem physiologischen Rezeptorantagonisten identisch. Anakinra zeigte in randomisiert plazebokontrollierten, doppelblinden Studien ein signifikantes Ansprechen der Krankheitssymptomatik und den Rückgang serologischer Entzündungsparameter. Die im Röntgenbild feststellbaren Erosionen der RA-Patienten waren zudem reduziert. Da Anakinra von der Leber sehr schnell abgebaut wird, muss es subkutan injiziert werden, wobei die auch im Serum relativ kurze Halbwertszeit von vier bis sechs Stunden eine häufige Applikationen bedingt. Gouze et al.

konnten in einer *in vitro* Studie zeigen, dass eine retroviral vermittelte kontinuierliche Expression von IL1RA, dem Kulturmedium zugesetztes IL1 β effektiver inhibierte, als das rekombinate Protein Anakinra (Gouze et al., 2003b).

Bereits 1990 zeigte man, dass der IL1RA die Effekte von IL1 β hinsichtlich Knochenresorption und Prostaglandinproduktion antagonisieren kann (Seckinger et al., 1990). Zahlreiche weitere tierexperimentelle Studien haben die wichtige chondroprotektive Bedeutung, die dem IL1RA zukommt, aufgezeigt (Müller-Ladner et al., 1997; van den Berg, 2000).

Injiziert man IL1 α oder IL1 β bei Kaninchen lokal ins Gelenk, kann es bereits nach wenigen Stunden zu einer Akkumulation von Leukozyten und zum Verlust von Proteoglykanen aus dem Gelenkknorpel kommen, was durch IL1RA inhibiert werden kann (Henderson et al., 1988).

In BALB/cA-Mäusen, deren IL1RA Gen deletiert wurde, findet sich nach wenigen Wochen eine entzündliche Arthropathie, welche zu einer schweren deformierenden Arthritis fortschreitet. Die Knochenerosionen sowie das histologische Erscheinungsbild ähneln dabei der RA beim Menschen (Horai et al., 2000; Smith et al., 1991; Nakae et al., 2003). Die Autoimmunität in diesen Mäusen ist durch einen Überschuss von IL1, IL6, TNF und IL17, sowie Autoantikörpern und Rheumafaktoren charakterisiert (Hirsch et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einer Überexpression von IL1RA einen verminderten Schweregrad und niedrigere Inzidenzraten bei Kollagen-induzierten Arthritiden (Ma et al., 1998). Weiterhin konnte man interessanterweise zeigen, dass sich die RA nicht in IL1RA-*knockout* Mäusen, die zudem IL17 oder TNF- α defizient waren, entwickelt, was auf die Beteiligung mehrerer Faktoren in der Entwicklung der RA hindeutet (Horai et al., 2004).

2.4 Behandlung der RA

Die gängige medikamentöse Therapie der RA umfasste lange Zeit die Gabe von Analgetika und nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), was vor allem der Schmerzreduktion diente (Chen et al., 2008). Aufgrund der limitierten Effektivität der NSAR und deren Unvermögen, den langfristigen Krankheitsverlauf zu beeinflussen, werden aktuell aber die Gruppe der sog. „*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*“ (DMARDs) als Mittel der Wahl eingesetzt (Donahue et al., 2008). Diese können im Gegensatz zu den NSAR den Krankheitsverlauf beeinflussen. Vorwiegend wird das Immunsuppressiva Methotrexat verabreicht (Ortendahl et al., 2002), desweiteren kommen Leflunomid und Sulfasalazin häufig zur Anwendung. Kombinationstherapien haben sich dabei als günstig erwiesen (O'Dell et al., 2002; Scott et al., 2010).

Bei Krankheitsschüben werden kurzzeitig Kortikosteroide aufgrund ihrer potenten antiphlogistische und immunsuppressiven Eigenschaften verabreicht. Ihr Einsatz in der

Langzeittherapie wird allerdings aufgrund der Nebenwirkungen, wie Osteoporose und Hypertonie kritisch betrachtet (Ravindran et al., 2009).

Patienten, die auf Basistherapeutika nur ungenügend angesprochen haben, erhalten sogenannte *Biologicals* (Olsen und Stein, 2004), dabei handelt es sich um rekombinante Proteine. Beispiele sind TNF-Hemmstoffe (Etanercept, Infliximab und Adalimumab), Wirkstoffe zur Elimination aktivierter B-Zellen wie Rituximab und IL1-Hemmstoffe wie Anakinra (Singh et al., 2009). Konventionell werden die Biologika mit Methotrexat verabreicht (Strangfeld et al., 2009).

Nachteilig sind jedoch oftmals Nebenwirkungen oder eine ausbleibende Wirksamkeit der Medikamente, z.B. sprechen ca. 30 % der Patienten nicht auf die TNF-Hemmstoffe an (*Non-Responder*) (Klareskog et al., 2004; Keystone et al., 2004). Die Medikamente sind zudem sehr kostspielig und müssen aufgrund ihrer kurzen Plasma- und intraartikulären Halbwertszeiten meist mehrmals wöchentlich und in hohen Dosen appliziert werden (Levick, 1998; Brennan et al., 2004). Anakinra beispielsweise muss täglich subkutan injiziert werden (100 mg IL1RA), bei mehr als zwei Drittel der Patienten kommt es dabei zu kutanen Reaktionen im Bereich der Injektionsstelle (Bresnihan et al., 2001a; Bresnihan et al., 2001b; Mertens und Singh, 2009). Da die Substanzen zudem immunsuppressiv wirken, besteht die Gefahr des Auftretens von opportunistischen Infektionen (Leombruno et al., 2009).

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Optimierung der Darreichungsform zur Behandlung sinnvoll.

2.5 Gentherapie

Die Gentherapie ist definiert als ein medizinisches Behandlungsverfahren, bei welchem durch das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen und der daraus resultierenden Expression ein therapeutischer oder präventiver Nutzen erzielt werden soll (Hallek et al., 2001; Cotrim und Baum, 2008). Die in Deutschland durchgeführten Studien werden im „Deutschen Register für Somatische Gentransferstudien (DeReG) dokumentiert (www.dereg.de).

Man unterscheidet zwischen der Keimbahntherapie, bei welcher gezielt Keimzellen genetisch verändert werden (die Keimbahntherapie ist nach dem Embryonenschutzgesetz (1990), den Richtlinien zur Gentherapie beim Menschen (1989) sowie der EU-GCP-Richtlinie 2001/20/EG Artikel 9 in Deutschland verboten (<http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3251>)) und der somatischen Gentherapie. Bei letzterer werden Zellen verändert, die nicht an der Reproduktion beteiligt sind (Wivel und Walters, 1993). Hier verfolgt man zwei Strategien, bei der *in vivo* Therapie wird das entsprechende Gen durch einen Vektor direkt injiziert oder systemisch appliziert.

Bei der *ex vivo* Behandlung hingegen werden dem Patienten entweder zunächst Zellen entnommen, die modifiziert retransplantiert werden, oder man greift auf universelle Spenderzellen zurück (Suhonen et al., 2006).

Der Gentransfer kann prinzipiell viral- und nicht viral vermittelt werden (Ohashi et al., 2002; Yovandich et al., 1995). Wichtig für den Erfolg einer Gentherapie sind neben der Effizienz des Gentransfers auch eine stabile und ggf. regulierbare Genexpression, sowie eine ausreichende Aufnahmekapazität von Genen, eine geringe Patho- und Immunogenität und eine einfache kosteneffiziente Herstellung (Somia und Verma, 2000). Es gibt zahlreiche physikalische, chemische und biologische Methoden, um den Transport in Zellen zu gewährleisten. Die verschiedenen Methoden weisen Vor- und Nachteile auf. Der Vorteil des viralen Gentransfers liegt allgemein in der hohen Effizienz und bei manchen Vektoren in der langfristigen Expression.

Der erste autorisierte Gentransfer am Menschen fand 1989 statt und zeigte die prinzipielle Realisierbarkeit der Gentherapie. Dabei wurde mit retroviraler Transduktion eine Neomycin Resistenz-Kassette in Tumor-infiltrierende Leukozyten eingeführt und die modifizierten Zellen in Patienten mit metastasierendem Melanom retransplantiert (Rosenberg et al., 1990; Culver et al., 1991). Zellen von vier der fünf Patienten konnten als resistent gegen ein Neomycin-Analogon getestet werden.

1999 gab es jedoch durch den Tod eines Probanden einen großen Rückschlag. Dem 18-jährigen Jesse Gelsinger wurde zur Behandlung der Ornithin-Transcarbamylase Insuffizienz ein adenoviraler Vektor, welcher die für das Enzym codierende cDNA trug appliziert. Vier Tage danach verstarb er durch eine unerwartete und verheerende Immunreaktion mit antiviralen Zytokinen („*cytokine storm*“) (Marshall, 1999; Raper et al., 2003). Als Konsequenz daraus wurden diese und andere Studien im Januar 2000 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) gestoppt.

Die für gentherapeutische Methoden prognostizierten Erfolge konnten dann in Frankreich mit der initialen Heilung zweier mit „*X-linked severe combined immunodeficiency*“ (X-SCID) betroffener Kinder im Alter von einem und elf Monaten erstmals klinisch bestätigt werden. X-SCID ist eine angeborene X-Chromosom-gekoppelte Krankheit, die durch Mutationen in der γ -Kette mehrerer Interleukinrezeptoruntereinheiten (IL-2, -4, -7, -9, -15) verursacht wird. Dies führt zu einem nicht funktionellen lymphatischen System, T- und NK-Zellen fehlen völlig und ohne eine Stammzelltransplantation versterben die Patienten im ersten Lebensjahr an schweren Infektionen (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Fischer et al., 2001, Hacein-Bey-Abina et al., 2003a). Durch den Transfer der Wildtyp-cDNA für die γ -Kette in autologe Knochenmarkstammzellen (CD34+ Zellen) mittels eines MLV-basierten Vektors und Retransplantation konnten die Patienten geheilt werden. Allerdings waren auch hier

unerwartete Rückschläge zu verzeichnen (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Die Integration der MLV-basierten Vektoren in der Nähe von zellulären Proto-Onkogenen (LMO-2) führte zu deren Überexpression und in Folge zum Auftreten von Leukämien bei zwei der zehn behandelten Kinder (Nienhuis et al., 2006; Hacein-Bey-Abina et al., 2003c). Die Studie wurde daraufhin freiwillig unterbrochen. An parallel durchgeführten Studien in Großbritannien und Australien wurden jedoch in der Zwischenzeit weitere Erfolge verzeichnet (Gaspar et al., 2004; Ginn et al., 2005). Die französische Studie wurde mit einem überarbeiteten Protokoll wieder gestartet. Im Jahr 2005 kam es aber bei einem weiteren Kind zu einer unkontrollierten Proliferation von Blutzellen (Check, 2005). Die Chemotherapie der Leukämie gelang bei zwei der drei Patienten, eines der Kinder der ersten Behandlungsgruppe verstarb jedoch im Jahr 2004. 2007 wurde ein vierter Leukämiefall aus Frankreich und ein erster Fall aus England gemeldet (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Diese als *Severe Adverse Effects* (SAE) bezeichneten Zwischenfälle lagen mit 25 % bei der Gentherapie von X-SCID ausgesprochen hoch (Cavazzana-Calvo und Fischer, 2007). Obwohl die restlichen Patienten eindeutig aus der Behandlung der Immundefizienz profitiert haben und ein normales Leben führen können, besteht die Gefahr von langfristig unkontrollierbaren Nebenwirkungen. Verbesserungen der für weitere klinische Studien in Frage kommenden Vektoren laufen derzeit. Die Arbeitsgruppe konnte bereits einen verbesserten Vektor charakterisieren, der keine LMO-2 Transaktivierung *in vitro* (Jurkat Zellen) und auch keine Tumore in Mäusen erzeugte (Zhou et al., 2010).

Das Auftreten der Leukämieerkrankungen führte weltweit zu einer Einschränkung der Gentherapievorhaben. Große Debatten über die Möglichkeiten sowie Risiken folgten und größere Hürden für neue Studien wurden von den Zulassungsbehörden auferlegt, was eine Verlangsamung der klinischen Entwicklung zur Folge hatte. Bis heute konnten allerdings in über 1500 gentherapeutischen Studien am Menschen „nur“ zwei Todesfälle (siehe Tabelle 1) und eine relativ geringe Anzahl an schwerwiegenden Nebenwirkungen eindeutig dem Gentransfer zugeordnet werden.

| Jahr | Einsatzbereich / Erkrankung | Vektor | Kommentar | Tod stand in Beziehung zur Gentherapie? | Ref. |
|------|--|------------|--|---|----------------------------------|
| 1999 | <i>Ornithine transcarbamylase deficiency</i> | Adenovirus | Patient verstarb innerhalb von vier Tagen an einer unregelmäßigen Produktion von anti-viralen Zytokinen („ <i>cytokine storm</i> “). | Ja | (Raper et al., 2003) |
| 2002 | <i>X-linked severe combined immunodeficiency</i> | Retrovirus | Entwicklung einer Leukämie, Integration in den LMO2 <i>oncogene promoter</i> . | Ja | (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b) |

| Jahr | Einsatzbereich / Erkrankung | Vektor | Kommentar | Tod stand in Beziehung zur Gentherapie? | Ref. |
|------|---|-------------------------------|---|---|---|
| 2006 | <i>X-linked chronic granulomatous disease</i> | Retrovirus | Der Verlust der Transgenexpression führte zum Tod an der zugrundeliegenden Krankheit. | Nein | (<i>European Society of Gene Therapy</i> , 2006) |
| 2007 | <i>Rheumatoid arthritis</i> | <i>Adeno-associated virus</i> | Als tatsächliche Ursache wurde eine <i>Histoplasma capsulatum</i> Infektion festgestellt. | Nein | (Evans et al., 2008) |

Tab. 1: Todesfälle in humanen Gentherapiestudien.

Ein Todesfall in einer länderübergreifenden Studie (Schweiz-Deutschland) im Jahr 2006 konnte der zugrundeliegenden Krankheit zugesprochen werden und war nicht Ursache des Gentransfers (*European Society of Gene Therapy*, 2006). Ein erster Todesfall ereignete sich zudem 2007 in einer Studie zur rheumatoiden Arthritis, bei der eine Patientin einige Wochen nach der zweiten i.a. Vektorinjektion verstarb (AAV Serotyp 2; TNF- α Antagonist). Als tatsächliche Ursache wurde jedoch eine Infektion mit dem Pilz *Histoplasma capsulatum* festgestellt und das Vorhaben wurde von der FDA in leicht abgeänderter Form 12/07 wieder freigegeben. So wurden nun bei erhöhter Temperatur, Müdigkeit oder Unwohlsein am Tag der Administration keine Vektoren appliziert (Evans et al., 2008; Frank et al., 2009).

Erfreulicherweise konnten jedoch auch erfolgversprechende Resultate der gentherapeutischen Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom (Morgan et al., 2006) und mit Morbus Parkinson (Edelstein et al., 2007; Sheridan et al., 2007) erzielt werden. Eine erfolgreiche Stammzellgentherapie wurde bei zwei Patienten mit Adenosindeaminase- (ADA) defizienter SCID erzielt. Dabei wurde ein ADA exprimierender retroviraler Vektor eingesetzt, um aus dem Knochenmark gewonnene CD34+ Zellen zu transduzieren. Eine milde Konditionierung der Patienten mit Busulfan verschaffte den transduzierten Zellen initial einen Wachstumsvorteil. Nach der Behandlung konnte in allen Blutreihen das Transgen nachgewiesen werden. Beide Patienten wurden als klinisch gesund beurteilt und zeigten eine normale Entwicklung (Aiuti et al., 2002; Gaspar und Trasher, 2005; Cassani et al., 2008). Eine ähnliche Technologie wurde bei der Septischen Granulomatose (CGD, *chronic granulomatous disease*) angewandt, die ebenfalls erfolgreich therapiert werden konnte (Ott et al., 2006).

Das erste kommerziell erhältliche Gentherapeutikum Gendicine™ ist seit 2003 in China auf dem Markt (SiBiono GeneTech, Shenzhen, China). Das Medikament basiert auf einem p53 exprimierenden adenoviralen Vektor, der für die Anwendung bei

Plattenepithelzellkarzinomen im Hals- und Nackenbereich vorgesehen ist (Wilson, 2005; Peng, 2005). Trotz einiger Bedenken, weil die Zulassung in China lediglich auf Grundlage von Phase I- und Phase II-Studien erfolgte, berichtete die Firma bereits 2007 mehr als 4.000 Menschen behandelt zu haben (Räty et al., 2008).

Wenn man den derzeitigen Stand der laufenden klinischen Gentherapiestudien hinsichtlich der zu therapierenden Krankheiten darstellt, wird deutlich dass die meisten Studien im Bereich der Krebsforschung (65 %) erfolgen. Einen geringeren Anteil stellen die monogenetischen (8 %), kardiovaskulären (9 %) und infektiösen Erkrankungen (8 %, zum Beispiel AIDS und Hepatitis B) dar, sowie weitere Krankheiten (2 %), zu denen unter anderem die rheumatoide Arthritis und neurodegenerative Leiden (Alzheimer, Morbus Parkinson) zählen. Am häufigsten verwendete Vektoren für die bisherigen Studien waren bislang mit einem Anteil von 23,8 % (n=400) adenovirale Systeme gefolgt von retroviralen Ansätzen mit 20,5 % (n=344) (Stand: Juni 2010; *The Journal of Gene Medicine; Clinical Trials Database*; www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

2.6 Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis

Das Vorhaben anti-arthritische Genprodukte direkt lokal in den einzelnen Gelenken durch intra- und periartikuläre Gewebe produzieren zu lassen scheint attraktiv, da die Gelenke separat zugänglich, sowie abgeschlossen sind und leicht in sie injiziert werden kann. Bereits in den frühen 90er Jahren wurden erste experimentelle Studien in der orthopädischen Gentherapie durchgeführt (Bandara et al., 1992; Bandara et al., 1993; Evans et al., 1992; Evans und Robbins, 1994a; Evans und Robbins, 1995). Durch eine gezielte Anreicherung des Genproduktes in den Gelenken, können die sonst bei systemischer Gabe induzierten Nebenwirkungen reduziert werden und höhere Konzentrationen der therapeutischen Proteine erzielt werden. Die hohe Anzahl präklinischer Daten zahlreicher tierexperimenteller Studien zeigen das große Interesse an einer intraartikulären Gentherapie (Traister und Hirsch, 2008). In Tabelle 2 ist eine Auswahl davon dargestellt.

| Vektor | Transgen | Tier und Arthritismodell | Referenz |
|----------------|--------------------|--------------------------|--|
| <i>Ex vivo</i> | | | |
| Retrovirus | IL1RA | Kaninchen, AIA | Otani et al., 1996 |
| Retrovirus | IL1RA | Ratte, SCW | Makarov et al., 1996 |
| Retrovirus | IL1RA, Angiostatin | Maus, Zymosan und CIA | Bakker et al., 1997; Kim et al., 2002a |
| Retrovirus | TNFR:Fc | Kaninchen, AIA | Kim et al., 2002b |
| Transfektion | SOD, Katalase | Ratte, AIA | Dai et al., 2003 |
| Transfektion | IL1RAcP | Maus, CIA | Smeets et al., 2003 |

| Vektor | Transgen | Tier und Arthritismodell | Referenz |
|----------------|-------------------------|-------------------------------|--|
| <i>In vivo</i> | | | |
| | IL1RA, sIL1R, TNFR:Fc, | | |
| Adenovirus | vIL10, p53, TRAIL | Kaninchen, AIA | Ghivizzani et al., 1998 |
| Adenovirus | p16 | Ratte, SCW induziert | Miagkov et al., 1998 |
| HSV | IL1RA | Kaninchen, IL1 Überexpression | Taniguchi et al., 1999; Oligino et al., 1999 |
| Lentivirus | Endostatin | TNF-transgene Maus | Yin et al., 2002 |
| Lentivirus | IL1RA | Ratte, IL1 Überexpression | Gouze et al., 2003a |
| Lentivirus | Angiostatin | Maus, CIA | Kato et al., 2005 |
| AAV | sTNFR | TNF-transgene Maus | Zhang et al., 2000 |
| AAV | TNFR:Fc | Ratte, SCW induziert | Chan et al., 2002 |
| AAV | IL4 | Maus, CIA | Watanabe et al., 2000 |
| AAV | IL1RA | Ratte, LPS induziert | Pan et al., 2000 |
| Plasmid | HSV TK plus Ganciclovir | Kaninchen AIA | Sant et al., 1998 |
| Liposomen | NF-kB decoy | Ratte, CIA | Tomita et al., 1999 |

Tab. 2: Arthritis Getherapiestudien in Tiermodellen. Modifiziert nach (Evans et al., 2006). TNFR:Fc (tumor necrosis factor receptor extracellular domains fused to the Fc domain of IgG), SOD (superoxide dismutase), sIL1R (soluble interleukin-1 receptor), vIL10 (viral IL10), sTNFR (soluble TNFR), IL1RAcP (IL1 receptor accessory protein), TRAIL (Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand), HSV (herpes simplex virus), AAV (adeno-associated virus), CIA (collagen-induced arthritis), AIA (antigen-induced arthritis), SCW (streptococcal cell wall), LPS (lipopolysaccharide).

Es gibt zahlreiche Strategien (Evans et al., 2009), die man in der GT der RA verfolgt (z.B. die *antisense*, Ribozyme oder RNA Interferenz). Erste klinische Studien wurden mit dem Einbringen therapeutischer cDNAs durchgeführt. Das Konzept dabei ist simpel, die cDNAs werden in einen Vektor eingebracht und mittels direktem oder indirektem Gentransfer in die Gelenke appliziert (Evans et al., 2010). Der nicht-virale Gentransfer hat sich im Allgemeinen als nicht sehr effektiv in Tiermodellen der RA erwiesen (Ghivizzani et al., 2008). Weil die Dichte der Knorpelmatrix die meisten Vektoren ausschließt, sind Ligamente und Gelenkinnenhäute wesentliche Orte der genetischen Modifikation und Transgenexpression (Gouze et al., 2007).

Eine Vielzahl viraler Vektoren wurde bereits in *in-* und *ex vivo* Ansätzen verwendet (siehe Tabelle 2). Für den direkten Gentransfer wurden AAV, HSV, adeno- und lentivirale Vektoren genutzt. Adenovirale und HSV Vektoren sind aber inflammatorisch und zytotoxisch, zudem gewährleisten sie keine stabile Transgenexpression (Robbins und Ghivizzani, 1998; Oligino et al., 1999; Nita et al., 1996). Das Nukleokapsid retroviraler Vektoren kann die Kernmembran nicht passieren, die Vektoren benötigen daher eine Zellteilung für die Integration ins Genom (Miller et al., 1990; Ciuffi und Bushman, 2006). Direkte retrovirale Ansätze, also die *in situ* Transduktion des Synoviums scheiterten, zum einen weil keine hohen Titer hergestellt werden konnten, als auch wegen der geringen mitotischen Aktivität der Synoviozyten im normalen Gelenk (del Vecchio et al., 2001). In der GT der RA wurden

retrovirale Vektoren deshalb in indirekten Gentransferstudien mit modifizierten autologen Synovialzellen oder Hautfibroblasten eingesetzt (Makarov et al., 1996; Bandara et al., 1993). Dabei konnten noch nach drei Monaten transplantierte Zellen anhand des lacZ Markergenes in Kaninchen Gelenken nachgewiesen werden (Bandara et al., 1992). Die nachstehende Tabelle soll einen kurzen Überblick über die in der RA Forschung eingesetzten Vektoren geben.

| Vektor | Vorteile | Nachteile | Referenz RA-Studie |
|-----------------|--|---|--|
| Adenovirus | <ul style="list-style-type: none"> • Vektorproduktion mit hohen Titern • Transduziert sich nicht teilende Zellen • mehrere Serotypen stehen zur Verfügung | <ul style="list-style-type: none"> • antigene und entzündliche Wirkung • transiente Transgenexpression | Roessler et al., 1993 Ghivizzani et al., 1998 Gouze et al., 2007 |
| HSV | <ul style="list-style-type: none"> • sehr große Verpackungskapazität • Effiziente Transduktion sich teilender und nicht teilender Zellen | <ul style="list-style-type: none"> • schwierig zu produzieren • zytotoxisch | Nita et al., 1996 Oligino et al., 1999 |
| AAV | <ul style="list-style-type: none"> • AAV Vektoren gelten als sicher • Transduziert sich nicht teilende Zellen | <ul style="list-style-type: none"> • geringe Verpackungskapazität • Transduktionseffizienz teilweise gering | Pan et al., 1999 Pan et al., 2000 Goater et al., 2000 Watanabe et al., 2000 Cottard et al., 2000 Ulrich-Vinther et al., 2004 Apparailly et al., 2005 Kay et al., 2009 Mease et al., 2010 |
| Orthoretrovirus | <ul style="list-style-type: none"> • Pseudotypisierung bringt breiten Wirtstropismus | <ul style="list-style-type: none"> • benötigt Zellteilung zur Integration • Risiko der Insertionsmutagenese | Bandara et al., 1992 Makarov et al., 1996 Otani et al., 1996 Kim et al., 2002b Evans et al., 2005 Gouze et al., 2002 Gouze et al., 2003a Gouze et al., 2007 |

Tab. 3: In der GT der RA eingesetzte Vektoren.

Die erste Applikation am Menschen erfolgte 2005 mit einem *ex vivo* Protokoll, welches einen retroviralen Ansatz (MFG-IRAP) verwendete um die cDNA des humanen IL1RA in die Gelenke der Betroffenen zu transferieren (Kim et al., 1998; Evans et al., 2005). Zuvor wurden den Patienten Synovialfibroblasten entnommen, *ex vivo* transduziert und retransplantiert. Eine Woche nach Injektion wurden die Gelenke im Rahmen einer Gelenkersatzoperation entnommen und untersucht. Dabei wurde der erfolgreiche Gentransfer und die IL1RA Expression mittels RT-PCR, *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie gezeigt. Im Jahre 2009 wurde eine vergleichbare Studie in Deutschland

durchgeführt, wobei der einzige Unterschied im Protokoll und in der Zeitspanne bis zur Gelenkentnahme bestand, die hier vier Wochen betrug (Wehling et al., 2009b). Diese Studie erbrachte den ersten Beleg für das klinische Ansprechen einer Gentherapie der RA. Beide Patienten zeigten eine merkliche Reduktion der Gelenkschwellung und verminderte Schmerzen während der gesamten Studiendauer. Auch ein Wiederaufflammen der Gelenkentzündung wurde in den behandelten Gelenken nicht festgestellt. Nach einer Synovektomie konnte zudem eine gesteigerte IL1RA und eine verminderte Expression von MMP-3 und IL1 β festgestellt werden. Nachstehende Abbildung zeigt die bisher verwendeten Transgene und Vektoren der bis heute durchgeführten klinischen Studien zur RA.

| Transgen | Vektor, <i>ex vivo</i> / <i>in vivo</i> | Phase | Institution, Referenz | <i>n</i> |
|---|--|-------|---|----------|
| IL1RA | Retrovirus, <i>ex vivo</i> | I | Evans und Robbins, Universität Pittsburgh, USA. (Evans et al., 2005) | 9 |
| IL1RA | Retrovirus, <i>ex vivo</i> | I | Wehling, Universität Düsseldorf, Deutschland. (Wehling et al., 2009b) | 2 |
| HSV-tk | Plasmid, <i>in vivo</i> | I | Roessler, Universität Michigan, USA. (nicht veröffentlicht) | 1 |
| TNFR:Fc <i>fusion protein</i> (Etanercept) | AAV, <i>in vivo</i> | I | Mease, <i>Targeted Genetics Corp.</i> , USA. (Mease et al., 2009) | 15 |
| TNFR:Fc <i>fusion protein</i> (Etanercept) | AAV, <i>in vivo</i> | I/II | Mease, <i>Targeted Genetics Corp.</i> , USA. (Mease et al., 2010) | 127 |

Tab. 4: Klinische Studien zur Gentherapie der rheumatoiden Arthritis. Modifiziert nach (Evans 2008). HSV-tk: *herpes simplex virus thymidine kinase*. Die HSV-tk Studie sieht dabei zusammen mit der Gabe von Ganciclovir das Absterben der Synovialzellen vor.

2.7 Foamyviren

2.7.1 Definition

Die Familie der Retroviren wird in Orthoretroviren und Spumaretroviren unterteilt. Die Spumaretroviren, besser bekannt als Foamyviren (FV) sind komplexe Retroviren, die aufgrund einiger wesentlicher Unterschiede eine eigene Subfamilie bilden. Sie wurden bereits 1971 als ein nicht tumorinduzierendes Retrovirus klassifiziert (Achong et al., 1971a; Achong et al., 1971b). Der zytopathische Effekt (CPE) der FV ist durch die Bildung von

großen mehrkernigen Syncytien (siehe Abb. 2) die intrazelluläre Vakuolen enthalten (Enders and Peebles; 1954; Rustigian et al., 1955) gekennzeichnet. Aufgrund dieses, unter dem Lichtmikroskop schaumartig aussehenden CPE, den FV in infizierten Zellkulturen verursachen, erfolgte die Namensgebung der Foamyviren (Lat. *spuma*, engl. *foam*; „Schaum“). Die ersten Foamyviren wurden aus Zellkulturen von gesunden Affen isoliert. Bisher ist trotz intensiver Forschung keine Krankheit mit FV assoziiert (Linial, 2000; Meiering und Linial, 2001; Schweizer et al., 1995). Langzeitstudien zur Virusübertragung von Mensch zu Mensch haben keine positiven Befunde ergeben (Boneva et al., 2002; Heneine et al., 2003; Switzer et al., 2004). Die Mechanismen, welche die apathogene, persistierende Existenz der FV im Wirt erlauben sind bislang unklar (Falcone et al., 2003; Linial, 2000).

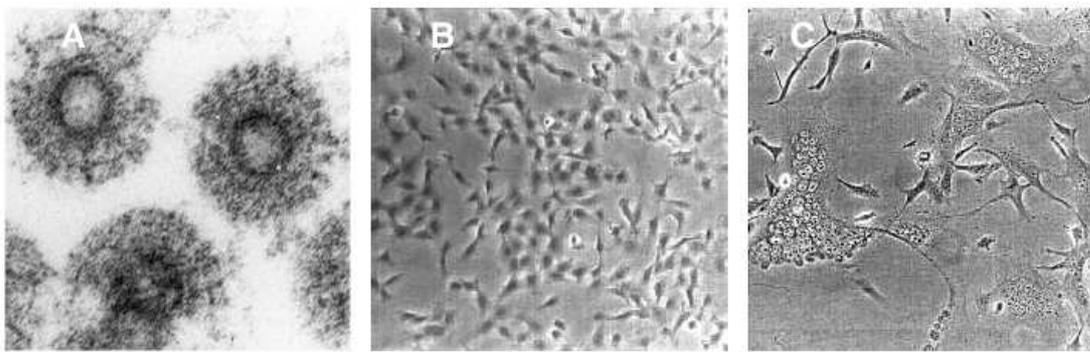


Abb. 2: EM Aufnahmen von Foamyviren und infizierte Zellkulturen. (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninferierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten mit zytopathischen Effekt (Picard-Maureau et al., 2003).

Achong et al. isolierten 1971 ein Virus aus einem Nasopharynxkarzinompatienten, das zunächst als HFV (*human foamy virus*) bezeichnet wurde. Später wurde festgestellt, dass die Sequenz fast identisch zu einem Schimpansenisolat war (Herchenröder et al. 1994). Anhand von seroepidemiologischen Studien und Sequenzanalysen der Isolate wurde gezeigt (Herchenröder et al., 1995; Schweizer et al., 1997), dass der Mensch kein natürlicher Wirt für FV ist (Saib und de The, 1996; Ali et al., 1996). Die bekannten FV Infektionen von Menschen sind auf Zoonosen von Affen FV zurückzuführen (Heneine et al., 2003; Heneine et al., 1998; Sandstrom et al., 2000; Switzer et al., 2004; Wolfe et al., 2004). Das von Menschen gewonnene Isolat wird aktuell als PFV (prototypisches Foamyvirus) bezeichnet (Rethwilm, 2003). Darüber hinaus gibt es Spumaviren in anderen Säugetierfamilien, so werden Virusisolate von diversen Primaten als SFV (*simian foamy virus*) bezeichnet (Hooks et al., 1972; Bieniasz et al., 1995a) und auch Isolate aus Katzen, Hamstern, Seelöwen, Pferden und Rindern sind bekannt (Riggs et al., 1969; Helps und Harbour, 1997; Malmquist et al., 1969; Renshaw et al., 1991; Tobaly-Tapiero et al., 2000).

FV sind in der Lage, zahlreiche Zelllinien verschiedenen Ursprungs zu infizieren und auch FV-DNA-Kopien können in fast allen Geweben infizierter Tiere nachgewiesen werden (Feldman et al., 1975; Swack und Hsiung, 1975). Die foamyvirale Replikation scheint jedoch auf die orale Mucosa beschränkt zu sein (Falcone et al., 1999; Murray et al., 2008). Die Übertragungen die bei Primaten und Rindern beschrieben wurden, erfolgten demnach wahrscheinlich über den Speichel (Hooks und Gibbs, 1975; Johnson et al., 1988; Romen et al., 2007). Es ist bekannt dass FV nach der Bindung an einen zellulären Rezeptor, über eine pH-abhängige Endozytose mit der zellulären Membran fusionieren. Der zelluläre Rezeptor, der zur Penetration genutzt wird, ist bislang allerdings nicht bekannt. Das große Wirtsspektrum und der sehr breite Zelltropismus deuten auf einen ubiquitären Rezeptor hin (Hill et al., 1999; Mergia et al., 1996; Rethwilm, 2007; Picard-Maureau et al., 2003). Es sind bislang nur zwei Zelllinien bekannt die vollkommen resistent gegen eine foamyvirale Transduktion sind (die Zebrafischzelllinie Pac2 und eine humane erythroide Progenitorzelllinie) (Stirnnagel et al., 2010). Die Eigenschaft, unterschiedliche Zelltypen verschiedenster Spezies transduzieren zu können, ist für den gentherapeutischen Einsatz der Vektoren von Vorteil.

2.7.2 Genomorganisation und Morphologie

Die infektiösen Partikel von Spumaviren bestehen aus sphärischen Proteinpartikeln mit ca. 100 nm Durchmesser, die von einer Lipidmembran umhüllt sind. Die viralen Hüllproteine (Env) sind in der Lipidmembran als Trimere angeordnet und verankert (Wilk et al., 2000). Im Inneren des Partikels befindet sich das Kapsid, eine sphärisch geformte elektronendichte Proteinhülle, die aus dem Gag-Protein gebildet wird (Cartellieri et al., 2005; Fischer et al., 1998; Hahn et al., 1994). Bei Orthoretroviren üblich, ist eine Spaltung des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease in Matrixprotein (MA), Kapsidprotein (CA) und Nukleokapsidprotein (NC). Bei FV jedoch findet nur eine C-terminale Verkürzung statt, die zum Vorliegen des Gag-Vorläuferprotein (71 kDa) und der prozessierten 68 kDa Gag-Variante im FV-Kapsid führt. Weiterhin einzigartig ist, dass extrazelluläre FV Partikel nicht nur RNA sondern bereits revers transkribierte DNA enthalten (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Anders als bei anderen Retroviren erfolgt bei Foamyviren nämlich der Prozess der reversen Transkription in einer späten Phase des Replikationszyklus, hauptsächlich vor der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel. Deshalb enthalten extrazelluläre Viruspartikel nicht nur RNA, sondern auch DNA. Das FV-Virion beinhaltet neben den Strukturproteinen auch das Pol-Vorläuferprotein aus dessen Untereinheiten (Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase mit RNase H) die Enzyme die für

die Replikation notwendig sind gebildet werden (Flügel und Pfrepper, 2003; Netzer et al., 1993).

FV kodieren neben den Gag-, Pol- und Env-Proteinen auch noch für akzessorische Proteine (Bet und Tas (Transaktivator)) (Muranyi und Flügel, 1991), weshalb sie zu den komplexen Retroviren gezählt werden. Dies zeigt auch eine weitere Besonderheit, nämlich dass FV neben dem U3-Promoter der LTRs noch einen internen Promoter (IP) besitzen. Er liegt im 3'-Bereich des *env* Gens (Löchelt et al., 1993; Mergia, 1994; Yang et al., 1997) und vermittelt die Expression der akzessorischen Proteine Bet und Tas (Rethwilm et al., 1991). Tas aktiviert durch seine direkte Bindung an die Tas responsiven Elemente (TREs) diesen internen Promoter, was zu einer verstärkten Bildung von Tas und Bet führt. Hat Tas eine gewisse Konzentration erreicht, bindet es an den U3-Promoter und schaltet so die Transkription von genomischer und einfach gespleißter mRNA an. Diese mRNAs führen zur Expression von viralem Gag, Pol und Env in der Zelle (Bodem et al., 2004; Erlwein und Rethwilm; 1993; Löchelt, 2003). Eine Funktion von Bet ist die Inhibierung von bestimmten zellulären antiviralen Restriktionsfaktoren, den APOBEC3-Faktoren (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptides*) der Wirtszelle. APOBEC-Proteine sind Cytidineaminasen die retrovirale Genome durch G- zu A-Hypermuation beeinträchtigen und ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Cullen, 2006). Bet kann ähnlich wie Vif bei HIV-1 mit den APOBEC-Proteinen interagieren und diese aus dem Replikationszyklus entfernen. Dadurch wird das Einfügen von Mutationen in das foamyvirale Genom verhindert und die Vitalität der Viren erhöht (Perkovic et al., 2009).

Das Genom der Foamyviren ist das größte unter den Retroviren. Die Länge der RNA des PFV beträgt 11,68 kb und die Länge des Provirus zusammen mit den retroviralen LTRs (*Long Terminal Repeats*) an 3'- und 5'-Ende 13,25 kb (Schmidt et al., 1997). Die genomische RNA von Orthoretroviren besitzt strukturelle Motive die für die Dimerisierung, Verpackung, reverse Transkription und Integration des viralen Genoms erforderlich sind. Das Verpackungssignal PSI (*packaging signal*) befindet sich meistens zwischen dem 5' SD (Spleißdonor) und dem Start-Codon des *gag*-Gens, manchmal reicht es aber auch in den *gag* Leserahmen hinein (Berkowitz et al., 1996). Auch hier weisen FV eine Besonderheit auf. Das Verpackungssignal der FV ist diskontinuierlich, es besteht aus der *cis*-aktiven Sequenz (CAS) I und II. Beide sind für effizienten Vektortransfer essentiell (Mergia und Heinkelein, 2003). Die *cis*-aktiven Sequenzen sind durch Interaktionen mit Gag für die Isolierung der viralen genomischen RNA aus dem Gemisch aus zellulären mRNAs erforderlich (Banks et al., 1998). Die 650 bp lange CAS I beginnt in der 5' U5-Region und endet im *gag*-Gen. Die Besonderheit der FV, die CAS II, liegt im 3'-Bereich des *pol*-Gens und ist 2 kb lang (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998).

Da bei gentherapeutischen Ansätzen mit viralen Vektoren ein großes Augenmerk auf dem Sicherheitsaspekt liegt, ist eine Minimierung der viralen Sequenzen von Interesse. So haben Wiktorowicz et al. bereits gezeigt, dass eine weitere Verkürzung der CAS Elemente möglich ist (Wiktorowicz et al., 2009).

Des Weiteren befindet sich in der 5'UTR noch das Dimerisierungssignal (UCCCUAGGGA), die Primer *binding site* (PBS) und den für die Expression von Gag und Pol essentiellen Hauptspeißdonor (5'SD) in der R-Region (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 2000; Russell et al., 2001). Eine weitere Besonderheit bei FV ist, dass das Pol-Protein von einer separaten gespleißten mRNA exprimiert wird und nicht als Gag-Pol-Fusionsprotein wie dies bei Orthoretroviren der Fall ist. Wie die Orthoretroviren, enthalten auch FV einen Polypurintrakt (PPT), der in der 5'- und 3'- U3-Region gelegen ist. Die Abfolge von mindestens 9 Adenosin- und Guanosinresten ist für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtig. Im 3'-Bereich des *pol*-Gens sind vier weitere purinreiche Sequenzen vorhanden, deren Funktionen aber noch nicht genau bekannt sind. Eine dieser Sequenzen, der cPPT (*central* PPT) ist eine exakte Kopie des 3'PPT, sie dient vermutlich als zweiter Initiationsort für die Plusstrang-DNA-Synthese, ist also für die optimale Virusreplikation wichtig (Charneau et al., 1992; Kupiec et al., 1988; Peters et al., 2008; Tobaly-Tapiero et al., 1991).

2.7.3 Foamyvirale Vektoren

Anfang der achtziger Jahre begann die Entwicklung replikationsinkompetenter retroviraler Vektorsysteme, die zunächst auf MoMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) basiert waren (Mann et al., 1983; Williams et al., 1984). PFV-basierte Vektoren bieten aufgrund einiger Vorteile eine attraktive Alternative zu den am meisten verbreiteten γ -retroviralen- und lentiviralen Vektorsystemen (Naldini et al., 1996). So weisen erste Studien im Großtiermodell bereits darauf hin, dass ein erfolgreicher klinischer gentherapeutischer Einsatz möglich wäre (Trobridge und Kiem, 2010).

Die Generierung des PFV-Expressionsplasmids (pHSRV) Anfang der neunziger Jahre (Rethwilm et al., 1990) machte den Anfang und hat zur Entwicklung der ersten FV-basierten Vektoren geführt (Schmidt und Rethwilm, 1995). Diese waren jedoch noch replikationskompetent. Durch schrittweise Deletion der strukturellen Gene wurde aus diesen replikationskompetenten FV-Vektoren (FVV) erste replikationsinkompetente FVV entwickelt (Russell und Miller, 1996). Bereits zwei Jahre später waren das gesamte *env-tas*-Leseraster sowie Teile des *gag*- und *pol*-Gens ersetzt (Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998).

Wegen niedriger Vektortiter ersetzte man zudem den FV U3-Promoter in der 5'LTR des Vektors durch einen stark exprimierenden CMV Promoter (Fischer et al., 1998; Heinkelein et

al., 1998; Schenk et al., 1999; Trobridge und Russell, 1998; Wu und Mergia, 1999). Sequenzen der 3' U3-Region wurden beibehalten, da sie für die reverse Transkription und Integration notwendig sind. Aufgrund der in Abwesenheit von Tas nicht aktiven LTRs nach Integration, ähneln die FVV den sogenannten SIN-Vektoren (engl: *self-inactivating*), welche aufgrund einer Deletion in der U3-Region (Yu et al., 1986) ebenfalls inaktive LTRs aufweisen.

Der derzeitige verwendete virale Vektor der dritten Generation enthält also neben 5' RU5-Sequenz, gefolgt von den essentiellen cis-aktiven Sequenzen in gag und pol (Δ gag und Δ pol), die Expressionskassette des Reportergens und die deletierte 3' U3-Region (Mergia und Heinkelein, 2003).

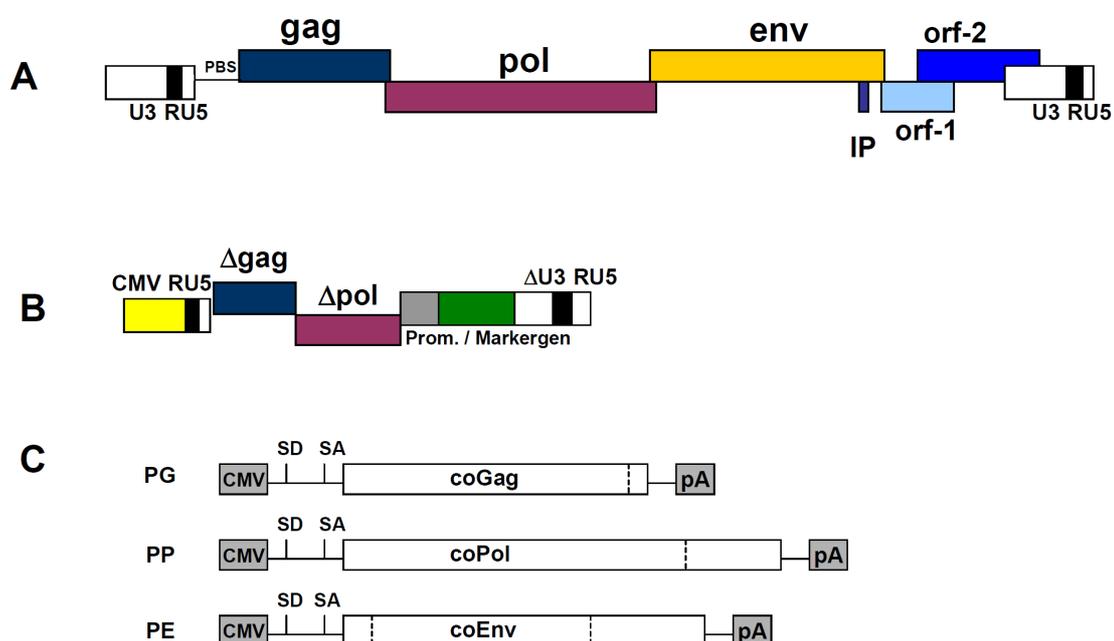


Abb. 3: Schematische Darstellung des (A) Wildtyp-Provirusgenom von PFV und (B) des CMV-getriebenen PFV-Vektors wie er in dieser Arbeit verwendet wurde. (C) Codonoptimierte (co) Expressionsplasmide: Gag (PG), coPol (PP) und coEnv (PE). Modifiziert nach (Mergia und Heinkelein, 2003; Lindemann und Rethwilm, 2011; Müllers et al., 2011). CMV (*cytomegalovirus immediate early promoter*), R (*LTR repeat region*), U5 (*LTR unique 5' region*), Δ U3 (*enhancer-promoter deleted LTR unique 3' region*), Prom (*internal heterologous promoter*), PBS (*primer binding site*), orf (*open reading frame*), IP (*internal promoter*), SD (*splice donor*), SA (*splice acceptor*).

Das bestehende Vektorsystem sieht die transiente Transfektion des viralen Vektors und der drei Helferplasmide (Gag, Pol und Env) in 293T Zellen vor (Vier-Plasmidsystem). Eine gemeinsame *gag-pol* Genkassette für deren Expression ist zwar möglich, es wurde jedoch gezeigt, dass die mRNA auch in das Partikel verpackt wird und somit mit der Vektor-RNA

konkurriert (Heinkelein et al., 2000; Heinkelein et al., 1998; Rethwilm, 2007). Deshalb wurden drei separate Expressionsplasmide für Gag, Pol und Env (Heinkelein et al., 2002; Park und Mergia, 2000; Trobridge et al., 2002a) konstruiert. So wurde eine hohe Expressionseffizienz der drei Proteine garantiert und es bestand eine geringere Wahrscheinlichkeit der Rekombination zwischen den überlappenden Sequenzen der drei Gene. Dies stellt einen wichtigen Aspekt für die Sicherheit von gentherapeutischen Vektoren dar.

Alle Foamyviralen (FV) Konstrukte dieser Arbeit basieren auf dem MD9 Vektor, der für das verpackbare FV-Vektorgenom kodiert (Heinkelein et al., 1998). Hinter dem CMV-Enhancer/Promotor enthält der Vektor die *cis*-aktiven Sequenzen CASI und CASII, diese sind für einen effizienten Vektortransfer erforderlich. Sämtliche für die Integration in das Wirtsgenom wichtigen Elemente wurden erhalten. Um eine Gag Expression auszuschließen wurde das ATG des *gag*-Gens in ein CTG mutiert, welchem ein STOP-Kodon folgt. Der 3' LTR-Promotor wurde deletiert, so wird die Proteinexpression nur durch den internen SFFV-U3-Promotor (*Spleen focus forming Virus* (SFFV)) vermittelt. Dieser kontrolliert die Expression des *Enhanced green fluorescent Proteins* (EGFP) (siehe Abschnitt 3.12, Abb. 5) (Heinkelein et al., 2002).

2.7.4 Gentherapie mit FV-Vektoren

Nachdem die gammaretrovirale Vektorintegration mit klonaler Expansion der Zellen und Tumorbildung in klinischen Studien am Menschen assoziiert wurde, ist das Interesse an alternativen Vektorsystemen groß (Hacein-Bey-Abina 2003b; Howe et al., 2008; Ott et al., 2006). Foamyvirale Vektoren könnten aufgrund einiger Merkmale und daraus resultierenden Vorteilen, gegenüber bestehenden Vektorsystemen, die in der GT eingesetzt werden, erfolgreich sein (Rethwilm, 2007).

Mit einer Länge des FV-Provirus von ~ 13-14 kb (Schmidt et al., 1997) ist die Verpackungskapazität der FV-Vektoren im Vergleich zu anderen Vektoren, die mit über 9 kb sehr groß ist, von Vorteil. Der heterologe Gentransfer von 9 kb wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen erreicht, das Verpackungslimit von FV-Vektoren wurde jedoch noch nicht experimentell bestimmt (Heinkelein et al., 2002; Rethwilm, 2007; Trobridge et al., 2002b). Es können somit sehr große Transgene verpackt werden und auch Vektoren mit mehreren Transgenkassetten wie z.B. verschieden shRNAs kombiniert mit einem Markergen sind denkbar. Kiem et al. haben sechs Transgene (4 anti-HIV Transgene, MGMT und EGFP) in einem FV-Vektor kombiniert und konnten die Expression und Funktionalität von fünf dieser Transgene nachweisen (Kiem et al., 2010). Bereits 2008 wurde die Eignung von FV für die Expression von anti-HIV Transgenen gezeigt (Taylor et al., 2008). Die FV Titer wurden dabei

nicht beeinflusst, im Vergleich dazu waren die LV Titer negativ von zwei der drei Transgene beeinflusst. Die FV vermittelte Expression der Transgene (mit verschiedenen Angriffsziele im viralen Zyklus) konnte die HIV Replikation in primären Makrophagen und der CEMx174 Zelllinie (Hybrid humaner B- und T-Zelllinie) effektiv blockieren. In weiteren Studien wurden FVV entwickelt die mit kombinatorischen anti-HIV Kassetten einen potenten Schutz vor HIV und SHIV (*simian-human immunodeficiency virus*) Infektionen *in vitro* gewährleisten konnten. Zudem wurde die Eignung der FVV für den Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen (HSZ) gezeigt (Kiem et al., 2010).

Des Weiteren gibt es im Hinblick auf das Integrationsmuster, also die Genotoxizität der FV-Vektoren Unterschiede zu den γ -Retroviren und Lentiviren. Es wurde gezeigt, dass FV eine geringere Präferenz haben in transkribierte Gene oder in Promotornähe zu integrieren (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). FV-Vektoren haben zudem im Vergleich zu gammaretroviralen, lentiviralen und SIN-MLV-Vektoren die niedrigste Wahrscheinlichkeit, andere Gene zu aktivieren. Dies wurde in einem Versuch gezeigt, der die Aktivierung eines Reportergens durch stromaufwärts liegende retrovirale Proviren untersuchte (Hendrie et al., 2008; Nienhuis et al., 2006). Das Onkogenpotential von FV-Vektoren kann daher als niedrig eingestuft werden.

In mehreren Studien konnte zudem eine effiziente Transduktion von murinen, caninen und humanen mesenchymalen, sowie pluripotenten hämatopoetischen (HSZ) Stammzellen durch FVV gezeigt werden (Hirata et al., 1996; Josephson et al., 2002; Kiem et al., 2007; Leurs et al., 2003, Vassilopoulos et al., 2001; Josephson et al., 2004; Si et al., 2008; Trobridge et al., 2009; Wiktorowicz et al., 2009). Und sogar mit sehr niedrigen Vektordosen konnten humane embryonale Stammzellen (ES) und ES von Makaken effizient transduziert werden (Gharwan et al., 2007). Auch eine erfolgreiche Repopulation foamyviral transduzierter humaner HSZ in sublethal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen (engl: *nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice*) konnte mithilfe einer einfachen Transduktion (10 h) erzielt werden. Die Zellen differenzierten lymphoid wie auch myeloid und zeigten hohe und stabile (5-7 Wochen nach Transplantation) Transgenexpressionsraten (GFP) (Josephson et al., 2004; Trobridge et al., 2002b).

Den breiten Zelltropismus der FVV demonstrieren auch Studien, in denen Astrozyten und hippokampale Neurone effizient transduziert wurden (Liu et al., 2005; Liu et al., 2007). Die Eignung FVV für Transgenexpressionen, die differenzierungsabhängig vermittelt werden sollen, konnte mit Transduktion einer neuronalen multipotenten Vorläuferzelllinie gezeigt werden, in der die Transgenexpression (EGFP) mit einem spezifischen Promoter erst während der Astrogenese stattfand (Rothenaigner et al., 2009). In einer kleinen initialen Studie wurden 2008 FV- und LV-Vektoren mit gleichen Titern in die Gehirne adulter Ratten injiziert und verglichen. Nach einer Woche war das mit den FVV transduzierte Areal

signifikant größer, als das der lentiviralen. Nach acht Wochen war jedoch eine deutliche Reduktion transduzierter Gewebe mit FVV zu verzeichnen. FV-Vektoren könnten sich demnach für kurzzeitige Gentransferstrategien im Zentralnervensystem eignen (Caprariello et al., 2008). FVV werden auch in vorklinischen Studien z.B. zur Korrektur der genetischen Defekte der β -Thalassämie und der CGD eingesetzt (Vassilopoulos und Rethwilm, 2008). Und in einem murinen Modell konnte mit Hilfe von FVV eine funktionelle Rekonstitution des Fanconi C-Genes erzielt werden (Si et al., 2008). Die Fanconi-Anämie ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit die mit kongenitalen Fehlbildungen, Knochenmarksversagen und einem erhöhtem Neoplasie-Risiko einhergeht. Die Erkrankung betrifft das DNA-Reparatursystem (ca. 15 assoziierte Gene), was u.A. zum vermehrten Absterben von blutbildenden Zellen führt (Kutler et al., 2003; Rosenberg et al., 2005).

Ein großer Erfolg wurde mit der Heilung einer Erbkrankheit in einem klinisch relevanten Großtiermodell der LAD (engl.: *Leukocyte Adhesion Deficiency*) mit FV erzielt. Die LAD ist eine genetische Immundefizienz, verursacht durch eine Mutation in der β -2 Integrin-Genuntereinheit (CD18). Dadurch wird der CD11-CD18-Adhäsionsfaktor nicht auf der Leukozytenoberfläche exprimiert und die Leukozyten können aufgrund der fehlenden Adhäsion am Endothel nicht zur entzündlichen Stelle gelangen. Dies äußert sich als letale Immunschwäche (Bauer et al., 2004; Malech und Hickstein, 2007). In einem Hundemodell der LAD (CLAD, *canine* LAD), konnte durch FV vermittelte CD18-Transgenexpression in den caninen Stammzellen eine Heilung der Hunde erzielt werden (Kiem et al., 2007; Bauer et al., 2008). Die FV-Vektoren exprimierten das canine CD18 von einem internen Promoter (*internal murine stem cell virus promoter*, MSCV) (Hawley et al., 1994). Es ist gelungen, durch die Korrektur des mutierten Gens mit FV-Vektoren eine im Schnitt drei- bis vierfach höhere Anzahl an korrigierten Leukozyten nachzuweisen als mit verwendeten gammaretroviralen Vektoren (Bauer et al., 2006; Vassilopoulos und Rethwilm, 2008; Hai et al., 2008). Die Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von über 800 Proviren, isoliert aus Blutzellen von vier therapierten CLAD Hunden, zeigte dass 26 davon im 30 kb Bereich von bekannten zellulären Proto-Onkogenen lagen (Bauer et al., 2008), was einer zufälligen Integration entspricht und gegen einen genotoxischen Effekt der FV-Vektorintegration. Demgegenüber zeigte eine entsprechende CLAD Studie mit gammaretroviralen Vektoren, dass diese nicht zufällig integrieren (Hai et al., 2008). Bis heute zeigen die genthapierten Hunde keine Nebenwirkungen und auch ein *silencing* der Transgenexpression ist nicht zu verzeichnen (Vassilopoulos und Rethwilm, 2008). Die neuesten Ergebnisse 36 bis 42 Monate nach der Behandlung, zeigen zwar dass die FVV auch u.A. in der Nähe von Proto-Onkogenen integrieren, dies aber nicht zwingend zu maligner Transformation führen muss (Ohmine et al., 2010). Neue Erkenntnisse in Zusammenhang mit den CLAD-Studien zeigen interessanterweise, dass der foamyvirale CD18 exprimierende Vektor, in dem der virale

MSCV Promoter durch den schwächeren zellulären PGK (Phosphoglyceratkinase) Promoter ersetzt wurde, nicht in der Lage war die Hunde zu heilen (Bauer et al., 2011).

Kein integrierendes Vektorsystem wird wohl je als komplett sicher angesehen werden können. Sicherheitsvorkehrungen, wie die Entwicklung von Transaktivierungsassays (Hendrie et al., 2008; Bokhoven et al., 2009), sowie die Minimierung der viralen Vektorsequenzen (Wiktorowicz et al., 2009) und die möglicherweise bessere Eignung zellulärer Promotoren (Zychlinski et al., 2008) sind deswegen Gegenstand intensiver Forschung und mögliche Wegbereiter der FVV in die Klinik.

2.8 Fragestellung

Der intraartikuläre Transfer von anti-inflammatorischen Genen (z.B. des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten - IL1RA) wurde bereits erfolgreich in Tiermodellen der RA und mehreren präklinischen Studien eingesetzt. Die klinische Anwendung dieser Technologie ist dabei essentiell von Vektoren abhängig, die in der Lage sind, effizienten intraartikulären Gentransfer und stabile Transgenexpression *in vivo* zu gewährleisten. Im Unterschied zu den gebräuchlicheren orthoretroviralen Vektoren leiten sich FV-Vektoren von apathogenen Elternviren ab und zeichnen sich durch ein vorteilhaftes Integrationsmuster in das zelluläre Genom aus. Das Projekt zielt auf die Entwicklung eines indirekten Gentransferansatzes zur Arthritistherapie mit foamyviralen Vektoren (FVV). Als erster Schritt werden FVV generiert, welche die cDNAs des humanen oder Ratten IL1RA exprimieren. Nach eingehender *in vitro* Charakterisierung mit verschiedenen Zelllinien und primären Zellen, sollten die Vektoren für einen indirekten Gentransferansatz *in vivo* zur Anwendung kommen. Nach intraartikulärer Injektion foamyviral transduzierter Synovialfibroblasten in Wistar und athymischen Nacktratten sollte die i.a. hIL1RA Expression im Zeitverlauf ermittelt, sowie Experimente zur Biodistribution durchgeführt werden.

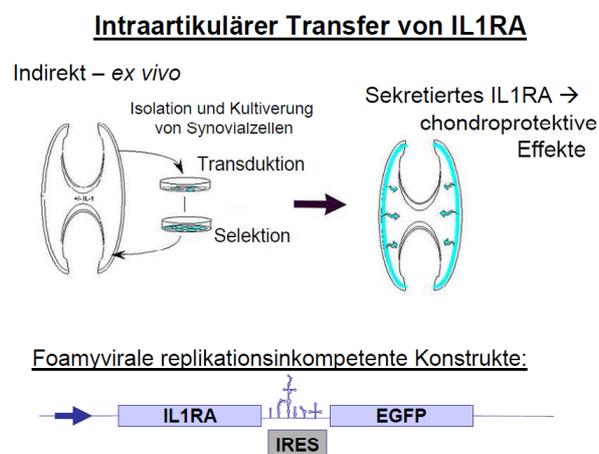


Abb. 4: Schematische Darstellung des Vorhabens.

3 Material

3.1 Geräte

Nachstehend ist eine Auswahl wichtiger Geräte aufgeführt:

| Gerät | Hersteller/Lieferant, Typbezeichnung |
|------------------------------------|---|
| Arbeitswerkbank | Gelaire, BSB 4A |
| Brutschrank | Heraeus, CO ₂ begast |
| ELISA-Reader | Tecan |
| FACSCalibur (Durchflusszytometrie) | Becton & Dickinson |
| FACSDiva (Zellsortierung) | Becton & Dickinson |
| Fluoreszenzmikroskop | Leitz, DMIRES 2 |
| Photometer | Eppendorf, Biophotometer 6131 |
| Real-Time Thermocycler | BioRad, iCycler iQ |
| Sterilwerkbank | Gelaire Flow Laboratories, BSB4A |
| Zentrifuge | Heraeus, Multifuge 1sr |
| Zentrifuge | Sorvall, Evolution RC |

3.2 Material

Plastikmaterial wurde bezogen von: Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc und Roth.

Sonstiges:

| Material | Firma, Lieferant |
|--|-------------------------|
| Freeze 'N Squeeze Spin Columns | BioRad |
| Sterilfilter (Porengröße: 0,22 und 0,45 µm) | Schleicher & Schüll |
| Wizard Minicolumns | Promega |
| Polyallomerflaschen 50 ml (#253211) für SS-34 Rotor | Beranek Laborgeräte |

Materialien für die tierexperimentellen Arbeiten:

| Produkt | Firma |
|---|--------------|
| BD Micro-Fine™ + Demi Insulinspritzen (0,3mm (30G) y 8mm) U-100 | BD |
| Collagenase NB4 | Serva |
| FORENE® (Isofluran, Inhalationsnarkotikum) | ABBOTT |
| Tramal® Tropfen | GRÜNENTHAL |

Steriles OP-Besteck sowie Nahtmaterial und Hautdesinfektionsmittel wurde aus der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus (Würzburg) bezogen.

3.3 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien von folgenden Herstellern verwendet: Applichem, MBI Fermentas, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma-Aldrich. Falls ein Produkt eines bestimmten Herstellers gezielt eingesetzt wurde, wird dies gesondert erwähnt.

3.4 Computerprogramme und Internetseiten

| Programm | Internetseite/ Firma |
|-----------------------|---|
| Adobe Photoshop 7.0 | Adobe Systems Inc. |
| Ape-A Plasmid Editor | M. Wayne Davis |
| Microsoft Office 2004 | Microsoft |
| NCBI-Blast | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.html |
| FlowJo Software | Tree Star Inc. |
| CellQuest Software | Becton-Dickinson |
| Endnote X3 | ResearchSoft |
| Softmax®PRO3.0 | Molecular Devices |
| Graphpad Prism 5.0 | Graphpad |

3.5 Enzyme und Reaktionspuffer

| Enzym | Firma |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Calf-Intestine Phosphatase (CIAP) | Fermentas |
| <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase | Peqlab |
| peqGOLD Taq-DNA-Polymerase | Peqlab |
| RNaseA | Roth |
| T4 DNA-Ligase | Fermentas |
| Collagenase NB 4 | Serva Electrophoresis |

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas und New England Biolabs erworben. Die mit den Enzymen verwendeten Puffer wurden jeweils vom Hersteller mit den entsprechenden Enzymen geliefert.

3.6 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

| Kit | Firma |
|-------------------------------------|-------------------------|
| BigDye™ Terminator 1.1 | Biosystems |
| GenElute™ Gel Extraction Kit | Sigma Aldrich |
| GenElute™ PCR Clean-Up Kit | Sigma Aldrich |
| iScript cDNA Synthesis Kit | BioRad |
| PCR-Purification Kit | Qiagen |
| peqGOLD PCR Master Mix S | peqLab |
| NucleoBond PC 500 | Macherey & Nagel |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| Nucleospin® RNA II isolation kit | Macherey & Nagel |
| DNeasy Blood and Tissue Kit | Qiagen |
| QuantiFast SYBR Green PCR Kit | Qiagen |
| DY201 (<i>human</i> IL1β) ELSIA | R&D |
| DY280 (<i>human</i> IL1RA) ELSIA | R&D |
| DY501 (<i>rat</i> IL1β) ELISA | R&D |
| <i>rat</i> IL1RA ELISA | Cusabio (über Biotrend) |
| PGE ₂ Assay | R&D |
| BD OptEIA™ TMB Substrat Reagent Set | R&D |
| QIAshredder™ | Qiagen |

3.7 Größenstandards

| Nukleinsäurelängenstandards | Firma |
|------------------------------------|--------------------|
| Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker | Fermentas |
| MassRuler™DNA Ladder, High Range | Fermentas |
| MassRuler™DNA Ladder, Ladder Mix | Fermentas |
| MassRuler™DNA Ladder, Low Range | Fermentas |
| O´RangeRuler™ 50bp DNA Ladder | Fermentas |
| λ-HindIII Marker | eigene Herstellung |
| λ-PstI Marker | eigene Herstellung |

3.8 Puffer und Lösungen

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM CaCl ₂ 1,0 mM MgCl ₂ |
| Tris-Acetat Puffer (TAE) 50x | 2,0M Tris pH 8,0 0,1M EDTA 1,0M CH ₃ COOH |
| Transformationspuffer I (Herstellung kompetente E-coli Bakterien) | 30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerin Mit 10% Essigsäure pH 5,8 einstellen. |
| Transformationspuffer II (Herstellung kompetente E-coli Bakterien) | 10 mM MOPS 100 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin Mit 1 M KOH pH 6,5 einstellen und 0,2 µm steril filtrieren. |
| Ampicillin Stammlösung | 100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz Sterilfiltrration mit 0,2 µm Filter, aliquoutieren, Lagerung bei -20°C. |
| ATV (<i>adjusted trypsin-versen</i>) | 8 g NaCl 400 mg KCl 1 g D-Glucose 580mg NaHCO ₃ (pH7,2-7,4) 500mg Trypsin 300mg Versen ad 1 L dH ₂ O |
| Polyethylenimin (PEI) Stocklösung | 100 mg/ml PEI (Polysciences, Inc.) Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter, Lagerung bei -20°C |
| Natriumbutyrat (50 x) | 500 mM Na-Butyrat in PBS gelöst Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter, Lagerung bei 4°C |
| FACS-Puffer | 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) 0,02 % Natriumazid in PBS |

| | |
|--|--|
| Collagenase (NB4, Serva) | Stammlösung: 1,25 U/ml in Dulbecco's PBS (DPBS) lösen aliquotiert bei -20°C lagern |
| 4% Formalin-Lösung (<i>phosphate-buffered paraformaldehyde</i> , PFA) | 4 g Paraformaldehyd ~ 75 ml 1x PBS Erhitzen auf einem Magnetrührer (55-60°C), Temp. 5 min halten, dann Zugabe von NaOH (~100 to 150 µl) bis die Lösung klar ist, pH 7,4 einstellen, danach ad 100 ml mit 1x PBS. |
| Bromphenolblau-Lösung für Elektrophorese | für Agarose-Gel 0,25 % Natriumsalz-Bromphenolblau (BPB) 30 % Glyzerin (steril) in A.dest. |

Minipräparation mit Diatomeen-Erde:

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|---|
| Diatomeen-Lösung | 10 g Diatomeen-Erde 500 µl HCl ad 50 ml ddH ₂ O |
| L6-Lösung (lichtgeschützt gelagert) | 100 ml 0,1M Tris HCl pH 6,4 8,8 ml 0,5M EDTA pH 8,0 2,6 ml Triton X100 13,2 ml ddH ₂ O 120 g Guanidin (Thiocyanatsalz) |
| Puffer I | 20 mM Tris pH 7,5 4 mM EDTA pH 8,0 40 µg/ml RNase |
| Puffer II | 0,2 N NaOH 1 % (w/v) SDS |
| Puffer III | 3 M Kaliumacetat |
| Waschpuffer | 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 2,5 mM EDTA pH 8,0 50 % Ethanol |

Hemalaun-Eosin (H&E)-Färbung:

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------|---|
| Hemalaunlösung | 6 g Hematoxylin 1 g Natriumiodat 250 g Aluminiumsulfat 250 g Chloralhydrat 5 g Citronensäure Ad 5 l ddH ₂ O |
| 1 % Eosinlösung | 1 g Eosin Ad 100 ml ddH ₂ O 1 Tropfen Essigsäure |

Alcianblau-Färbung:

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------|--|
| Alcianblau-Lösung | 0,1 g Alcianblau 8 GX Ad 100 ml ddH ₂ O 3 ml Eisessig |
| Kernechtrot | 5 g Aluminiumsulfat A 100 ml H ₂ O Erhitzen bis zum Kochen 0,1 g Kernechtrot zugeben Nach Abkühlen filtrieren |

3.9 Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| LB-Medium (flüssig) | 20 g GIBCO BRL® LB Broth Base ad 1 l ddH ₂ O, autoklavieren. Antibiotika-Supplementation nach Abkühlen: Ampicillin [100 µg/ml] |
| LB-Agar | 1,6 % (w/v) Agar in LB-Medium (Nährmedium Bakterien) autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen, Antibiotika-Supplementation: Ampicillin [100 µg/ml], Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml) |
| SOC-Medium | 95 ml LB-Medium 1 ml 1 M MgCl ₂ 1 ml 1 M MgSO ₄ 2 ml 1 M Glucose 0,2 µm sterilfiltriert |

| Medium | Zusammensetzung |
|----------------------------------|--|
| Komplettmedium für 293T Zellen | 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 500 µg/ml L(+)-Glutamin 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in MEM (<i>Modified eagle's Medium</i> , 9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO ₃ Hausmedium) |
| Komplettmedium für HT1080 Zellen | 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>) (Gibco) |
| Komplettmedium für Tert-4 Zellen | 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in MEM <i>with Earle's Salts</i> (PAA) |
| Komplettmedium für MSZ | 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM/Ham's F-12 (PAA) |
| Einfriermedium | 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 90 % Fötale Kälberserum (FCS) |

Stammlösungen der Medienzusätze zur chondrogenen Differenzierung

***L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt* (50 mg/ml)**

MG = 289,5 g/mol

in Aqua bidest. lösen

sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern

Dexamethason (1 mM = 1 µmol/ml)

MG = 392,5 g/mol

in 10 ml 100% EtOH lösen

aliquotiert bei -80°C lagern

Pyruvat (*Pyruvic acid sodium salt*; 100 mg/ml)

MG = 110 g/mol

in Aqua bidest. lösen

sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern

L-Prolin (Stammlösung mit 40 mg/ml)

MG = 115,1 g/mol

in Aqua bidest. lösen

sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern

Recombinant Human Interleukin-1 β , (IL1 β) (R&D Biosystems)(Stammlösung mit 10 μ g/ml)

in PBS mit 0,1 % BSA lösen

aliquotiert bei -20°C lagern

Recombinant Transforming growth factor β 1, (TGF β 1) (R&D Biosystems)(Stammlösung mit 10 μ g/ml)

in 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA lösen

aliquotiert bei -20°C lagern

Chondrogenes Differenzierungsmedium:

| | | |
|---|--------------|--------------------------|
| DMEM <i>High Glucose</i> (4,5 g/l) (PAA) + Pen/Strep [100 μ g/ml] | 10 ml | Endkonzentration: |
| <i>L-Ascorbic acid-2-phosphate</i> | 10 μ l | 50 μ g/ml |
| <i>Dexamethasone</i> | 1 μ l | 1 μ M |
| <i>Pyruvate</i> | 10 μ l | 100 μ g/ml |
| <i>L-Proline</i> | 10 μ l | 40 μ g/ml |
| ITS ⁺ 1 | 100 μ l | 1% |
| TGF β 1 (R&D) | 10 μ l | 10 ng/ml |

3.10 Bakterienstämme

| Spezies | Stamm | Bezugsquelle |
|-------------------------|--------------|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | TOP10F' | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> | DH5 α | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> | XL2-Blue | Stratagene |

3.11 Zelllinien

| Zellen | Beschreibung | Bezugsquelle |
|---|---|--|
| HEK-293T | Humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV40 große T-Antigen stabil exprimiert; adhären (Du Bridge et al, 1987). | ATCC: CRL-11268 |
| HT1080 | Humane Fibroblastensarkom Zellen; Verwendung zur Transduktion mit viralen Vektoren; adhären. | ATCC: CCL-121 |
| hMSZ-Tert-4 (Tert-4) | Humane mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase immortalisierte mesenchymale Stammzelllinie | Moustapha Kassem (Odense, Dänemark) |
| hMSZ | Primäre humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) | (Friedenstein et al., 1982; Nöth et al., 2002) |
| Synovialzellen / Synovialfibroblasten (SF) | Primäre Synovialzellen von Wistar und athymischen <i>nude</i> Ratten; isoliert aus Synovialgewebe der Kniegelenke. | Gegenstand dieser Arbeit |

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ Begasung kultiviert.

3.12 Vektorplasmide

| Bezeichnung | Beschreibung/ Eigenschaften | Bezugsquelle |
|--------------------|--|------------------------------|
| pMD9 | PFV Vektor mit EGFP Marker, enthält CASI und CASII | (Heinkelein et al., 2002) |
| pBF014 | PFV Vektor mit IRES (ECMV) | B. Klüpfel, nicht publiziert |
| pNA1 | PFV Vektor mit EGFP Marker und <i>human</i> IL1RA Transgen | Dieser Arbeit |
| pNA2 | PFV Vektor mit EGFP Marker und <i>rat</i> IL1RA Transgen | Dieser Arbeit |
| pNA3 | PFV Vektor mit mRFP Marker und IL1 β Transgen | Dieser Arbeit |
| pNA4 | PFV Vektor mit EGFP Marker und EF-1 α Promoter | Dieser Arbeit |
| pCZlgag2 | CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV-Gag | (Heinkelein et al., 2002) |

| Bezeichnung | Beschreibung/ Eigenschaften | Bezugsquelle |
|-----------------|--|---|
| pCZlpol | CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV-Pol | (Stange et al., 2005) |
| pCZ-HFVenvEM002 | CMV-getriebenes Expressionsplasmid für PFV-Env | (Lindemann und Rethwilm, 1998) |
| pKG84 | PFV Vektor mit Expressionskassette für EGFP unter dem CMV-Promoter | (Gärtner et al., 2009) |
| pCDNA3.1+hIL1RA | Expressionsplasmid (Invitrogen); mit eingefügten hIL1RA Transgen | Dieser Arbeit |
| pSJ03 | PFV Vektor mit Expressionskassette für mRFP | (Diplomarbeit Stefanie Jaitner, nicht publiziert) |

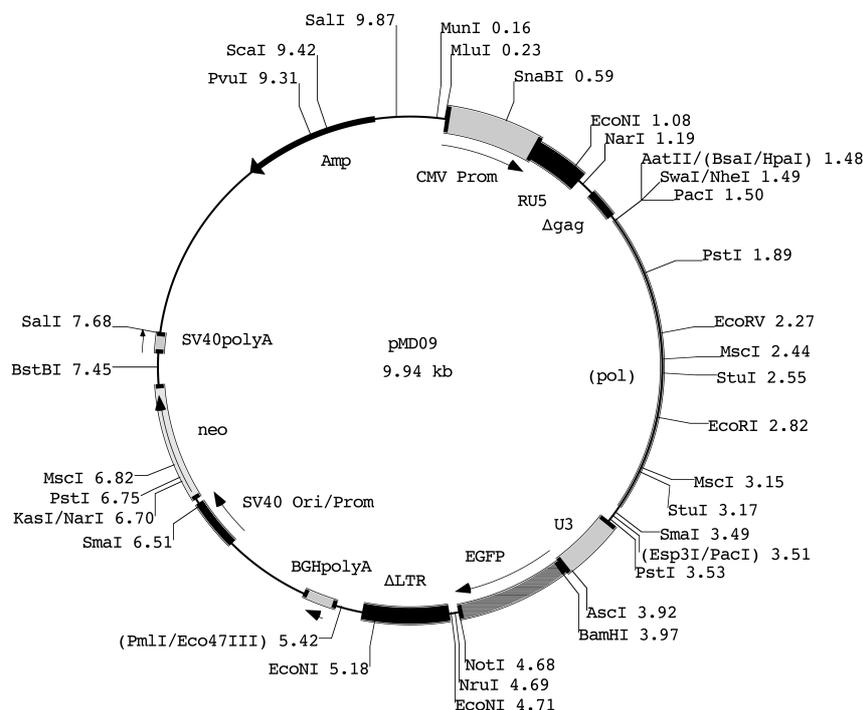


Abb.5: Vektorkarte MD9. Δ LTR – deletierte *Long Terminal Repeats*; CASI/II – cis-aktive Sequenz I und II; Amp – Ampizillinresistenzgen; EGFP – Grün fluoreszierendes Protein; U3 – Promoter des *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV); IRES – *internal ribosomal entry site*.

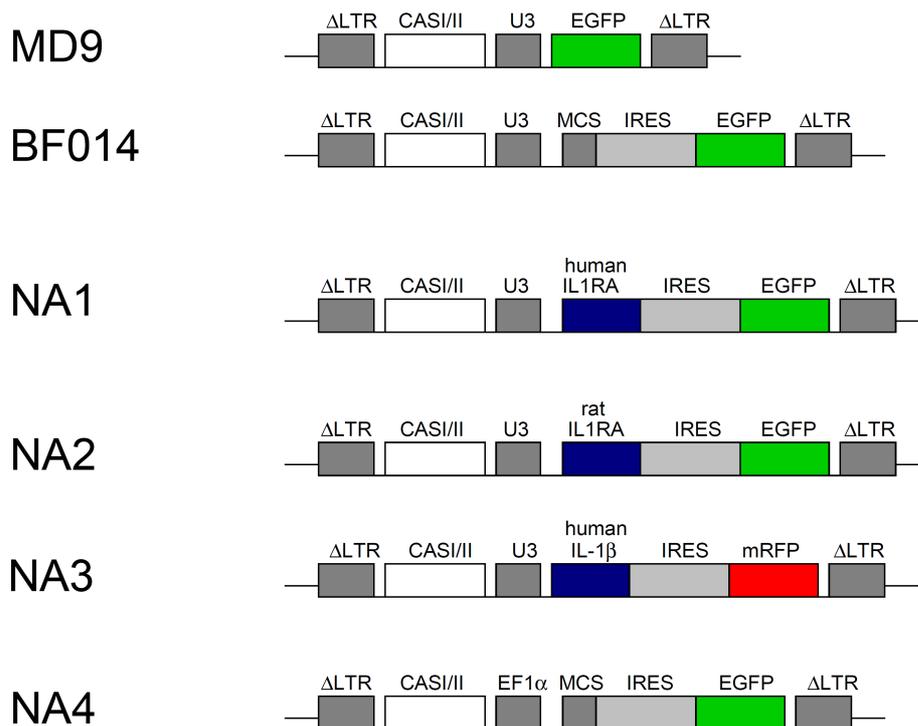


Abb. 6: Übersicht / Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren.

(Dargestellt als Provirusintegrate). MCS – *multiple cloning site*; IL1RA – Interleukin-1 Rezeptorantagonist; mRFP – *monomeric red fluorescent protein*.

3.13 Primer und Oligonukleotide

Klonierungs- und Sequenzierprimer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und entsalzt. Als Primer für die *Realtime* PCR wurden QuantiTect® Primer Assays von Qiagen verwendet.

Validierte QuantiTect® Primer Assays für die Realtime PCR von Qiagen :

human β-Actin (QT01680476)

human GAPDH (QT01192646)

rat GAPDH (QT00199633)

rat β-Actin (QT00193473)

EGFP (QT01171611)

| Primername / Gen | Sequenz (5' - 3') |
|---|---|
| Klonierungs- und Sequenzierprimer | |
| hIL1beta_hin_Xba / hIL1beta_rück_Xba | GCTCTAGAATGGCAGAAGTACCTGAGCTCG GCTCTAGATTAGGAAGACACAAATTGCATG |
| h_IL1Ra_hin_Xho / h_IL1Ra-rück_Xba (Nr. 257 / 258) | GCCTCGAGATGGAAATCTGCAGAGGCCTC GCTCTAGACTACTCGTCCTCCTGGAAGTAGA |
| rIL1RA_hin_Xho / rIL1RA_rück_Xba (Nr. 259 / 260) | GCCTCGAGATGGAAATCTGCAGGGGAC GCTCTAGACTATTGGTCTTCCTGGAAG |
| fw_Eco47III_EF1a / rev_AscI_EF1a | GCTCAGCGCTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGT GCGGCGCGCCTCACGACACCTGAAATGGAAGAA |
| F_Sequ_BF014_4609-4589 (Nr. 263) | GGCCTTATTCCAAGCGGCTTC |
| F_Sequ_BF014_3863-3883 (Nr. 262) | GCCTGCTTCTCGCTTCTGTTC |
| F_Sequ_hIL1RA_270-290 (Nr. 261) | GTGCCTGTCCTGTGTCAAGTC |
| EF-1a_fw_1054 (Nr. 707) | GGGTGGAGACTGAAGTTAGG |
| EF-1a_rv_144 (Nr. 708) | ACACGACATCACTTTCCAG |
| pBF014-Linkersequenz (Nr. 64) | GATCCGGTGGCCTCGAGAATGACTCTAGAGCAGGTG |
| pBF014-Linkersequenz (Nr. 63) | GATCCACCTGCTCTAGAGTCATTCTCGAGGCCACCG |
| Sonstige | |
| LC_secr_hIL1RA (Realtime PCR Primer) (Palmer et al., 2002) | GGCCTCCGCAGTCACCTAATCACTCT TTGACACAGGACAGGCACAT |
| EGFP_Fw2 | GCGACGTAAACGGCCACAAG |
| EGFP_Rev1 | TCACGAACTCCAGCAGGACC |
| Knorpelspezifische Gene | |
| Aggrecan 1 (AGN) | GCCTTGAGCAGTTCACCTTC CTCTTCTACGGGGACAGCAG |
| Biglycan (BGN) | ACAGTGGCTTTGAACCTGGA TCATCCTGATCTGGTTGTGG |
| <i>Cartilage oligomeric protein (COMP)</i> | CAGGACGACTTTGATGCAGA AGGCTGGAGCTGTCCTGGTA |
| Collagen type II, alpha 1 (Col II) | TTTCCCAGGTCAAGATGGTC CTTCAGCACCTGTCTCACCA |
| EF-1α (Referenzgen) | AGGTGATTATCCTGAACCATCC AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC |

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Zufuhr kultiviert. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur für 3 Minuten und 1200 rpm (Multifuge 1S-R). Alle Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch jeweils im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt und waren steril.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Die Zellkultur wurde zweimal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit ATV gespült, anschließend wurden die Zellen mit ATV abgelöst und mit dem entsprechenden Medium 1:10- bis 1:20-fach verdünnt. Die hMSZ-Tert-4 Zellen wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet.

4.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 10 ml vorgelegtes Zellkulturmedium überführt und 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Es war darauf zu achten, dass der Auftauungsprozess schnell verläuft, da DMSO beim Auftauen sehr toxisch für die Zellen ist. Nach einem weiteren Waschschrift, wurden die Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in einer kleinen Zellkulturflasche kultiviert.

Zum Einfrieren von Zellen wurde die Zellkultur erst mit ATV abgelöst, einmal mit PBS gewaschen und bei 1200 rpm 5 min lang pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in ca. 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in Kryotubes überführt. Die Zellen wurden über Nacht in einer Einfrierbox bei – 80 °C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

4.1.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) zur Produktion foamyviraler Partikel

Bei der Transfektion werden fremde Nucleinsäuren (z.B. Plasmide) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Verschiedene Reagenzien erlauben auf unterschiedliche Weisen das Einschleusen von fremder Nucleinsäure. Es handelte sich hierbei immer um transiente Transfektionen, da die in den eukaryotischen Zellen eingebrachte Fremd-DNA im Laufe der Zellteilungen verloren geht. Polyethylenimin ist ein kationisches Polymer, welches Nucleinsäure-bindende und -kondensierende Eigenschaften besitzt. DNA-Polykation-Komplexe werden effizient von verschiedenen Zellarten durch Endozytose aufgenommen. Der so genannte „Protonensponge-Effekt“ des Polykations wirkt einer intrazellulären Degradierung entgegen, so dass ein effizienter Gentransfer stattfinden kann (Boussif et al., 1995; Kircheis et al., 1997).

Zur Gewinnung von FVV, die nur eine Replikationsrunde durchlaufen können, wurde das Vier-Plasmidsystem verwendet. 293T Zellen wurden mit vier CMV-Promotor getriebenen Plasmiden transfiziert. Drei Expressionsplasmide kodierten jeweils das FV Gag, Pol und Env Protein und das vierte eine verpackbare RNA als Vektor, die zusätzlich unter einem separaten Promotor das Markergen EGFP kodierte, welches eine Infektionsanalyse *via* Durchflusszytometrie ermöglichte (Heinkelein et al., 2002). Das PFV-Vektorsystem bestand aus den Helferplasmiden pCZlgag2, pCZlpol und pCZ-HFVenvEM002 und dem Vektorplasmid pMD9, pBF014, pNA1-4 oder pKG84.

Ein Tag vor der Transfektion wurden 6×10^6 293T Zellen in 8 ml Medium pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz aus DNA, PEI und Medium ohne Zusätze angesetzt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und die Schale leicht geschwenkt. Am nächsten Morgen nach der Transfektion wurde dem Medium 10 mM Natriumbutyrat für 6-8 h zugesetzt, anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zugabe von Natriumbutyrat erfolgte, da die verwendeten Konstrukte einen CMV-Promotor enthielten, dessen Genexpression durch Natriumbutyrat stimuliert werden kann (Soneoka et al. 1995). Die Aufarbeitung des Überstandes erfolgte 48 h nach Transfektion.

Transfektionsansatz:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| DNA-Ansatz (20µg): | |
| Vektor, gag, pol, env im Verhältnis: | 10-5-1-1 |
| Medium ohne Zusätze | ad 500 µl |
| PEI-Ansatz : | |
| PEI (linear 25kD; Polysciences, Inc.) | 60 µl |
| Medium ohne Zusätze | 440 µl |

4.1.4 Herstellung virushaltiger Überstände

Nach erfolgter Transfektion von 293T Zellen mit den Plasmid-DNAs wurden zellfreie Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das virusenthaltende Medium mit einer sterilen Spritze abgenommen und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der filtrierte Überstand mit den enthaltenen Vektorpartikeln wurde entweder bei -80°C gelagert oder weiter aufgearbeitet. Hierzu wurde dieser in Polyallomerröhrchen überführt und anschließend bei 12.000 g und 4°C für zwei Stunden zentrifugiert (SS34-Rotor). Das die Virusvektoren enthaltende Pellet wurde in PBS oder den Zielzellen entsprechendem Medium resuspendiert, gevortext und 5 min auf Eis gelöst. Anschließend wurden die aufkonzentrierte Vektorpartikeln entweder direkt für die Transduktion verwendet oder bei -80°C gelagert.

4.1.5 Transduktion von Zielzellen mit FV-Vektorpartikeln

1×10^4 Zellen wurden in 12-Lochplatten einen Tag vor Transduktion ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen des Virusüberstandes infiziert. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und je 1 ml einer Verdünnungsstufe pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach 72 h erfolgte die FACS-Analyse, wodurch die Transduktionsrate bestimmt wurde. Ggf. wurde vor Ablösen der Zellen der Überstand für spätere ELISA-Messungen abgenommen und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden mit 0,5 ml ATV pro Vertiefung abgelöst und für eine FACS-Analyse zur Bestimmung der „cell culture infectious dose 50“ (CCID₅₀) in FACS-Röhrchen überführt.

Die CCID₅₀ wurde als Kenngröße für die Infektiosität einer Vektorsuspension verwendet. Hierbei wurde aus den erhaltenen Transduktionseffizienzen die Verdünnung berechnet bei der 50 % der Zellen transduziert werden. Je kleiner also der CCID₅₀ Wert, desto größer ist die Infektiosität der Vektorproduktion. Die CCID₅₀ wurde mit dem Statistikprogramm GraphPadPrism®5.0 (Prism) ermittelt. Dabei wird der durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsatz EGFP-positiver Zellen gegen die logarithmische Verdünnungsstufe der Vektorsuspension aufgetragen. Um die Vektoren zu titrieren wurde standardmäßig die HT1080 Zelllinie verwendet.

4.1.6 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz von Zellen mit fluoreszierendem Protein zu überprüfen, wurden sie unter einem UV-Mikroskop kontrolliert (DMIRES 2, Leitz) und

fotografiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in den jeweiligen Kulturschalen bei einer 10-fachen Vergrößerung im Durchlicht betrachtet. Durch das Einschalten eines optischen Filters, der die zur Anregung des Farbstoffs notwendige Wellenlänge isoliert und das gleichzeitige Betätigen eines Farbteilers, wurden die fluoreszierenden Zellen sichtbar gemacht.

4.1.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Anhand der Durchflusszytometrie (FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*) können Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension analysiert werden. Hierzu wird die zu untersuchende Zellsuspension über eine Kapillare in den Messbereich befördert. Dabei werden die Zellen durch die hydrodynamische Fokussierung des Flüssigkeitsstroms so beschleunigt, dass sie am Messpunkt einzeln vorliegen. Abhängig von Größe, Zellmembranstruktur und Granularität des Zytoplasmas wird der am Messpunkt auf die Zellen treffende Laserstrahl in spezifischer Weise gestreut. Das Emissionsspektrum wird dabei vom Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton & Dickinson) detektiert. So können die Zellen nach ihren Merkmalen sortiert und gezählt werden. Diesem Zweck dienen als Parameter der *Forward Scatter* (FSC = Vorwärtsstreulicht) und der *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht). Der FSC nimmt die Beugung des Lichts auf, die durch die Größe der Zellen bestimmt wird. Dagegen wird der SSC durch die Brechung des Lichts bestimmt, was Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen zulässt.

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit für den Nachweis der Expression des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) sowie des *monomeric red fluorescent protein* (mRFP) verwendet. Diese Proteine, welche bei der Anregung durch einen Laserstrahl grün bzw. rot fluoreszieren, sind als Markergene weit verbreitet. Sie wurden in foamyvirale Vektoren als Marker eingefügt und dienen der Bestimmung der Transduktionseffizienz / CCID₅₀. Zur Messung wurden die transduzierten Zellen zuerst mit ATV gewaschen und abgelöst. Danach wurden sie in FACS-Röhrchen mit 3 ml vorgelegtem FACS-Puffer überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente wurden abhängig von der Größe in 100-300 µl 4 %-iger Formalinlösung fixiert. Danach erfolgte die Messung am Durchflusszytometer und die Auswertung der Ergebnisse mit der *CellQuest Pro 3* und *FlowJo Software* (Becton & Dickinson; Tree Star Inc.).

4.1.8 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wird ein Sortingmodul benötigt, welches die in der Flusskammer entstehenden feinen Tröpfchen elektrisch aufladen kann. Darauf werden diese computergesteuert mittels Kondensatorplatten nach den in der Durchflusszytometrie gemessenen Eigenschaften und dem zuvor gesetzten Merkmalsrahmen (*Gate*) in sterile Sammelgefäße sortiert.

Die transduzierten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit ATV abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in ein bis drei ml Medium aufgenommen, resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen filtriert (70 μ m). Bis zur Zellsortierung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit Hilfe der EGFP-Markergenexpression von der zuständigen Abteilung im Institut für Virologie mittels FACS lebend sortiert. Zum fluoreszenzaktivierten Zellsortieren wurde ein FACSDiVa Optima-Gerät von Becton Dickinson verwendet. Die sortierten Zellen wurden dabei in einem sterilen 15 ml Plastikröhrchen mit ~ 5 ml Medium gesammelt. Anschließend wurden diese sortierten Zellen gewaschen, in frisches Medium aufgenommen und in einer der Zellzahl entsprechenden Flasche weiterkultiviert.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen

Zur Vermehrung von Plasmidvektoren für die Durchführung von Plasmid Mini- und Maxipräparationen wurden Bakterien in Flüssigkulturen über Nacht angezchtet. Dabei wurde für eine Plasmid Mini-Übernachtskultur (ÜNK) 5 ml und für eine Maxi-ÜNK 150 ml LB-Medium in sterilen Kulturgefäßen vorgelegt und mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugesetzt. Das Animpfen der Flüssigkulturen erfolgte abhängig vom Verwendungszweck entweder mit einer Bakterieneinzelkolonie einer Agarplatte, 10 μ l Bakteriensuspension einer Vorkultur oder etwas Bakterienmaterial einer Glycerinkultur, welche mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt wurden. Die Kulturen wurden anschließend über Nacht bei 37°C unter Schütteln zwischen 150 und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Weiterverarbeitung der Kulturen oder Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

4.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit, Plasmid DNA aufzunehmen. Durch eine chemische Behandlung werden *E. coli* Bakterien kompetent gemacht. Von einer Übernachtskultur eines ausgewählten Stammes, wird 1 ml der Kultur in 100 ml LB Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer Dichte 0,2-0,3 (OD600) inkubiert. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 4 °C und 2500 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml Transformationspuffer I resuspendiert und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 4 ml Transformationspuffer II aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert, zu je 300 µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff weggefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.3 Anlegen von Glycerinkulturen

Für die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen angelegt. Zur Herstellung dieser wurden 850 µl einer frischen ÜNK mit 150 µl einer Glycerollösung bestehend aus gleichen Anteilen Glycerol und LB⁺-Medium versetzt und bei -80°C gelagert.

4.2.4 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von exogener DNA in eine Bakterienzelle. Dabei kann ein zirkuläres Plasmidmolekül mit eigenem Replikationsursprung (*origin of replication*) im Bakterium amplifiziert und bei der Teilung weitergegeben werden. Die Selektion der Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen haben, erfolgte mit Hilfe eines auf der Plasmid-DNA codierten Antibiotikaresistenz-Gens und Anreichern des Kulturmediums mit diesem Antibiotikum.

Dazu wurden chemisch kompetente *E.coli*-Stämme einem Hitzeschock ausgesetzt, der die Bakterien befähigte, die Plasmid-DNA aufzunehmen. Zu 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde 10 µl des Ligationsansatzes pipettiert, für 30 min auf Eis inkubiert, ungefähr 60 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend wieder für 3 min auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden dann 300 µl SOC-Medium zugesetzt, und es folgte eine Inkubationszeit von 45 - 60 min bei 37°C. Abschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert, dekantiert, in ca. 100 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden.

Diese wurden dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Bakterienplatten mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C im Kühlschrank gelagert

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 RNA Isolation aus eukaryotischen Zellen

Für die quantitative *realtime* PCR, sowie die semiquantitativen Analysen der Pelletkulturen musste RNA isoliert werden. Dabei kamen unterschiedliche Protokolle zum Einsatz.

4.3.1.1 RNeasy Kit (Qiagen)

250.000 bis 10^6 Zellen wurden für 3 Minuten mit 1.200 rpm sedimentiert. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µl Puffer RLT mit 1 % [V/V] β-Mercaptoethanol resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einen QIAshredder überführt und für 2 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss mit einem äquivalenten Volumen 70% Ethanol versetzt und der Ansatz vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Die Proben wurden dann in eine RNeasy Mini-Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 700 µl Puffer RW1 gewaschen. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule für 1 Minute trocken zentrifugiert. Schließlich wurde die RNA in 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser in ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

4.3.1.2 Trizol (Invitrogen)

Die Zellen wurden in 1 ml Trizol aufgenommen, gevortext und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Die Zellaggregate (Pelletversuche) wurden mittels Mikropistill homogenisiert. Ggf. wurden die Proben an dieser Stelle bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden 5 min bei 30°C aufgetaut und mit 200 µl Chloroform kräftig ausgeschüttelt (mindestens 30 s). Nach 3 min Inkubation bei 30°C erfolgte die Phasentrennung durch 15 min Zentrifugation bei 12.000 g. Anschließend wurde die obere Phase in neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30°C erfolgte ein weiterer 10 minütiger

Zentrifugationsschritt bei 12.000 g. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 7.500 g wurde der Überstand wieder abgenommen und das Pellet mindestens 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl RNase freies H₂O aufgenommen und entweder über Nacht bei 4°C oder 10 min bei 60°C gelöst. Anschließend wurde die RNA quantifiziert und dann bei -80°C gelagert.

4.3.1.3 NucleoSpin[®] RNA II Kit (Machery-Nagel)

Die Zellaggregate (Pellets) wurden in Stickstoff durchgefroren und mittels Mikropistill homogenisiert, anschließend mit Lysepuffer (RA1 der Reaktionskomplettausstattung) und β-Mercaptoethanol versetzt. Die RNA-Extraktion erfolgte anschließend nach Herstellerangaben. Die Proben wurden dabei auf der Säule einem DNase-Verdau unterzogen, nach multiplen Waschschritten mit entsprechenden Puffern der Reaktionskomplettausstattung wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert, quantifiziert und dann bei -80°C gelagert.

(Nach reverser Transkription (siehe 4.3.4) wurden die cDNAs der Pellets in semiquantitativen PCRs (4.3.3.1) auf chondrogene Markergene getestet. Die PCR Produkte wurden auf Agarosegele aufgetragen).

4.3.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde die DNA-Sequenz von Interesse mittels PCR (vgl. 4.3.3.1) amplifiziert, wobei rekombinante Plasmid-DNA oder cDNA als Matrize diente und über Starteroligonukleotide (Primer) Restriktionsschnittstellen an das PCR-Produkt eingefügt wurden. Der Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 4.3.7) und das Amplifikat aus dem Agarosegel isoliert (vgl. 4.3.6). Nach einer präparativen Restriktion (vgl. 4.3.10) des gesamten Amplifikates wurde die DNA wiederum aufgereinigt (vgl. 4.3.5) und quantifiziert (vgl. 4.3.9). Parallel hierzu wurde der Zielvektor präparativ restringiert, seine 5'-Enden dephosphoryliert (vgl. 4.3.11), anschließend aufgereinigt und quantifiziert. Nach Ligation der DNA-Fragmente (vgl. 4.3.12) wurden diese in *E. coli*-Zellen transformiert (vgl. 4.2.4). Einzelne gewachsene Kolonien wurden gepickt und in 5 ml-Kulturen (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) überführt. Positive Klone, die das rekombinante Plasmid trugen, wurden nach Plasmid-DNA Minipräparation (vgl. 4.3.8.1) durch analytische Restriktion identifiziert und mit DNA-Sequenzierung verifiziert (vgl. 4.3.3.3).

4.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Standardmethode um Nukleinsäuren *in vitro* zu vervielfältigen. Dabei kommen als Primer bezeichnete kurze Oligonukleotidsequenzen zum Einsatz, die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren. Die Reaktion besteht aus drei sich wiederholenden Schritten. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize durch hohe Temperatur (95°C) in Einzelstränge denaturiert. Das ermöglicht den zweiten Schritt, in dem die Oligonukleotide (Primer) spezifisch an die Matrize binden, dabei ist eine Temperaturabsenkung Voraussetzung, die unter anderem vom Schmelzpunkt der eingesetzten Primern abhängig ist. Nachdem der Primer an die Matrizen-DNA gebunden hat, folgt der nächste Schritt die Elongation. Eine thermostabile Polymerase verwendet das 3' Ende des Primers, wodurch die Synthese der Zielsequenz eingeleitet wird. Durch mehrmalige Wiederholungen dieser Schritte (20-30 mal) kommt es zu einer exponentiellen Vervielfachung der Zielsequenz. Modifikationen an den Primern erlauben es, Änderungen in die synthetisierte Sequenz, wie z.B. Mutationen oder Enzymschnittstellen, einzufügen welche die Zielsequenz flankieren, was weiteres Klonieren mit dem Amplifikat ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Anwendungen der PCR vor. Zur einfachen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte im Rahmen von Klonierungen sowie zur Kontrolle von Plasmid-DNA und Analyse genomischer DNA aus Organen der Ratten, wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) angewandt. Diese erforderte außerdem ein Umschreiben zellulärer Gesamt-RNA in sogenannte cDNA mittels einer Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR).

4.3.3.1 Standard PCR

Für eine Standard-PCR wurde ein PCR-Master-Mix (peqGOLD PCR-Master-Mix S, Peqlab) mit *Taq-DNA-Polymerase* verwendet. Diese Polymerase mit einem Temperaturoptimum bei 72°C wurde ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *thermophilus aquaticus* isoliert. Sie besitzt keine Fehlerkorrekturfunktion (3'-5' Exonukleaseaktivität und *proof-reading*) und erzeugt am 3' Ende des PCR-Produkts einen A-Überhang.

Pipettierschema für eine Standard-PCR mit PCR-Master-Mix (Peqlab):

- 1,0 µl Plasmid-DNA (verdünnt auf 100 ng/µl)
- 12,5 µl peqGOLD PCR-Master-Mix
- 1,0 µl Vorwärtsprimer (100 ng/µl)
- 1,0 µl Rückwärtsprimer (100 ng/µl)
- 4,5 µl H₂O bidest
- 20,0 µl Gesamtvolumen**

Im Rahmen von Klonierungen, bei welchen eine fehlerfreie Amplifikation der Ziel-DNA notwendig war, wurde eine *Pwo*-DNA-Polymerase, ursprünglich stammend aus dem hyperthermophilen Tiefseebakterium *Pyrococcus woesei*, mit Fehlerkorrekturlesefunktion (3'-5' Exonukleaseaktivität) eingesetzt.

Der Reaktionsansatz für Klonierungs-PCRs ergab sich wie folgt:

- 1,0 µl Plasmid-DNA (verdünnt auf 100 ng/µl)
- 1,0 µl Vorwärtsprimer (100 ng/µl)
- 1,0 µl Rückwärtsprimer (100 ng/µl)
- 1,0 µl dNTP-Lösung (2,5 mM)
- 5,0 µl *Pwo*-DNA-Polymerase Reaktionspuffer(10-fach, Peqlab)
- 1,0 µl *Pwo*-DNA-Polymerase (1 u/µl, Peqlab)
- 40,0 µl H₂O bidest
- 50,0 µl Gesamtvolumen**

Die Reaktionsansätze wurden jeweils in einem 0,25 ml PCR-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert, wobei die Polymerase immer am Schluss des Ansatzes zugegeben wurde. Nach der Resuspension des Reaktionsansatzes wurde die Amplifikation in Thermocyclern (BioRad) durchgeführt, die eine automatische aber individuell programmierte Steuerung der Temperaturprogramme zuließen. Folgendes PCR-Programm wurde eingestellt:

| | | |
|---------------------|------------------------|---|
| 1 Zyklus | Initiale Denaturierung | 5 Minuten, 95°C |
| 25-35 Zyklen | Denaturierung | 30 s, 95°C |
| | Primer Annealing | 30 s, Temperatur je nach Primer |
| | Elongation | 1 Minute pro 1000 Basen (<i>Taq</i>), 72°C 1 Minute pro 500 Basen (<i>Pwo</i>), 68°C |
| 1 Zyklus | Finale Elongation | 10 Minuten, 72°C (<i>Taq</i>) bzw. 68°C (<i>Pwo</i>) |
| 1 Zyklus | Kühlung | 4°C |

Die Elongationszeit wurde jeweils individuell an die Länge des erwarteten Produktes und nach Versuchsanspruch eingesetzter Polymerase angepasst.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 5 µl der Reaktionsansätze auf ein 1 %-iges Agarose-TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.3.7).

4.3.3.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *realtime* PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR mit dem Unterschied, dass gleichzeitig eine Quantifizierung der amplifizierten DNA möglich ist. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung der Amplifikation mit Hilfe des Farbstoffs SYBR[®] Green I, der sich in die neu amplifizierte DNA einlagert und so zu einer Zunahme der Fluoreszenz während der Amplifikation führt. Am Ende jedes Zyklus erfolgte eine Messung dieser Zunahme, indem das emittierte Licht mittels einer im Thermocycler integrierten Kamera detektiert wurde. Der Anstieg an Fluoreszenzintensität war dabei mit einem Anstieg an amplifizierten DNA-Produkten gleichzusetzen. Ein Nachteil der Färbung ist ihre geringe Spezifität, welche jedoch durch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse kontrolliert werden kann. Hierbei wird durch langsame Temperatursteigerung auf 95°C die DNA-Doppelhelix aufgeschmolzen, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird. Die daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenz kann ermittelt werden. Da beispielsweise die gewünschten PCR-Amplifikate einen höheren Schmelzpunkt aufweisen als unspezifische Primerdimere, kann beurteilt werden, inwieweit Verunreinigungen die Messung beeinflussen haben könnten. Sobald diese Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat, spricht man vom sogenannten Ct- oder Cp-Wert. Dieser Wert gibt die Anzahl an Zyklen an, die den Punkt markieren, an dem in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an amplifizierter DNA vorhanden ist. Unter der Annahme, dass sich mit jedem Zyklus die vorhandene DNA-Menge verdoppelt, entspricht ein um eine Einheit niedrigerer Ct-Wert der doppelten Menge an eingesetzter cDNA. Die Quantifizierung kann auf zwei Arten erfolgen, anhand der absoluten oder der relativen Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung werden die Ergebnisse anhand einer Kalibrierungskurve basierend auf einer Verdünnungsreihe von z.B. RT-PCR-Produkten oder *in vitro* transkribierter DNA ausgewertet. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (*Housekeeping Gen*) wie z. B. β -Actin, EF-1 α , GAPDH oder ribosomale Untereinheiten (18S, 28S) bezogen bzw. normiert. Dies hat den Vorteil, dass versuchsinterne Schwankungen gleichermaßen das Zielgen wie auch das *Housekeeping Gen* betreffen. In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung relativ, durch Normierung gegen die Referenzgene β -Actin und GAPDH.

Die Expression des Zielgens lässt sich unter Annahme einer maximalen Effizienz der PCR-Reaktion nach folgender Formel berechnen:

$$F = 2^{\Delta C_p(\text{Kontrolle} - \text{transduziert}) \text{ Zielgen} / 2^{\Delta C_p(\text{Kontrolle} - \text{transduziert}) \text{ Referenzgen}}$$

Dabei gibt der Faktor F an, ein Wievielfaches der Expression der untransduzierten Kontrollzellen die Probe aufweist (relative Expression) (Wong und Medrano, 2005).

Die Real-Time PCR Reaktion wurde in einer Platte mit 96 Vertiefungen (Peqlab) durchgeführt. Zunächst wurde jeweils 1 μl Proben-cDNA (RNA-Isolierung siehe 4.3.1; cDNA Synthese 4.3.4) pro Vertiefung vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe der restlichen Reagenzien in Form eines Reaktionsgemischs, von dem jeweils 19 μl zu jeder cDNA pipettiert wurden. Ein Ansatz pro Vertiefung setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|---------------------------------------|--|
| 10,00 μl | SYBR Green (Qiagen) |
| 0,25 μl | Fluorescein (BioRad) (1:1000 verdünnt) |
| 1,00 μl | Forward-Primer |
| 1,00 μl | Reverse-Primer |
| 6,75 μl | DEPC-H ₂ O |
| 19,00 μl | Gesamtvolumen |

Die Proben wurden jeweils dreifach bestimmt. Nach Versiegelung der Platten durch eine Klebefolie (Adhesive Seal, BioRad) erfolgte der Start der PCR. Diese wurde im iCycler der Firma Biorad durchgeführt.

PCR-Programm für die quantitative Real-Time PCR:

| | | | |
|------------------|---|----------|------|
| 1 Zyklus | Aktivierung der Polymerase | 5 min | 95°C |
| | Denaturierung | 10 s | 95°C |
| | Annealing und Elongation | 30 s | 60°C |
| 1 Zyklus | Denaturierung | 1 min | 95°C |
| 1 Zyklus | Startpunkt der Schmelzkurve | 1 min | 52°C |
| 86 Zyklen | Schmelzkurve mit $\Delta T = 0,5^\circ\text{C}$ | 10 s | 52°C |
| 1 Zyklus | Kühlung | ∞ | 15°C |

4.3.3.3 Sequenzier-PCR

Bei der Sequenzierung von DNA wird die genaue Nukleotidabfolge einer DNA bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle klonierten Vektor-Insert-Konstrukte einer basengenauen Überprüfung durch eine *Cycle-Sequencing* Reaktion mit einem „BigDye™ Terminator 1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit“ unterzogen. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Kettenabbruchreaktion (Didesoxyribonukleotid-Abbruch Methode) nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977).

Diese beruht auf einer Kettenabbruchreaktion durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs), denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Im Reaktionsgemisch befanden sich neben dNTPs ddNTPs in definierter Menge, so dass sich statistisch verteilte DNA-Fragmente, die sich jeweils um ein Nukleotid in der Länge unterschieden, bildeten. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte wurde durch eine Kapillargelelektrophorese nach der Sequenzier-PCR erreicht. Da die vier unterschiedlichen ddNTPs in dem Reaktionsansatz mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelt waren, ließen sich jeweils die letzten Nukleotide, die zum Abbruch geführt haben, mit Hilfe eines Argonlasers identifizieren. Diese Detektion erfolgte im hauseigenen Kapillarsequencer. Im Normalfall konnten mit einer Reaktion Abschnitte mit einer Länge von 500 bis 800 Basenpaaren bestimmt werden.

Folgender Ansatz wurde für eine Sequenzierreaktion angesetzt:

- 3,3 µl DNA
- 0,7 µl Sequenzierprimer (100 ng/µl)
- 1,0 µl BigDye Version 1.1
- 5,0 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Das Standardprogramm bestand aus 25 Zyklen. Der Denaturierungsschritt dauerte jeweils 10 Sekunden und erfolgte bei 96°C. Das anschließende *Annealing* fand für 5 Sekunden bei 50°C statt und die Elongation für 4 Minuten bei 60°C. Im Anschluss wurden die Ansätze auf 4°C zur Aufbewahrung herabgekühlt.

Alle Schritte nach der Amplifikation bis zur Ausgabe der Sequenz als Chromatogramm wurden von der Sequenzierabteilung im Institut übernommen.

4.3.4 Reverse Transkriptions (RT)-PCR (cDNA-Synthese)

Da die Taq-Polymerase nur eine sehr schwache RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität besitzt, muss die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase vor der Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-

Rad) verwendet. Im *Kit* waren bereits oligo(dT)- sowie Hexamerprimer enthalten, so dass eine große Breite von cDNAs unter einer Länge von 1 kb erzeugt werden konnten.

Die Zusammensetzung ergab sich wie folgt:

| | | |
|----------------|-----------|-------------------------------|
| 1 | µg | RNA |
| 1,0 | µl | iScript Reverse Transkriptase |
| 4,0 | µl | iScript Reaction-Mix |
| ad 20,0 | µl | Gesamtvolumen |

Die Reaktionsansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 42°C in einen Heizblock gestellt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Reaktionen schließlich für 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Dann wurden die Reaktionsgefäße für mindestens 5 Minuten in einem Eisbad abgekühlt. Kondensierte Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation wieder im Boden des Gefäßes gesammelt. Dann wurden 80 µl DEPC-Wasser zu den Ansätzen gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 100 µl je Ansatz vorlag. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Standardmäßig wurde davon 1 µl in eine qRT-PCR-Reaktion eingesetzt (siehe 4.3.3.2).

4.3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte durch das GenElute™ PCR Clean-Up von Sigma-Aldrich nach Herstellerprotokoll.

4.3.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

GenElute™ Gel Extraction Kit:

Die Elution der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Gel Extraction Kits (Sigma–Aldrich). Für große Fragmente (über 10 kb) wurde eine weitere Methode mit Diatomeen-Erde angewandt. Zunächst wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter schwachen UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht, dann mit einem behelfsmäßig durch Abflammen sterilisiertem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Isolierung der DNA aus der Agarose mit der Reaktionskomplettausstattung nach Angaben des Herstellers.

Gelisolierung mit Diatomeen:

Mit dieser Methode wurde die Masse der Gelbande durch Wiegen bestimmt und anschließend die zweifache Volumenmenge an L6-Lösung (siehe 3.8) hinzugefügt. Im

Heizblock wurde sie bei 60°C geschmolzen. Der Schmelzvorgang wurde durch zwischenzeitliches vortexen unterstützt. Anschließend wurde der Ansatz mit 50 µl Diatomeen-Lösung versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde er jede Minute durch kurzes Aufschütteln gemischt. Während der Inkubationsphase wurde die Vakuumkammer vorbereitet. Nach Ablauf der fünfminütigen Inkubation wurde der Ansatz auf die Säulen gegeben und mittels Vakuum durchgesaugt. Es folgten vier Waschschrte mit 2 ml Waschpuffer. Nachdem Waschen wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und für 20 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Dann konnte die DNA mit 20 bis 50 µl sterilem Wasser eluiert werden.

4.3.7 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die DNA-Agarosegelelektrophorese dient sowohl der Trennung als auch der Analyse von DNA-Fragmenten. Aufgrund der negativen Ladung der DNA ist es möglich, die DNA-Fragmente im Agarosegel, an dem elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt nach dem Molekulargewicht der DNA, die während der Elektrophorese Richtung Anode wandert. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2 %-ige Agarosegele verwendet, die 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die DNA-Proben wurden mit 6x Bromphenolblaupuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 70-120 V erfolgte die elektrophoretische Trennung. Durch das in der DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde der DNA/Ethidiumbromid-Komplex im UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (Gel Imager, INTAS) digital aufgenommen und im Computer archiviert.

4.3.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Methoden zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Durch Zugabe einer SDS-/Natriumhydroxidhaltigen Lösung werden die Zellen lysiert und Proteine, chromosomale sowie plasmidale DNA denaturiert. Die anschließende Zugabe von Natrium- bzw. Kaliumacetat führt zur Präzipitation chromosomaler DNA und anderer zellulären Bestandteile und neutralisiert das Lysat. Plasmid DNA, welche in Lösung bleibt, kann in ihre native Struktur renaturieren. Sie kann anschließend entweder selektiv an eine Matrix gebunden (Maxipräparation) oder durch Fällung (Minipräparation) isoliert werden. Minipräparationen lag

eine 2-5 ml Übernachtskultur zugrunde; Maxipräparationen wurden von 150 ml Bakterienflüssigkulturen durchgeführt, um hohe Plasmidmengen zu erhalten.

4.3.8.1 Minipräparation / Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab mit Diatomeen-Erde

In Eppendorfreaktionsgefäßen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für 2 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 150 µl Puffer I resuspendiert. Nach der vollständigen Wiederaufnahme des Sediments wurden 150 µl Puffer II hinzugeben und die Reaktionsgefäße mehrmalig geschwenkt, so dass eine anfangs einsetzende Trübung wieder verschwand. Zelluläre DNA und Proteine wurden durch Zufügen von 150 µl Puffer III und mehrmaliges Umdrehen der Reaktionsgefäße in einem Komplex mit SDS gefällt, der als weißer Niederschlag sichtbar war. Durch Zentrifugation für 10 Minuten mit 13.000 rpm wurde das Präzipitat sedimentiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert, das eine Suspension aus 900 µl L6 und 50 µl Diatomeen-Lösung enthielt. Um der Plasmid-DNA eine Bindung an die Kieselgelmatrix zu ermöglichen, wurden die Ansätze für insgesamt 5 Minuten stehen gelassen und circa alle 60 Sekunden kurz aufgeschüttelt, um sich absetzende Diatomeenpartikel wieder aufzuwirbeln. Während der Inkubation wurden Filtersäulen auf eine Vakuumkammer gesteckt. Die Säulen enthielten eine Matrix aus Silica-Gel, welche die Plasmid-DNA band, während unerwünschte Kontaminanten wie Proteine, Salze usw. durchflossen. Nachdem die Suspension die Säule passiert hatte, wurden dreimal je 2ml Wasch-Lösung durchgesaugt. Im Anschluss wurden die Säulen auf Eppendorf Reaktionsgefäße gesteckt und 50 µl Wasser auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation von 5 Minuten wurde die Plasmid-DNA mittels Zentrifugation für 1 Minute mit 13.000 rpm eluiert.

4.3.8.2 Maxipräparation / Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus 150 ml ÜNK erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel. In diesem Fall erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse über eine Anionenaustauschsäule und anschließender Fällung. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl Aquadest aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt und mit Aquadest auf eine Konzentration von 1 µg/µl DNA eingestellt.

4.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der präparierten DNA erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im Photometer der Firma Eppendorf. Das Verhältnis der beiden Werte 260/280 gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Der Wert sollte zwischen 1,7 bis 2 liegen. Ein Wert unter 1,7 deutet auf Kontaminationen durch Proteine hin, liegt der Wert über 2, dann ist die Probe wahrscheinlich mit degradierter RNA und/oder Überschuss an freien Nukleotiden kontaminiert.

Die zu vermessende DNA wurde in Aquadest verdünnt (Maxipräparationen bspw. im Verhältnis 1:100). Als Referenzprobe wurde Aquadest verwendet. Die Konzentration der DNA wie auch der Reinheitsgrad (RNA- und/oder Protein-Verunreinigungen) konnte man direkt am Gerät ablesen. Danach wurde die Probe entsprechend mit Aquadest verdünnt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

4.3.10 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen erkennen meist palindromische spezifische Sequenzen des DNA-Doppelstranges und spalten diese hydrolytisch an definierten Stellen. So entstehen glatte oder überhängende DNA-Enden. Aufgrund ihrer Sequenzspezifität werden Restriktionsendonukleasen analytisch zur Überprüfung von DNA und Plasmiden anhand der entstehenden Bandenmuster und präparativ für weitere Klonierungen verwendet.

Das spezifische Schneiden und Zusammenfügen der DNA stellt die Grundlage des Klonierens dar. Restriktionsspaltungen kamen jedoch auch für die Erzeugung spezifisch vorhersagbarer Fragmente zur Analyse isolierter Plasmid-DNA zum Einsatz (Kontrollverdau).

Für einen Verdau von PCR-Produkten wurde meist der gesamte PCR-Ansatz eingesetzt, bei Plasmiden lag die eingesetzte DNA-Menge bei ca. 1 - 3 µg.

Pipettierschema:

| Reaktionsansatz: | analytisch | präparativ |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| DNA | 1 µg | 5 - 10 µg |
| 10x Puffer | 2 µl | 5 µl |
| Enzym | 5 U | 20 U |
| Aqua dest. steril | ad 20 µl | ad 50 µl |

Die entsprechenden Puffer wie auch Enzymmenge, Inkubations-Temperatur und -Dauer wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. In der Regel wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch Zugabe von Bromphenolblau-Lösung inaktiviert. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung und Isolierung des Fragments.

4.3.11 Dephosphorylierung

Um die Religation eines linearisierten Plasmids zu verhindern, wurden seine 5'Enden mit Hilfe des CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) Enzym dephosphoryliert. Dies verhindert die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen den beiden Plasmidenden. Nach dem Restriktionsverdau wurde 1 µl CIAP (10 U/µl) in den Ansatz beigefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde im Heizblock bei 85°C für 15 Minuten deaktiviert.

4.3.12 Ligation

Durch Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-Hydroxyende eines DNA-Fragments und dem 5'Phosphatende des zweiten Fragments kann man DNA miteinander verknüpfen. Diese Reaktion wird durch eine ATP abhängige Ligase katalysiert. Die T4-DNA Ligase ist in der Lage sowohl glatte, wie auch kohäsive Enden miteinander zu verbinden. Im Ligationsansatz wurden immer gleichartige DNA Überhänge verwendet (entweder glatte oder identisch kohäsiv). Das molare Verhältnis von Vektor zu *Insert* betrug 1 zu 3.

Pipettierschema für einen 10 µl Ligationsansatz:

| | | |
|---------|-------|----------------------------------|
| 1 | Teil | Vektor |
| 1-3 | Teile | Insert |
| 1,0 | µl | T4-DNA-Ligase (5u/µl, Fermentas) |
| 1,0 | µl | Ligationspuffer (Fermentas) |
| ad 10,0 | µl | H ₂ O |

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14°C. Der gesamte Ansatz wurde zur Transformation chemisch kompetenter *E.coli* verwendet.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

Zellkultur-Überstände für die Verwendung in ELISA-Messungen wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 6 min), der Überstand in neue Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Reaktionskomplettausstattungen wurden von den Firmen R&D und Cusabio bezogen und nach den Anleitungen der Hersteller durchgeführt. Die kolorimetrische Messung erfolgte in einem ELISA-Reader (Tecan).

4.4.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ELISAs sind Mikrotiterplattentests, die zum immunologischen Nachweis und gleichzeitiger Konzentrationsbestimmung von Antigenen genutzt werden. Spezifische Erstantikörper gegen die zu messende Substanz (Antigene) werden an die Wand des Probengefäßes gebunden. An sie lagern sich Antigene aus der Probenlösung an. Enzym-tragende Sekundärantikörper werden zugesetzt, die an jedes, im ersten Schritt fixierte Antigenmolekül binden. Die Enzymaktivität des über Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich-Technik) an der Probengefäßwand gebundenen Enzyms wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch gemessen. Dabei ist die Substratumsetzung dem Enzymgehalt und somit auch dem Antigengehalt direkt proportional. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-Tests zum Nachweis des Zytokins hIL1RA, IL1RA der Ratte und hIL1 β eingesetzt.

Der Nachweis des humanen Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (hIL1RA) erfolgte mittels *DuoSet Elisa Development kit* von Quantikine (R&D Systems) nach Herstellerprotokoll. Die Detektion erfolgte hier durch monoklonale biotinkonjugierte Antikörper sowie ein HRP-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat anhand der enzymatischen Umsetzung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Dieses bildet ein blaues Reaktionsprodukt, welches beim Abstoppen der Reaktion durch Schwefelsäure in ein gelbes Endprodukt überführt wird (Messung bei 450 nm).

Die Zellkulturüberstände wurden standardmäßig Verhältnis 1:4 verdünnt, wurden die Proben vor der Messung nicht bei -20°C durchgefroren, wurden diese höher verdünnt (1:20 - 1:100). Ebenso wurde mit dem *DuoSet Elisa Development kit* von Quantikine (R&D) für *human* IL1 β und dem ELISA *kit* für den Ratten IL1RA (Cusabio) nach Herstellerprotokoll verfahren.

4.4.2 PGE₂-Assay

Um PGE₂ in Zellkulturüberständen zu messen, wurde ein *kit* von R&D verwendet. Auch hier wurde nach Herstellerangaben verfahren. Der Assay basiert auf einer kompetitiven Bindung an einen monoklonalen Antikörper (*mouse*), zwischen der PGE₂ Menge der zu analysierenden Probe und einer definierten Menge an HRP-gekoppeltem PGE₂. Während der Inkubationszeit bindet der Antikörper an den auf der Mikrotiterplatte vorgebundenen *goat anti-mouse* Antikörper. Nach Waschen und Substratzugabe erfolgte die Messung bei 450 nm. Der Farbreaktion liegt die enzymatische Umsetzung von TMB zugrunde. Die Intensität ist dabei umgekehrt proportional zur PGE₂ Menge in der Probe.

4.5 3D-Pelletkulturen / Chondrogene Differenzierung in vitro

4.6 Kultivieren von hMSZ

Die Isolation von primären humanen adulten mesenchymalen Stammzellen (hMSZ) aus dem Knochenmark wurde im Orthopädischen Zentrum für Muskuloskelettale Forschung (König-Ludwig-Haus) vollzogen. Die hMSZ wurden aus dem Hüftkopf von Patienten, denen eine Hüftendoprothese implantiert wurde, isoliert. Dabei wurde ein von Haynesworth et al. entwickeltes Protokoll, modifiziert nach Nöth et al. verwendet (Haynesworth et al., 1992; Nöth et al., 2002).

Kurz zusammengefasst wurde dabei spongöser Knochen mit einem scharfen Löffel aus dem Hüftkopf gewonnen und mit Medium (DMEM/Ham's F-12, FCS, Antibiotika und L-Ascorbat-2-Phosphat) gewaschen (1200 rpm, 5 min). Der aus Fett bestehende Überstand wurde verworfen. Dem verbleibenden Pellet aus Zellen und Knochenstücken wurde Medium zugegeben und durch vortexen die Knochenmarkzellen von den Knochen trabekeln herausgelöst. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, nach jedem vortexen wurde die Suspension durch ein Zellsieb gegeben um Knochenfragmente zurückzuhalten. Nach dem finalen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen gegeben. Nach zwei bis drei Tagen wurden die nicht adhärennten Zellen abgesaugt und die adhärennten mesenchymalen Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Medium wurden die Zellen weiter kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage.

Nach Anwachsen der Zellen wurden diese in das Institut der Virologie transportiert, wo die weitere Kultivierung stattfand. Dabei wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt und die Zellen mit den foamyviralen Vektoren transduziert.

4.6.1 Transduktion von hMSZ mit FV-Vektoren

Die primären hMSZ bzw. hMSZ-Tert-4-Zellen wurden bei einer 40 %-iger Konfluenz mit foamyviralen Partikeln transduziert. Dazu wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 1 ml aufkonzentrierten NA1-Vektorpartikeln transduziert. Nach drei Tagen erfolgte ein Medienwechsel, und die Transduktion wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

4.6.2 Chondrogene Differenzierung von hMSZ in der Pelletkultur

Die Chondrogenese erfolgte in einem „*high-density*“ Pellet-Zellkultursystem (kurz: *Pellets*) modifiziert nach Johnstone et al. (chondrogenes Differenzierungsmedium, siehe 3.9)

(Jonstone et al., 1998). Hierzu wurden hMSZ (primäre hMSZ oder hMSZ-Tert-4-Zellen) verwendet, die zuvor mit NA1 oder MD9 transduziert und anschließend im FACS mittels EGFP-Markergenexpression sortiert wurden, wobei untransduzierte hMSZ als Negativkontrolle dienten. Die Eingruppierung ist im Ergebnisteil dargestellt (siehe 5.6.4).

Anlegen der Pellets:

Zunächst wurden die Zellen mittels ATV abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und in einem entsprechenden Volumen an chondrogenem Differenzierungsmedium aufgenommen (3×10^5 Zellen /Pellet in 500 μ l chondrogenem Differenzierungsmedium). Nach Resuspendieren wurde die entsprechenden Zellsuspensionen der Gruppen (ohne/mit FVV) in zwei weitere gleich große Teile aufgeteilt, sodass in einen Teil IL1 β (R&D) für die Inhibierung der Chondrogenese zugegeben werden konnte.

Anschließend wurden jeweils 0,5 ml der Zellsuspension in ein 15 ml „Greinerröhrchen“ gegeben. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 1200 rpm wurden die Zellen zu Pellets sedimentiert. Der Deckel des Röhrchens wurde für den Gasaustausch leicht aufgedreht. Anschließend wurden die Pellets 21 Tage kultiviert, dabei wuchsen die sedimentierten „Zellscheiben“ zu runden Zellpellets heran. Während der Kultivierung wurde alle drei Tage das chondrogene Differenzierungsmedium gewechselt. TGF β 1 und IL1 β [10 ng/ml] wurden dabei den verschiedenen Behandlungsgruppen entsprechend zugesetzt (siehe 5.6.4). Des Weiteren wurden dabei die Zellkulturüberstände abgenommen und aliquotiert bei -20°C für spätere Analysen gelagert. Nach 21 Tagen Kultivierung wurden die Pellets geerntet und weiterverarbeitet.

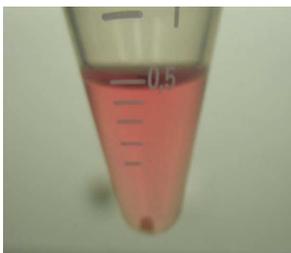


Abb. 7: MSZ-Pellet wie es sich nach 21 Tagen in Kultur darstellt.

4.6.3 Paraffineinbettung von Pellets

Nach 21 Tagen Kultivierung wurden die Pellets für die Histologie und Immunhistochemie aufbereitet. Hierzu wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und die Pellets zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Pellets für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Das Auswaschen der Fixierlösung erfolgte für zwei Stunden in Leitungswasser, bevor die Pellets in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 95 %, 100 % ETOH für je 1 Stunde) entwässert wurden. Anschließend wurden die Pellets für 30

min mit EtOH / Amylacetat, welches 1:1 gemischt wurde, bei RT, dann für weitere 30 min bei 56-60°C gewaschen. Danach folgte eine zweimalige Inkubation mit Amylacetat (Intermediat) für jeweils 30 min im Heizblock bei 56-60°C. Anschließend wurden die Pellets zweimal in Paraffin über Nacht in einen 60°C Wärmeschrank gestellt. Die endgültige Paraffineinbettung der Pellets erfolgte am darauffolgenden Tag auf einer 70°C Heizplatte in vorgewärmten Edelstahlgießformen. Nach Vorgabe von etwas Paraffin wurden die Pellets mit einer vorgewärmten Spatel in der Mitte der Form platziert, welche anschließend vollständig mit Paraffin gefüllt und mit einer Einbettkassette bedeckt wurde. Das Paraffin wurde zunächst bei RT ausgehärtet, dann mindestens über Nacht bei -20°C aufbewahrt, wo sie bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

4.6.4 Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Die Herstellung von Paraffinschnitten wurde an einem Schnittmikrotom durchgeführt. Hierbei wurden Schnitte einer Dicke von 4 µm hergestellt. Darauf folgend wurden diese zunächst in ein kaltes Wasserbad, dann zum Strecken in ein warmes Wasserbad (ca. 45°C) überführt. Von dort konnten die gestreckten Paraffinschnitte auf Objektträger platziert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet werden.

Um histochemische bzw. immunhistochemische Färbungen durchführen zu können, mussten die getrockneten Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden diese eine Stunde bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend wurde die Entparaffinierung mit Xylol zweimalig für jeweils 8 min fortgesetzt, bevor die Rückführung in destilliertes Wasser durch eine absteigende Alkoholreihe (95 % EtOH zweimalig für jeweils 2 min, 70 % und 50 % EtOH für jeweils 5 min) erfolgte. Alle im Folgenden aufgeführten histologische Verfahrensprotokolle sind von diesem Punkt aus detailliert beschrieben.

4.6.5 Hämalun&Eosin (H&E) Färbung

Die Hämalun&Eosin (H&E) Färbung ist eine allgemeine Färbung um Gewebestrukturen und die darin enthaltenen Zellen darzustellen. Dabei werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen wie das Chromatin der Zellkerne, das mit Ribosomen angereicherte raue ER und einige Cytoplasmabestandteile mittels der Hämalun Färbelösung nach Meyer blau gefärbt, während die saure Eosin-Färbelösung alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen wie das Cytoplasma vor allem die Zellplasmaproteine rot färbt.

Die entparaffinierte Schnitte wurden 9 min. in der Hämalunlösung nach Meyer gefärbt, anschließend solange mit Aqua dest. gespült bis die überschüssige Färbelösung entfernt war

und 3 Sekunden in 0,25 % HCl / 50 % EtOH differenziert. Nach der Hämalaun Färbung erschienen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Die Schnitte wurden für 10 min. in Leitungswasser gestellt, wodurch sich der pH-Wert erhöhte und der Farbton sich in das typische Blauviolett umschlägt („Bläuen“). Anschließend erfolgte die Zytoplasma-Färbung für 1 min. in einer 1 %-igen alkoholischen oder wässrigen Lösung von Eosin. Nachdem die überschüssige Färbelösung durch Spülen mit Aqua dest. entfernt war, folgte die Differenzierung in 70 %-igem Ethanol für 3 Sekunden. Weitere Spülschritte in Alkohol folgten (95 % Ethanol für 3 Sekunden, dann 2 x Isopropanol für jeweils 5 min). Dann wurde der entwässerte Schnitt für 2 x 5 min in dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt, mit einem organischem Eindeckmittel (Entellan®) überschichtet und unter Ausschluss von Luftblasen mit einem Deckglas bedeckt. So bleiben Schnitt und Färbung für lange Zeit erhalten und mikroskopierbar. Nach der Trocknung über Nacht erfolgte die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.

4.6.6 Alcianblau Färbung

Mit Alcianblau wird die Knorpelgrundsubstanz, saures, sulfatreiches Proteoglycan angefärbt. Die Färbung wurde in dieser Arbeit für den histologischen Nachweis der chondrogenen Differenzierung verwendet. Die Zellkerne werden durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot rot dargestellt.

Die entparaffinierte, 4 µm dicken Schnitte wurden zunächst für 3 min. mit 3 % Essigsäure auf einen pH Wert von 2,5 eingestellt, dann 30 min. mit 1 %-iger Alcianblau-Färbelösung überschichtet, anschließend mehrmals mit Aqua dest. gespült bis überschüssige Färbelösung entfernt war. Es folgte die Kernfärbung mit Kernechtrot für 2 min. und ein mehrmaliges spülen mit Aqua dest. bis die überschüssige Färbelösung entfernt war. Anschließend folgte die Differenzierung in 70 %-igem Ethanol für 3 Sekunden. Dann wurde der entwässerte Schnitt für 2 x 5 min in dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt, mit einem organischem Eindeckmittel (Entellan®) überschichtet und unter Ausschluss von Luftblasen mit einem Deckglas bedeckt. So bleiben Schnitt und Färbung für lange Zeit erhalten und mikroskopierbar. Nach der Trocknung über Nacht erfolgte die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.

4.7 Tierexperimentelle Arbeiten

Die Vorgehensweise wurde unter der Projektnummer 55.2-2531.01-74/07 vom Regierungspräsidium Würzburg genehmigt. Die Versuche wurden im Tierstall

(Infektionseinheit) des Institutes für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Fragestellung wurde aufgrund des erforderlichen Injektionsvolumen in die Kniegelenke der Hinterläufe an Ratten durchgeführt.

4.7.1 Haltung der Tiere und verwendete Rattenstämme

Die Ratten wurden in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien unter regelmäßigem Tag/Nacht-Lichtrhythmus gehalten und erhielten spezielles Nagerfutter und Wasser ad libidum.

Im Rahmen dieser Studie wurden männliche Wistar Ratten (Charles River) verwendet, welche zum Zeitpunkt der Implantation ein Körpergewicht von 150-170g aufwiesen. Die Nacktratten (CrI:RNU:Foxn1 rnu) wurden ebenfalls von Charles River bezogen und aufgrund der Anzahl der benötigten Tiere in der Versuchstiereinrichtung des Institutes gezüchtet. Mit vier homozygoten Zuchtpaaren gelang die Bereitstellung der Tiere für die Versuche. In den Versuchen wurden 12 - 20 Wochen alte nude Ratten verwendet (Festing et al., 1978; Davies et al., 1983; Zachos et al., 2007).

Als Positivkontrolle für die Biodistributionsanalysen wurden zwei männliche EGFP Sprague-Dawley-Ratten verwendet (freundliche Gabe von Prof. Schönfelder, Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) (Popova et al., 2008).

4.7.2 Anästhesie, Operation und Postoperative Versorgung

Alle operativen Eingriffe wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Als Narkosemittel diente Isofluran (Forene[®]) (3-4% (v/v) in O₂), welches dem Tier über eine Atemmaske zugeführt wurde. Während der Eingriffe wurde darauf geachtet, dass die Tiere nicht auskühlen. Eventuelle postoperative auftretende Schmerzen wurden kontinuierlich über drei Tage mit Tramal[®] (5-6 Tropfen pro Wasserflasche, 2,5 mg/100 ml) über das Trinkwasser behandelt.

Die intraartikuläre (i.a.) Injektion der Zellen erfolgte in den Zellpassagen 6-12. 2×10^6 EGFP-positive Zellen in PBS wurden pro Kniegelenk i.a. injiziert. Das maximale Injektionsvolumen betrug 100 μ l. Bei den kleineren *nude* Tieren konnten aufgrund der Größe des Gelenkes teilweise nur 50 μ l i.a. injiziert werden. Das Operationsfeld wurde desinfiziert und nach Bedarf rasiert (Wistar Ratten). Für die Injektion wurde ein ca. zwei cm langer Hautschnitt gesetzt, das Knie anschließend gebeugt und durch die Patellarsehne die Zellsuspension mit einer Insulinspritze injiziert. Anschließend wurde der Schnitt mit zwei bis vier Einzelheftnähten geschlossen.

4.7.3 Präparation von Synovialmembranen aus Rattenkniegelenken

Zur Gewinnung von Synovialzellen aus den Kniegelenken der Ratten wurden nach Entnahme der Gelenke die Synovialmembranen nach Hyc et al. präpariert (Hyc et al., 2007).

Hierzu wurden nach Entfernung der Haut die Knie mit Fragmenten von Femur und Tibia mit einer Schere entnommen. Danach wurden die Knie unter der Sterilwerkbank ausgiebigst mit sterilem PBS (~ 300 ml pro Gelenk) gespült, um Kontaminationen vorzubeugen.

Die Gelenke wurden in 10 cm Zellkulturschalen vom femoralen Ende her mit einem Skalpell geöffnet. Inzisionen entlang der lateralen und medialen Seite, sowie die Durchtrennung der kollateralen anterioren und posterioren Kreuzbänder ermöglichten das Zurückfallen der Gelenkkapsel. Je nach Tier (transplantiert oder Spendertier) wurde nun entsprechend verfahren.

Für die i.a. hIL1RA ELISA-Messung verwendete Gelenke

Da die Kniegelenke der Ratten aufgrund Ihrer Größe keine *lavage* (engl. Spülung) des Gelenks erlaubten, wurden die Gelenke, um die hIL1RA Menge zu bestimmen, mit zwei Inzisionen entlang der lateralen und medialen Seite mit einem Skalpell geöffnet. Anschließend wurden die kollateralen anterioren und posterioren Kreuzbänder durchtrennt, dann die Gelenkkapsel zurückgefaltet, um die Exposition der gesamten inneren Oberfläche der Gelenkkapsel zu ermöglichen. So wurden die Gelenke in 12-Lochplatten mit 4 ml DMEM/Ham`s F12 Medium pro Vertiefung platziert und für 24 h im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Die konditionierten Überstände wurden in Aliquots bis zur hIL1RA ELISA-Messung bei -20°C gelagert.

Präparation von Synovialzellen aus Spendertieren:

Die Synovialmembran, welche Patella und patellare Ligamente bedeckt, wurde mit einem Skalpell präpariert und in 18 ml Kulturmedium / Kniegelenk (DMEM/Ham`s F12) gegeben. Durch anschließende Zugabe von 2 ml Collagenase (NB4, Serva) (1,25 U/ml) wurden die präparierten Areale einem 24-stündigem Verdau unterzogen, der die einzelnen Zellen aus dem Zellverband löste. Der Verdau wurde dann durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben und die Zellen nach anschließender Zentrifugation in Medium aufgenommen (DMEM/Ham`s F12), und in T25 Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Zellen waren im Schnitt nach vier Tagen angewachsen.

Präparation von transplantierten Zellen aus den Gelenken:

Zunächst wurden Teile der Synovialmembran (ca. 1 cm²) unter dem Fluoreszenzmikroskop auf EGFP exprimierende Zellen hin untersucht. Anschließend wurden die Synovialmembranen der Gelenke präpariert, sowie etwaig am Knochen angewachsene Zellen durch Abschaben der Knochenoberfläche mit einem Skalpell abgelöst und dem Kulturmedium (18ml DMEM/Ham`s F12) zugefügt, dieses wurde mit 2 ml Collagenase (1,25

U/ml) versetzt und nach 24 h durch ein Zellsieb gegeben (70 µm). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in T25 Gewebekulturflaschen kultiviert. Nach Konfluenz der T25 Gewebekulturflasche wurden die explantierten Zellen abgelöst und mittels FACS-Messungen auf ihre EGFP-Expression hin analysiert.

4.7.4 Organentnahme

Analog der i.a. Injektionen wurden den Tieren bei Versuchsende Organe entnommen, um auf hL1RA- bzw. EGFP-Expression hin untersucht zu werden. An den Tagen 5, 10, 21, 42 (und zusätzlich Tag 88 bei den *nude* Ratten) post injektionem wurde den Tieren Leber, Lunge, Herz, Milz, Nieren, Leber, Gonaden und das Gehirn entnommen. Teile der Organe wurden danach unmittelbar für verschiedene Zwecke folgendermaßen behandelt:

- Ein Teil des jeweiligen Organs wurde unmittelbar nach Entnahme auf Trockeneis gelagert und anschließend bei -80°C eingefroren (*na tiv*).
- Für die Organkulturen wurden Teile in sterilem PBS aufgenommen (jew. ca. 500 mg).
- Ein weiterer Teil des Organs wurde unmittelbar in 4 % PFA fixiert, um nach Entwässerung und Paraffineinbettung auf EGFP-Expression hin untersucht zu werden.
- Der verbleibende Rest des Organs wurde für FACS-Analysen durch ein 70 µm Zellsieb gerieben. Dabei wurde darauf geachtet, ein Minimum an Medium (DMEM/Ham`s F12) zu verwenden (maximal 3 ml).

Es wurden dabei jeweils drei verschiedene Organareale zur Probengewinnung verwendet. Des Weiteren wurde den Tieren Blut mittels Herzpunktion entnommen und das nach Zentrifugation des Vollblutes im Überstand erhaltene Serum bei -20°C gelagert.

4.7.5 Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Geweben

Zur Isolierung der gDNA aus den Organen wurde aus den nativ bei -80°C gelagerten Organen auf Trockeneis ~ 30 mg Gewebe aus drei verschiedenen Organarealen entnommen. Nach Proteinase K Verdau (Enzym im *kit* beinhaltet) bei 56°C über Nacht wurde die genomische DNA isoliert (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen). Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren (*spin-column protocol of total DNA from animal tissues*). Die gDNAs wurden bis zur PCR-Analyse bei 4°C gelagert. Nach Quantifizierung wurden 100 ng gDNA in die jeweilige PCR Reaktion (NEB Taq 2x Mastermix; New England Biolabs) eingesetzt. Neben dem Referenzgen β -Actin (*rat* β -Actin; QuantiTect® Primer; Qiagen) als

Ladekontrolle, wurden EGFP Primer (EGFP Fw2; EGFP Rev1, siehe 1.13) verwendet. Der gesamte PCR Ansatz wurde auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen.

Ansatz:

x μ l gDNA (100 ng/ μ l)
 12,5 μ l NEB Taq Mastermix
 1,0 μ l Vorwärtsprimer (100 ng/ μ l)
 1,0 μ l Rückwärtsprimer (100 ng/ μ l)
 ad 25 μ l H₂O bidest

4.7.6 Organkulturen

Zwischen 100 bis 300 mg des jeweiligen Organs wurde abgewogen, mittels Skalpell zerstückelt und in 3 ml DMEM/Ham's F12 Medium für 24 h in einer 12-Lochplatte im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Alle Überstände wurden nach Zentrifugation und aliquotieren bei -20°C gelagert. Die konditionierten Zellkulturüberstände wurden analog der „Kniegelenksüberstände“ mittels ELISA auf deren hIL1RA Expression hin überprüft. Jeweils 100 μ l der Organüberstände und das Serum wurden im ELISA in Dreifachbestimmung gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf 100 mg Organ normiert.

4.8 Quantitative Analyse und Statistik

Die Verarbeitung der Rohdaten sowie die statistische Analyse durch Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte nach *student's t-test* erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Die Symbole in den Abbildung sind wie folgt definiert:

| P value | Wording | Summary |
|----------------|------------------------------|----------------|
| >0.05 | <i>Not significant</i> | ns |
| 0.01 to 0.05 | <i>Significant</i> | * |
| 0.001 to 0.01 | <i>Very significant</i> | ** |
| <0.001 | <i>Extremely significant</i> | *** |

5 Ergebnisse

Sämtliche foamyvirale Vektoren (FVV) dieser Arbeit basieren auf dem MD9 Vektor (siehe 2.7.3 und 3.12), welcher für das verpackbare FV-Vektorgenom kodiert (Heinkelein et al., 1998) und werden mit dem Plasmidnamen ohne „p“ abgekürzt, und zum besseren Verständnis mit dem internen Promoter oder dem exprimierten Transgen angegeben. Beispielsweise FV.EGFP für MD9 oder FV.hIL1RA für den NA1 Vektor.

5.1 Konzentrierung FV-Vektoren durch Zentrifugation

Konzentrierungen von FV Vektorsuspensionen mittels Zentrifugation (im folgenden „Spin-Konzentrierung“ genannt) wurden bereits beschrieben (Trobridge et al., 2002b). In dieser Arbeit wurde die Spin-Konzentrierung verwendet, um Vektoren umzupuffern, damit die Transduktion der empfindlichen primären Zielzellen in unverbrauchtem, Zelltyp-spezifischem Medium erfolgen konnte.

Die Vektortiter wurden vor und nach der Spin-Konzentrierung (12.000 g, 4°C, 2 h) in Verdünnungsreihen auf HT1080 Zellen bestimmt. In nachstehender Abbildung ist der Effekt der Zentrifugation exemplarisch mit Fluoreszenzaufnahmen und den ermittelten Transduktionseffizienzen dokumentiert.

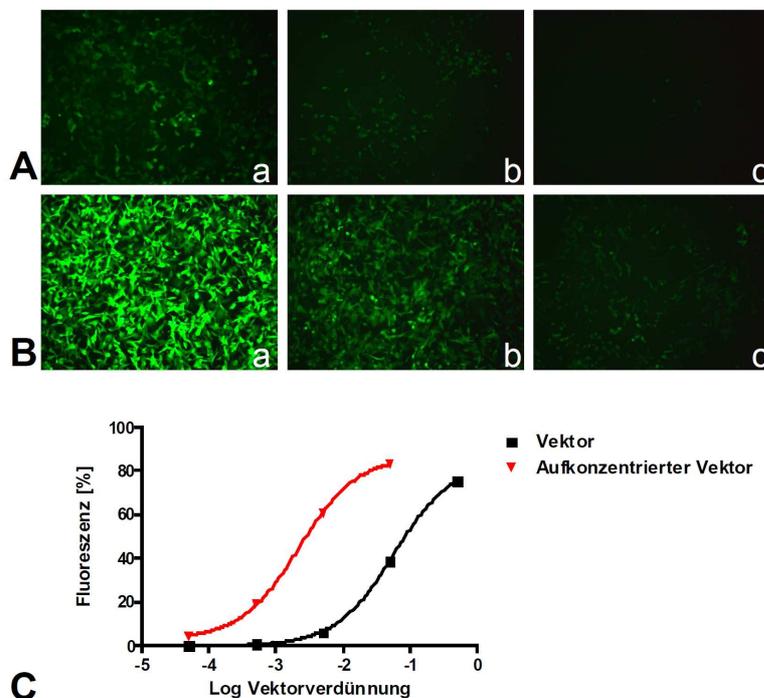


Abb. 8: Foamyvirale Vektorsuspensionen lassen sich durch Zentrifugation konzentrieren. Effekt der Spin-Konzentrierung (Sorvall SS-34 Rotor, 14000 rpm, 4°C, 2 h)

des FV-Vektors MD9 auf die Transduktionseffizienz von HT1080 Fibroblasten drei Tage nach Transduktion (A, B). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Vektorverdünnungsreihe auf HT1080 Zellen vor (A) und nach (B) Spin-Konzentrierung des Vektors (Verdünnungsstufen: a-c = 1:2, 1:20, 1:200). (C) Ermittlung der CCID₅₀ nach FACS-Analyse.

In Abbildung 8 sind die Anteile EGFP-positiver Zellen bei der jeweiligen Vektorverdünnung gezeigt. Die CCID₅₀ (siehe 4.1.5) des Vektors vor Zentrifugation betrug 0,058. Danach wurde ein Wert von 0,002 ermittelt. Durch die Zentrifugation wurde somit eine Konzentrierung des Vektors um den Faktor ~ 26 erreicht.

5.2 Klonierung von pBF014 (IRES-EGFP):

Das MD9 Plasmid wurde durch die Einbringung der *internal ribosomal entry site* (IRES) (Jackson et al., 1990; Jang et al., 1990) des Encephalomyokarditis Virus (ECMV) vor den EGFP Sequenzbereich erweitert. So wurde die Co-Expression zweier Gene vom SSFV-U3 Promoter ermöglicht (Peters et al., 2005). Zusätzlich wurde ein Linker mit drei weiteren Restriktionsschnittstellen eingefügt.

Dazu wurde pMD9 mit BamHI und NotI verdaut, es folgte die Einbringung eines BamHI-IRES2-EGFP-NotI Amplifikats aus pKanCIEG. In einem zweiten Schritt wurde der Linker (-BamHI-XhoI-XbaI-BamHI-) über die BamHI Schnittstelle eingesetzt. Das generierte BF014 Plasmid (schematische Darstellung unter 3.12, Abb. 6) wurde Grundlage für die weiteren Klonierungen der Konstrukte pNA1, pNA2 und pNA4 (Abb. 6).

5.3 Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA4 (pBF014-EF-1 α)

Ziel dieser Klonierung war es den viralen SFFV-U3 Promoter in pBF014 durch den zellulären humanen Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α) Promoter (Uetsuki et al., 1989) zu ersetzen. Für die Effektivität einer Gentherapie ist unter anderem die Expressionsstärke des Transgens maßgebend. Die Verwendung eines starken Promoters geht dabei mit einem erhöhten Risiko einer Transaktivierung einher (Weber und Cannon, 2007). Der schwächere EF-1 α Promoter wurde deshalb angesichts der Biosicherheit gegenüber dem starken viralen Promotor SFFV-U3 (Zychlinski et al., 2008) für die Tierversuche in Betracht gezogen.

Anhand einer PCR mit „Schnittstellenprimern“ wurde der EF-1 α Promoter aus dem Plasmid pEF-GW-51-lacZ (Gateway Vektor System, Invitrogen) vervielfältigt und in das Zielplasmid pBF014 über die AfeI und AclI (NEB) Schnittstelle eingebracht.

Die Produktion der Vektorpartikel erfolgte nach der unter 4.1.3 beschriebenen Vorgehensweise (Vier-Plasmidsystem; Heinkelein et al., 2002). Die Vektoren wurden mittels Fluoreszenzmikroskop und FACS-Analyse charakterisiert und mit den Vektoren MD9 (SFFV-U3 Promoter) und KG84 (CMV) verglichen (Abb. 9)

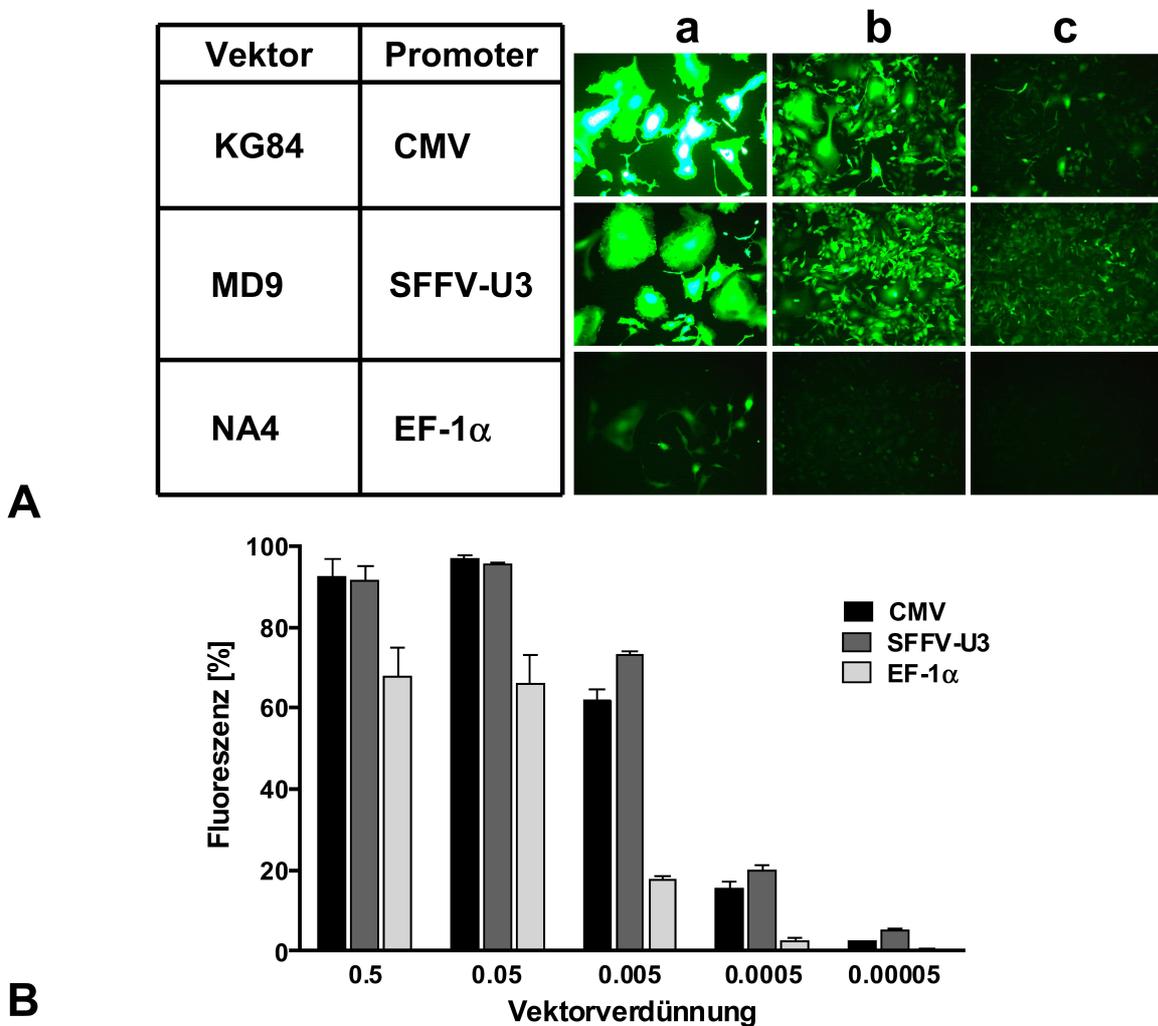


Abb. 9: NA4 exprimiert das gleiche Transgen eher schlechter als MD9 und KG84. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KG84, MD9 und NA4 transduzierten HT1080 Zellen. Neben den Aufnahmen sind die verwendeten Vektoren und ihre Promotoren tabellarisch angegeben. Gezeigt sind Vektorverdünnungen von 1:2, 1:20 und 1:200 (a bis c). (B) FACS-Analysen foamyviral transduzierter HT1080 Zellen drei Tage post Transduktion. Die FV-Vektoren sind mit dem jeweiligen Promotor angegeben (CMV= KG84, SFFV-U3= MD9, EF-1α= NA4). Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung (n=2).

Vergleicht man die mit Prism berechneten CCID₅₀ Werte, zeigt sich, dass die Vektorpräparation mit dem EF-1α-Promoter (NA4) einen um den Faktor 15 bzw. 23

schlechteren CCID₅₀ Wert (0,0423) im Vergleich zu den KG84 bzw. MD9 Vektoren aufwies. KG84 und MD9 zeigten vergleichbare CCID₅₀ Werte mit 0,0030 bzw. 0,0019). Die Negativkontrolle (MOCK) bestand aus Virusüberstand von 293T Zellen, die mit allen Plasmiden außer dem Env-Plasmid transfiziert wurden (nicht dargestellt).

5.4 Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA3 (hIL1 β in SJ03)

Ein FVV, der das humane IL1 β (hIL1 β) exprimiert, wurde mit dem Fernziel kloniert, eine Zelllinie zu generieren, die stabil hIL1 β überexprimiert. Durch Transplantation einer solchen Zelllinie in die Gelenke gesunder Ratten lässt sich eine experimentelle Arthritis generieren (Ghivizzani et al., 1997a; Oligino et al., 1999). Mit einem derartigen Tiermodell könnte die biologische Wirksamkeit des in dieser Arbeit konstruierten und charakterisierten FVV NA1 (FV.hIL1RA) untersucht werden.

Die codierende Sequenz für humanes IL1 β wurde ungerichtet über die XbaI Schnittstelle in pSJ03 eingebracht. pSJ03 basiert auf pBF014, lediglich das EGFP Markergen ist gegen das monomere *Red Fluorescent Protein* (mRFP) (Campbell et al., 2002) ausgetauscht (Diplomarbeit von Stefanie Jaitner). Als *template* für die PCR mit den Schnittstellenprimern wurde der MGC Clone 9216 von Invitrogen verwendet. Nach FV-Vektorproduktion wurde der Vektor auf primären Rattensynovialfibroblasten mittels Fluoreszenzmikroskop (Abb. 6), FACS-Analyse (nicht gezeigt) und hIL1 β ELISA (Abb. 7) charakterisiert.

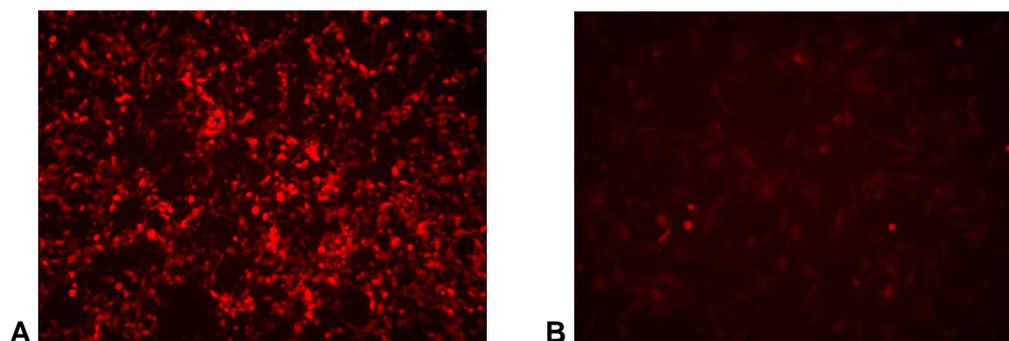


Abb. 10: Rattensynovialfibroblasten lassen sich mit NA3 (SFFV-U3-hIL1 β -IRES-mRFP) transduzieren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter (A) und transduzierter (B) primärer Rattensynovialfibroblasten. (A) Vektorproduktion in 293T Zellen, welche mit pNA3 (SFFV-U3-hIL1 β -IRES-mRFP), sowie den Expressionsplasmiden für Gag, Pol, und Env transfiziert wurden. (B) Mit FV.hIL1 β transduzierte primäre Rattensynovialfibroblasten, die auf mRFP sortiert wurden. Vergrößerung: 100x.

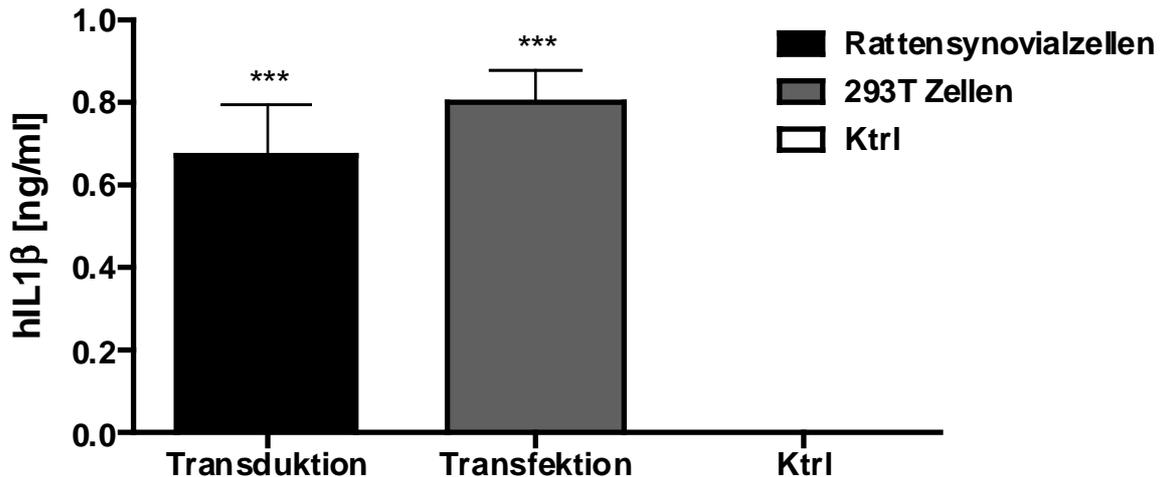


Abb. 11: NA3-transduzierte Synovialzellen setzen hIL1β frei. hIL1β ELISA-Messung von Zellkulturüberständen nach Transfektion von 293T Zellen mit pNA3 und Transduktion primärer Rattensynovialfibroblasten mit NA3. Die Überstände wurden 2 Tage nach Transfektion bzw. Transduktion entnommen. Die Werte wurden auf die ausgesäten Zellzahlen normiert (293T: 40×10^6 Zellen; Synovialzellen: 1×10^6 Zellen). Dargestellt sind Mittelwerte +SD aus zwei unabhängigen Versuchen mit n=3.

In Fluoreszenzaufnahmen zeigte sich eine starke mRFP Expression nach Transfektion in 293T Zellen, im Vergleich zu den schwach mRFP exprimierenden transduzierten primären Rattensynovialzellen (Abb. 10 A und B). Die Zellkulturüberstände der 293T und Synovialzellen wurden in einem hIL1β spezifischen ELISA gemessen (Abb.11). Um die Werte zu vergleichen, wurden die Werte auf die Zellzahlen normiert. Transfiziert wurden in diesem Experiment 40×10^6 293T Zellen in 175 cm^2 Zellkulturflaschen. Die primären Synovialzellen wurden nach Transduktion sortiert (mRFP; Kanal: 585 nm) und 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät. Mit einer Expression von im Mittel 0,7 ng/ml nach Transduktion waren die Werte mit denen nach der Transfektion vergleichbar (0,8 ng/ml).

5.5 Klonierung und Charakterisierung des Vektors NA2 (ratIL1RA in BF014)

Das Fernziel der GT der RA liegt in der Applikation der generierten Vektoren am Menschen. In sämtlichen publizierten tierexperimentellen Studien zur RA, die den IL1RA zum Einsatz brachten, wurde das humane Gen des IL1RA verwendet. In immunkompetenten Tieren wurde dabei stets ein Verlust der Transgenexpression innerhalb von ca. 3 Wochen beobachtet, während immundefiziente Empfängertiere eine länger-dauernde Transgenexpression zeigten. Dieses deutet auf eine Immunantwort gegen das humane Transgen hin. Durch Verwendung homologer Transgene könnte also eventuell eine länger

andauernde Transgenexpression vermittelt werden. Um dies näher zu untersuchen, wurde ein FV-Vektor, der die cDNA des IL1RA der Ratte (*ratIL1RA*) trägt, generiert. Die cDNA (RZPD, Berlin; cDNA clone IMAGE:7096987) wurde dazu mittels PCR amplifiziert und als ein XhoI / XbaI Fragment in pBF014 kloniert. Nach foamyviraler Vektorproduktion in 293T Zellen wurde der Vektor *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskop und FACS-Analysen charakterisiert.

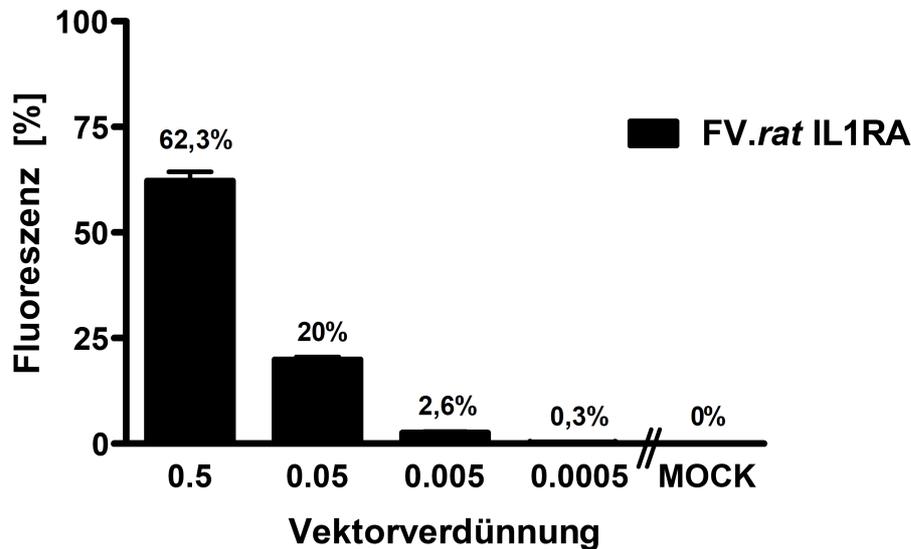


Abb. 12: Ratten Synovialfibroblasten lassen sich mit NA2 (FV.*ratIL1RA*) transduzieren. Transduktion primärer Rattensynovialfibroblasten mit dem Vektor NA2 (FV.*ratIL1RA*). 1×10^4 Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät, nach 24 h erfolgte die Transduktion. Drei Tage danach wurden die Zellen abgelöst und mittels FACS auf ihre EGFP-Expression hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung.

Die Transduktionseffizienz wurde mit einer Verdünnungsreihe der Vektorsuspension auf primären Synovialfibroblasten getestet. Wie in Abb. 12 zu sehen, konnten die Synovialzellen erfolgreich mit der FV.NA2 Vektorsuspension transduziert werden. Der mit Prism errechnete CCID₅₀ Wert betrug dabei 0,272. Nachdem die FV vermittelte EGFP-Expression des Vektors gezeigt wurde, galt es die IL1RA Transgenexpression nachzuweisen.

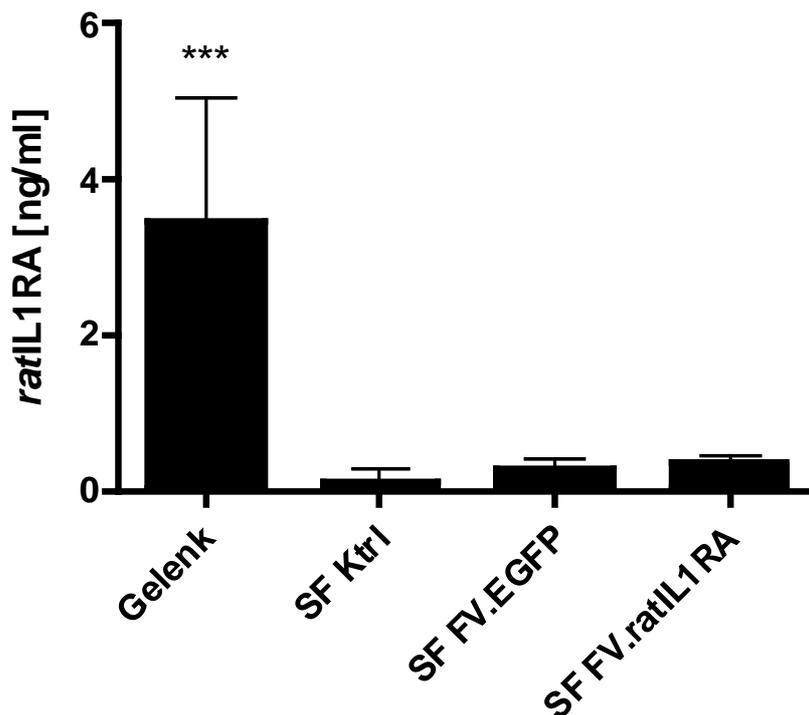


Abb. 13: *RatIL1RA* ELISA-Messung. Die dargestellten Werte der Gelenke stammen von drei verschiedenen *nude* Rattenkniegelenken, die sich geöffnet mit Exposition der gesamten Kniegelenksinnenflächen für 24 h in 4 ml Kulturmedium befanden. Die Synovialfibroblasten (SF) wurden mit zwei verschiedenen FV-Vektorproduktionen transduziert (Ktrl n=6; FV.*ratIL1RA* n=7, FV.EGFP n=3).

Eine Analyse des sezernierten Ratten IL1RA-Proteins in den Überständen von transduzierten Synovialzellen und geöffneten Kniegelenken wurde mittels spezifischem ELISA (Cusabio) vorgenommen. Dabei waren starke Schwankungen (Abb. 13 Gelenk) in den Messungen der mit den geöffneten Kniegelenken konditionierten Medien zu verzeichnen. Zudem war die endogene IL1RA Produktion mit im Mittel 3,5 ng/ml sehr hoch. Eine spezifische Produktion an Ratten IL1RA in den NA2 (FV.*ratIL1RA*) transduzierten SF konnte nicht gezeigt werden. Die Werte lagen im Bereich der nativen SF und der mit MD9 (FV.EGFP) transduzierten Kontrollen. Da man aufgrund der hohen Hintergrundexpression in den Kniegelenken ohnehin nicht zwischen endogener und FV vermittelter IL1RA-Expression hätte unterscheiden können, war der Vektor NA2 für die Tierexperimente ungeeignet. Die Tierexperimente wurden mit dem Vektor NA1 (FV.hIL1RA) durchgeführt. Dessen Klonierung und Charakterisierung wird im Folgenden beschrieben.

5.6 *In vitro* Evaluierung des FV.hIL1RA / NA1 Vektors (hIL1RA in BF014)

Das Projekt dieser Arbeit zielt auf die Entwicklung eines indirekten Gentransferansatzes zur Arthritisbehandlung mit FVV. Der humane Interleukin-1 Rezeptorantagonist (hIL1RA) wurde bereits in zahlreichen tierexperimentellen und auch klinischen Studien zur RA erfolgreich eingesetzt (Evans et al., 2010). Für die tierexperimentellen Arbeiten sollte ein FVV generiert werden, der den hIL1RA als therapeutisches Transgen und EGFP als Markergen trägt. Die Evaluierung des Vektors erfolgte zunächst *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie (EGFP), FACS-Analysen (EGFP), *realtime* PCR (hIL1RA) und ELISA-Messungen (hIL1RA). Die Versuche wurden mit verschiedenen Zelllinien und primären Zellen durchgeführt. Zudem wurde, um die Funktionalität des IL1RA zu testen, den Zellkulturen IL1 β hochdosiert (10 ng/ml) zugesetzt und analysiert, ob die sezernierte IL1RA Menge ausreichend ist, um die Effekte des IL1 β zu antagonisieren. Dazu wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Gehalt hin untersucht (siehe 4.4.2).

Die cDNA des humanen IL1RA (Isoform 1, Celera cDNA Clone Collection, Invitrogen) wurde mittels PCR amplifiziert und als ein XhoI / XbaI Fragment in pBF014 kloniert. Die Transduktionseffizienz der generierten Vektoren wurde mit primären humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ), Tert-4 Zellen (Telomerase-immortalisierte humane mesenchymale Stammzelllinie) und HT1080 Fibroblastenzellen analysiert.

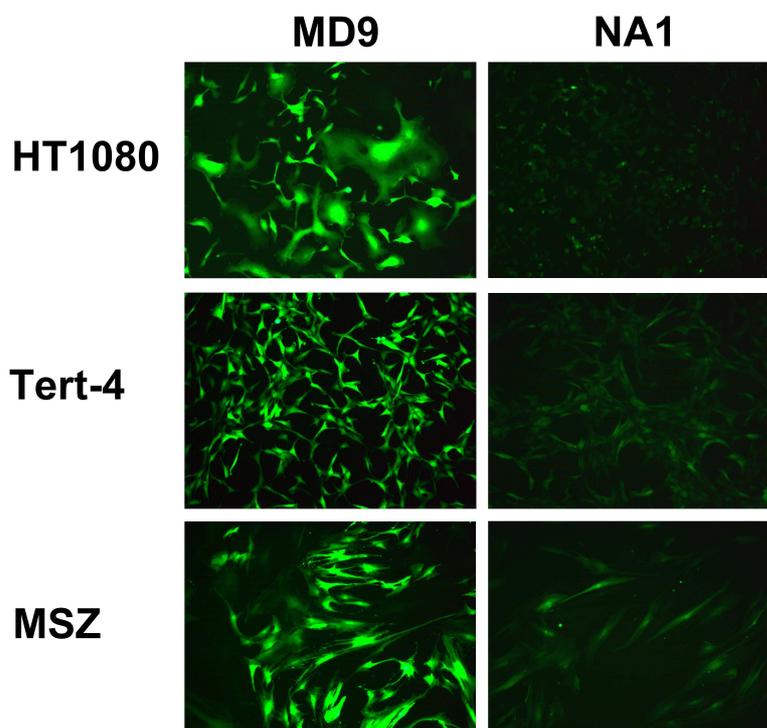


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen MD9 (FV.EGFP) und NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter Zellen. HT1080 Fibroblasten, Tert-4 Zellen (mesenchymale

Stammzelllinie) und primäre humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) drei Tage nach Transduktion bei gleicher Belichtungszeit. Vektorverdünnung: 0,5. Vergrößerung: 100x.

Durch die im NA1 Vektor enthaltene IRES (SFFV-U3-hIL1RA-IRES-EGFP) war die EGFP-Expression in den Zellen schwächer im Vergleich zur EGFP Expression des MD9 Vektors (SFFV-U3-EGFP). Dies ist in den in Abb. 14 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gegenübergestellt.

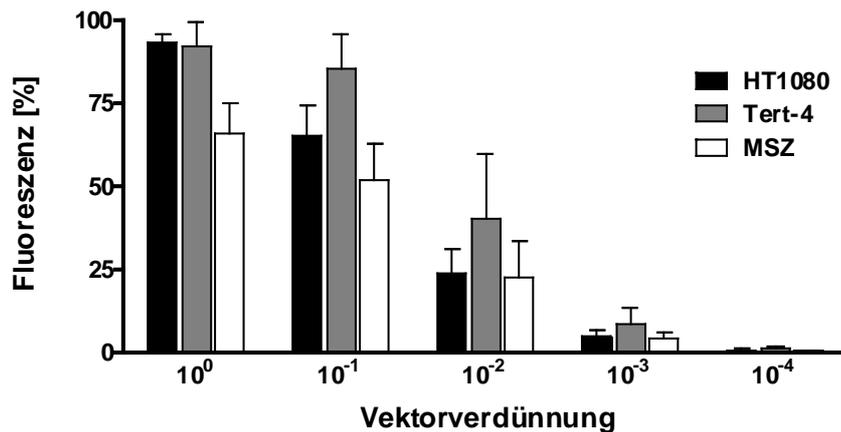


Abb. 15: Transduktionseffizienz des NA1-Vektors auf verschiedenen Zellen. An Tag eins des Experimentes wurden 1×10^4 Zellen in 12-Lochplatten ausgesät. Die Transduktionsrate wurden drei Tage nach Titration des Vektors mittels FACS-Analyse (EGFP) ermittelt. HT1080 Fibroblasten, die mesenchymale Stammzelllinie, Tert-4 und primäre humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) wurden verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen +SD (n=3).

Neben den Fluoreszenzaufnahmen wurde die Transduzierbarkeit der verwendeten Zellen mit dem NA1 (FV.hIL1RA) Vektor auch in FACS-Analysen gezeigt. Die Tert-4 Stammzelllinie erwies sich mit einem CCID₅₀ Wert von 0,0155 als am besten transduzierbar, die HT1080 Fibroblasten waren mit einem Wert von 0,0446 ähnlich permissiv. Die MSZ zeigten einen um den Faktor neun bzw. drei höheren CCID₅₀ Wert mit 0,1401. Die HT1080 und Tert-4 Zellen waren in diesem Versuch also geringfügig besser transduzierbar als die primären MSZ. Die Zellkulturüberstände der 10⁰-Verdünnungen der Vektoren wurden zusätzlich in einem hIL1RA spezifischen ELISA gemessen, die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung dargestellt. Die hIL1RA-Expression der verwendeten Zellen war dabei vergleichbar hoch.

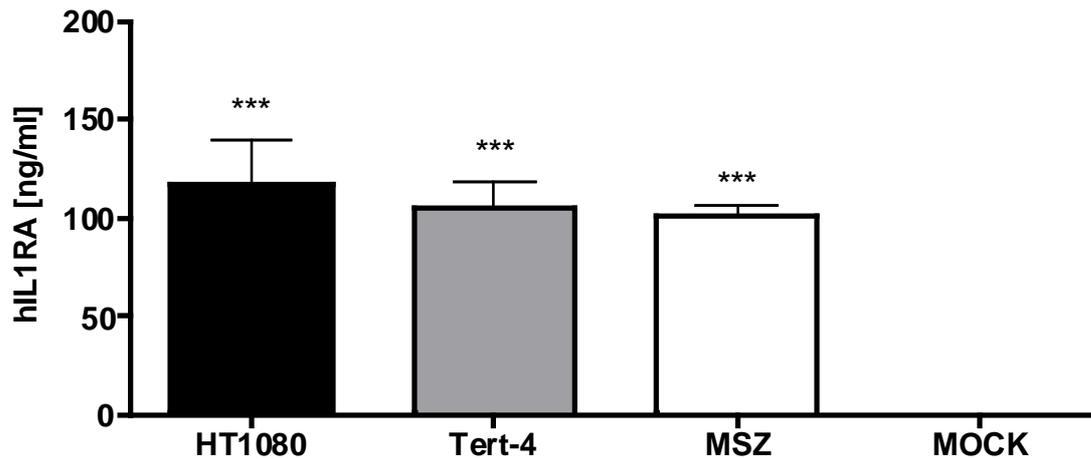


Abb. 16: hIL1RA Expression NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter Zellen (HT1080, Tert-4 und MSZ). Die Überstände wurden drei Tage post Transduktion abgenommen und in einem spezifischen ELISA gemessen. Exemplarisch ist für jede Zellart eine MOCK Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen +SD (n=3).

Die hIL1RA-Transgenexpression betrug im Mittel 117 ng/ml ± 23 bei den HT1080 Zellen, 105 ng/ml ± 13 bei Tert-4 und 101 ng/ml ± 5 bei MSZ (Mittelwert [ng/ml] ± SD) (Abb. 16).

Weiterhin wurden die Zellen auf mRNA Ebene auf Ihre hIL1RA Expression hin untersucht. Hierzu wurden 3×10^6 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und nach 24 h mit dem FV.hIL1RA (NA1) Vektor transduziert. Die gesamt-RNA der kultivierten Zellen wurde drei Tage nach Transduktion mittels Trizol isoliert, in cDNA transkribiert und anschließend eine *realtime* PCR zur Analyse der hIL1RA-Expression durchgeführt. Isoform-spezifische Primer für hIL1RA, sowie β -Actin zur Normalisierung wurden verwendet. Die amplifizierten Transkripte wurden mittels komparativer Ct-Methode quantifiziert. Aus den erhaltenen Werten wurde für jede Zelllinie die relative hIL1RA-Expression berechnet. In Abb. 17 sind exemplarisch die Amplifikationskurven für das Referenz- und Zielgen dargestellt.

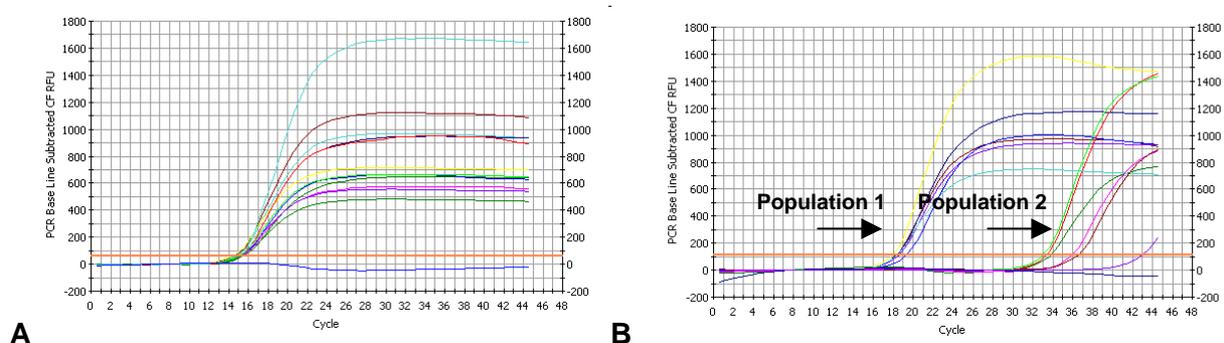


Abb. 17: Repräsentative Amplifikationskurven von β -Actin (A) und hIL1RA (B). Der Zyklus wird dabei gegen die Fluoreszenz aufgetragen (RFU = *relative fluorescence units*). Neben dem Zielgen hIL1RA wurde zudem ein PCR-Lauf mit einem sogenannten

housekeeping gene, hier β -Actin (A) durchgeführt. Dieses Gen, dessen Expression relativ konstant ist dient als Referenzgen.

Im hIL1RA PCR-Lauf (Abb. 13 B) sind die Kontrollen, die keine oder wenig hIL1RA Expression zeigen, anhand der höheren Ct-Werte zu erkennen (zweite Population der Graphen; ca. ab Zyklus 32). Im Gegensatz dazu stellen die mit NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten Proben die erste Population dar (ab ca. Zyklus 18; Population 1). Aus den Schnittpunkten (sog. *crossing points*, CP) der Wendepunktstangenten an den sigmoiden Amplifikationskurven mit der Zeit-/Reaktionszyklenachse kann die relative Menge der jeweiligen cDNA berechnet werden. Die PCR Produkte wurden zusätzlich auf Agarosegele aufgetragen. Dies diente neben der Schmelzkurvenanalyse als Kontrolle für Produktgröße und Spezifität der Primer (nicht gezeigt). Durch Verwendung Intron-überspannender Primerpaare konnte eine mögliche Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

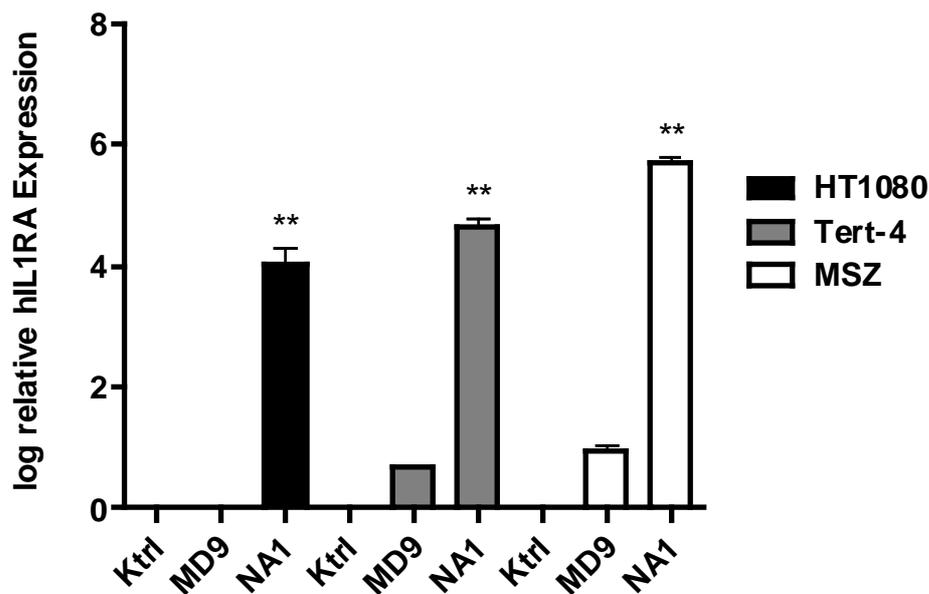


Abb. 18: Relative hIL1RA-mRNA Expressionen in HT1080, Tert-4 und primären MSZ.

Logarithmische Darstellung der relativen hIL1RA-mRNA-Expressionen in den Kontrollen (Ktrl), nach FV.EGFP (MD9 Kontrolle) und nach FV.hIL1RA (NA1) Transduktion. Die erhaltenen Werte wurden auf β -Actin normiert, welches als Referenzgen diente und in Bezug auf die jeweiligen untransduzierten Zellen (Ktrl) angegeben (auf eins normiert). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression + SD aus drei unabhängigen Versuchen mit n=2.

Die Transduktion mit NA1 (FV.hIL1RA) führte zu einer spezifischen Überexpression der hIL1RA mRNA in den drei untersuchten Zelllinien. Um auszuschließen, dass es sich um

einen unspezifischen Effekt nach FVV Transduktion handelt, wurden MD9 Kontrollen mitgeführt. In den durchgeführten Versuchen war in den MSZ die höchste hIL1RA-mRNA Expression mit einem Faktor von $4,9 \times 10^5$ relativ zu den untransduzierten MSZ Zellen zu beobachten (Abb. 18). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität in den MD9 Kontrollen der MSZ war mit einem relativen Faktor von im Mittel 8,8 zu vernachlässigen. Auch in den mit NA1 transduzierten HT1080 Fibroblasten und Tert-4 Zellen konnte die Expression von hIL1RA nachgewiesen werden (Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber unbehandelten Zellen um den Faktor $1,2 \times 10^4$ bzw. $4,3 \times 10^4$). MD9 Kontrollansätze zeigten auch hier keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Faktor gegenüber unbehandelten Zellen von 1,7).

5.6.1 In vitro Charakterisierung des FV.hIL1RA Vektors mit primären Ratten Synovialfibroblasten

Für die geplanten Transplantationsexperimente, war die Transduzierbarkeit der primären Rattensynovialzellen aus dem Kniegelenk mit den foamyviralen Vektoren erforderlich, insbesondere mit dem NA1 (FV.hIL1RA) Vektor. Die Zellen wurden, wie bereits im Methodenteil (siehe 4.7.3) erwähnt, aus der präparierten Synovialmembran isoliert, in Passage zwei transduziert und mit verschiedenen Methoden auf Ihre Transgenexpression hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

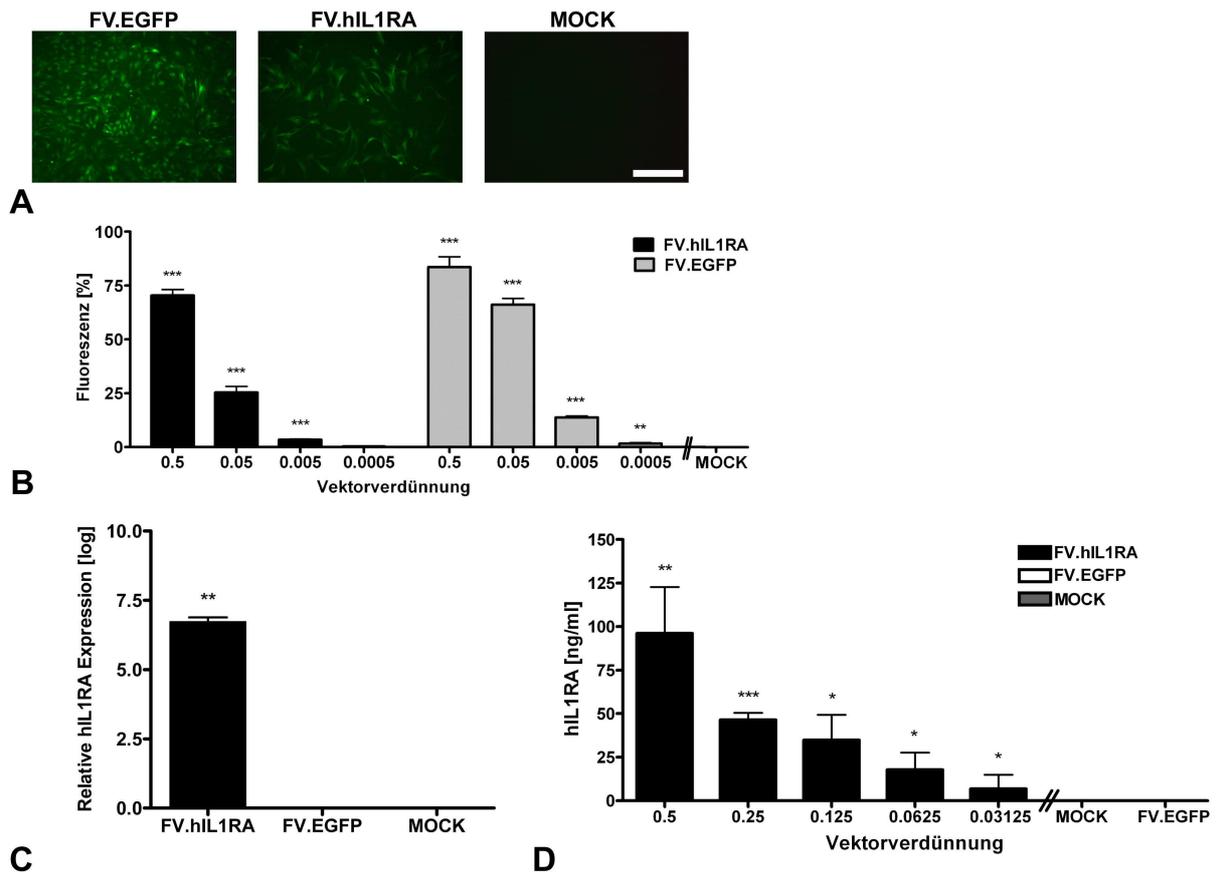


Abb. 19: NA1 (FV.hIL1RA) Evaluierung *in vitro* mit primären Synovialfibroblasten der Ratte (SF). Die Versuche wurden mit FV.hIL1RA, FV.EGFP und der MOCK Kontrolle durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils drei Tage nach Transduktion analysiert. Die Zellen wurden mittels (B) FACS (EGFP), (C) *Realtime* PCR (hIL1RA) und (D) ELISA (hIL1RA) analysiert. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Vergrößerung 100x; Größenbalken = 200 μ m. (B) Transduktionseffizienzen der FV-Vektoren. (C) Relative hIL1RA-mRNA Expression [log]. Die erhaltenen Werte wurden auf β -Actin normiert und in Bezug auf die MOCK Kontrolle angegeben (auf eins normiert). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpression +SD aus drei unabhängigen Versuchen mit n=2. (D) Sezernierte hIL1RA Mengen in Zellkulturüberständen transduzierter SF mit verschiedenen Vektorverdünnungen. Dargestellt sind Mittelwerte +SD mit n=3.

Die erfolgreiche Transduktion der SF mit den Vektoren konnte fluoreszenzmikroskopisch (Abb. 19 A) anhand der EGFP Expression gezeigt werden. Die Transduktionsraten (und die daraus errechneten CCID₅₀ Werte) wurden drei Tage nach Titration der Vektoren mittels FACS-Analyse ermittelt. Mit einem CCID₅₀ Wert von 0,1804 (NA1) und 0,0298 (MD9) war die Infektiosität der MD9- gegenüber der NA1-Vektorproduktion um den Faktor sechs erhöht. Die CCID₅₀ Werte, die mit den Vektoren auf primären Synovialzellen (SF) erreicht wurden, waren mit denen auf HT1080 Zellen vergleichbar, die SF Zellen zeigten eine ähnlich gute

Transduzierbarkeit. In der *realtime* PCR wurde die Überexpression der hIL1RA-mRNA in den Rattensynovialzellen gezeigt (Abb. 19 C). Die relative mRNA-Expression in den FV.hIL1RA transduzierten Zellen war um den Faktor $5,6 \times 10^6$ gegenüber den Kontrollen (MOCK) erhöht. In den FV.EGFP Kontrollen wurde wie erwartet keine hIL1RA-mRNA detektiert (Abb. 19 C). In der ELISA Auswertung ist zu erkennen, dass hIL1RA von den NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten Zellen in hoher Konzentration sezerniert wird. In der 1/2 Verdünnung wurden im Mittel 96 ng/ml hIL1RA im Überstand gemessen. Die Expression nahm mit Verdünnung der Vektorsuspension ab. In den Kontrollen war keine hIL1RA Expression zu verzeichnen (Abb. 19 D).

5.6.2 *In vitro* Funktionalität von hIL1RA

Um die Funktionalität der foamyviral vermittelten Expression des hIL1RA Proteins zu untersuchen, wurden Tert-4 Zellen mit einer hohen Dosis des pro-inflammatorischen Zytokins IL1 β inkubiert. Dies soll die Verhältnisse im rheumatischen Gelenk nachahmen, in dem IL1 β chronisch produziert wird. Zellen des Immunsystems, die durch Entzündungsmediatoren stimuliert werden, sezernieren große Mengen an Prostaglandin E₂ (PGE₂). PGE₂ wird durch die Prostaglandin-E-Synthase aus Prostaglandin H₂ synthetisiert und ist eines der Hauptprostaglandine, das im Entzündungsgeschehen involviert ist.

Die durch IL1 β induzierte Prostaglandin E₂ Produktion diente in den Versuchen als *readout* der Stimulation. Da der kommerziell erhältliche Assay nur für humanes PGE₂ zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit der humanen Tert-4 mesenchymalen Stammzelllinie durchgeführt. Nach Auftauen der Proben wurde neben dem PGE₂ Assay zudem die Messung der korrespondierenden hIL1RA Mengen mit einem spezifischen ELISA vorgenommen.

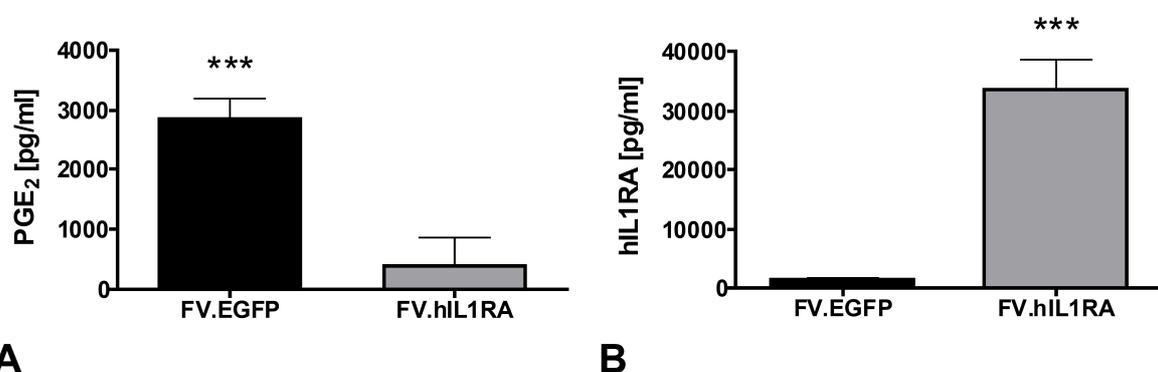


Abb. 20: PGE₂ Produktion und korrespondierender hIL1RA ELISA nach IL1 β Inkubation. Nach 48 h IL1 β [10 ng/ml] Inkubation wurden die Zellkulturüberstände

abgenommen und bei -20°C gelagert. (A) In einem PGE₂ Assay (R&D) wurden die von den Zellen produzierte PGE₂ Menge gemessen. (B) Korrespondierend wurde die hIL1RA Menge im ELISA (R&D) gemessen. Verwendet wurden Tert-4 Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen +SD mit n=3.

Das von den FV.hIL1RA transduzierten Zellen sezernierte hIL1RA war in der Lage, das dem Medium zugesetzte IL-β zu antagonisieren. Dies zeigte sich in einer signifikant verminderten PGE₂-Produktion gegenüber den transduzierten (FV.EGFP) Kontrollzellen (Abb. 20 A). Mit im Mittel 386 pg/ml wurde eine Inhibierung der Prostaglandinproduktion um 86 % im Gegensatz zu den Kontrollen erzielt, welche im Schnitt 2,8 x 10³ pg/ml PGE₂ sezernierten. In einer korrespondierenden ELISA-Messung wurde zudem mit 3,3 x 10⁴ pg/ml eine spezifische hIL1RA Produktion der FV.hIL1RA Tert-4 Zellen im Gegensatz zu den MD9 Kontrollen nachgewiesen, die nahezu keine hIL1RA-Expression zeigten (Abb. 20 B).

5.6.3 Langzeitexpression von FV.hIL1RA in MSZ

Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) bilden heterogene Zellpopulationen, die in ihren morphologischen und biologischen Eigenschaften stark variieren können. In einem Langzeitexperiment mit primären humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) konnte die stabile, NA1 (FV.hIL1RA) vermittelte hIL1RA-Expression über einen Zeitraum von 137 Tagen nachgewiesen werden. Vor der Langezeitkultivierung erfolgte die Selektion positiver (grün fluoreszierender) Zellen mit einem FACSDiVa Zellsortierer. Die Zellen wurden nach Sortierung in 6-Lochplatten kultiviert und die Überstände in ELISA-Messungen mit untransduzierten MSZ derselben Spenderzellcharge verglichen.

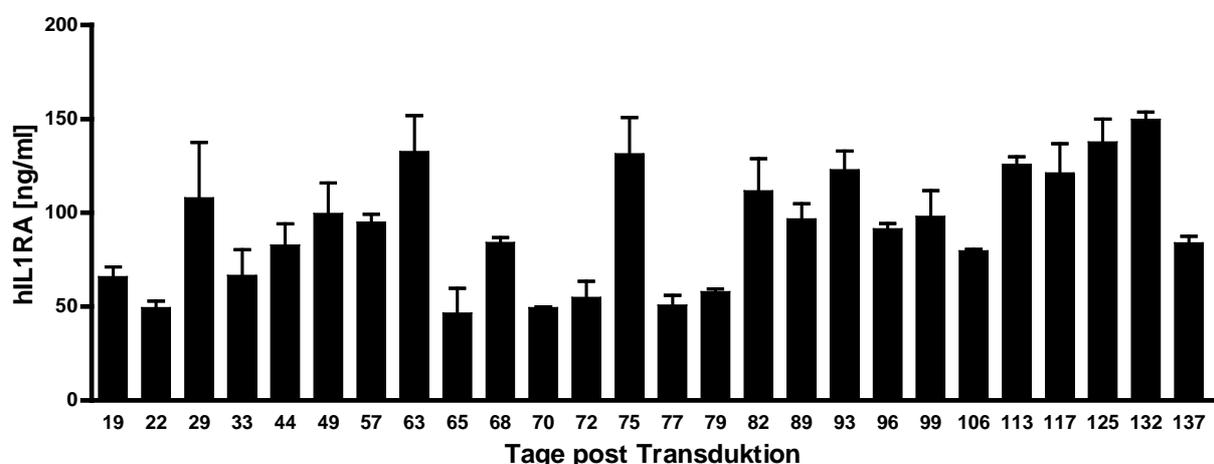


Abb. 21: hIL1RA Expression im Zeitverlauf in mesenchymalen Stammzellen (MSZ). Die MSZ wurden mit NA1 (FV.hIL1RA) transduziert und nach EGFP sortiert. Die Entnahme der

Zellkulturüberstände erfolgte zusammen mit dem Medienwechsel in verschiedenen Zeitabständen. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Entnahmezeitpunkte der Überstände dargestellt. Diese wurden bis zur ELISA-Messung bei -20°C gelagert und in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus einem Versuch mit Standardabweichung und n=6. (MSZ Spenderzellchargenr.: 499).

Abb. 21 zeigt eine, mit im Mittel 91 ng/ml \pm 28, relativ stabile hIL1RA Proteinexpression der Zellen über den Zeitraum von 137 Tagen (Mittelwert [ng/ml] \pm SD). Die jeweiligen Kontrollen (untransduzierte MSZ) zeigten keine hIL1RA Proteinexpression im ELISA (nicht dargestellt). Neben der Analyse der hIL1RA Expression, wurde auch die EGFP Expression mittels Fluoreszenzmikroskop über die Zeit dokumentiert.

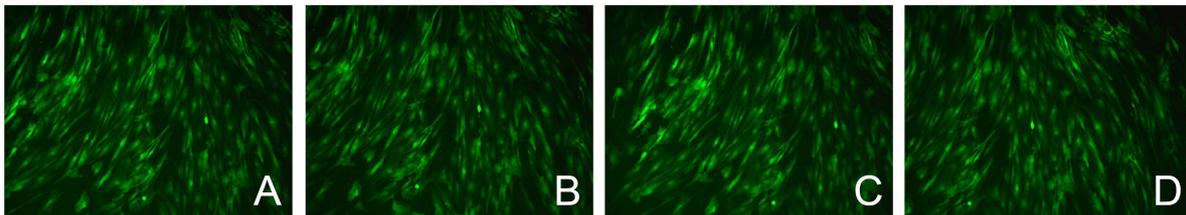


Abb. 22: Zeitverlauf der EGFP Expression in NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten MSZ. Darstellung der EGFP Expression einer Vertiefung der 6-Lochplatte in bestimmten Zeitabständen (A-D entspricht Tag 29, 65, 75 und 137), bei gleicher Belichtungszeit. Vergrößerung: 100x.

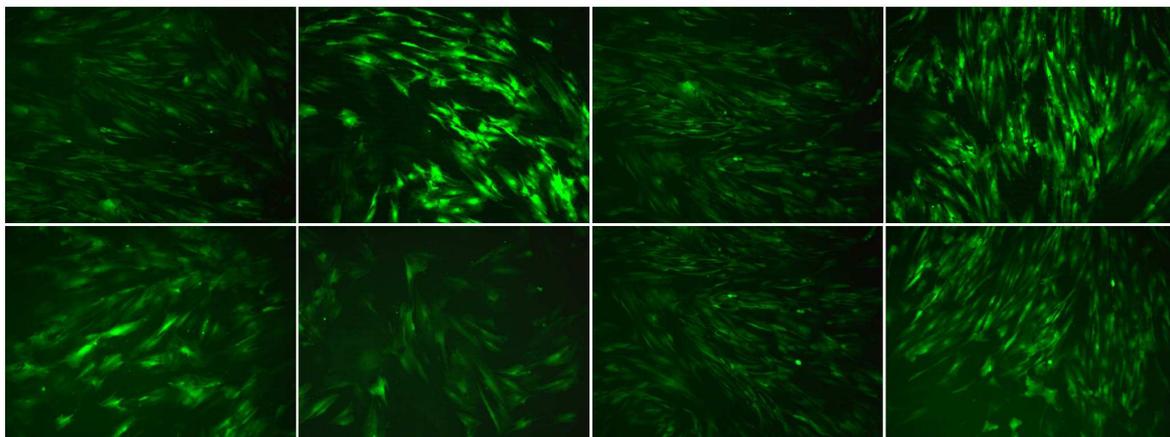


Abb. 23: NA1 (FV.hIL1RA) transduzierte MSZ an Tag 137 in Kultur. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Vertiefungen der 6-Lochplatte Gleiche Belichtungszeit. Vergrößerung: 100x.

Die Zellen wurden nach Zellsortierung nicht weiter passagiert, sondern es wurde lediglich regelmäßig das Medium gewechselt. Neben der hIL1RA Transgenexpression war auch die Fluoreszenz (EGFP) über die untersuchte Zeitspanne stabil (Abb. 22 Zeitverlauf).

Senescente Phänotypen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgemacht werden. Die stark vergrößerten, abgeflachten Zellen, sowie nicht konfluente Bereiche in den Vertiefungen der 6-Lochplatte zeigten einen Wachstumsstopp bzw. die Seneszenz der Zellen (in Abb. 23, obere Bildreihe). Nach 137 Tagen in Kultur wurden mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die heterogene Zellpopulation dokumentiert (Abb. 23), bevor die Zellen anschließend mit ATV abgelöst und in der FACS-Analyse auf ihre Vitalität und EGFP-Expression hin charakterisiert wurden (Abb. 24).

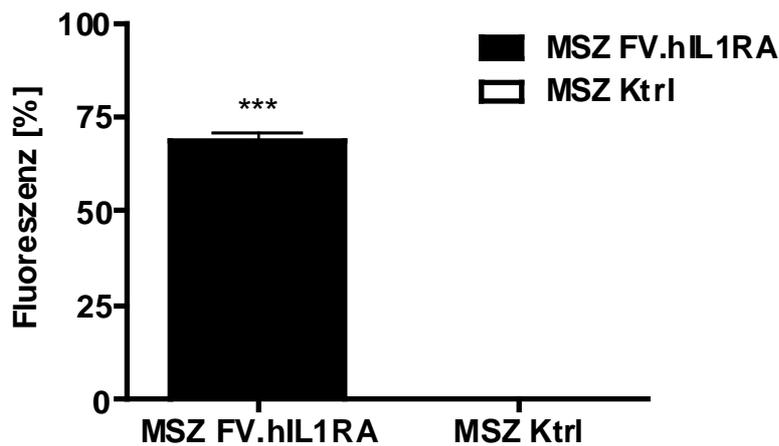


Abb. 24: Finale FACS-Analyse NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter MSZ nach 137 Tagen in Kultur. Dargestellt ist der durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsatz an grün fluoreszierenden Zellen der FV.hIL1RA-transduzierten und der unbehandelten MSZ Kontrollzellen. Dargestellt ist ein Experiment +SD (n=6).

Der transgenpositive Anteil in der Lebendzellpopulation belief sich in der abschließenden FACS-Analyse auf 68,5 % im Mittel.

5.6.4 NA1-transduzierte Zellen überwinden die IL1 β -induzierte Blockade der chondrogenen Differenzierung

Johnstone et al. etablierten bereits im Jahr 1998 die *in vitro* Chondrogenese von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSZ) in einem dreidimensionalen (3D) Kultursystem in Form von hochdichten Zellaggregaten, den so genannten *Pellets* (Johnstone et al. 1998). In serumfreien Medium unter Zusatz von Ascorbat, Pyruvat, Dexamethason sowie Insulin, Transferrin und Selen, sowie mit den Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie standardmäßig eine chondrogene Entwicklung induziert werden (Puetzer et al., 2010). Neben TGF β gibt es auch andere bedeutsame chondrogen wirkende Faktoren wie bspw.

BMP-6, BMP-2, Hyaluronsäure und autologe Synovialflüssigkeit (Palmer et al., 2005; Steinert et al., 2009). Weiterer Gegenstand des Projektes war nun die Klärung der Frage, ob eine FV vermittelte IL1RA-Expression in der Lage ist, die durch IL1 β inhibierte chondrogene Differenzierung von primären humanen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) wieder herzustellen. Die chondrogene Differenzierung wurde mit TGF β vorgenommen.

Die angelegten Pellets wurden in Gruppen unterteilt:

| Gruppe | Beschreibung | FVV | TGF β | IL1 β | Erwartungswert |
|--------|------------------|-----------|-------------|-------------|----------------------------------|
| 1 | Kontrolle | - | - | - | nicht chondrogen (nicht gezeigt) |
| 2 | TGF β | - | + | - | chondrogen |
| 3 | IL1 β | - | + | + | nicht chondrogen |
| 4 | MD9 | FV.EGFP | + | - | chondrogen (nicht gezeigt) |
| 5 | NA1, TGF β | FV.hIL1RA | + | - | chondrogen |
| 6 | NA1, IL1 β | FV.hIL1RA | + | + | chondrogen |

Tab. 5: Einteilung der MSZ in Pelletgruppen.

Es gibt MSZ Spenderzellchargen, die weniger gut differenzierbar sind. Die Ursache dafür ist bislang unklar; vermutlich spielt unter anderem das Alter des Patienten dabei eine Rolle (Roobrouck et al., 2008). Eine Gruppe mit TGF β wird deshalb mitgeführt, um zu zeigen, dass die Spenderzellcharge prinzipiell differenzierbar ist (Gruppe zwei). Durch IL1 β wird die Chondrogenese inhibiert, was in den Pellets der Gruppe drei deutlich werden sollte (Wehling et al., 2009a). Gruppe vier sollte die Frage klären, ob die foamyvirale Transduktion der Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung hat. Ebenso diente die Gruppe fünf als weitere (foamyvirale) Kontrolle. Die Frage, ob durch die FV vermittelte hIL1RA-Expression die „Rettung“ der Chondrogenese stattfinden kann, sollte mit Gruppe sechs (Tabelle 5) geklärt werden.

Die MSZ wurden in Passage eins mit den FV-Vektorpartikeln transduziert. Nach Konfluenz der Zellkulturflaschen wurden die Zellen abgelöst und anschließend von der zuständigen Abteilung im Institut der Virologie anhand der EGFP-Markergenexpression mittels FACS sortiert (siehe 4.1.8).

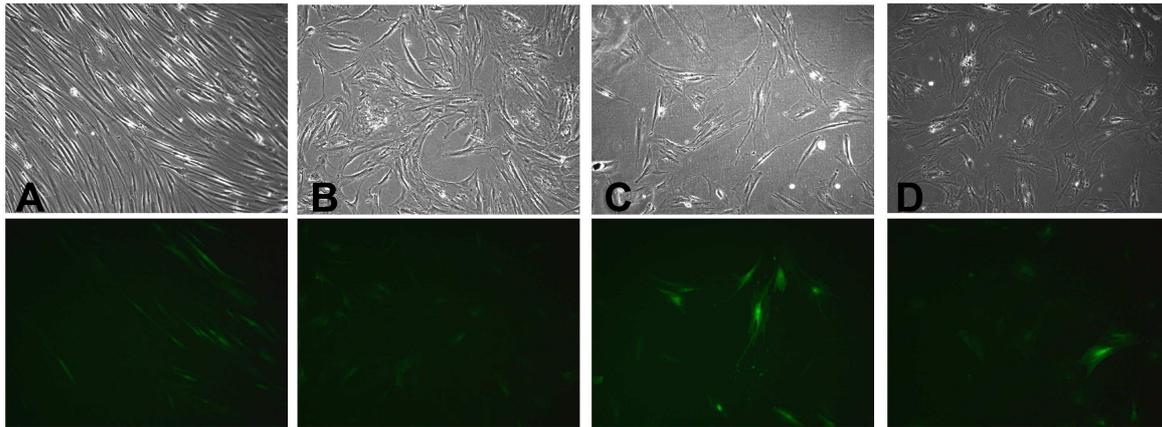


Abb. 25: MSZ Phänotypen nach NA1 (FV.hIL1RA) Transduktion (A) und Zellsortierung (B, C, D). In der oberen Bildreihe sind die Hellfeldaufnahmen und darunter jeweils die Fluoreszenzaufnahme gezeigt. MSZ in Passage zwei (A) und drei (B, C, D). Vergrößerung: 100x.

Da die MSZ in Passage eins transduziert wurden, waren die Zellen nach Expansion und Zellsortierung beim Anlegen der Pelletkulturen bereits in Passage drei oder sogar vier. Dies führte häufig zur Seneszenz der Zellen nach der Zellsortierung. Die Zellen konnten durch den auftretenden Wachstumsstopp nicht weiter expandiert werden (Abb. 25 C, D). Aufgrund der geringen Zellausbeute nach der Sortierung war es nicht möglich, die für die Analysen des chondrogenen Phänotyps notwendige Anzahl an Pellets anzulegen. Oben dargestellt sind NA1 (FV.hIL1RA) transduzierte MSZ-Chargen nach Transduktion (Abb. 25 A) und Zellsortierung (Abb. 25 B, C, D). In C und D sind zum Teil vergrößerte, abgeflachte Zellen zu erkennen.

Aufgrund der unzureichend zur Verfügung stehenden Anzahl an MSZ wurde des Weiteren auf die Tert-4 Stammzelllinie zurückgegriffen, um eine geeignete Anzahl an Pellets in verschiedenen Läufen analysieren zu können. Die Zellen wurden bei ca. 40 % Konfluenz mit NA1 (FV.hIL1RA) und MD9 (FV.EGFP) transduziert und nach Expansion anhand der EGFP-Markergenexpression von der zuständigen Abteilung im Institut für Virologie mittels FACS sortiert. Die EGFP-positiven FV.hIL1RA- und FV.EGFP-Tert-4 Zellen wurden anschließend weiterkultiviert und nach Expansion aliquotiert eingefroren (siehe 4.1.2). Nach Auftauen der Zellen wurden nach drei bis vier Zellpassagen die Pellets der verschiedenen Gruppen angelegt.

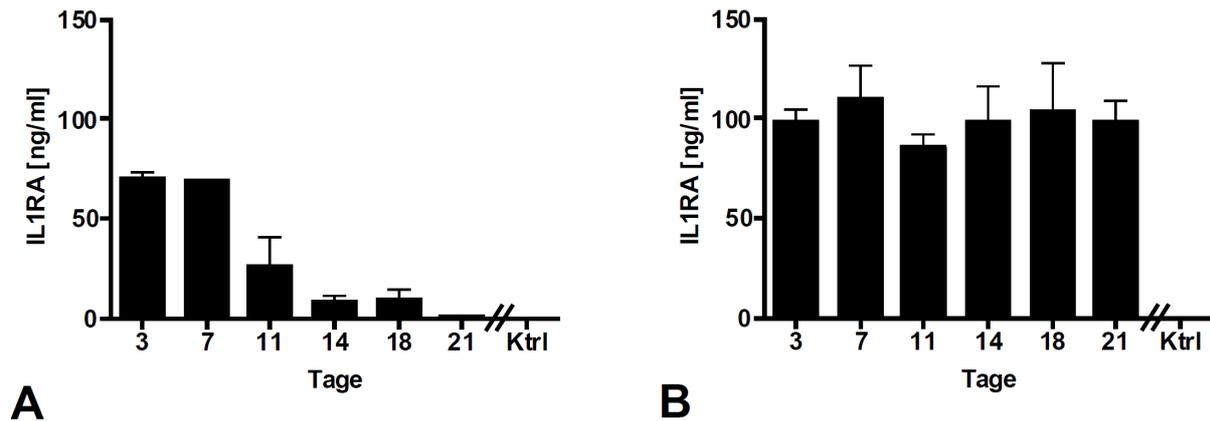


Abb. 26: hIL1RA ELISA-Messung von Zellkulturüberständen von MSZ (A) und sortierten Tert-4 (B) Pellets. Die x-Achse gibt den jeweiligen Tag der Pelletkultur an. 24 h vor Entnahme der Überstände erfolgte ein Medienwechsel. (A) Pelletkulturen primärer hMSZ aus zwei Spenderzellchargen (n = 2), die mit NA1 (FV.hIL1RA) transduziert wurden. (B) Pelletkulturen aus EGFP-sortierten Tert-4 Zellen, die mit NA1 (FV.hIL1RA) transduziert wurden. Dargestellt sind zwei unabhängige Versuche mit n=2.

Zunächst wurde die hIL1RA Expression der Pellets über den Zeitverlauf gemessen. In Abbildung 26 sind die ELISA-Messungen von MSZ und Tert-4 Pellets der Gruppe fünf (siehe Tabelle 5), d.h. der Pellets die 21 Tage mit chondrogenem Differenzierungsmedium (TGFβ) kultiviert wurden dargestellt. Aus den ELISA-Messungen der Zellkulturüberstände wurde ersichtlich, dass die hIL1RA Transgenexpression in den primären MSZ Pellets mit der Kulturdauer der Pellets sank. Nach 21 Tagen war keine hIL1RA Expression mehr messbar. Demgegenüber wurden FV.hIL1RA transduzierte Tert-4 Pellets mittels FACS sortiert (EGFP) und zeigten nach Anlegen in Pelletkultur eine stabile hIL1RA Expression über den Verlauf der 21 Tage.

Zum Nachweis von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix (EZM) wurden Paraffinschnitte der Tert-4 Pellets mit Alcianblau gefärbt.

| | A | B | C | D |
|------------------|---|---|---|---|
| TGF-β [10 ng/ml] | + | + | + | + |
| IL-1β [50 ng/ml] | - | + | - | - |
| IL-1β [5 ng/ml] | - | - | + | + |
| FV.hIL1RA | - | - | - | + |

Abb. 27: Alcianblau angefärbte Paraffinschnitte von Tert-4 Pellets. Alle Pellets wurden unter Zugabe von 10 ng/ml TGF β in chondrogenem Standardmedium differenziert. (A) Positivkontrolle, ohne IL1 β . (B) Inhibierung der Chondrogenese mit 50 ng/ml IL1 β . (C) Inhibierung der Chondrogenese mit 5 ng/ml IL1 β . (D) FV.hIL1RA Gruppe, mit 5 ng/ml IL1 β behandelt. Vergrößerung: 100x.

Die Hemmung der Chondrogenese konnte in den Kontrollgruppen mit 5 und 50 ng/ml IL1 β durch eine schwächere bzw. negative Alcianblaufärbung gezeigt werden. Die Schnitte der Pellets der „rescue“-Gruppe (Gruppe D in Abb. 27; IL1 β mit NA1 (FV.hIL1RA)) zeigten eine mit der Positivkontrolle (Abb. 27 A) vergleichbar starke Alcianblaufärbung.

Für die Charakterisierung auf der Ebene der Genexpression (semiquantitative PCRs) wurde aufgrund der benötigten Zellzahlen auf die Tert-4 Stammzelllinie zurückgegriffen. Dabei wurden drei unabhängige Pelletläufe mit den vorherig beschriebenen Gruppen durchgeführt (siehe Tabelle 5). An den Tagen 3, 7, 11, 14, 18 und 21 wurden jeweils vier Pellets pro Gruppe zur Isolierung von RNA verwendet (siehe 4.3.1.2). Dabei wurde ersichtlich, dass die RNA Isolation bzw. RT-Reaktion (siehe 4.3.4) erfolgreich verlaufen war; die Referenzgene waren in allen Ansätzen mit annähernd gleicher Bandenintensität nachweisbar. In den mit TGF β behandelten Gruppen war in der mRNA-Analyse jedoch keine Expression knorpelspezifischer Gene zu detektieren. Die PCRs mit den Primern für Collagen II, COMP, Biglykan und Aggrekan (chondrogene Marker) zeigten keine Banden in den Agarosegelen (nicht gezeigt). Die cDNAs eines Versuches mit Tert-4 Pellets wurden zusätzlich in einem *realtime* PCR-Lauf auf knorpelspezifische Gene und ein Referenzgen getestet. Nachstehend sind die Ergebnisse von Collagen II dargestellt.

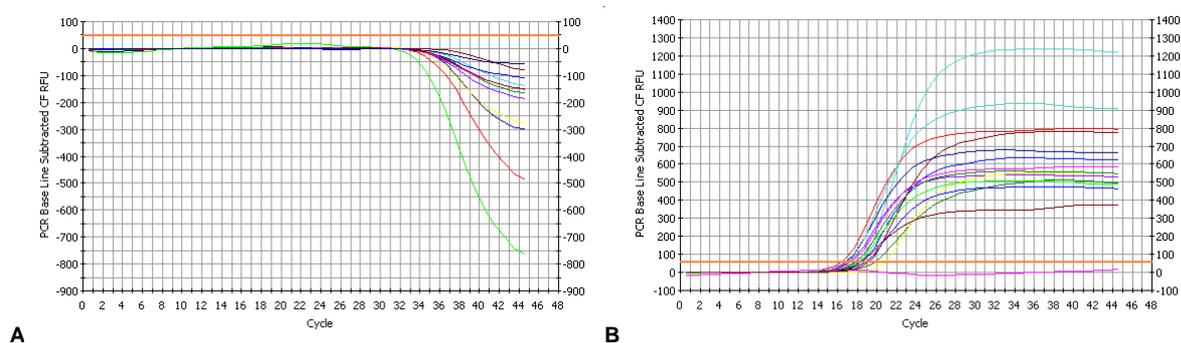


Abb. 28: Amplifikationskurven von Collagen II (A) und β -Actin (B). Der Zyklus ist dabei gegen die Fluoreszenz aufgetragen (RFU = *relative fluorescence units*). Verwendet wurden Tert-4 Pellets an Tag 21 der Kultivierung.

Auch in der *realtime* PCR war keine mRNA-Expression knorpelspezifischer Gene zu verzeichnen, das Referenzgen wurde hingegen erfolgreich nachgewiesen.

Mit Verwendung ganzer Spenderzellchargen (jeweils aus einem Hüftkopf) wurde die Durchführung der Pelletversuche mit primären humanen MSZ ermöglicht. Die Inhibierung der Chondrogenese nach IL1 β Zugabe wurde in Kontrollpellets gezeigt (Alcianblau und Collagen II negativ). Im Gegensatz dazu waren FV.hIL1RA MSZ Pellets chondrogen (Alcianblau und Collagen II positiv) und zeigten signifikant gesteigerte Glykosaminoglykan/DNA (GAG/DNA) Raten an allen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 14, 21) (Diplomarbeit Jennifer Krieg).

5.7 FVV vermittelte Transgenexpression *in vivo*

Für die *in vivo* Versuche wurden zwei verschiedene Rattenstämme verwendet. Ein dauerhaft hohes hIL1RA-Level wurde dabei über einen Zeitraum von 168 Tagen gemessen (Gouze et al., 2007). Im Folgenden werden die intraartikulären Injektionen der FVV in Kniegelenke von 150-175 g schweren männlichen Wistar Ratten und 12 bis 20 Wochen alten athymischen Nacktratten (des Weiteren auch als *nude* Ratten bezeichnet) beschrieben.

5.7.1 Experimentelles Design der Gentransferstudien

In folgendem Schema ist der Ablauf der Versuche dargestellt:

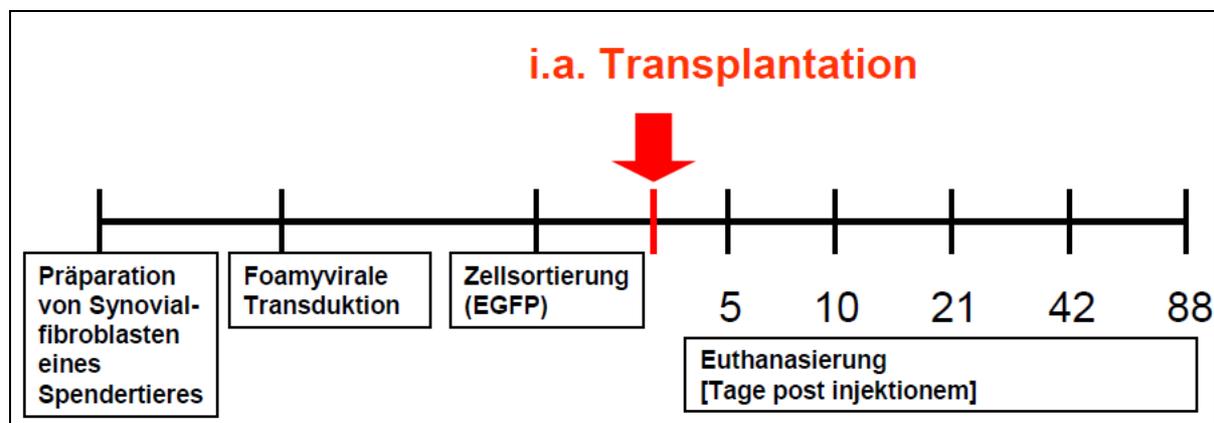


Abb. 29: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Tierexperimente.

Aus den zwei Rattenstämmen wurden jeweils die drei Gruppen Ktrl (unbehandelte Kontrolle), FV.EGFP Kontrolle und FV.hIL1RA gebildet. Die i.a. Injektion der *nude* Ratten erfolgte in die jeweiligen Geschwistertiere des Spenders.

Zu Beginn wurden Synovialfibroblasten aus Synovialmembranen von Wistar und *nude* Ratten mittels Collagenaseverdau (siehe 4.7.3) isoliert.

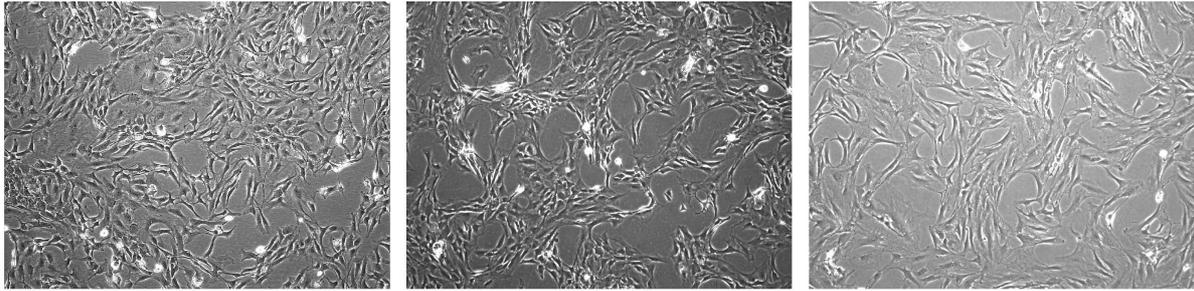


Abb. 30: Aus der Synovialmembran präparierte Synovialzellen für die *ex vivo* Transduktion. Nach Präparation der Synovialmembranen aus den Kniegelenken wurden die Zellen nach Collagenaseverdau in Gewebekultur genommen. Beispielhafte Hellfeldaufnahmen angewachsener synovialer Fibroblasten, wie sie sich nach einigen Tagen darstellen. Belichtungszeit variiert. Vergrößerung 100x.

Nach Konfluenz der Zellen wurden diese expandiert, in T75 Zellkulturflaschen bei mittlerer Konfluenz mit den Vektoren transduziert (Zellen in Passage 2) und auf EGFP sortiert. Nach erneuter Expansion (bis maximal Passage 12) wurden die Zellen unmittelbar vor der i.a. Transplantation im FACS analysiert und 2×10^6 EGFP-positive Zellen pro Kniegelenk in PBS i.a. injiziert (siehe Methodenteil 4.7.2).

5.7.2 Zellkulturen von explantierten Synovialzellen

Zunächst wurde versucht, die mit MD9 (FV.EGFP) transduzierten und transplantierten Synovialfibroblasten wieder aus dem Kniegelenk zu isolieren. Durch Analyse der EGFP-Expression sollte im Zeitverlauf ein etwaiger Verlust an EGFP-positiven transplantierten Zellen dokumentiert werden. Die Kniegelenke wurden nach verschiedenen Zeitpunkten post injektionem nach Tötung der Tiere entnommen und die Synovialmembranen wie unter 4.7.3 beschrieben präpariert.

Fünf Tage post injektionem konnten EGFP-positive Zellen in den Synovialmembranen von FV.EGFP transplantierten Wistar und *nude* Ratten ausgemacht werden (Abb. 31 A, B), sowie EGFP-positive explantierte Zellen nach Collagenaseverdau in Gewebekultur nachgewiesen werden (Abb.31 und 32).

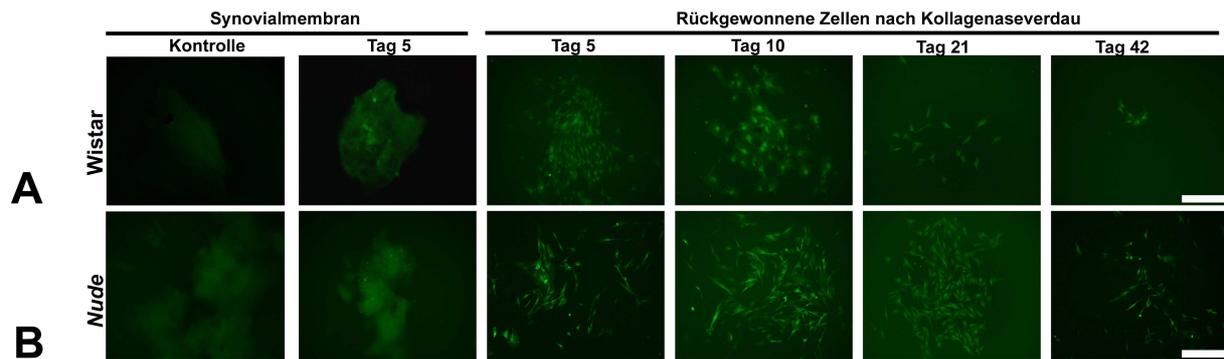


Abb. 31: EGFP-Expression in explantierten Synovialzellen die mit MD9 (FV.EGFP) transduziert und in Kniegelenke von Wistar und *nude* Ratten transplantiert wurden. Nach i.a. Injektion von 2×10^6 EGFP-positiver Zellen wurden die Synovialmembranen der entnommenen Gelenke präpariert. (A, B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Teilen der präparierten Synovialmembranen und nach 24-stündigem Collagenaseverdau in Gewebekultur angewachsener Explantatzellen.

Die EGFP-Expression der explantierten Zellen wurde im Zeitverlauf mittels FACS analysiert. So konnten in immunkompetenten Wistar Ratten an Tag fünf und 10 nach Transplantation ein Maximum von 3,5 % bzw. 8,1 % EGFP-positiven Zellen aus der Explantatkultur gewonnen werden (Abb. 32 C). Jedoch waren drei Wochen nach Transplantation keine EGFP-exprimierenden Zellen mehr nachzuweisen. Das Maximum an fluoreszierenden Zellen wurde bei den Wistar Ratten an Tag 10 nach Transplantation isoliert (Abb. 32). Dem hingegen konnten aus den *nude* Rattenkniegelenken noch nach 13 Wochen bis zu 2,6 % EGFP-positive Zellen aus der Gesamtzellpopulation isoliert werden. Fünf Tage post injektionem waren die Werte mit 5 bzw. 9 % in den *nude* Ratten zu diesem Zeitpunkt höher als die Werte der Wistar Ratten. An Tag 21 bzw. 42 waren im Mittel 0,6 bzw. 0,2 % EGFP-positive Zellen in der analysierten Gesamtzellpopulation vorhanden. Es wurden jeweils ungefähr zwei Millionen Zellen im FACS analysiert. Aufgrund der geringen Zahl analysierter Kniegelenke sollte man diese Ergebnisse als Tendenz sehen. Diese galt es mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten näher zu untersuchen.

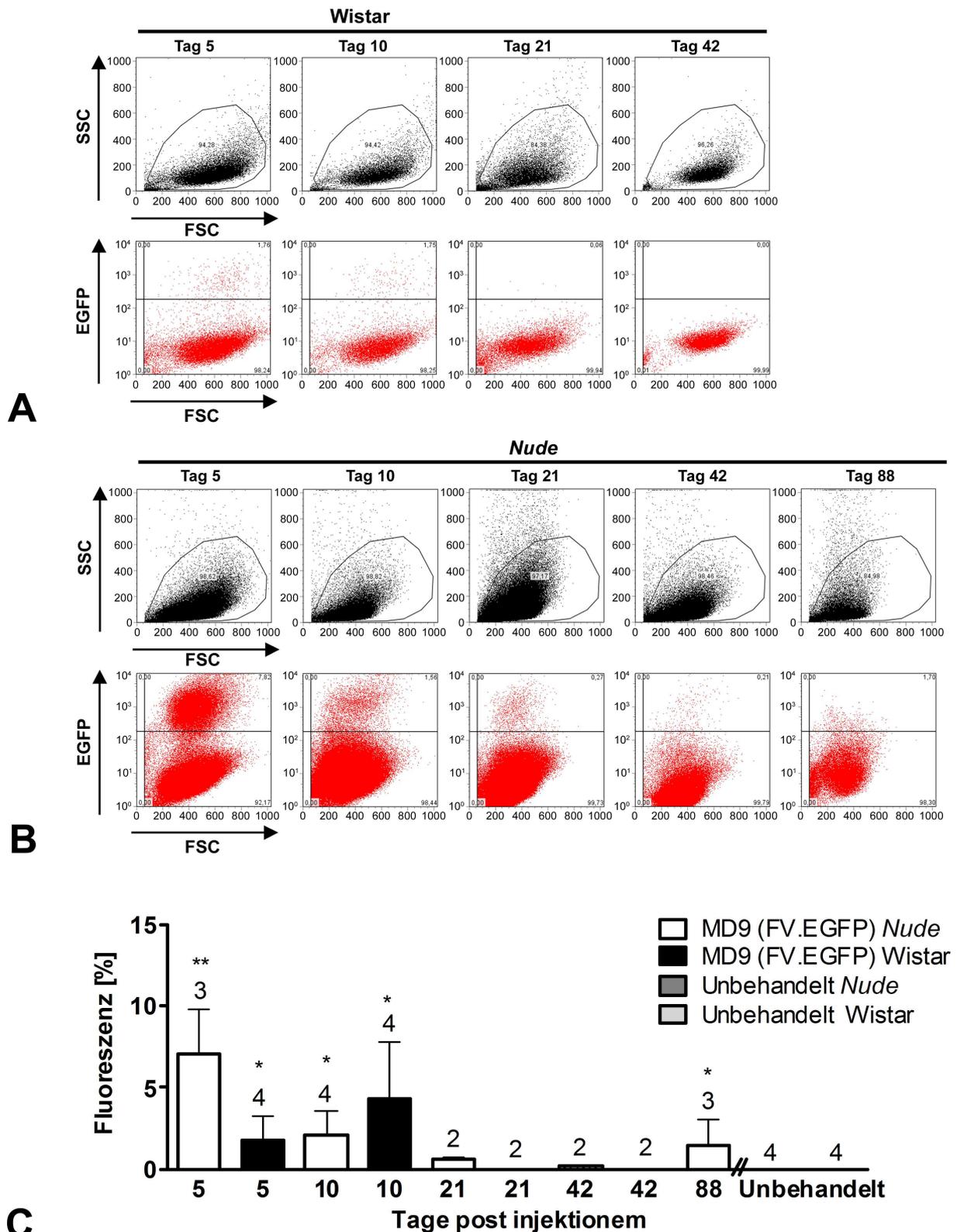


Abb. 32: Zeitverlauf der EGFP-Expression in Explantatkulturen (FV.EGFP Gruppe). Die nach Collagenaseverdau der Synovialmembranen in Kultur genommenen Zellen wurden nach Konfluenz einer 25 cm² Gewebekulturflasche abgelöst und mittels FACS auf ihre EGFP-Expression hin untersucht. (A, B) Exemplarische FACS dot *plots*. (C) FACS-Analyse der explantierten Zellen nach Konfluenz. Über den jeweiligen Balken ist die Anzahl der

untersuchten Kniegelenke angegeben. Jeweils vier Kniegelenke von unbehandelten Wistar und *nude* Ratten dienten als Kontrollen.

5.7.3 *In Vivo Expression von humanem IL1RA in Wistar Ratten*

Die Tiere wurden 5, 10, 21, 42 und im Falle der *nude* Ratten zusätzlich 88 Tage nach der i.a. Transplantation euthanasiert. In Abbildung 33 sind zunächst die Ergebnisse der hIL1RA ELISA-Messungen der Versuche mit den immunkompetenten Ratten dargestellt.

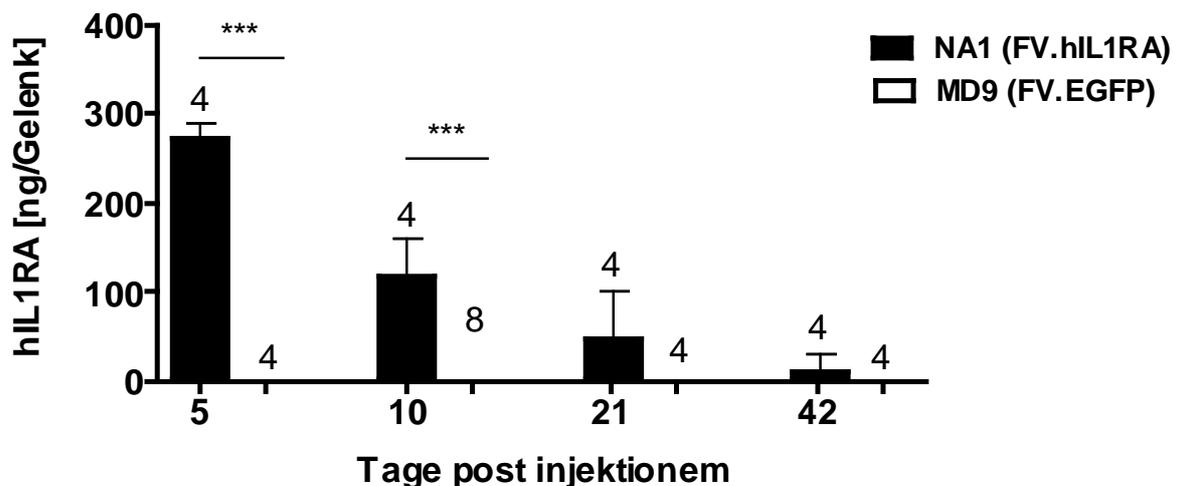


Abb. 33: Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in Wistar Ratten. Die Kniegelenke wurden an den entsprechenden Tagen post injektionem entnommen, steril geöffnet und mit exponierter Gelenksinnenfläche 24 h in Gewebekultur genommen. Die hIL1RA Mengen in den konditionierten Medien wurden mit einem spezifischen ELISA in Dreifachbestimmung gemessen. Die gemittelten Daten wurden auf das angenommene Gelenkvolumen (50 µl) bezogen (ng hIL1RA pro 50µl Gelenkflüssigkeit; des Weiteren mit ng/Gelenk bezeichnet). Neben den jeweiligen FV.hIL1RA Balken sind die korrespondierenden FV.EGFP Kontrollen angegeben. Die Anzahl der untersuchten Kniegelenke ist über den Balken angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte +SD.

Fünf Tage nach i.a. Injektion der NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten Zellen wiesen die durch die Gelenke konditionierten Medien sehr hohe hIL1RA-Mengen mit im Schnitt $272,7 \pm 17$ ng/Gelenk auf. Jedoch war ein starker Abfall der Expression im Zeitverlauf zu beobachten. Dies zeigte sich schon nach zehn Tagen mit einer niedrigeren hIL1RA-Menge von $117,8 \pm 42$ ng pro Gelenk. Nach 42 Tagen waren die Werte in zwei Gelenken mit ~ 95 ng/Gelenk vergleichbar mit den Werten von Tag 10, zwei Gelenke wiesen jedoch gar keine hIL1RA-Expression auf. An Tag 42 war nur in einem der vier analysierten Kniegelenke eine

Expression vorhanden (41,9 ng/Gelenk). In den FV.EGFP Kontrollgruppen war zu keinem Zeitpunkt eine Expression messbar. Es wurden des Weiteren vier Kniegelenke von unbehandelten Wistar Ratten (native Kontrollgruppe) in Kultur genommen, und auch in diesen Überständen war keine Expression zu verzeichnen (nicht dargestellt).

5.7.4 *In Vivo* Expression von humanem IL1RA in nude Ratten

Obwohl genbasierte Behandlungsstrategien in den letzten Jahren in verschiedenen klinischen Studien der Phase I untersucht wurden, konnte bislang die Langzeitexpression exogener Transgene in Synovialzellen *in vivo* nicht beweiskräftig gezeigt werden. In zahlreichen tierexperimentellen Studien zur RA zeigte sich, dass die Transgenexpression nur 2 - 3 Wochen andauert (Ghivizzani et al., 1998; Adriaansen et al., 2006). Eine T-zellspezifische Immunantwort scheint dabei eine Rolle für die Dauer der Transgenexpression zu spielen (Gouze et al., 2007).

Es sollte deswegen untersucht werden ob, die Transgenexpression in athymischen *nude* Ratten über einen längeren Zeitraum stabil bleibt. Dazu wurden die Tiere 5, 10, 21, 42 und 88 Tage nach i.a. Injektion von 2×10^6 EGFP-positiven Synovialfibroblasten euthanasiert und die Gelenke entnommen. Analog zu den Versuchen mit Wistar Ratten wurden ELISA-Messungen mit den Überständen der konditionierten Medien durchgeführt. Hier zeigte sich nun ein vollkommen anderes Bild, verglichen mit den Ergebnissen der Wistar Ratten. Wie in Abbildung 34 zu sehen, war die Transgenexpression über einen Zeitraum von 88 Tagen auf hohen Leveln stabil.

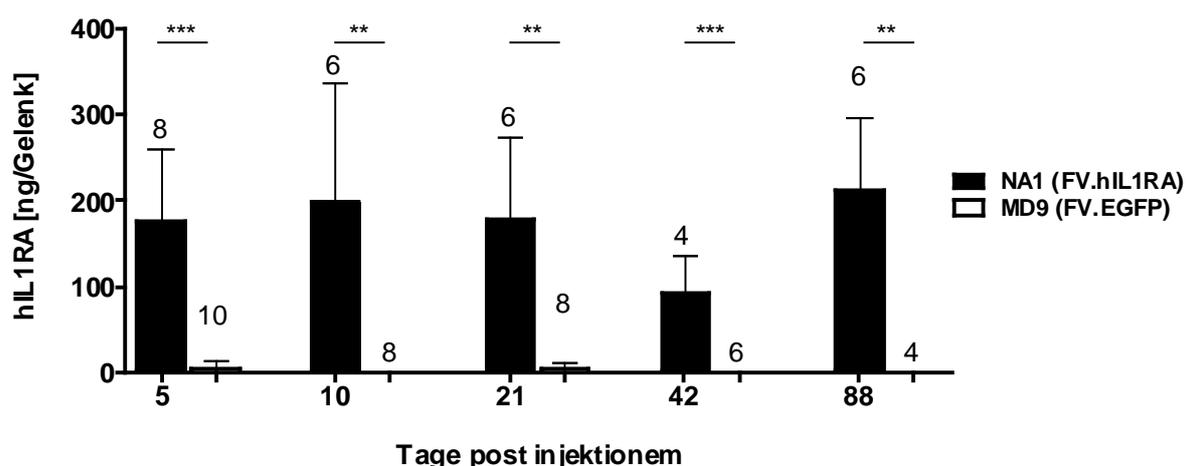


Abb. 34: Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in *nude* Ratten. Die Kniegelenke wurden an den entsprechenden Tagen post injektionem entnommen, steril geöffnet und mit exponierter Gelenksinnenfläche 24 h in Gewebekultur genommen. Die hIL1RA-Mengen in den konditionierten Medien wurden mit einem spezifischen ELISA in

Dreifachbestimmung gemessen. Die gemittelten Daten wurden auf das angenommene Gelenkvolumen (50 µl) bezogen. Neben den jeweiligen FV.hIL1RA Balken sind die korrespondierenden FV.EGFP Kontrollen angegeben. Die Anzahl der untersuchten Kniegelenke ist über den Balken angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte +SD.

Für die Zellpräparationen der FV.hIL1RA Gruppe wurden vier *nude* Spendertiere verwendet. Die Menge des von den transplantierten Zellen abgegebenen hIL1RA blieb bei den *nude* Ratten über einen langen Zeitraum relativ stabil. Die maximale Konzentration wurde am Tag zehn mit 447,3 ng/Gelenk gemessen. Die einzelnen hIL1RA-Messwerte und Daten zu den Tieren sind detailliert in Tabelle 7.1 im Anhang angegeben. Es wurden des Weiteren vier Kniegelenke von unbehandelten *nude* Tieren (native Kontrollgruppe) in Kultur genommen, auch in diesen Überständen war keine Expression zu verzeichnen (nicht dargestellt).

| Tag post injektionem | Nude Ratten | | Wistar Ratten | |
|----------------------|----------------------------|----|----------------------------|----|
| | hIL1RA MW ± SD [ng/Gelenk] | n= | hIL1RA MW ± SD [ng/Gelenk] | n= |
| 5 | 176 ± 85 | 8 | 273 ± 17 | 4 |
| 10 | 199 ± 56 | 6 | 118 ± 42 | 4 |
| 21 | 177 ± 96 | 6 | 47,6 | 4 |
| 42 | 92 ± 45 | 4 | 10,5 | 4 |
| 88 | 213 ± 85 | 6 | - | |

Tab. 6 : Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in *nude* und Wistar Ratten.

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der FV.hIL1RA Versuchstiergruppe.

In Abbildung 34 und in Tabelle 6 fallen starke Schwankungen der Messwerte der FV.hIL1RA Gruppe der *nude* Tiere auf. Um eine mögliche Korrelation zwischen den jeweiligen Messwerten und verschiedenen Spenderzellpräparationen zu untersuchen, wurden die Zellpassagen, die Prozentanteile EGFP-positiver Zellen, sowie die Spenderzellchargen zum Zeitpunkt der Transplantationen verglichen. Besonders auffällig waren dabei die Werte einer Spenderzellcharge, die vier *nude* Tieren injiziert wurde. Die Tiere wurden für Analysen der Tage 5, 10, 21 und 42 post injektionem verwendet. In der nachfolgenden Abbildung sind die mit dieser Charge erhaltenen hIL1RA-Werte dargestellt.

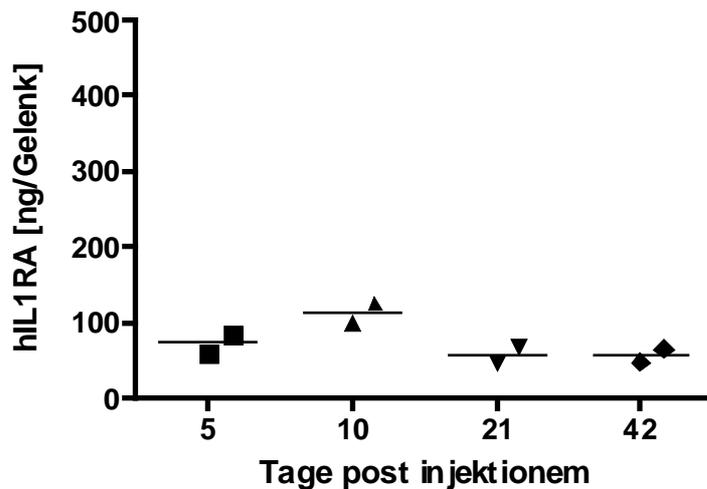


Abb. 35: Im Detail: NA1 (FV.hIL1RA) i.a. Expression einer Spenderzellcharge in *nude* Ratten. Darstellung der hIL1RA-Werte die mit einer Spenderzellcharge generiert wurden.

Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transplantation nur zu 50 % EGFP-positiv, weswegen die doppelte Menge an Zellen (vier Millionen) i.a. injiziert werden musste. Abbildung 35 zu entnehmen ist, dass die Zellcharge über den Zeitverlauf von 42 Tagen zwar niedrige Werte generierte, diese aber stabil waren. Die Schwankungen der hIL1RA-Werte der Kniegelenke scheinen also mitunter auch von der jeweiligen Spenderzellpräparation abhängig zu sein.

5.7.5 Biodistribution

Der Erfolg eines Gentherapievorhabens ist maßgeblich von der Sicherheit der verwendeten Vektoren oder den bei *ex vivo* Ansätzen verwendeten Zellen abhängig. Aus der Wundheilung ist bekannt, dass gewebständige Fibroblasten durch Chemokine und Wachstumsfaktoren in einen aktivierten Phänotyp wechseln und lokal durch das Gewebe zur geschädigten Stelle wandern (Moore et al., 2005). Lefèvre et al. haben gezeigt dass rheumatoide SF (RASf) aktiv in Richtung gesunden Knorpel migrieren (Lefèvre et al., 2009). Daher galt es den hier angewandten indirekten Gentransfer in Bezug auf den Verbleib der transplantierten Zellen genauer zu betrachten. Die Organe der Tiere, die zehn Tage post injektionem euthanasiert wurden, wurden dabei intensiv betrachtet. Es bestand die Möglichkeit, die genetisch modifizierten, i.a. injizierten Zellen, anhand des EGFP-Margergens und durch Detektion des humanen IL1RA zu identifizieren.

Bei etwaigem Vorliegen von extraartikulärem hIL1RA muss allerdings bedacht werden, dass es bei gesättigten i.a. hIL1RA-Konzentrationen auch zu einem Austritt des Proteins aus dem Gelenk kommen könnte (Gouze et al., 2002). Die Analyse von hIL1RA im Serum und in den Organen ist deswegen kein eindeutiger Hinweis für das Vorliegen einer genetisch

modifizierten Zelle. Der Nachweis von EGFP stellte deshalb den eigentlichen Nachweis für aus dem Gelenk gewanderte Zellen dar.

5.7.5.1 hIL1RA ELISA-Messung von Organkulturüberständen 10 Tage post injektionem

Zwischen 100 bis 300 mg des jeweiligen Organs wurde abgewogen, mittels Skalpell zerstückelt und in 3 ml DMEM/Ham's F12 Medium für 24 h in einer 12-Lochplatte im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Etwaige in andere Organe ausgewanderte transplantierte Zellen würden hIL1RA produzieren und in den Zellkulturüberstand sezernieren. Die so konditionierten Zellkulturüberstände wurden analog der Überstände der Kniegelenke mittels ELISA auf deren hIL1RA-Expression hin überprüft. Alle Überstände wurden bis zur ELISA-Messung bei -20°C gelagert. Jeweils 100 µl der Organkulturüberstände und das Serum wurden im ELISA in Dreifachbestimmung gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf 100 mg Organ normiert. Zusätzlich zur NA1 (FV.hIL1RA) und MD9 (FV.EGFP) Kontrollgruppe wurden konditionierte Medien von Organen unbehandelter Ratten des jeweiligen Stammes als Kontrollen mitgeführt.

In den ELISA-Messungen wurden in Leber und Niere der Wistar Ratten hIL1RA Mengen gemessen (Leber: FV.EGFP = 0,2 ng/ml, FV.hIL1RA = 0,1 ng/ml; Niere: FV.EGFP = 0,7 ng/ml, FV.hIL1RA = 0,4 ng/ml). Jedoch waren die Werte der FV.EGFP Kontrollgruppen und der unbehandelten Tiere (Leber, Niere: 0,5 und 0,7 ng/ml) höher als die der FV.hIL1RA Gruppe. Auf die Werte der unbehandelten Kontrollen bezogen, waren in den FV.hIL1RA Gruppen keine positiven Befunde mehr zu verzeichnen. Bei den *nude* Ratten fanden sich ebenfalls höhere Werte in den Nieren der Kontrolltiergruppen (FV.EGFP = 1,2 ng/ml; nativ = 1,1 ng/ml) als in der FV.hIL1RA Gruppe (FV.hIL1RA = 0,9 ng/ml). Sämtliche weiteren Organe und Seren aller Versuchstiergruppen wiesen keine positiven Werte in der ELISA-Messung auf (siehe Abb. 36 D). Des Weiteren wurden Organkulturüberstände von Tieren 88 Tage post injektionem (FV.hIL1RA Gruppe) im ELISA gemessen. Und auch hier konnte keine Expression in den *nude* und Wistar Ratten gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

5.7.5.2 FACS-Analysen von Organen

Die Zellsuspension wurde mittels FACS auf EGFP exprimierende Zellen untersucht. Organe von unbehandelten Kontrolltieren dienten als Negativkontrolle. Ubiquitär EGFP-exprimierende Sprague Dawley Ratten wurden als Positivkontrolle verwendet. In Abbildung 36 A und B sind exemplarisch für jeweils ein Tier die FACS Histogramme dargestellt.

In den FACS-Analysen der Organe der FV.hIL1RA *nude*- u. Wistargruppe und den unbehandelten Versuchsgruppen waren 10 und 88 Tage post injektionem keine EGFP-positiven Zellen in den analysierten Organen zu verzeichnen (88 Tage nicht dargestellt).

5.7.5.3 Analyse genomischer DNA 10 Tage post injektionem

Aus den nativ bei -80°C gelagerten Organen wurden auf Trockeneis ~ 30 mg aus drei verschiedenen Organarealen entnommen. Nach Proteinase K Verdau bei 56°C über Nacht wurde die genomische DNA isoliert. Nach Quantifizierung wurden 100 ng gDNA in die jeweilige PCR-Reaktion eingesetzt. Neben dem Referenzgen β -Actin als Ladekontrolle, wurden EGFP Primer verwendet. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Auch mit dieser Methode waren keine EGFP-positiven Proben zu verzeichnen (Abb. 36 C). In nachfolgender Abbildung ist zusammengefasst dargestellt, dass keine extraartikuläre Expression von EGFP oder hIL1RA mit den angewandten Methoden detektiert werden konnte.

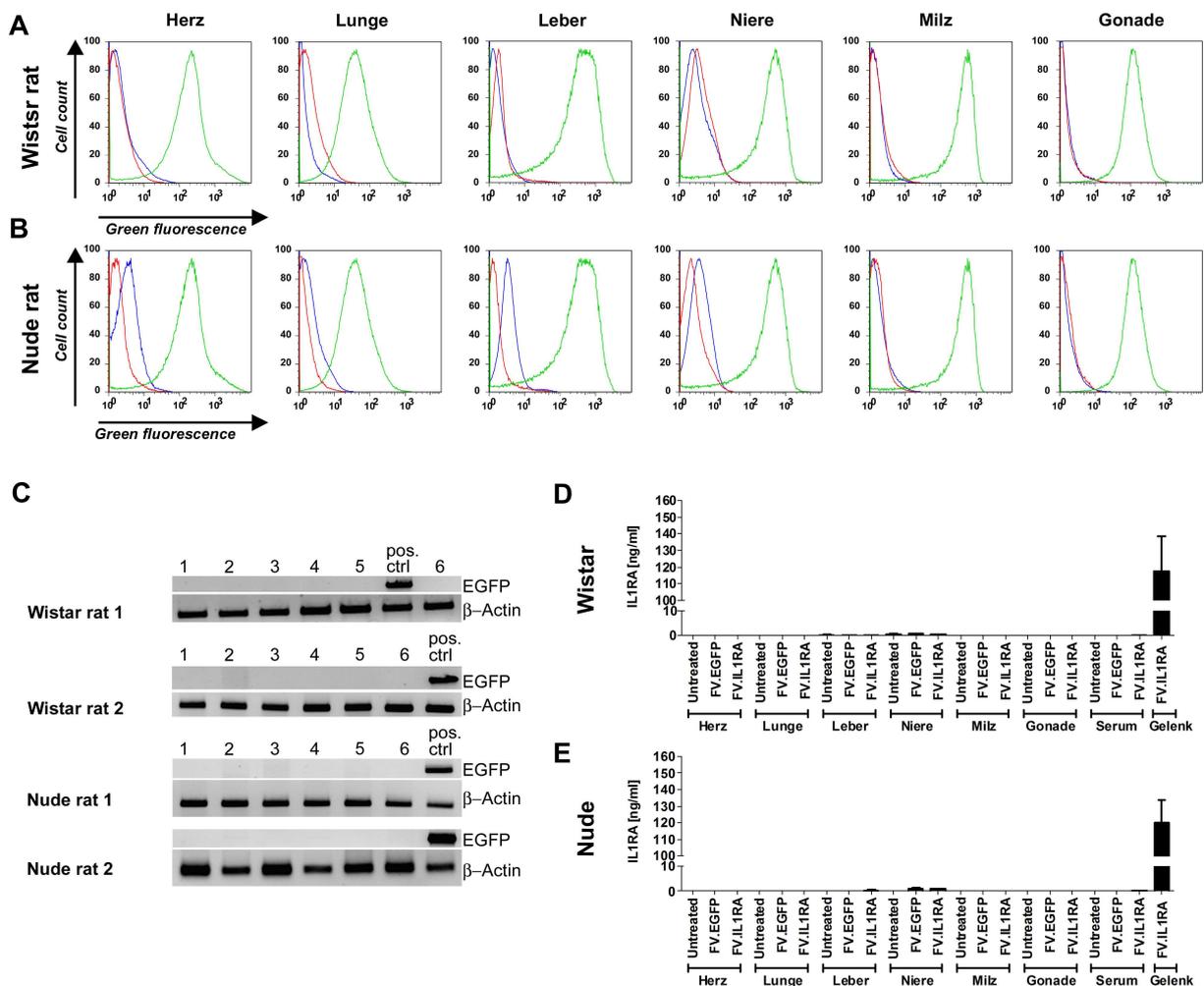


Abb. 36: Biodistribution nach foamyviral vermitteltem *ex vivo* Gentransfer in Rattenkniegelenke der FV.EGFP (A, B, C) und FV.hIL1RA (D, E) Versuchsgruppe 10 Tage post injektionem. (A, B) Dargestellt sind repräsentative FACS-Histogramme ganzer Organe. Dabei entspricht: rot = MD9 (FV.EGFP), blau = native Kontrolle, grün = EGFP Sprague Dawley Ratte). (C) PCR Analysen von genomischer DNA (1: Herz; 2: Lunge; 3: Leber; 4: Niere; 5: Milz; 6: Gonaden) der zwei Rattenstämme. Die jeweiligen Organe von zwei EGFP Sprague Dawley Ratten dienten als positiv Kontrolle. Der gesamte PCR Ansatz (EGFP spezifische Primer) wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. (D, E) Die hIL1RA Freisetzung von zerstückelten Organen (100 mg) ins Zellkulturmedium wurde nach 24 h mittels ELISA bestimmt. Die korrespondierenden Werte der Kniegelenke, der FV.hIL1RA Gruppe sind zum Vergleich dargestellt.

6 Diskussion

6.1 FVV für die Gentherapie der RA

Gentransfertechnologien ermöglichen eine kontrollierte, gezielte und andauernde Expression der Genprodukte in definierten somatischen Geweben wie bspw. den Gelenken. Sie haben das Potential Gelenkserkrankungen effektiver und kostengünstiger als herkömmliche Therapien und dabei mit weniger Nebenwirkungen zu behandeln. Die Gentherapie der Arthritis ist seit nunmehr 20 Jahren Gegenstand intensiver Forschung; neben einer immensen Anzahl präklinischer Daten gibt es aber bis zum heutigen Zeitpunkt nur eine abgeschlossene Phase II klinische Studie (Evans et al., 2009; Evans et al., 2010; Bandara et al., 1992; Mease et al., 2010). Neben den technologischen und wissenschaftlichen Anforderungen spielt der Sicherheitsaspekt - nach dem Auftreten der Leukämien mit retroviralen Vektoren - eine große Rolle auf dem Weg der Studien in die klinische Anwendung.

FVV könnten aufgrund einiger Merkmale und den daraus resultierenden Vorteilen gegenüber bestehenden Vektorsystemen, die in der GT eingesetzt werden, erfolgreich sein (Rethwilm, 2007; Rethwilm, 2010) (siehe auch 2.7.4). FVV leiten sich von apathogenen Elternviren ab und zeichnen sich durch ein vorteilhaftes Integrationsmuster in das zelluläre Genom aus (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Im Unterschied zu Lenti- und γ -Retroviren haben sie eine geringere Präferenz in transkribierte Gene oder in Promotornähe zu integrieren (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Ein mit der Integration in das zelluläre Genom einhergehendes gewisses Restrisiko wird aber wohl alleine durch ein vorteilhaftes Integrationsmuster nicht vollständig beseitigt werden können (Kustikova et al., 2007). Weitere Studien in klinisch relevanten Tiermodellen mit FVV müssen zukünftig deren genotoxisches Potential untersuchen.

Ein großer Erfolg wurde mit der Heilung der LAD in einem klinisch relevanten Großtiermodell mit FVV erzielt. Zwar zeigen Ergebnisse, die 36 bis 42 Monate nach der Behandlung erfolgten, dass die FVV u.A. auch in der Nähe von Proto-Onkogenen integrieren, dies aber nicht zwingend zu maligner Transformation führen muss (Bauer et al., 2008; Ohmine et al., 2010). Die therapierten Hunde dieser Studie zeigen bis zum heutigen Zeitpunkt keine Nebenwirkungen und auch kein *silencing* der Transgenexpression (Bauer et al., 2006; Vassilopoulos und Rethwilm, 2008; Trobridge et al., 2009; Trobridge, 2009). Resultate zur Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von über 800 Proviren, isoliert aus Blutzellen der therapierten Hunde, zeigten eine zufällige Integration und sprechen gegen einen genotoxischen Effekt der Vektorintegration (Bauer et al., 2008).

FVV haben zudem im Vergleich zu gammaretroviralen, lentiviralen und SIN-MLV-Vektoren die niedrigste Wahrscheinlichkeit andere Gene zu aktivieren. Dies wurde in einem Versuch demonstriert, der die Aktivierung eines Reportergens durch stromaufwärts liegende retrovirale Proviren untersuchte (Hendrie et al., 2008; Nienhuis et al., 2006). Das Onkogenpotential von FVV kann daher als niedrig eingestuft werden. Ferner werden FVV nicht durch humanes Serum inaktiviert und zeigen wie bereits erwähnt kein *silencing* in Langzeitanwendungen (Russell und Miller, 1996; Takeuchi et al., 1997; Bauer et al., 2008; Ohmine et al., 2010; Josephson et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2001; Vassilopoulos et al., 2003). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die foamyvirale Transduktion weniger als die orthoretrovirale Transduktion von der Zellteilung abhängig ist (Russell und Miller, 1996). Die *in situ* Transduktion des Synoviums mit retroviralen Ansätzen scheiterte bislang an der Herstellung ausreichend hoher Titer und der geringen mitotischen Aktivität der Synoviozyten im normalen Gelenk (del Vecchio et al., 2001). In der GT der RA wurden retrovirale Vektoren deshalb in indirekten Gentransferstudien mit modifizierten autologen Synovialzellen oder Hautfibroblasten eingesetzt (Makarov et al., 1996; Bandara et al., 1993). Die effiziente Transduktion sich selten teilender Zellen ist in diesem Zusammenhang ein weiterer positiver Aspekt von FVV (Hirata et al., 1996; Kiem et al., 2007; Leurs et al., 2003; Josephson et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass das FV Kapsid in ruhenden Zellen über Interaktionen mit dem Mikrotubulus-Netzwerk der Zelle zum Zentrosom transportiert wird und dort längere Zeit bis zur Zellteilung verharren kann (Patton et al., 2004; Trobridge und Russell, 2004; Lehmann-Che et al. 2007). Dies könnte für eine direkte i.a. Injektion von FVV, in Anbetracht der zellulären Dynamik von artikulärem Gewebe, von Vorteil sein.

Interessanterweise konnten Kim et al. synergistische Effekte, mit dem gemeinsamen i.a. Transfer mehrerer anti-entzündlicher Gene, in arthritischen Kaninchengelenken erzielen (Kim et al., 2002b). Die Kombination mehrerer Expressionskassetten für therapeutische Transgene scheint demnach sehr vielversprechend. Die sehr hohe Verpackungskapazität von FVV für heterologe Sequenzen (Rethwilm, 1995; Heinkelein et al., 2002; Trobridge et al., 2002a) könnte in diesem Zusammenhang für die Anwendung mehrerer Therapiestrategien (z.B. IL1RA und TNF- α Antagonisten) von großem Nutzen sein. Die Kombination von sechs Transgenen (4 anti-HIV Transgene, MGMT und EGFP) wurde bereits in einem FVV realisiert, die Expression und Funktionalität von fünf der Transgene konnte dabei nachgewiesen werden (Kiem et al., 2010).

Die klinische Anwendung der i.a. Gentherapie ist maßgeblich von Vektoren abhängig, die einen effizienten Gentransfer und eine stabile Transgenexpression gewährleisten können. Angesichts der hier aufgeführten Aspekte von FVV erscheint deren Etablierung als

Alternative zu den gebräuchlicheren orthoretroviralen Vektoren - sowohl für direkte als auch für indirekte Strategien - als sehr sinnvoll.

Das vorliegende Projekt zielt auf die Entwicklung eines indirekten Gentransferansatzes zur Arthritistherapie mit FVV. In dieser Arbeit wurden FVV generiert, welche die cDNA des IL1RA und ein Markergen exprimieren. Nach eingehender *in vitro* Charakterisierung, wurden im zweiten Teil der Arbeit zellbasierte Versuche *in vivo* mit Wistar und Nacktratten durchgeführt (siehe 5.6 und 5.7) (Zachos et al., 2007).

6.2 *In vitro* Charakterisierung und Aufbau der Foamyviralen Vektorkonstrukte

Für eine direkte gentherapeutische Anwendung eines Vektorsystems werden für die meisten Anwendungen hohe Vektortiter ($\sim 10^8$ IU/ml) benötigt. Zudem sollten große Mengen des Vektors mit geringem Kostenaufwand im kommerziellen Maßstab produzierbar sein. Aufgrund ihrer Hülle, deren Unversehrtheit für die Infektion zwingend notwendig ist, sind Retroviren besonders anfällig für physikalische Einwirkungen wie bspw. Einfrierprozesse oder Zentrifugation. Mit dem Hüllprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) können retrovirale Partikel pseudotypisiert werden (Burns et al., 1993). Neben dem breiten Wirtstropismus bringt dies zudem den Vorteil, dass die Partikel an Stabilität gewinnen und ultrazentrifugiert werden können (Akkinä et al., 1996; Yamada et al., 2003). Versuche, FV mit VSV-G Env zu pseudotypisieren, scheiterten jedoch, bzw. waren mit einem erheblichen Verlust der Transduktionseffizienzen verbunden (Pietschmann et al., 1999; Mergia und Heinkelein, 2003; Rethwilm, 2007). Es besteht neben der Ultrafiltration (Porengröße 100 kDa) noch die Möglichkeit der Aufkonzentrierung foamyviraler Vektoren mittels Zentrifugation (Hill et al., 1999; Wu und Mergia, 1999). So konnten FVV um den Faktor 100 ohne einen Verlust der Infektiosität aufkonzentriert werden (Trobridge et al., 2002b). In dieser Arbeit wurde die Spin-Konzentrierung (12.000 g, 4°C, 2 h) verwendet um Vektoren umzupuffern, damit die Transduktion der Zielzellen in unverbrauchtem, Zelltyp-spezifischem Medium erfolgen konnte. Zudem konnte so eine Konzentrierung der Vektoren erzielt werden (siehe 5.1). Exemplarisch ist dies für den MD9 (FV.EGFP) Vektor in Abb. 8 dargestellt, bei dem eine Konzentrierung um den Faktor 26 erreicht werden konnte.

Bicistronische FVV mit der Sequenz für den IL1RA und EGFP (-IL1RA-IRES-EGFP-) wurden generiert und zunächst *in vitro* charakterisiert (siehe 5.5 und 5.6). IRES-Elemente sind in der Lage die Translation an internen Stellen zu starten und die sonst für die eukaryotische Translationsinitiation notwendige Cap-Struktur funktionell zu ersetzen (Pelletier und Sonenberg, 1988). Die in dieser Arbeit verwendete EMCV-IRES benötigt zur Bindung der

40S-ribosomalen Untereinheit alle eukaryoten Initiationsfaktoren (eIFs) bis auf das Cap-Bindeprotein eIF4E (Chen und Sarnow, 1995; Pestova et al., 1996).

Während die Translation des IL1RA von der 5'-CAP Struktur der mRNA initialisiert wurde, erfolgte dies beim EGFP durch die IRES. Hierbei war eine geringere Expressionsrate des zweiten Cistron (EGFP) im Vergleich zur EGFP-Expression des MD9 (FV.EGFP) Vektor zu verzeichnen. Fluoreszenzaufnahmen und FACS-Analysen verschiedener Zellen drei Tage nach Transduktion verdeutlichen dies (siehe 5.6, Abb. 10 und 5.6.1, Abb.19 A, B).

In diesem Zusammenhang wurde bereits mehrfach beschrieben, dass die durch die IRES vermittelte Translation des zweiten Cistrons in vielen Fällen ineffektiv ist (~ 20-50 % Prozent verglichen mit dem ersten Cistron) (Zhu et al., 1999; Mizuguchi et al., 2000). Es gibt jedoch auch Arbeiten in denen beide Gene eine ähnlich hohe Aktivität aufweisen (Suzuki et al., 1998). Die verwendeten Gene, deren Reihenfolge und die verwendete Zelllinie scheinen dabei eine Rolle zu spielen (Borman et al., 1997)

Die Sequenzhomologie zwischen dem humanen IL1RA und dem der Ratte beträgt 75 % (Eisenberg et al., 1991). Ein FVV, der den IL1RA der Ratte und das Markergen EGFP exprimiert, wurde kloniert, um *in vitro* und ggf. *in vivo* zu analysieren, ob eine längere Expression mit dem speziesspezifischen Transgen erreicht werden kann. Anhand der EGFP-Expression konnte die Transduzierbarkeit primärer Ratten Synovialzellen mit dem Vektor NA2 (FV.*rat*IL1RA) gezeigt werden. Die Menge an sezerniertem IL1RA-Protein war allerdings zu gering (im Mittel 0,4 ng/ml), um für die Tierversuche relevant zu sein (siehe 5.5, Abb.13). Aufgrund des sehr hohen Hintergrundes (im Mittel 3,5 ng/ml), den die nativen Rattenkniegelenke in der ELISA-Messung verursachten (endogene IL1RA-Expression), wurden die niedrigen Expressionslevel der NA2 (FV.*rat*IL1RA) transduzierten Synovialfibroblasten nicht näher untersucht. Bislang unklar bleibt auch die Ursache für die hohe endogene IL1RA-Expression im nativen Gelenk. Interessanterweise sind keine gentherapeutischen RA-Studien an Ratten mit der speziesspezifischen Isoform beschrieben. Da weiterhin der Einsatz eines Markergens erforderlich war und hier das artfremde EGFP verwendet wurde, wurden die Tierversuche mit dem humanen IL1RA durchgeführt. Zudem besteht das Fernziel in der Etablierung und Evaluierung eines Gentransfersystems, welches die Applikation am Menschen erlaubt.

Die cDNA des hIL1RA wurde erfolgreich als anti-inflammatorisches therapeutisches Transgen in zahlreichen arthritischen Tiermodellen und in klinischen Studien am Menschen eingesetzt (siehe 2.6) (Evans et al., 2005; Wehling et al., 2009b).

Die Transgenexpression wurde in dieser Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie (EGFP), Durchflusszytometrie (EGFP), *realtime* PCR (hIL1RA) und ELISA (IL1RA) evaluiert (siehe

5.6), und die Funktionalität des hIL1RA Protein in einem PGE₂ Assay demonstriert (siehe 5.6.2).

Gouze et al. haben bereits 2003 gezeigt, dass die rekombinante Form des IL1RA (Kineret®) dem Kulturmedium zugesetztes IL1β weniger effektiv inhibiert als die durch Gentransfer vermittelte konstitutive IL1RA-Expression. Neben der kontinuierlichen Produktion an IL1RA bringt der Gentransfer den Vorteil, dass das produzierte IL1RA der posttranslationalen Prozessierung unterzogen wird, während die rekombinante Form keine Glykosylierung und am Aminoterminus einen zusätzlichen Methioninrest aufweist. Für die Versuche verwendeten Gouze et al. primäre humane Synovialzellen von Osteoarthritispatienten. Das von diesen Zellen in Reaktion auf die IL1β-Gabe sezernierte PGE₂ wurde in den Zellkulturüberständen gemessen. Das rekombinante IL1RA wurde den Zellen einmalig zugesetzt, während man für die konstitutive IL1RA-Expression die Linie HIG-82-IL1Ra⁺ mittels retroviralem Gentransfer entwickelte (Georgescu et al., 1988). Die HIG-82 Zelllinie [aus peri-artikulärem Weichgewebe (Kaninchen)] wurde verwendet, da sie bei IL1β-Gabe kein PGE₂ bildet. *In vivo* werden Agenzien, die ins Gelenk injiziert wurden, je nach Größe und Löslichkeit in weniger als 30 min beseitigt (Owen et al., 1994) (siehe auch 2.1.2). Dieser dynamische Prozess wurde von Gouze et al. durch Medienwechsel simuliert. Um eine chronische Situation mit ständiger IL1β-Produktion, wie sie sich im rheumatischen Gelenk darstellt, nachzuahmen, wurden dermale konstitutiv IL1β exprimierende Ratten Fibroblasten verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Funktionalitätsprüfung des hIL1RA die humane Tert-4 Stammzelllinie verwendet (siehe 5.6.2, Abb. 20). In Kinetikexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Produktion von PGE₂ 48 h nach IL1β Gabe ein Maximum erreicht (Gouze et al., 2003b). Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, um die Überstände zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass die foamyviral vermittelte hIL1RA-Expression die PGE₂-Sekretion der Zellen, im Gegensatz zu den MD9 (FV.EGFP) transduzierten Kontrollen, signifikant niedrig halten konnte. Die einmalige Gabe von 10 ng/ml an rekombinanten IL1β konnte erfolgreich antagonisiert werden. Mit im Mittel 386 pg/ml PGE₂ wurde eine Inhibierung um 86 % im Gegensatz zu den Kontrollen erzielt, welche im Mittel 2849 pg/ml PGE₂ sezernierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das von den NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten Tert-4 Zellen sezernierte hIL1RA funktional ist.

Die hIL1RA-Menge in den Ansätzen wurde parallel mittels ELISA bestimmt, die IL1RA : IL1β Ratio betrug dabei 3,3 : 1 (Abb. 20). Dies ist erstaunlich, wegen des beschriebenen 10- bis 100-fach molaren Überschusses an IL1RA, der aufgrund des *spare receptor* Effektes des IL1R benötigt wird, um die Effekte des IL1β zu inhibieren (Seckinger et al., 1990; Arend und Gabay, 2000). In der Veröffentlichung von Gouze et al. konnten 50 % bzw. eine komplette Inhibierung der PGE₂-Produktion mit einer Ratio von 46 : 1 bzw. 160 : 1 erzielt werden. Eine

mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass bei den ELISA-Messungen dieses Versuchs (siehe 5.6.2) keine Verdünnung der Zellkulturüberstände vorgenommen wurden. Da die ermittelten hIL1RA-Werte sehr hoch waren, könnte eine sehr viel höhere IL1RA-Menge in den Ansätzen vorgelegen haben als tatsächlich gemessen wurde. Ebenso können Unterschiede aufgrund der verwendeten Zellen möglich sein (Tert-4 Stammzelllinie vs. primäre humane Synovialzellen).

Für die Genexpression der FVV wird u.A. aufgrund der deletierten viralen LTR ein interner Promoter benötigt. Hierfür können virale (z.B. SFFV-U3) oder zelluläre Promotoren, wie z.B. EF-1 α , verwendet werden (Weber und Cannon, 2007). Der Wahl des optimalen internen Promoters liegt dabei eine Balance zwischen einem eventuell ungenügenden Gentherapieerfolg und einer möglichen Insertionsmutagenese zugrunde, da mit Verwendung starker Promotoren das Risiko der Transaktivierung zellulärer Gene steigt (Flasshove et al., 2000). Einige Daten belegen dabei, dass die Deregulation *in vivo* weniger mit der transkriptionellen Aktivität des Promoters, als vielmehr mit der Präsenz starker *enhancer* Elemente korreliert (Robert-Richard et al., 2007). Dass Reporterassays alleine nicht ausreichend sind, um das Transformationspotential eines Vektors auszumachen, zeigten Zychlinski et al. 2008. Die in einem Transfektionsassay ermittelte schwache *enhancer* Aktivität eines gammaretroviralen Vektors (SIN) mit SFFV Promoter stand dabei in scharfen Kontrast zum hohen Transformationspotential, das in einem *replating assay* ermittelt wurde (verwendet wurden murine HSZ). In der Veröffentlichung wurde ebenso gezeigt, dass die zwei gut charakterisierten zellulären Promotoren, EF-1 α (kurze Form; 250 bp) und PGK, ein geringeres Potential als der vom SFFV abgeleitete virale Promoter haben, benachbarte Promotoren und Proto-Onkogene (*Evi1*) zu aktivieren (Montini et al., 2006). Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der SFFV-U3 Promotor mehr und dichter gepackte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besitzt als der zelluläre EF-1 α Promotor (Zychlinski et al. 2008). Die Wahl eines geeigneten Promoters hängt auch mit der Art der Erkrankung zusammen und ist individuell für jede Anwendung zu finden. Dies zeigen in diesem Zusammenhang die aktuellen Ergebnisse der foamyviralen LAD-Studie am Großtiermodell (CLAD) (siehe 2.7.4). Mit Verwendung foamyviraler Vektoren, die anstelle des viralen MSCV Promoter der initialen Studie den schwächeren zellulären PGK Promotor tragen, konnte keine Heilung der Hunde erzielt werden (Kiem et al., 2007; Bauer et al., 2008; Bauer et al., 2011).

In tierexperimentellen Studien zur RA wurden zudem sich selbst regulierende Konstrukte verwendet, in denen das therapeutische Transgen unter der transkriptionellen Kontrolle eines induzierbaren Promoters stand, welcher auf entzündliche Signale reagierte (Miagkov et

al., 2002). Eine Vielzahl solcher Systeme wurde bisher entwickelt, bei denen bspw. der IL1 und IL6 Promoter, sowie NF- κ B *response* Elemente verwendet wurden. Eine weitere Möglichkeit ist der Gebrauch externer Agenzien, wie z.B. Doxycyclin, um die Transgenexpression zu regulieren (van de Loo et al., 2004a, Adriaansen et al., 2007).

Van de Loo et al. konnten eine stabile Luciferase-Expression über 90 Tage hinweg mit einem Hybridpromoter (IL1*enhancer*/IL6 *proximal*, (IL1E/IL6P)) in einem murinen Kollagen-induzierten Arthritismodell erzielen (van de Loo et al., 2004a). Mit adenoviralem IL4 Gentransfer wurde der IL1E/IL6P Hybridpromoter näher charakterisiert. Da der Gentransfer von IL4 im nativen Knie ungünstige inflammatorische Nebeneffekte mit sich bringt, wurde analysiert, ob der Einsatz von IL4 mit einem krankheitsregulierten Promoter möglich ist. Dabei zeigte sich, dass mit einem konstitutiv aktiven viralen Promoter massive Gelenkentzündungen in nativen Mäusen hervorgerufen werden, wohingegen mit dem krankheitsregulierten (IL1E/IL6P) Promotor nur eine marginale Entzündung zu verzeichnen war. Der Hybridpromotor sprach auf eine Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine *in vitro* sowie *in vivo* an (Zymosan und SCW-induzierte Gelenkentzündung) und generierte in den arthritischen Mäusegelenken IL4-Level, die in der Lage waren, Knorpel- und Knochenerosionen zu verhindern (Van de Loo et al., 2004b; Geurts et al., 2007).

Mit vergleichenden Motivanalysen von Expressionsprofilen normaler und rheumatischer Gelenkinnenhäute konnten zudem Promotoren ausgemacht werden, die bei der RA hochreguliert sind (Geurts et al., 2009). Mit einem Algorithmus wurden mögliche funktionelle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Eine Vielzahl an Kandidaten konnte so ermittelt werden, wobei *in vitro* (humane SF und murine Zellen) letztlich neun in lentivirale (SIN) Vektoren klonierte computerermittelte Promoterregionen mit Zytokinen induziert werden konnten. Der *serum amyloid A3* (Saa3) Promoter zeigte dabei die stärkste Induktion und wurde für *in vivo* Versuche (Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis) zur Expression von IL1RA verwendet, in denen die Effizienz des Vektors gezeigt werden konnte (Geurts et al., 2009). Eine feinabgestimmte und restriktierte Abgabe der therapeutischen Transgene könnte demnach mit krankheitsregulierten Promotoren bewerkstelligt werden. Ferner führte die Hypothese - zelluläre Promotoren könnten weniger anfällig für ein *silencing* sein und daher Expressionen über einen langen Zeitraum im Synovium gewährleisten - (Gouze et al., 2002; Watanabe et al., 2000) zur Klonierung von pNA4, einem FVV bei dem EGFP unter der Kontrolle eines zellulären Promoters steht (EF-1 α) (siehe 5.3). Der EF-1 α Promoter vermittelt sehr hohe Transgenexpressionen in zahlreichen Zelltypen (Kim et al., 1990; Wakabayashi-Ito und Nagata, 1994; Qin et al., 2010). Um die Eignung des Vektors für die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche zu ermitteln, wurde der Vektor zunächst *in vitro* mit den foamyviralen Vektoren MD9 (SFFV-U3 Promoter) und KG84 (CMV Promoter) verglichen. Dabei zeigten sich niedrigere Transduktionsraten bzw. höhere CCID₅₀ Werte bei

der EF-1 α vermittelten EGFP-Expression (siehe 5.3, Abb. 9). Für die tierexperimentellen Arbeiten sollte ein starker Promoter zum Einsatz kommen, da die i.a. transplantierten Zellen nach Versuchsende erneut anhand ihrer EGFP-Expression detektiert werden sollten. Deshalb wurde der starke SFFV-U3 Promoter für die Tierversuche gewählt. Unterstützt wurde diese Wahl auch durch die sich bei der *in vitro* Charakterisierung abzeichnende Abschwächung der Markergenexpression durch die IRES Sequenz im therapeutischen FVV (siehe 5.6, Abb. 14).

Des Weiteren steht zukünftig ein pTW01 basierter FVV (JK1) zur Verfügung, bei dem mCherry als Fusionsprotein zusammen mit der autokatalytischen aktiven 2A-Protease des Maul- und Klauenseuche-Virus (*Foot-and-Mouth disease virus*, FMDV-2A) vor das Gen für hIL1RA inseriert wurde (JK1: -SFFV-U3-mcherry2A-hIL1RA-) (Diplomarbeit Jennifer Krieg). Bei der FMDV-2A-Protease handelt es sich um ein 16 Aminosäuren umfassendes autonomes Element, welches kotranslational die autoproteolytische Spaltung an ihrem eigenen C-terminalen Ende katalysiert (Ryan et al., 1991). Das JK1 Plasmid ist mit 7854 bp um 3225 bp verkürzt gegenüber dem NA1 Plasmid (11079 bp). Es ist das Ziel, virale Sequenzen der FVV zu minimieren, um ihre Sicherheit für die Anwendung in der Gentherapie zu erhöhen (Trobridge et al., 2002a; Wiktorowicz et al., 2009).

6.3 Zellbasierter foamyviral vermittelter Gentransfer in Rattenkniegelenke

Aufgrund der unklaren Langzeitverträglichkeit bzw. dem Nebenwirkungspotential und der Optimierung von Therapieansätzen, sind Erkenntnisse aus Tiermodellen essentiell für die Beurteilung von Gentherapiestrategien. Im Bereich der Onkologie sowie bei Organ- und Zelltransplantationen wurden vermehrt athymische Mutanten als Tiermodelle eingesetzt (Grinnemo et al., 2004). 1953 hat man eine Mutation im *Rowett Research Institute* in England entdeckt, welche einen athymischen haarlosen Rattenphänotyp hervorbrachte. Die Mutation wurde aber nicht isoliert, da man die Immundefizienz der Tiere anfangs nicht erkannte. Das erneute Auftreten der Mutation in derselben Auszuchtkolonie, zwei Jahrzehnte später, legte die Vermutung nahe, dass die Mutation in der Rattenkolonie autosomal rezessiv vererbt wurde (Festing et al., 1978). Die Tiere wurden als *Rowett nude rats* (rnu) benannt (Festing et al., 1978) und sind durch einen sehr schwach ausgeprägten wechselnden Haarbesatz gekennzeichnet. Im Vergleich zum Durchschnittsgewicht von heterozygoten Tieren sind die Nacktratten ca. 20 % leichter und haben unter konventionellen Haltungsbedingungen eine Lebenserwartung von etwa neun Monaten (Schuurman et al., 1992). Immunologisch wird die Nacktmutation begleitet von einer Aplasie des Thymus,

welcher nur in einer rudimentären Form ohne Lymphozytenpopulationen existiert (Rolstad, 2001). Folglich resultiert die kongenitale Abwesenheit des Thymus in einer hochgradig defizienten zellvermittelten Immunantwort. Das Fehlen der T-Zellfunktionen wurde durch die Akzeptanz von *allo*- und *xenograft* Transplantaten demonstriert (Davies et al., 1983).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transduktion mit dem Vektor NA1 (FV.hIL1RA) zu einer spezifischen und signifikanten Menge an hIL1RA Protein in den HT1080, Tert-4 und primären MSZ drei Tage nach Transduktion führt (~ 100 ng/ml) (siehe 5.6, Abb. 16). Die Höhe der *in vitro* hIL1RA-Transgenexpression war dabei vergleichbar mit den Werten, die mit lenti- und adenoviralen Vektoren erreicht wurden und um ein vielfaches (~ 100) höher, als die mit AAV-Vektoren erzielten Werte (siehe 5.6.1, Abb. 19) (Gouze et al., 2003a; Ghivizzani et al., 1998; Kay et al., 2009). Ebenso konnte nach Evaluierung der Synovialmembranpräparation aus Rattenkniegelenken und anschließender Isolierung der Synovialfibroblasten, deren erfolgreiche Transduktion mit NA1 (FV.hIL1RA) und MD9 (FV.EGFP) *in vitro* gezeigt werden (siehe Abb. 19 und 30). Nach Zellsortierung waren die Zellen weiterhin teilungsfähig und zeigten keine morphologischen Veränderungen oder Anzeichen von Seneszenz. In ELISA-Messungen vor den Transplantationen produzierten eine Millionen Zellen (in 20 ml Medium) im Mittel ~ 100 ng/ml hIL1RA (Wistar SF: 91 ± 8 ng/ml; Nude SF 105 ± 4 ng/ml; Daten nicht gezeigt).

Die RA ist durch eine variable Krankheitsaktivität gekennzeichnet, wobei das spontane Nachlassen und Wiederaufflammen der Gelenkentzündung bei einer medikamentösen Behandlung aber nur schwer berücksichtigt werden kann (van de Loo, 2004; van de Loo et al., 2004b). Der Transfer des therapeutischen Transgens in das arthritische Gelenk hat den Vorteil einer kontinuierlichen Produktion und zellulären Modifizierung der Transgenprodukte (Glykosylierung) (Traister und Hirsch, 2008). Die stabile Langzeitexpression im Gelenk stellt dabei eines der wichtigsten Leistungsmerkmale in der RA Gentherapie dar. Das *in vivo silencing*, hervorgerufen durch die Methylierung von CpG Motiven (Brooks et al., 2004), durch Histon Modifikationen (Mutskov und Felsenfeld, 2004), durch Zytokin-vermitteltes Promoter *silencing* (Sung et al., 2001) oder durch die immunvermittelten Beseitigung der transduzierten Zellen (Elkon et al., 1997, Zhang et al., 1998; Lutzko et al., 1999), stellt eines der größten Probleme von gentherapeutischen Studien der RA im Tiermodell dar.

Mit scAAV (*self complementary AAV*) vermitteltem direktem Gentransfer führten Kay et al. 2009 Versuche mit Kaninchen durch. Dabei konnten *in vitro* mit der höchsten viralen Dosis von 10^5 Partikel / Zelle, nur hIL1RA-Mengen im pg Bereich erzielt werden (artikuläre Kaninchenfibroblasten). In normalen und arthritischen Kaninchengelenken konnten im Schnitt ~ 1 ng/ml hIL1RA in der Lavageflüssigkeit über einen Zeitraum von drei Wochen detektiert werden (Kay et al., 2009). Mit einem zweiten inflammatorischen Stimulus wurde versucht, die Expression nach Abklingen wiederherzustellen, wie es bereits in Studien von

Pan et al. gezeigt werden konnte (Pan et al., 1999). Dies gelang jedoch nicht. Auch eine zweite AAV.hIL1RA Injektion führte zu keinen detektierbaren hIL1RA-Mengen in der Lavageflüssigkeit.

Erste Versuche mit direktem lentiviralem intraartikulären Gentransfer zeigten, dass mit immunkompetenten Wistar Ratten, bei Verwendung nicht homologer Transgene (hIL1RA), eine Expressionsdauer von ~ 21 Tagen im Gelenk erreicht werden kann (Gouze et al., 2002). Die Werte die dabei an Tag fünf erreicht wurden, sind mit ~ 81 ng/ml bei den Wistar Ratten sehr hoch; die Transgenexpression war jedoch bereits an Tag 10 um 85 % erniedrigt. In athymischen *nude* Ratten wurden zu Beginn ähnlich hohe Werte gemessen, der Verlust der Transgenexpression hingegen war nicht so rapide, und selbst nach 42 Tagen konnten noch 15 ng/ml IL1RA nachgewiesen werden (Gouze et al., 2002). Die Arbeitsgruppe konnte die Ergebnisse 2007 mit lenti- und adenoviralen Vektoren bestätigen. Die Dauer der Expression in immundefizienten Ratten konnte stabil über einen Zeitraum von 168 Tagen mit 1/5 der maximalen Anfangsexpression aufrechterhalten werden. Das Maximum der Expression wurde nach fünf Tagen post injektionem mit ca. 58 ng/ml erreicht, die Expression sank mit der Zeit und lag ab Tag 42 stabil zwischen 3 - 15 ng/ml (Gouze et al., 2007). In Wistar Ratten war die Expression von hIL1RA sowohl mit lenti- als auch adenoviralen Vektoren anfänglich (fünf Tage nach Injektion) ebenfalls hoch, bewegte sich jedoch nach drei Wochen im Bereich der Hintergrundexpression der Kontrollen. Die Umgehung der Immunantwort des Empfängertieres scheint demnach eine maßgebliche Rolle bei der Langzeitexpression zu spielen. Weiterhin waren Zellen, die zu einem späten Zeitpunkt des Versuchs aus den Gelenken isoliert und auf die Anwesenheit des Markergens mittels FACS analysiert wurden, im Gegensatz zu den früheren Analysezeitpunkten größer und führten zu der Hypothese dass zwei Subpopulationen an Zellen im Kniegelenk der Ratten transduziert wurden. Demnach gab es eine transient vorhandene Population mit einer Halbwertszeit von weniger als 21 Tagen, die 75 % der initial transduzierten Zellen ausmachten, und eine weitere langlebigere Zellpopulation, die 25 Prozent der transduzierten Zellen stellte, und ~ 20 Prozent der anfänglichen Expression über den längeren Zeitraum hin gestattete. Weitere Versuche konnten die stabil exprimierenden Fibroblasten den Ligamenten, Sehnen und der Gelenkkapsel zuordnen. Diese langlebigeren Subpopulationen müssen weiter gründlich untersucht werden, da bisher der Grund für deren Fortbestehen im Gelenk nicht bekannt ist. Die Veröffentlichung rückte die zelluläre Dynamik des artikulären Gewebes in ein neues Licht und zeigte, dass der Zellumsatz und die Immunreaktivität eine Schlüsselposition in der i.a. Langzeitexpression einzunehmen scheinen.

Da auch eine T-zellspezifische Immunantwort gegen virale und nicht-homologe Proteine vermutlich eine Rolle für das Fortbestehen der Transgenexpression spielt, erforderten die i.a.

Transplantationen der foamyviral transduzierten Synovialzellen aufgrund der Verwendung artfremder Transgene (humanes IL1RA und EGFP), die Verwendung von athymischen Nacktratten. Nach Präparation der Synovialzellen aus Spendertieren, foamyviraler Transduktion, Zellsortierung (EGFP) und i.a. Injektion, war zunächst das Ziel, die Zellen nach Versuchsende erneut detektieren zu können (siehe 5.7.2). Dabei war der Verlust an EGFP-positiven Zellen nach 21 Tagen, wie erwartet bei den Wistar Tieren früher zu verzeichnen als bei den *nude* Ratten. Auch in den *nude* Gelenken war eine Abnahme EGFP-positiver Zellen zu beobachten (Maximalwerte: Tag 21: 0,7 %; Tag 42: 0,2 %), allerdings konnten nach 88 Tagen noch bis zu 2,6 % EGFP-positive Zellen isoliert werden. Zudem wurden die Gelenke für eine hIL1RA-Expressionsanalyse geöffnet und nach 24 h in Gewebekultur die konditionierten Medien untersucht. Nach Präparation der Synovialmembran sowie der Gelenkinnenflächen und anschließendem 24-stündigem Collagenaseverdau dieser Gelenke, zeigte sich jedoch ein zunehmender Vitalitätsverlust mit Absterben und fehlendem Anwachsen der Zellen. Es war demnach nicht möglich, Gelenke, die für eine quantitative hIL1RA-Expressionsanalyse herangezogen wurden, zugleich mittels FACS zu untersuchen. Aufgrund der daraus resultierenden geringen Anzahl der untersuchten Kniegelenke sei die EGFP-Analyse im Zeitverlauf als Tendenz zu sehen, welche die in dieser Arbeit erhaltenen i.a. hIL1RA ELISA-Daten in ihrer Aussage unterstreicht (siehe 5.7.3 und 5.7.4).

Neben der EGFP-Expression konnte in dieser Arbeit auch die foamyviral vermittelte i.a. hIL1RA-Expression für die Dauer von 21 Tagen in immunkompetenten Wistar Ratten und über 88 Tage in *nude* Ratten erzielt werden. Die Ergebnisse stimmen dabei, in Hinsicht auf die Dauer der Transgenexpression in den beiden verwendeten Rattenstämmen, mit den publizierten lenti- und adenoviralen Vektorstudien überein (Gouze et al., 2007).

Um die Höhe der Transgenexpression mit Studien anderer Vektorsysteme zu vergleichen, muss berücksichtigt werden, dass die ermittelten hIL1RA-Werte auf das angenommene Gelenkvolumen der Ratten zurückgerechnet und in ng pro 50µl Gelenkflüssigkeit („ng/Gelenk“) angegeben wurden (siehe Anhang 7.1 für detaillierte ng/ml Angaben).

Mit direktem lenti- und adenoviralem Gentransfer wurden sehr hohe i.a. hIL1RA-Werte an Tag 5 und 10 nach Injektion publiziert (Gouze et al., 2007). Die FVV Daten beider Rattenstämme sind im direkten Vergleich (ng/ml) ~ um den Faktor 45 geringer.

Rechnet man die hohen mit LV.hIL1RA erhaltenen Werte von Gouze et al. (maximal 113 ng/ml) auf das Gelenkvolumen zurück, erhält man Werte mit ~ 2,3 µg an Tag fünf nach Transplantation (Gouze et al., 2002). Diese hohen Konzentrationen könnten zu Nebenwirkungen durch aus dem Gelenk austretendes hIL1RA führen. In der Studie wurde hIL1RA im Serum detektiert, daraus resultierende Nebenwirkungen sind jedoch nicht beschrieben.

Im Zeitverlauf (bis 168 Tage nach Injektion) betrachtet, sank die LV.hIL1RA Expression auf stabile 3 bis 15 ng/ml nach Tag 42, während die Ad.hIL1RA Expression auf ~ 30 ng/ml absank (Gouze et al., 2007). In diesem Bereich sind die FV.hIL1RA Werte mit maximal 4 ng/ml an Tag 88 nun interessanterweise durchaus vergleichbar mit den mit LV Vektoren erhaltenen Werten und nur ca. 8-fach geringer gegenüber den Resultaten mit Ad.hIL1RA.

Mit dem kommerziell erhältlichen spezifischen ELISA (R&D) stand dieser Arbeit eine evaluierte hIL1RA-Konzentrationsbestimmung zur Verfügung. Auffallend in den Resultaten waren starke Schwankungen der i.a. hIL1RA-Expression bei den *nude* Tieren (siehe Abb. 34). Mögliche Faktoren, die für die Abweichungen verantwortlich sein könnten, sind neben den verschiedenen Spenderzellchargen die i.a. Injektionen. Während dieser konnte es aufgrund der Unterschiede im Gelenkvolumen, je nach Alter und Gewicht der Tiere, zu minimal austretenden Volumen der Zellsuspension kommen. Diese wurden mittels Insulinspritze wieder aufgenommen und erneut ins Gelenk injiziert.

Bei genauerer Betrachtung der niedrigen hIL1RA-Werte der *nude* Ratten zeigte sich, dass eine Spenderzellcharge über den Zeitverlauf von 42 Tagen zwar niedrige, aber stabile Werte generierte (siehe Abb. 35). Die Schwankungen waren demnach auch von der jeweiligen Spenderzellpräparation abhängig. Dafür sprechen auch die Resultate der Wistar FV.hIL1RA-Gruppe, bei welcher nur eine Spenderzellcharge verwendet wurde, was zur Folge hatte, dass die Werte dementsprechend nicht so stark differierten (siehe Abb. 33).

Um etwaige Abweichungen der ELISA-Messungen zu vermeiden wurden alle Proben in großen Messreihen zusammengefasst. Dadurch ergaben sich verschiedene Lagerungszeiten der Proben bei -20°C. Proben mit langer Lagerungsdauer wurden nach Abschluss der Tierversuche erneut gemessen und zeigten keinen signifikanten Verlust an hIL1RA. Die Schwankungen der i.a. hIL1RA-Expression sind demnach den Spenderzellchargen und der Injektion zuzuordnen.

Weiterhin auffällig waren die Unterschiede der EGFP- und hIL1RA-Expression im Zeitverlauf in den Nacktratten. Während die EGFP-Expression in den explantierten Synovialzellen im Zeitverlauf abfiel (Abb. 32), war die FV.hIL1RA-Expression hingegen über 88 Tage relativ stabil (Abb. 34). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei den FACS-Analysen Synovialzellen aus den präparierten Synovialmembranen analysiert wurden, während bei den ELISA-Messungen die gesamten Kniegelenkinnenflächen dem Medium exponiert vorlagen. Es ist denkbar, dass transplantierte Zellen an Sehnen, Ligamenten oder am Knorpel angewachsen sind, bzw. als separate Zellansammlung im Gelenk vorlagen (im Fettpolster oder im fibrösen Kapselgewebe) und bei den Präparationen der Synovialmembranen in den FACS-Analysen nicht miterfasst wurden. Zudem sind

Schwankungen, die von der Durchführung der Synovialmembranpräparationen herrühren, denkbar.

6.4 Therapiesicherheit

Eine einfache reproduzierbare und effiziente Herstellung der Vektoren ist für gentherapeutische Ansätze von zentraler Bedeutung. Bei der Anwendung zellbasierter *ex vivo* Strategien sind die Kosten, welche die Präparation und Expansion der Zellen unter *GMP* Bedingungen verursachen ein Nachteil. Allerdings gewährleisten indirekte Strategien gegenüber der direkten Applikation viraler Vektoren eine höhere Sicherheit, da die Zellen vor der Transplantation z.B. hinsichtlich morphologischer Veränderungen / Entartungen analysiert werden können.

In den meisten *ex vivo* RA-Studien wurden Synovialfibroblasten verwendet (Evans et al., 2009). Aus der Wundheilung weiß man, dass gewebständige Fibroblasten durch Chemokine und Wachstumsfaktoren von einem ruhenden Phänotyp in einen aktivierten Phänotyp wechseln und lokal durch das Gewebe zur geschädigten Stelle migrieren können. Nach Adhäsion an die EZM sezernieren sie dort u.a. Matrixproteine für den Aufbau einer gesunden Matrix (Moore et al., 2005). Lefèvre et al. konnten interessanterweise zeigen, dass RASF in nicht betroffene Gelenke einwandern können (Lefèvre et al., 2009). Sie implantierten gesunden humanen Knorpel subkutan in ein SCID-Maus-Modell und applizierten kontralateral die Zellen (i.p., s.c., i.v.). Die RASF bewegten sich bei allen Applikationsformen in Richtung gesunden Knorpel, wanderten ein und zerstörten diesen letztlich (Müller-Ladner, 1996; Lefèvre et al., 2009). Dies erscheint nicht nur für die Ausbreitung der RA von Interesse, sondern muss auch für den Einsatz der SF in der Gentherapie berücksichtigt werden. Als Alternative zu den in dieser Arbeit verwendeten Synovialzellen kommen derzeit primäre T-Zellen, B-Zellen, DCs (*dendritic cells*), Makrophagen und MSZ zum Einsatz (Pap et al., 2002; van de Loo et al., 2004b).

Dass Kosten und Komplexität von *ex vivo* Ansätzen durch Verwendung transduzierter allogener Zelllinien gemindert werden können, zeigen klinische Arthrostudien aus Korea und den USA, die mit einer etablierten Zelllinie durchgeführt wurden (Evans et al., 2009). Die *ex vivo* genetisch modifizierten humanen Chondrozyten (Gentransfer von TGF β 1) wurden zuvor bestrahlt, um Zellteilungen und eine etwaige Tumorbildung zu verhindern. 16 Probanden wurden ohne Zwischenfälle behandelt, wobei die Hälfte eine symptomatische Verbesserung zeigten. Mittels Kernspinnresonanztomographie wurden zudem Nachweise zur Knorpelregeneration erbracht.

Im Jahr 2005 wurde die erste Phase I klinische Studie mit einem *ex vivo* Protokoll zur RA durchgeführt (Kim et al., 1998; Evans et al., 2005). Den Probanden wurden

Synovialfibroblasten entnommen, die *ex vivo* transduziert (hIL1RA, retroviral) und retransplantiert wurden. Eine Woche nach Injektion hat man die Gelenke im Rahmen einer Gelenkersatzoperation entnommen und untersucht. Präklinische Daten zur RA belegen dass die i.a. injizierten Zellen während der ersten Woche nach Injektion aus dem Gelenkraum austreten können (Evans et al., 1996). Die Gefahr besteht demnach, dass Zellen nach der chirurgischen Gelenkentnahme extraartikulär vorliegen und so eine potentielle Quelle für zeitverzögerte Nebenwirkungen sind. Die 2005 von Evans durchgeführte klinische Studie zeigt bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch keine Nebenwirkungen (Evans et al., 2010).

Interessant in dieser Hinsicht sind die von einigen Forschergruppen sowohl bei direktem als auch indirektem Gentransfer beobachteten kontralateralen Effekte (verwendet wurden adeno- und retrovirale Vektoren) (Bakker et al., 1997; Ghivizzani et al., 1998; Ma et al., 1998; Lechman et al., 1999). Dabei wurden anti-entzündliche und chondroprotektive Effekte sowohl im behandelten, als auch im unbehandelten Gelenk nachgewiesen (verminderte Leukozyteninfiltration, histologische Analysen und GAG-Messungen). Man nahm an, dass transduzierte Antigen präsentierende Zellen zu entzündlichen Stellen und den Lymphknoten wandern und für den Effekt im unbehandelten Gelenk verantwortlich sein könnten. Es wurde aber auch gezeigt, dass Serumlevel der therapeutischen Proteine und zirkulierende Vektoren mit dem kontralateralen Effekt korrelieren (Watanabe et al., 2000). Die distal synergistischen Effekte wurden auch mit einem zellbasierten Ansatz (retroviral vermittelte hIL1RA Expression, SF) im Kaninchenmodell der AIA nachgewiesen (Kim et al., 2002b). Verwendet wurden dabei autologe lapine Synovialfibroblasten, von denen die Arbeitsgruppe zuvor zeigen konnte, dass diese kein substantielles „Wandern“ (engl. *trafficking*) nach i.a. Injektion zeigen (Evans et al., 1996). Ebenso interessant war die Beobachtung, dass die hIL1RA Transgenexpression nach sieben Tagen im Gelenk sank, während der Transfer von hIL1RA und sTNFR-Ig gemeinsam zu einem Anstieg der Expression führte (Kim et al., 2002b). Da gezeigt wurde dass TNF- α Antagonisten zwar die Entzündung supprimieren, die Knorpeldestruktion aber weiter voranschreitet (Joosten et al., 1999), scheint die Kombination von IL1RA und TNF- α Antagonisten sehr vielversprechend. Aufgrund der hohen Verpackungskapazität foamyviraler Vektoren, könnten diese bei der Verfolgung mehrerer Therapiestrategien, bspw. der Expression von mehreren anti-entzündlichen Genen sehr von Nutzen sein.

In dieser Arbeit galt es weiterhin zu klären, ob die für den indirekten Gentransfer verwendeten Zellen nach i.a. Injektion aus dem Kniegelenk auswandern. Daten zur Therapiesicherheit konnten gewonnen werden indem die Biodistribution (siehe 5.7.4) untersucht wurde. Dabei konnte keine extraartikuläre EGFP oder hIL1RA Expression festgestellt werden.

In den ELISA-Messungen (hIL1RA) der Organkulturüberstände waren zwar Nieren- und Leberproben der Wistar Ratten, sowie Nierenproben der *nude* Ratten positiv (FV.hIL1RA Gruppe), die Mengen in den beiden Kontrollgruppen (FV.EGFP und nativ) waren allerdings ähnlich hoch, bzw. höher. Nach Normierung auf die unbehandelten Kontrollen waren keine positiven hIL1RA-Werte zu verzeichnen. Eine etwaige Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen Komponenten der Organkulturüberstände von Nieren und Lebern könnte hier für die schwach positiven Resultate in sämtlichen Versuchsgruppen verantwortlich sein.

Das Vorliegen einer hIL1RA Expression wäre aber kein eindeutiger Hinweis auf gewanderte genetisch modifizierte Zellen, da es aufgrund der hohen Mengen im Gelenk auch zu einem Austritt von hIL1RA gekommen sein könnte. Erstaunlich war in dieser Hinsicht, dass kein hIL1RA im Serum detektiert werden konnte (Serum der Tage 5, 10, 21, 42 und 88). Während mit lentiviralen Vektoren signifikant erhöhte Werte in Plasma, Leber, Lunge und Milz an Tag fünf nach Injektion gegenüber den nativen Organen gemessen wurden (Gouze et al., 2002). Allerdings waren die i.a. LV.hIL1RA Expressionswerte mit ~ 100 ng/ml an Tag fünf sehr hoch, im Gegensatz zu den Leveln die mit NA1 erzielt wurden (2,2 und 3,4 ng/ml im Mittel mit *nude* bzw. Wistar Tieren).

Zusätzlich wurde neben den FACS-Analysen und der ELISA-Messung (siehe 5.7.5.1 und 5.7.5.2), die Detektion von EGFP auf genomischer DNA Ebene als sehr sensitive Methode herangezogen. Um dabei die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, transplantierte Zellen zu erfassen, wurden verschiedene Organareale für die Probenentnahme gewählt. Sämtliche PCR Proben (EGFP) waren dabei negativ.

An der Verlängerung der Zeitspanne und Kontinuität der Proteinbereitstellung besteht großes Interesse. Neben dem Einsatz osmotischer Pumpen (Chuma et al., 2004) wurden auch durch in Liposomen oder synthetische Mikrosphären verpackte / eingekapselte Proteine längere Halbwertszeiten erzielt (Elisseeff et al., 2001). Weiterhin sollen deshalb zukünftig für eine verlängerte Halbwertszeit und kontrollierte Abgabe der Proteine sog. Alginate-Sphären angewandt werden. Schon 1999 wurde die Eignung der Sphären für *in vivo* Injektionen ins Gewebe beschrieben (Chang et al., 1999). Kaul et al. führten 2006 eine erfolgreiche Studie an Kaninchen mit Gelenkknorpeldefekten durch. Die Sphären beinhalteten dabei Chondrozyten die den FGF-2 (*human fibroblast growth factor 2*) überexprimierten und so die Heilung des Defektes durch Stimulierung der Chondrogenese anregten (Kaul et al., 2006). Eine Studie im Zentralnervensystem zeigt, wie vielfältig anwendbar diese Technologie ist (Ross et al., 1999). Das abgeschlossene System bietet einen erhöhten Schutz vor einem etwaigen Wandern der implantierten Zellen und deren Abschirmung vom Immunsystem. Immunologische Abwehrreaktionen können weitgehend gemildert oder sogar völlig vermieden werden (van Schilfgaarde und de Vos, 1999). Ein Vorteil der Verkapselung von

modifizierten Zellen wäre neben dem erhöhten Sicherheitsaspekt vor allem die Möglichkeit, universelle Zelllinien einzusetzen und damit eine enorme Kostenreduktion zu erzielen.

Der sichere Verbleib der Zellen im Gelenk ist ein Sicherheitsaspekt der in dieser Arbeit mit drei Methoden näher untersucht wurde. Dabei wurde kein extraartikuläres hIL1RA oder EGFP detektiert.

6.5 Experimentelle Arthritismodelle

Verschiedene Tiermodelle wurden bisher entwickelt, um zum Verständnis der Pathomechanismen der RA beizutragen (Bendele et al., 1999a; Bendele et al., 1999b; van de Loo et al., 2006). Im Modell der SCW-induzierten Arthritis wird durch eine einmalige i.p. Injektion von Zellwandbestandteilen von *Streptococcus pyogenes* eine Polyarthritits ausgelöst (Cromartie et al. 1977). Ein anderes Modell ist die Kollagen-induzierte Arthritis, bei der die subkutane Injektion von artfremdem Collagen Typ II zum Ausbruch einer Polyarthritits in Ratten führt (Trentham et al., 1977). Bei der Antigen-induzierten Arthritis wird das Antigen direkt in die Gelenke der bereits immunisierten Tiere injiziert wird (Griffiths, 1992). Alle Modelle entwickeln dabei eine akute Arthritis mit den klinischen Symptomen Gelenkschwellung, Überwärmung und Rötung (Bräuer et al., 1988). Gemeinsamkeiten zur RA beim Menschen werden dabei im histopathologischen Bild, in der Chronifizierung der Gelenkschädigung und der Wirksamkeit anti-rheumatischer Medikamente deutlich.

Ein FVV, der das humane IL1 β exprimiert (NA3, siehe 5.4), wurde wie schon erwähnt, mit dem Fernziel kloniert, eine Zelllinie zu generieren, die nach i.a. Transplantation einen arthritischen Phänotyp auslöst (siehe 5.4). Mit einem derartigen Tiermodell könnte die biologische Wirksamkeit des in dieser Arbeit konstruierten und charakterisierten FVV NA1 untersucht werden. Jedoch konnte bei der *in vitro* Charakterisierung von NA3 nur eine minimale IL1 β -Sezernierung (~ 0,7 ng/ml) in den Extrazellularraum gemessen werden. Die Sezernierung des nativen Proteins mit viralen Vektoren nicht sehr effizient, da IL1 β kein Signalpeptid aufweist und nicht den bekannten Signalwegen der Sekretion folgt (MacKenzie et al., 2001). Die Einbringung einer Sequenz zur Steigerung der Sezernierungsrate ist für die vektorvermittelte Expression von Vorteil. Ghivizzani et al. verwendeten dazu die *leader* Sequenz des Parathyroidhormons (Fusion an den N-Terminus) und generierten ~ 100 bis 200 ng/ml /10⁶ Zellen / 48h *in vitro*. Mit Transduktion und Retransplantation von 10⁷ autologen Zellen in Kaninchengelenke zeigte sich die potente Wirkung dieser Modifizierung. Die Tiere verstarben oder mussten euthanasiert werden. Daraufhin wurden weniger Zellen transplantiert. Nach Injektion von 10⁶ Zellen konnte in der Spülflüssigkeit des Gelenks ca. 100 pg/ml hIL1 β über zwei Wochen lang gemessen werden, danach stoppte die Transgenexpression aber abrupt. Die Kaninchen entwickelten während der zwei Wochen

Fieber, verloren an Gewicht, die Kniegelenke schwellen massiv an, die Synovia wurde hypertroph und invadierte Knorpel- und Knochen, sogar die Gelenkkapsel wurde in den angrenzenden Muskel geschoben, was nekrotische Veränderung zur Folge hatte. Auch die endogene (*rabbit*) IL1 β Produktion stieg; ~ 200 pg/ml konnten in der Lavageflüssigkeit gemessen werden. Markant war, dass alle nicht-erosiven Merkmale nach Verlust der Transgenexpression reversibel waren. Auch mit Wistar Ratten konnte die Arbeitsgruppe den arthritischen Phänotyp generieren. Dermalfibroblasten wurden dazu aus Spendertieren isoliert und retroviral transduziert (DFG-hIL1 β -neo) (Ghivizzani et al., 1997b). Eine Arthritis wurde durch *ex vivo* Gentransfer von hIL1 β in beiden Hinterläufen induziert. Die Zellen wurden in verschiedenen Dosen injiziert (3×10^3 bis maximal 10^5). Der lentiviral vermittelte Gentransfer von IL1RA war in der Lage, selbst die mit der höchsten Zelldosis bewirkten pathologischen Veränderungen zu präventieren (Gouze et al., 2003a). Interessanterweise war dabei eine Steigerung der IL1RA Expressionsraten mit steigender Zellzahl, also steigender IL1 β -Menge zu verzeichnen.

Ob auch ein Anstieg der FV.hIL1RA Expression im Krankheitsmodell zu verzeichnen ist, gilt es zukünftig zu analysieren. Eine weitere Optimierung des pNA3 Plasmid durch Einfügen einer entsprechenden Sequenz zur Steigerung der Sezernierung, könnte einen FVV zur Verfügung stellen, der für die Entwicklung eines RA Krankheitsmodell geeigneter als NA3 wäre.

6.6 Foamyvirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen sind nicht-hämatopoetische, multipotente Stromazellen, die fähig sind in mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bänder, Sehnen und Fettgewebe zu differenzieren, was zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes beiträgt (Caplan, 1991; Prockop, 1997; Chamberlain et al., 2007). Es gibt Studien die neben der „klassischen *in vitro* Differenzierung“ in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten, auch eine Differenzierung in β -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Chen et al., 2004) und Hautzellen (Deng et al., 2005) zeigen konnten. Die unproblematische Gewinnung z.B. aus Knochenmarkaspiraten oder Fettgewebe, sowie die leichte Expandierbarkeit und Transduzierbarkeit *in vitro*, lassen eine große Zahl von klinischen Anwendungen möglich erscheinen (Steinert et al., 2008; Nöth et al., 2010).

Bei MSZ unterscheidet man drei verschiedene Subpopulationen mit individuellen Charakteristika: Kleine, sich schnell teilende Zellen (RS-Zellen, *rapidly self-renewing cells*), spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen (SS-Zellen, *spindle shaped cells*) und große, flache, sich langsam teilende Zellen (FC-Zellen, *flat cells*) (Schieker et al., 2007). Da MSZ

keinen spezifischen Oberflächenmarker aufweisen wurden Minimalbedingungen für ihre Definition festgelegt (Tuan et al., 2003; Dominici et al., 2006). Diese sind neben der Plastikadhärenz, die Expression von CD105, CD73 und CD90, sowie die Abwesenheit von CD45, CD34, CD14 und die *in vitro* Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten.

Aufgrund ihres regenerativen Potentials und optimalen Sicherheitsprofils sind MSZ für zellbasierte Ansätze geeignet und können unter Einfluss chondrogener Faktoren zur Ausbildung eines hyalinen Regeneratgewebes im Knorpeldefekt beitragen (Trippel et al., 2004; Steinert et al., 2007; Steinert et al., 2008; Steinert et al., 2009). Klinischen Fallstudien implantierter humaner MSZ in osteochondrale Defekte haben die erfolgreiche Formation knorpelspezifischer Gewebe gezeigt (Wakitani et al., 2002; Tuan et al., 2003). Pagnotto et al. differenzierten MSZ *in vitro* mit AAV.TGF β 1 chondrogen und implantierten die Zellaggregate / Pellets dann in osteochondrale Defekte von athymischen Ratten. Die Transgenexpression über den Zeitraum, der für die Knorpeldefektheilung nötig ist, konnte dabei mit den AAV-Vektoren vermittelt werden. Nach 12 Wochen wurde eine verbesserte Knorpelreparatur in den AAV.TGF β 1 Gruppen beobachtet (Pagnotto et al., 2007).

MSZ haben *in vitro* eine limitierte Lebensspanne, sie stellen bereits nach ca. 40-50 Populationsverdopplungen das Wachstum ein (Stenderup et al., 2003; Bonab et al., 2006). Dieser als „replikative Seneszenz“ bezeichnete Wachstumsstopp geht mit dem Verlust der klonalen Multipotenz einher (Banfi et al., 2000). Morphologische Veränderungen der Zellen hin zu einer vergrößerten, abgeflachten Form und einem vakuolenreichen Zytoplasma sind zu beobachten (Dimri et al., 1995; Noh et al., 2010).

Für die MSZ Pelletversuche wurden die foamyviral transduzierten Zellen sortiert, wobei danach häufig seneszente Phänotypen beobachtet werden konnten (siehe Abb. 25 C und D). Aufgrund dieser Problematik und der benötigten Anzahl an Zellen/Pellets wurde deshalb zudem auf die Tert-4 Stammzelllinie zurückgegriffen.

Zur Beurteilung der Funktionalität des NA1 (FV.IL1RA) Gentransfers, dem inhibitorischen Effekt von IL1 β auf die Chondrogenese primärer MSZ und Tert-4 Zellen entgegenzusteuern, wurden die Zellen nach NA1 (FV.hIL1RA) bzw. MD9 (FV.EGFP) Transduktion in Pelletkultur gegeben ($3 \cdot 10^5$ Zellen/Pellet) und in chondrogenem Differenzierungsmedium in An- und Abwesenheit von 10 ng/ml IL1 β kultiviert (siehe 5.6.4). Über den Zeitraum von drei Wochen wurden die Transgenexpressionsraten der Pellets analysiert und am Endzeitpunkt histologisch und mittels semiquantitativer PCRs deren chondrogener Phänotyp untersucht. In MSZ Pelletkulturen erreichten die Transgenexpressionsraten maximale IL1RA Werte von 70 ng/ml an Tag drei und sanken danach auf null ng/ml nach 21 Tagen ab, wohingegen die IL1RA Konzentrationen der Kontrollen permanent unter 400 pg/ml lagen. Auch in publizierten Daten mit adenoviral vermittelter Transgenexpression in MSZ Pellets war diese nur transient

(Steinert et al., 2007b; Steinert et al., 2009). Maximal wurden 100 ng/ml erreicht, an Tag 21 konnten Palmer et al. immerhin noch 10 ng/ml im Überstand detektieren (Palmer et al., 2005).

Auch in dieser Arbeit war die Transgenexpression mit FV.hIL1RA MSZ-Pellets nach 21 Tagen nicht mehr nachzuweisen, während man hingegen mit sortierten Tert-4 FV.hIL1RA-Pelletkulturen stabile hIL1RA Level mit im Mittel 99 ng/ml über die Kulturdauer von 21 Tagen erreichte (siehe 5.6.4, Abb. 26).

Der Farbstoff Alcianblau bindet relativ spezifisch an Sulfatgruppen von Proteoglykanen (z.B. Aggrecan) des hyalinen Gelenkknorpels, der besonders reich an Chondroitinsulfat ist. In den mikroskopischen Aufnahmen der Tert-4 Pelletschnitte zeigte sich eine positive Alcianblaufärbung in den chondrogenen Kontrollen, während die IL1 β inhibierten Gruppen negativ waren und durch foamyviral vermittelten hIL1RA Gentransfer eine Rekonstitution der Blaufärbung zeigten. In den Schnitten konnten jedoch keine typischen Chondrone ausgemacht werden. Mit semiquantitativen PCRs (AGN, BGN, Col II, COMP) konnten des Weiteren keine knorpelspezifischen mRNA Expressionen in den Tert-4 Pelletgruppen mit chondrogenem Differenzierungsmedium nachgewiesen werden, wobei das Haushaltsgen und die positiv Kontrolle die Qualität der cDNA und Primer sicherstellte. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zellen aufgrund der hohen Zellpassage (Passage 94) die Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung verloren haben könnten. Abdallah et al. haben zudem neben der Tert-4 auch eine Tert-20 etablieren können. Es wurde dabei beschrieben, dass die Zellen nach unsachgemäßem Splitten (z.B. Tert-4 nicht 1/4) ihr Expressionsmuster verändern (Abdallah et al., 2005). Eine derartige Veränderung könnte nach Sortierung der Tert-4 Zellen auch zum Verlust der Differenzierungsfähigkeit beigetragen haben.

Mit Verwendung ganzer Spenderzellchargen (jeweils aus einem Hüftkopf) wurde die Durchführung der Pelletversuche mit primären humanen MSZ ermöglicht. Die Inhibierung der Chondrogenese nach IL1 β Zugabe wurde in Kontrollpellets gezeigt (Alcianblau und Collagen II negativ). Im Gegensatz dazu waren FV.hIL1RA MSZ Pellets chondrogen und zeigten signifikant gesteigerte Glykosaminoglykan/DNA (GAG/DNA) Raten zu allen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 14, 21) (Diplomarbeit Jennifer Krieg). Das GAG/DNA-Verhältnis ermöglicht eine quantitative Aussage über die knorpelspezifische Matrixbildung (Glykosylaminoglykan / Zelle).

6.7 FV.hIL1RA Langzeitexpression in MSZ

In primären hMSZ konnte eine stabile hIL1RA und EGFP Expression über einen Zeitraum von 137 Tagen nachgewiesen werden. Dies erwies sich insofern als interessant, da MSZ in Kultur bereits nach wenigen Passagen Anzeichen replikativer Seneszenz zeigen (Wagner et al., 2009). Die Seneszenz kann interessanterweise durch Kulturbedingungen und die

Zelldichte bei der Aussaat der MSZ beeinflusst werden. Colter et al. konnten zeigen, dass bis zu 50 Zellverdopplungen (PD, *population doublings*) mit einer geringen Aussaatdichte erreicht werden können. Werden die Zellen jedoch mit hoher Zelldichte kultiviert, stoppt das Wachstum bereits nach 15 PD (Colter et al., 2000). Das Gen- und Proteinexpressionsmuster ändert sich mit der Dauer der Kultivierung der MSZ. Gene der Zelldifferenzierung, Apoptose und Zelltod werden hochreguliert, die für Proliferation und Mitose hingegen herunterreguliert (Schallmoser et al., 2010). Die FV.hIL1RA Expression scheint interessanterweise nicht durch die Seneszenz beeinflusst zu werden. Die Gründe dafür sind bislang noch unbekannt. Unsere Arbeiten zeigen bislang, dass FV-Vektoren für eine effiziente Transduktion primärer MSZ verwendet werden können, um IL1RA Transgenlevel über einen längeren Zeitraum zu generieren, die in der Lage sind IL1 β Effekte *in vitro* effektiv zu blockieren.

6.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit NA1 (FV.hIL1RA) ein foamyviraler Vektor konstruiert werden, der funktionell *in vitro* und *in vivo* näher charakterisiert wurde. Zur Klärung der Frage, ob foamyvirale Vektoren eine intraartikuläre Transgenexpression stabil über einen längeren Zeitraum auch in immunkompetenten Tieren, unter Berücksichtigung speziesspezifischer Transgene, zellulärer Promotoren und eines verkürzten Vektors mit minimalen viralen Sequenzen gewährleisten können, stehen die generierten FVV den weiteren Versuchen im Projekt zu Verfügung. Des Weiteren könnte mit Verkapselung der Zellen in Alginat-Sphären eine Abschirmung der Zellen vor dem Immunsystem und so möglicherweise eine längere Transgenexpression in den immunkompetenten Tieren erzielt werden. Weiterhin könnte ein Austausch des Markergens sensitivere Methoden zur Untersuchung der Biodistribution und damit der Therapiesicherheit ermöglichen.

Als nächster Schritt soll die biologische Wirksamkeit und je nach Versuchsaufbau, der präventive oder palliative therapeutische Effekt der hIL1RA Expression im arthritischen Rattenkniegelenk näher analysiert werden. Nach erfolgreichem Abschluss dieser anstehenden Experimente könnten die entwickelten Gentransfersysteme dazu verwendet werden, den FV-vermittelten Ansatz zur Arthritistherapie im zulassungsrelevanten Grosstiermodell zu testen.

7 Anhang

7.1 Detaillierte Angaben zu den i.a. hIL1RA Messungen

| Tag(e) post injektionem | hIL1RA [ng/Knie] | hIL1RA [ng/ml] | Präparationszeitpunkt / Spenderzellcharge | EGFP pos. Zellen [%] zum OP Zeitpunkt | OP Datum |
|----------------------------|---------------------|-------------------|--|--|------------|
| 5 | 132,5 | 1,7 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 5 | 289,9 | 3,6 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 5 | 237,1 | 3,0 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 5 | 228,2 | 2,9 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 5 | 85,4 | 1,1 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 5 | 61,1 | 0,8 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 5 | 124,5 | 1,6 | 18.07.2009 | 50 | 18.08.2009 |
| 5 | 246,1 | 3,1 | 18.07.2009 | 50 | 18.08.2009 |
| 10 | 100,5 | 1,3 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 10 | 156,2 | 2,0 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 10 | 125,1 | 1,6 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 10 | 98,9 | 1,2 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 10 | 447,3 | 5,6 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 10 | 268,2 | 3,4 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 21 | 66,6 | 0,8 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 21 | 45,8 | 0,6 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 21 | 261,6 | 3,3 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 21 | 248,4 | 3,1 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 21 | 213,3 | 2,7 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 21 | 228,8 | 2,9 | 16.03.2009 | 50 | 03.05.2009 |
| 42 | 146,2 | 1,8 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 42 | 109,1 | 1,4 | 16.03.2009 | 75 | 17.04.2009 |
| 42 | 47,7 | 0,6 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 42 | 65 | 0,8 | 25.05.2009 | 50 | 27.06.2009 |
| 88 | 181,8 | 2,3 | 18.07.2009 | 92 | 23.08.2009 |
| 88 | 296,8 | 3,7 | 18.07.1009 | 92 | 23.08.2009 |
| 88 | 138,2 | 1,7 | 25.01.2010 | 85 | 12.03.2010 |
| 88 | 114,9 | 1,4 | 25.01.2010 | 85 | 12.03.2010 |
| 88 | 230,1 | 2,9 | 25.01.2010 | 85 | 12.03.2010 |
| 88 | 317,1 | 4,0 | 25.01.2010 | 85 | 12.03.2010 |

Tab. 7: Daten zur FV.hIL1RA *nude* Rattengruppe.

| Tag(e) post injektionem | hIL1RA [ng/Knie] | hIL1RA [ng/ml] | Präparationszeitpunkt / Spenderzellcharge | EGFP pos. Zellen [%] zum OP Zeitpunkt | OP Datum |
|----------------------------|---------------------|-------------------|--|--|------------|
| 5 | 267,8 | 3,3 | 27.05.2009 | 72 | 18.07.2009 |
| 5 | 252,5 | 3,2 | 27.05.2009 | 72 | |
| 5 | 292,8 | 3,7 | 27.05.2009 | 72 | 18.07.2009 |
| 5 | 277,8 | 3,5 | 27.05.2009 | 72 | |
| 10 | 149,8 | 1,9 | 27.05.2009 | 73 | 16.07.2009 |
| 10 | 125,4 | 1,6 | 27.05.2009 | 73 | |
| 10 | 56,6 | 0,7 | 27.05.2009 | 73 | 16.07.2009 |
| 10 | 139,2 | 1,7 | 27.05.2009 | 73 | |
| 21 | 93,4 | 1,2 | 27.05.2009 | 72 | 18.07.2009 |
| 21 | 97,0 | 1,2 | 27.05.2009 | 72 | |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 27.05.2009 | 73 | 16.07.2009 |
| 21 | 0,0 | 0,0 | 27.05.2009 | 73 | |
| 42 | 41,9 | 0,5 | 27.05.2009 | 73 | 16.07.2009 |
| 42 | 0,0 | 0,0 | 27.05.2009 | 73 | |
| 42 | 0,0 | 0,0 | 27.05.2009 | 73 | 16.07.2009 |
| 42 | 0,0 | 0,0 | 27.05.2009 | 73 | |

Tab. 8: Daten zur FV.hIL1RA Wistar Rattengruppe.

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der durch Interleukin-1 vermittelten Effekte und klinischen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis..... | 15 |
| Abb. 2: EM Aufnahmen von Foamyviren und infizierte Zellkulturen..... | 26 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung des (A) Wildtyp-Provirusgenom von PFV und (B) des CMV-getriebenen PFV-Vektors wie er in dieser Arbeit verwendet wurde..... | 30 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung des Vorhabens..... | 34 |
| Abb.5: Vektorkarte MD9..... | 44 |
| Abb. 6: Übersicht / Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren..... | 45 |
| Abb. 7: MSZ-Pellet wie es sich nach 21 Tagen in Kultur darstellt..... | 67 |
| Abb. 8: Foamyvirale Vektorsuspensionen lassen sich durch Zentrifugation konzentrieren.... | 74 |
| Abb. 9: NA4 exprimiert das gleiche Transgen eher schlechter als MD9 und KG84..... | 76 |
| Abb. 10: Rattensynovialfibroblasten lassen sich mit NA3 (SFFV-U3-hIL1 β -IRES-mRFP) transduzieren..... | 77 |
| Abb. 11: NA3-transduzierte Synovialzellen setzen hIL1 β frei..... | 78 |
| Abb. 12: Ratten Synovialfibroblasten lassen sich mit NA2 (FV. <i>rat</i> L1RA) transduzieren..... | 79 |
| Abb. 13: <i>Rat</i> L1RA ELISA-Messung..... | 80 |
| Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen MD9 (FV.EGFP) und NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter Zellen..... | 81 |
| Abb. 15: Transduktionseffizienz des NA1-Vektors auf verschiedenen Zellen..... | 82 |
| Abb. 16: hIL1RA Expression NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter Zellen (HT1080, Tert-4 und MSZ)..... | 83 |
| Abb. 17: Repräsentative Amplifikationskurven von β -Actin (A) und hIL1RA (B)..... | 83 |
| Abb. 18: Relative hIL1RA-mRNA Expressionen in HT1080, Tert-4 und primären MSZ..... | 84 |
| Abb. 19: NA1 (FV.hIL1RA) Evaluierung <i>in vitro</i> mit primären Synovialfibroblasten der Ratte (SF)..... | 86 |
| Abb. 20: PGE ₂ Produktion und korrespondierender hIL1RA ELISA nach IL1 β Inkubation..... | 87 |
| Abb. 21: hIL1RA Expression im Zeitverlauf in mesenchymalen Stammzellen (MSZ)..... | 88 |
| Abb. 22: Zeitverlauf der EGFP Expression in NA1 (FV.hIL1RA) transduzierten MSZ..... | 89 |
| Abb. 23: NA1 (FV.hIL1RA) transduzierte MSZ an Tag 137 in Kultur..... | 89 |
| Abb. 24: Finale FACS-Analyse NA1 (FV.hIL1RA) transduzierter MSZ nach 137 Tagen in Kultur..... | 90 |
| Abb. 25: MSZ Phänotypen nach NA1 (FV.hIL1RA) Transduktion (A) und Zellsortierung (B, C, D)..... | 92 |
| Abb. 26: hIL1RA ELISA-Messung von Zellkulturüberständen von MSZ (A) und sortierten Tert-4 (B) Pellets..... | 93 |
| Abb. 27: Alcianblau angefärbte Paraffinschnitte von Tert-4 Pellets..... | 93 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 28: Amplifikationskurven von Collagen II (A) und β -Actin (B)..... | 94 |
| Abb. 29: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Tierexperimente..... | 95 |
| Abb. 30: Aus der Synovialmembran präparierte Synovialzellen für die <i>ex vivo</i> Transduktion..... | 95 |
| Abb. 31: EGFP-Expression in explantierten Synovialzellen die mit MD9 (FV.EGFP) transduziert und in Kniegelenke von Wistar und <i>nude</i> Ratten transplantiert wurden..... | 97 |
| Abb. 32: Zeitverlauf der EGFP-Expression in Explantatkulturen (FV.EGFP Gruppe)..... | 98 |
| Abb. 33: Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in Wistar Ratten..... | 99 |
| Abb. 34: Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in <i>nude</i> Ratten..... | 100 |
| Abb. 35: Im Detail: NA1 (FV.hIL1RA) i.a. Expression einer Spenderzellcharge in <i>nude</i> Ratten..... | 101 |
| Abb. 36: Biodistribution nach foamyviral vermitteltem <i>ex vivo</i> Gentransfer in Rattenkniegelenke der FV.EGFP (A, B, C) und FV.hIL1RA (D, E) Versuchsgruppe 10 Tage post injektionem..... | 104 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. 1: Todesfälle in humanen Gentherapiestudien..... | 21 |
| Tab. 2: Arthritis Gentherapiestudien in Tiermodellen..... | 22 |
| Tab. 3: In der GT der RA eingesetzte Vektoren..... | 24 |
| Tab. 4: Klinische Studien zur Gentherapie der rheumatoiden Arthritis..... | 25 |
| Tab. 5: Einteilung der MSZ in Pelletgruppen..... | 91 |
| Tab. 6 : Foamyviral vermittelte i.a. Expression von hIL1RA in <i>nude</i> und Wistar Ratten..... | 100 |
| Tab. 7: Daten zur FV.hIL1RA <i>nude</i> Rattengruppe..... | 125 |
| Tab. 8: Daten zur FV.hIL1RA Wistar Rattengruppe..... | 126 |

7.4 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| µg | Microgramm |
| µl | Microliter |
| AAV | <i>adeno-associated virus</i> |
| Abb. | Abbildung |
| ADA | Adenosindeaminase |
| AGN | <i>aggrecan</i> |
| AIA | <i>antigen-induced arthritis</i> |
| Amp | Ampizillinresistenzgen |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| aq. | Aqua |
| ATV | <i>adjusted trypsin versen</i> |
| BGN | <i>biglycan</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovine serum albumine |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CASI/II | cis-aktive Senquenz I und II |
| CD4 | <i>cluster of differentiation 4</i> |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cds | coding sequence |
| CIA | <i>collagen-induced arthritis</i> |
| CLAD | <i>canine LAD</i> |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Col II | Collagen Typ II |
| COMP | <i>Cartilage oligomeric protein</i> |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CPE | zytopathischer Effekt |
| cPPT | <i>central PPT</i> |
| dest. | destilliert |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5`-Triphosphat |
| ECMV | Encephalomyokarditis Virus |

| | |
|---------|--|
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EF-1a | Elongationsfaktor-1alpha |
| EGFP | Enhanced green fluorescent protein |
| ES | embryonale Stammzellen |
| et al. | und andere |
| Evi1 | <i>Ecotropic viral integration site 1</i> |
| FACS | <i>fluorescent activated cell scanning</i> |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FDA | <i>US Food and Drug Administration</i> |
| FSC | <i>forward scatter</i> |
| FV | Foamyviren |
| FVV | FV-Vektoren |
| g | Gramm |
| GAG | <i>glycosaminoglycan</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GT | Gentherapie |
| h | Stunde(n) |
| H/E | Hämatoxylin/Eosin |
| HCl | Salzsäure |
| hIL1RA | humaner Interleukin-1 Rezeptorantagonist |
| hMSZ | humane mesenchymale Stammzellen |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| HSV | <i>herpes simplex virus</i> |
| HSZ | hämatopoetische Stammzellen |
| HFV | <i>human foamy virus</i> |
| i.a. | intraartikulär |
| ICE | <i>Interleukin-1 Converting Enzyme</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IL1RI | IL1-Rezeptor Typ I |
| IL1RA | Interleukin-1 Rezeptorantagonist |
| IL1RAcP | <i>IL1 receptor accessory protein</i> |
| IRES | <i>internal ribosomal entry site</i> |
| iNOS | <i>inducible nitric oxide synthase</i> |
| IP | <i>internal promoter</i> |
| ITS | Insulin Transferrin Selenit |
| kb | Kilobasen |

| | |
|----------------|---|
| kDa | kilo Dalton |
| Koll II | Kollagen Typ II |
| Koll X | Kollagen Typ X |
| Koll XI | Kollagen Typ IX |
| Konz. | Konzentration |
| l | Liter |
| LAD | <i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i> |
| LB | Luria-Bertani |
| LPS | <i>lipopolysaccharide</i> |
| Lsg. | Lösung |
| LTR | <i>Long Terminal Repeat</i> |
| LV | Lentivirus |
| LVV | Lentiviraler Vektor |
| M | Mol |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MEM | Modified Eagle Medium |
| mg | Milligramm |
| MHC II | <i>major histocompatibility complex type II</i> |
| min | Minute(n) |
| mio. | Millionen |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MoMLV | <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> |
| MSC | mesenchymal stem cells |
| MSZ | mesenchymale Stammzellen |
| mRFP | <i>monomeric red fluorescent protein</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NF- κ B | <i>Nuclear Factor-κB</i> |
| ng | Nanogramm |
| NK | natürliche Killer-Zellen |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffoxid |
| orf | <i>open reading frame</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PBS | Primer <i>binding site</i> |

| | |
|------------------|---|
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PEI | Polyethylenimin |
| PFV | Prototypisches Foamyvirus |
| pg | Picogramm |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PGK | Phosphoglyceratkinase |
| PPT | Polypurintrakt |
| Prom | <i>internal heterologous promoter</i> |
| PUMA | <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> |
| R | <i>LTR repeat region</i> |
| RASF | rheumatoide Synovialfibroblasten |
| RLU | <i>Relative lights units</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction |
| SA | <i>splice acceptor</i> |
| SCW | <i>streptococcal cell wall</i> |
| SD | <i>splice donor</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| sek | Sekunde(n) |
| SF | Synovialfibroblasten |
| SFFV | <i>Spleen Focus Forming Virus</i> |
| SHIV | <i>simian-human immunodeficiency virus</i> |
| SIN | <i>self-inactivating</i> |
| sIL1R | <i>soluble interleukin-1 receptor</i> |
| SOD | <i>superoxide dismutase</i> |
| SSC | <i>side scatter</i> |
| sTNFR | <i>soluble TNFR</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | thermus aquaticus |
| TEMED | N, N-N, N-Tetramethyl-Ethylendiamin |
| TGFβ | Transforming Growth Factor β |
| TIMP | <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |

| | |
|---------|---|
| TNFR:Fc | <i>tumor necrosis factor receptor extracellular domains fused to the Fc domain of IgG</i> |
| TRAIL | <i>Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand</i> |
| TREs | Tas responsive Elemente |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| ÜNK | über Nachtkultur |
| V | Volt |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| vIL10 | <i>viral IL10</i> |
| Vol. | Volumen |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| X-SCID | <i>X-linked severe combined immunodeficiency</i> |
| z.B. | zum Beispiel |

7.5 Publikationsliste

Wiktorowicz T., K. Peters, N. Armbruster, AF. Steinert and A. Rethwilm. Generation of an improved foamy virus vector by dissection of *cis*-acting sequences. Journal of General Virology 2009 J Gen Virol 90, 481-487.

Armbruster N., Weber C., Rethwilm A., Scheller C. and Steinert A., (2011). Ex vivo gene delivery to synovium using foamyviral vectors. Eingereicht bei Gene Therapy.

8 Literaturverzeichnis

- ABDALLAH, B. M., HAACK-SORENSEN, M., BURNS, J. S., ELSNAB, B., JAKOB, F., HOKLAND, P. & KASSEM, M. 2005. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 527-38.
- ABELES, A. M. & PILLINGER, M. H. 2006. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 64, 20-4.
- ACHONG, B. G., MANSELL, P. W. & EPSTEIN, M. A. 1971a. A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*, 103, P18.
- ACHONG, B. G., MANSELL, P. W., EPSTEIN, M. A. & CLIFFORD, P. 1971b. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 46, 299-307.
- ADRIAANSEN, J., KHOURY, M., DE CORTIE, C. J., FALLAUX, F. J., BIGEY, P., SCHERMAN, D., GOULD, D. J., CHERNAJOVSKY, Y., APPARAILLY, F., JORGENSEN, C., VERVOORDELDONK, M. J. & TAK, P. P. 2007. Reduction of arthritis following intra-articular administration of an adeno-associated virus serotype 5 expressing a disease-inducible TNF-blocking agent. *Ann Rheum Dis*, 66, 1143-50.
- ADRIAANSEN, J., VERVOORDELDONK, M. J. & TAK, P. P. 2006. Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes. *Rheumatology (Oxford)*, 45, 656-68.
- AIUTI, A., SLAVIN, S., AKER, M., FICARA, F., DEOLA, S., MORTELLARO, A., MORECKI, S., ANDOLFI, G., TABUCCHI, A., CARLUCCI, F., MARINELLO, E., CATTANEO, F., VAI, S., SERVIDA, P., MINIERO, R., RONCAROLO, M. G. & BORDIGNON, C. 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 296, 2410-3.
- AKKINA, R. K., WALTON, R. M., CHEN, M. L., LI, Q. X., PLANELLES, V. & CHEN, I. S. 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, 2581-5.
- ALI, M., TAYLOR, G. P., PITMAN, R. J., PARKER, D., RETHWILM, A., CHEINGSONG-POPOV, R., WEBER, J. N., BIENIASZ, P. D., BRADLEY, J. & MCCLURE, M. O. 1996. No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12, 1473-83.

- APPARAILLY, F., KHOURY, M., VERVOORDELDONK, M. J., ADRIAANSEN, J., GICQUEL, E., PEREZ, N., RIVIERE, C., LOUIS-PLENCE, P., NOEL, D., DANOS, O., DOUAR, A. M., TAK, P. P. & JORGENSEN, C. 2005. Adeno-associated virus pseudotype 5 vector improves gene transfer in arthritic joints. *Hum Gene Ther*, 16, 426-34.
- AREND, W. P. 1991. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest*, 88, 1445-51.
- AREND, W. P. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol*, 54, 167-227.
- AREND, W. P. 2001a. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum*, 30, 1-6.
- AREND, W. P. 2001b. Cytokines and cellular interactions in inflammatory synovitis. *J Clin Invest*, 107, 1081-2.
- AREND, W. P. & GABAY, C. 2000. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res*, 2, 245-8.
- AREND, W. P., MALYAK, M., BIGLER, C. F., SMITH, M. F., JR. & JANSON, R. W. 1991. The biological role of naturally-occurring cytokine inhibitors. *Br J Rheumatol*, 30 Suppl 2, 49-52.
- AREND, W. P., MALYAK, M., GUTHRIDGE, C. J. & GABAY, C. 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*, 16, 27-55.
- BAKKER, A. C., JOOSTEN, L. A., ARNTZ, O. J., HELSEN, M. M., BENDELE, A. M., VAN DE LOO, F. A. & VAN DEN BERG, W. B. 1997. Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum*, 40, 893-900.
- BANDARA, G., MUELLER, G. M., GALEA-LAURI, J., TINDAL, M. H., GEORGESCU, H. I., SUCHANEK, M. K., HUNG, G. L., GLORIOSO, J. C., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 1993. Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10764-8.
- BANDARA, G., ROBBINS, P. D., GEORGESCU, H. I., MUELLER, G. M., GLORIOSO, J. C. & EVANS, C. H. 1992. Gene transfer to synoviocytes: prospects for gene treatment of arthritis. *DNA Cell Biol*, 11, 227-31.
- BANFI, A., MURAGLIA, A., DOZIN, B., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R. & QUARTO, R. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*, 28, 707-15.
- BANKS, J. D., YEO, A., GREEN, K., CEPEDA, F. & LINIAL, M. L. 1998. A minimal avian retroviral packaging sequence has a complex structure. *J Virol*, 72, 6190-4.
- BAUER, T. R., JR., ALLEN, J. M., HAI, M., TUSCHONG, L. M., KHAN, I. F., OLSON, E. M., ADLER, R. L., BURKHOLDER, T. H., GU, Y. C., RUSSELL, D. W. & HICKSTEIN, D.

- D. 2008. Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med*, 14, 93-7.
- BAUER, T. R., JR., GU, Y. C., CREEVY, K. E., TUSCHONG, L. M., EMBREE, L., HOLLAND, S. M., SOKOLIC, R. A. & HICKSTEIN, D. D. 2004. Leukocyte adhesion deficiency in children and Irish setter dogs. *Pediatr Res*, 55, 363-7.
- BAUER, T. R., JR., HAI, M., TUSCHONG, L. M., BURKHOLDER, T. H., GU, Y. C., SOKOLIC, R. A., FERGUSON, C., DUNBAR, C. E. & HICKSTEIN, D. D. 2006. Correction of the disease phenotype in canine leukocyte adhesion deficiency using ex vivo hematopoietic stem cell gene therapy. *Blood*, 108, 3313-20.
- BAUER, T. R., JR., OLSON, E. M., HUO, Y., TUSCHONG, L. M., ALLEN, J. M., LI, Y., BURKHOLDER, T. H. & RUSSELL, D. W. 2011. Treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors expressing CD18 from a PGK promoter. *Gene Ther*.
- BENDELE, A., MCABEE, T., SENNELLO, G., FRAZIER, J., CHLIPALA, E. & MCCABE, D. 1999a. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum*, 42, 498-506.
- BENDELE, A., MCCOMB, J., GOULD, T., MCABEE, T., SENNELLO, G., CHLIPALA, E. & GUY, M. 1999b. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol*, 27, 134-42.
- BERKOWITZ, R., FISHER, J. & GOFF, S. P. 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol*, 214, 177-218.
- BIENIASZ, P. D., RETHWILM, A., PITMAN, R., DANIEL, M. D., CHRYSTIE, I. & MCCLURE, M. O. 1995. A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology*, 207, 217-28.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- BODEM, J., KANG, Y. & FLUGEL, R. M. 2004. Comparative functional characterization of the feline foamy virus transactivator reveals its species specificity. *Virology*, 318, 32-6.
- BOKHOVEN, M., STEPHEN, S. L., KNIGHT, S., GEVERS, E. F., ROBINSON, I. C., TAKEUCHI, Y. & COLLINS, M. K. 2009. Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors. *J Virol*, 83, 283-94.
- BONAB, M. M., ALIMOGHADDAM, K., TALEBIAN, F., GHAFARI, S. H., GHAVAMZADEH, A. & NIKBIN, B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, 7, 14.
- BONEVA, R. S., GRINDON, A. J., ORTON, S. L., SWITZER, W. M., SHANMUGAM, V., HUSSAIN, A. I., BHULLAR, V. B., CHAMBERLAND, M. E., HENEINE, W., FOLKS, T.

- M. & CHAPMAN, L. E. 2002. Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion*, 42, 886-91.
- BORMAN, A. M., LE MERCIER, P., GIRARD, M. & KEAN, K. M. 1997. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res*, 25, 925-32.
- BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B. & BEHR, J. P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7297-301.
- BRAUER, R., THOSS, K., HENZGEN, S. & WALDMANN, G. 1988. Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp Pathol*, 34, 197-208.
- BRENNAN, A., BANSBACK, N., REYNOLDS, A. & CONWAY, P. 2004. Modelling the cost-effectiveness of etanercept in adults with rheumatoid arthritis in the UK. *Rheumatology (Oxford)*, 43, 62-72.
- BRESNIHAN, B. 2001a. The prospect of treating rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *BioDrugs*, 15, 87-97.
- BRESNIHAN, B. 2001b. The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 30, 17-20.
- BRESNIHAN, B., ALVARO-GRACIA, J. M., COBBY, M., DOHERTY, M., DOMLJAN, Z., EMERY, P., NUKI, G., PAVELKA, K., RAU, R., ROZMAN, B., WATT, I., WILLIAMS, B., AITCHISON, R., MCCABE, D. & MUSIKIC, P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41, 2196-204.
- BROOKS, A. R., HARKINS, R. N., WANG, P., QIAN, H. S., LIU, P. & RUBANYI, G. M. 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med*, 6, 395-404.
- BUCKLEY, C. D., PILLING, D., LORD, J. M., AKBAR, A. N., SCHEEL-TOELLNER, D. & SALMON, M. 2001. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*, 22, 199-204.
- BURKHARDT, H. & MOLLER, B. 2003. [The pathologic basis: pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Pharm Unserer Zeit*, 32, 368-74.
- BURNS, J. C., FRIEDMANN, T., DRIEVER, W., BURRASCANO, M. & YEE, J. K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8033-7.

- BURRAGE, P. S., MIX, K. S. & BRINCKERHOFF, C. E. 2006. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11, 529-43.
- CAMPBELL, R. E., TOUR, O., PALMER, A. E., STEINBACH, P. A., BAIRD, G. S., ZACHARIAS, D. A. & TSIEN, R. Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7877-82.
- CANTAGREL, A., NAVAUX, F., LOUBET-LESCOULIE, P., NOURHASHEMI, F., ENAULT, G., ABBAL, M., CONSTANTIN, A., LAROCHE, M. & MAZIERES, B. 1999. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 42, 1093-100.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- CAPRARIELLO, A. V., MILLER, R. H. & SELKIRK, S. M. 2009. Foamy virus as a gene transfer vector to the central nervous system. *Gene Ther*, 16, 448-52.
- CARTELLIERI, M., HERCHENRODER, O., RUDOLPH, W., HEINKELEIN, M., LINDEMANN, D., ZENTGRAF, H. & RETHWILM, A. 2005. N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol*, 79, 12464-76.
- CASSANI, B., MIROLO, M., CATTANEO, F., BENNINGHOFF, U., HERSHFELD, M., CARLUCCI, F., TABUCCHI, A., BORDIGNON, C., RONCAROLO, M. G. & AIUTI, A. 2008. Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood*, 111, 4209-19.
- CAVAZZANA-CALVO, M. & FISCHER, A. 2007. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*, 117, 1456-65.
- CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J. L., BOUSSO, P., DEIST, F. L. & FISCHER, A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 669-72.
- CHA, H. S., ROSENGREN, S., BOYLE, D. L. & FIRESTEIN, G. S. 2006. PUMA regulation and proapoptotic effects in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum*, 54, 587-92.
- CHAMBERLAIN, G., FOX, J., ASHTON, B. & MIDDLETON, J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-49.
- CHAN, J. M., VILLARREAL, G., JIN, W. W., STEPAN, T., BURSTEIN, H. & WAHL, S. M. 2002. Intraarticular gene transfer of TNFR:Fc suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product. *Mol Ther*, 6, 727-36.
- CHANDRASEKHAR, S., HARVEY, A. K., HRUBEY, P. S. & BENDELE, A. M. 1990. Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection. *Clin Immunol Immunopathol*, 55, 382-400.

- CHANG, P. L., VAN RAAMSDONK, J. M., HORTELANO, G., BARSOUM, S. C., MACDONALD, N. C. & STOCKLEY, T. L. 1999. The in vivo delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. *Trends Biotechnol*, 17, 78-83.
- CHARNEAU, P., ALIZON, M. & CLAVEL, F. 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol*, 66, 2814-20.
- CHECK, E. 2005. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433, 561.
- CHEN, C. Y. & SARNOW, P. 1995. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, 268, 415-7.
- CHEN, L. B., JIANG, X. B. & YANG, L. 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 10, 3016-20.
- CHEN, Y. F., JOBANPUTRA, P., BARTON, P., BRYAN, S., FRY-SMITH, A., HARRIS, G. & TAYLOR, R. S. 2008. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, 12, 1-278, iii.
- CHOY, E. H. & PANAYI, G. S. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344, 907-16.
- CHUMA, H., MIZUTA, H., KUDO, S., TAKAGI, K. & HIRAKI, Y. 2004. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 834-42.
- CIUFFI, A. & BUSHMAN, F. D. 2006. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet*, 22, 388-95.
- COLOTTA, F., SIRONI, M., BORRE, A., POLLICINO, T., BERNASCONI, S., BORASCHI, D. & MANTOVANI, A. 1993. Type II interleukin-1 receptor is not expressed in cultured endothelial cells and is not involved in endothelial cell activation. *Blood*, 81, 1347-51.
- COLTER, D. C., CLASS, R., DIGIROLAMO, C. M. & PROCKOP, D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3213-8.
- COTRIM, A. P. & BAUM, B. J. 2008. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol*, 36, 97-103.
- COTTARD, V., MULLEMAN, D., BOUILLE, P., MEZZINA, M., BOISSIER, M. C. & BESSIS, N. 2000. Adeno-associated virus-mediated delivery of IL-4 prevents collagen-induced arthritis. *Gene Ther*, 7, 1930-9.
- CROMARTIE, W. J., CRADDOCK, J. G., SCHWAB, J. H., ANDERLE, S. K. & YANG, C. H. 1977. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*, 146, 1585-602.

- CULLEN, B. R. 2006. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol*, 80, 1067-76.
- CULVER, K. W., OSBORNE, W. R., MILLER, A. D., FLEISHER, T. A., BERGER, M., ANDERSON, W. F. & BLAESE, R. M. 1991. Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc*, 23, 170-1.
- DAI, L., CLAXSON, A., MARKLUND, S. L., FEAKINS, R., YOUSAF, N., CHERNAJOVSKY, Y. & WINYARD, P. G. 2003. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gene Ther*, 10, 550-8.
- DAVIES, G., GRANT, A. G., DUKE, D. & HERMON-TAYLOR, J. 1983. Antibody response of nude (RNU/RNU) and hairy (RNU/+) rats to circulating cell surface components from human pancreatic cancer xenografts. *Br J Cancer*, 48, 239-45.
- DEL VECCHIO, M. A., GEORGESCU, H. I., MCCORMACK, J. E., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 2001. Approaches to enhancing the retroviral transduction of human synoviocytes. *Arthritis Res*, 3, 259-63.
- DENG, W., HAN, Q., LIAO, L., LI, C., GE, W., ZHAO, Z., YOU, S., DENG, H., MURAD, F. & ZHAO, R. C. 2005. Engrafted bone marrow-derived flk-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng*, 11, 110-9.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- DINARELLO, C. A. 1994a. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw*, 5, 517-31.
- DINARELLO, C. A. 1994b. Interleukin-1. *Adv Pharmacol*, 25, 21-51.
- DINARELLO, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-147.
- DINARELLO, C. A. & THOMPSON, R. C. 1991. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*, 12, 404-10.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DONAHUE, K. E., GARTLEHNER, G., JONAS, D. E., LUX, L. J., THIEDA, P., JONAS, B. L., HANSEN, R. A., MORGAN, L. C. & LOHR, K. N. 2008. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 148, 124-34.

- DOWER, S. K., KRONHEIM, S. R., HOPP, T. P., CANTRELL, M., DEELEY, M., GILLIS, S., HENNEY, C. S. & URDAL, D. L. 1986. The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature*, 324, 266-8.
- EASTGATE, J. A., SYMONS, J. A., WOOD, N. C., GRINLINTON, F. M., DI GIOVINE, F. S. & DUFF, G. W. 1988. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2, 706-9.
- EDELSTEIN, M. L., ABEDI, M. R. & WIXON, J. 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med*, 9, 833-42.
- EISENBERG, S. P., BREWER, M. T., VERDERBER, E., HEIMDAL, P., BRANDHUBER, B. J. & THOMPSON, R. C. 1991. Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5232-6.
- EISENBERG, S. P., EVANS, R. J., AREND, W. P., VERDERBER, E., BREWER, M. T., HANNUM, C. H. & THOMPSON, R. C. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 343, 341-6.
- ELISSEEFF, J., MCINTOSH, W., FU, K., BLUNK, B. T. & LANGER, R. 2001. Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res*, 19, 1098-104.
- ELKON, K. B., LIU, C. C., GALL, J. G., TREVEJO, J., MARINO, M. W., ABRAHAMSEN, K. A., SONG, X., ZHOU, J. L., OLD, L. J., CRYSTAL, R. G. & FALCK-PEDERSEN, E. 1997. Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9814-9.
- ENDERS, J. F. & PEEBLES, T. C. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med*, 86, 277-86.
- ERLWEIN, O., BIENIASZ, P. D. & MCCLURE, M. O. 1998. Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol*, 72, 5510-6.
- ERLWEIN, O. & RETHWILM, A. 1993. BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology*, 196, 256-68.
- EUROPEAN SOCIETY OF GENE THERAPY (2006). One of three successfully treated CGD patients in a Swiss-German gene therapy trial died due to his underlying disease: a position statement from the (ESGT). *The Journal of Gene Medicine*, 8, 1435.
- EVANS, C. & ROBBINS, P. D. 1994a. Prospects for treating arthritis by gene therapy. *J Rheumatol*, 21, 779-82.
- EVANS, C. H., BANDARA, G., MUELLER, G., ROBBINS, P., GLORIOSO, J. C. & GEORGESCU, H. I. 1992. Synovial cell transplants for gene transfer to joints. *Transplant Proc*, 24, 2966.

- EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. & ROBBINS, P. D. 1998. Blocking cytokines with genes. *J Leukoc Biol*, 64, 55-61.
- EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. & ROBBINS, P. D. 2006. Will arthritis gene therapy become a clinical reality? *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2, 344-5.
- EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. & ROBBINS, P. D. 2008. Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Res Ther*, 10, 110.
- EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. & ROBBINS, P. D. 2009. Orthopedic gene therapy in 2008. *Mol Ther*, 17, 231-44.
- EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. & ROBBINS, P. D. 2010. Getting arthritis gene therapy into the clinic. *Nat Rev Rheumatol*.
- EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1994b. The interleukin-1 receptor antagonist and its delivery by gene transfer. *Receptor*, 4, 9-15.
- EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1995. Progress toward the treatment of arthritis by gene therapy. *Ann Med*, 27, 543-6.
- EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., GHIVIZZANI, S. C., HERNDON, J. H., KANG, R., BAHNSON, A. B., BARRANGER, J. A., ELDERS, E. M., GAY, S., TOMAINO, M. M., WASKO, M. C., WATKINS, S. C., WHITESIDE, T. L., GLORIOSO, J. C., LOTZE, M. T. & WRIGHT, T. M. 1996. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther*, 7, 1261-80.
- EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., GHIVIZZANI, S. C., WASKO, M. C., TOMAINO, M. M., KANG, R., MUZZONIGRO, T. A., VOGT, M., ELDER, E. M., WHITESIDE, T. L., WATKINS, S. C. & HERNDON, J. H. 2005. Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8698-703.
- FALCONE, V., LEUPOLD, J., CLOTTEN, J., URBANYI, E., HERCHENRODER, O., SPATZ, W., VOLK, B., BOHM, N., TONIOLO, A., NEUMANN-HAEFELIN, D. & SCHWEIZER, M. 1999. Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology*, 257, 7-14.
- FALCONE, V., SCHWEIZER, M. & NEUMANN-HAEFELIN, D. 2003. Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 161-80.
- FASSBENDER, H. G. & SIMMLING-ANNEFELD, M. 1983. The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis. *J Pathol*, 139, 399-406.
- FEIGE, U., KARBOWSKI, A., RORDORF-ADAM, C. & PATAKI, A. 1989. Arthritis induced by continuous infusion of hr-interleukin-1 alpha into the rabbit knee-joint. *Int J Tissue React*, 11, 225-38.

- FELDMAN, M. D., DUNNICK, N. R., BARRY, D. W. & PARKMAN, P. D. 1975. Isolation of foamy virus from rhesus, African green and cynomolgus monkey Leukocytes. *J Med Primatol*, 4, 287-95.
- FELDMANN, M. 1996. The cytokine network in rheumatoid arthritis: definition of TNF alpha as a therapeutic target. *J R Coll Physicians Lond*, 30, 560-70.
- FESTING, M. F., MAY, D., CONNORS, T. A., LOVELL, D. & SPARROW, S. 1978. An athymic nude mutation in the rat. *Nature*, 274, 365-6.
- FIRESTEIN, G. S. 1996. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, 39, 1781-90.
- FIRESTEIN, G. S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, 356-61.
- FISCHER, A., HACEIN-BEY, S., LE DEIST, F., DE SAINT BASILE, G. & CAVAZZANA-CALVO, M. 2001. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Immunity*, 15, 1-4.
- FISCHER, N., HEINKELEIN, M., LINDEMANN, D., ENSSLE, J., BAUM, C., WERDER, E., ZENTGRAF, H., MULLER, J. G. & RETHWILM, A. 1998. Foamy virus particle formation. *J Virol*, 72, 1610-5.
- FLASSHOVE, M., BARDENHEUER, W., SCHNEIDER, A., HIRSCH, G., BACH, P., BURY, C., MORITZ, T., SEEBER, S. & OPALKA, B. 2000. Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126, 391-9.
- FLUGEL, R. M. & PFREPPER, K. I. 2003. Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 63-88.
- FONG, K. Y., BOEY, M. L., KOH, W. H. & FENG, P. H. 1994. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. *Clin Exp Rheumatol*, 12, 55-8.
- FRANK, K. M., HOGARTH, D. K., MILLER, J. L., MANDAL, S., MEASE, P. J., SAMULSKI, R. J., WEISGERBER, G. A. & HART, J. 2009. Investigation of the cause of death in a gene-therapy trial. *N Engl J Med*, 361, 161-9.
- FRIEDENSTEIN, A. J., LATZINIK, N. W., GROSHEVA, A. G. & GORSKAYA, U. F. 1982. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol*, 10, 217-27.
- GABAY, C. 2002. Cytokine inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 2, 135-49.
- GABRIEL, S. E. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 27, 269-81.

- GARTNER, K., WIKTOROWICZ, T., PARK, J., MERGIA, A., RETHWILM, A. & SCHELLER, C. 2009. Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology*, 6, 32.
- GASPAR, H. B., PARSLEY, K. L., HOWE, S., KING, D., GILMOUR, K. C., SINCLAIR, J., BROUNS, G., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., BARINGTON, T., JAKOBSEN, M. A., CHRISTENSEN, H. O., AL GHONAIUM, A., WHITE, H. N., SMITH, J. L., LEVINSKY, R. J., ALI, R. R., KINNON, C. & THRASHER, A. J. 2004. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*, 364, 2181-7.
- GASPAR, H. B. & THRASHER, A. J. 2005. Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther*, 5, 1175-82.
- GEORGESCU, H. I., MENDELOW, D. & EVANS, C. H. 1988. HIG-82: an established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activatable" phenotype. *In Vitro Cell Dev Biol*, 24, 1015-22.
- GEURTS, J., ARNTZ, O. J., BENNINK, M. B., JOOSTEN, L. A., VAN DEN BERG, W. B. & VAN DE LOO, F. A. 2007. Application of a disease-regulated promoter is a safer mode of local IL-4 gene therapy for arthritis. *Gene Ther*, 14, 1632-8.
- GEURTS, J., JOOSTEN, L. A., TAKAHASHI, N., ARNTZ, O. J., GLUCK, A., BENNINK, M. B., VAN DEN BERG, W. B. & VAN DE LOO, F. A. 2009. Computational design and application of endogenous promoters for transcriptionally targeted gene therapy for rheumatoid arthritis. *Mol Ther*, 17, 1877-87.
- GHWAN, H., HIRATA, R. K., WANG, P., RICHARD, R. E., WANG, L., OLSON, E., ALLEN, J., WARE, C. B. & RUSSELL, D. W. 2007. Transduction of human embryonic stem cells by foamy virus vectors. *Mol Ther*, 15, 1827-33.
- GHIVIZZANI, S. C., GOUZE, E., GOUZE, J. N., KAY, J. D., BUSH, M. L., WATSON, R. S., LEVINGS, P. P., NICKERSON, D. M., COLAHAN, P. T., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 2008. Perspectives on the use of gene therapy for chronic joint diseases. *Curr Gene Ther*, 8, 273-86.
- GHIVIZZANI, S. C., KANG, R., GEORGESCU, H. I., LECHMAN, E. R., JAFFURS, D., ENGLE, J. M., WATKINS, S. C., TINDAL, M. H., SUCHANEK, M. K., MCKENZIE, L. R., EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1997a. Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 159, 3604-12.
- GHIVIZZANI, S. C., LECHMAN, E. R., KANG, R., TIO, C., KOLLS, J., EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1998. Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4613-8.

- GHIVIZZANI, S. C., LECHMAN, E. R., TIO, C., MULE, K. M., CHADA, S., MCCORMACK, J. E., EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1997b. Direct retrovirus-mediated gene transfer to the synovium of the rabbit knee: implications for arthritis gene therapy. *Gene Ther*, 4, 977-82.
- GINN, S. L., CURTIN, J. A., KRAMER, B., SMYTH, C. M., WONG, M., KAKAKIOS, A., MCCOWAGE, G. B., WATSON, D., ALEXANDER, S. I., LATHAM, M., CUNNINGHAM, S. C., ZHENG, M., HOBSON, L., ROWE, P. B., FISCHER, A., CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY-ABINA, S. & ALEXANDER, I. E. 2005. Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med J Aust*, 182, 458-63.
- GOATER, J., MULLER, R., KOLLIAS, G., FIRESTEIN, G. S., SANZ, I., O'KEEFE, R. J. & SCHWARZ, E. M. 2000. Empirical advantages of adeno associated viral vectors in vivo gene therapy for arthritis. *J Rheumatol*, 27, 983-9.
- GORMAN, J. D. & CRISWELL, L. A. 2002. The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 28, 59-78.
- GOUZE, E., GOUZE, J. N., PALMER, G. D., PILAPIL, C., EVANS, C. H. & GHIVIZZANI, S. C. 2007. Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint: implications for gene therapy of chronic joint diseases. *Mol Ther*, 15, 1114-20.
- GOUZE, E., PAWLIUK, R., GOUZE, J. N., PILAPIL, C., FLEET, C., PALMER, G. D., EVANS, C. H., LÉBOULCH, P. & GHIVIZZANI, S. C. 2003a. Lentiviral-mediated gene delivery to synovium: potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol Ther*, 7, 460-6.
- GOUZE, E., PAWLIUK, R., PILAPIL, C., GOUZE, J. N., FLEET, C., PALMER, G. D., EVANS, C. H., LÉBOULCH, P. & GHIVIZZANI, S. C. 2002. In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther*, 5, 397-404.
- GOUZE, J. N., GOUZE, E., PALMER, G. D., LIEW, V. S., PASCHER, A., BETZ, O. B., THORNHILL, T. S., EVANS, C. H., GRODZINSKY, A. J. & GHIVIZZANI, S. C. 2003b. A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer. *Arthritis Res Ther*, 5, R301-9.
- GRAVALLESE, E. M. 2002. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 2, ii84-6.
- GRIFFITHS, M. M., CREMER, M. A., HARPER, D. S., MCCALL, S. & CANNON, G. W. 1992. Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats. Both MHC and non-MHC gene products determine the epitope specificity of immune response to bovine and chick type II collagens. *J Immunol*, 149, 309-16.
- GRINNEMO, K. H., MANSSON, A., DELLGREN, G., KLINGBERG, D., WARDELL, E., DRVOTA, V., TAMMIK, C., HOLGERSSON, J., RINGDEN, O., SYLVEN, C. & LE

- BLANC, K. 2004. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127, 1293-300.
- GROSS, S. & PIWNICA-WORMS, D. 2005. Monitoring proteasome activity in cellulo and in living animals by bioluminescent imaging: technical considerations for design and use of genetically encoded reporters. *Methods Enzymol*, 399, 512-30.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., DE SAINT BASILE, G. & CAVAZZANA-CALVO, M. 2003a. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Methods Mol Biol*, 215, 247-59.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., GARRIGUE, A., WANG, G. P., SOULIER, J., LIM, A., MORILLON, E., CLAPPIER, E., CACCAVELLI, L., DELABESSE, E., BELDJORD, K., ASNAFI, V., MACINTYRE, E., DAL CORTIVO, L., RADFORD, I., BROUSSE, N., SIGAUX, F., MOSHOUS, D., HAUER, J., BORKHARDT, A., BELOHRADSKY, B. H., WINTERGERST, U., VELEZ, M. C., LEIVA, L., SORENSEN, R., WULFFRAAT, N., BLANCHE, S., BUSHMAN, F. D., FISCHER, A. & CAVAZZANA-CALVO, M. 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 118, 3132-42.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J. L., FRASER, C. C., CAVAZZANA-CALVO, M. & FISCHER, A. 2003b. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348, 255-6.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., MCCORMACK, M. P., WULFFRAAT, N., LEBOULCH, P., LIM, A., OSBORNE, C. S., PAWLIUK, R., MORILLON, E., SORENSEN, R., FORSTER, A., FRASER, P., COHEN, J. I., DE SAINT BASILE, G., ALEXANDER, I., WINTERGERST, U., FREBOURG, T., AURIAS, A., STOPPA-LYONNET, D., ROMANA, S., RADFORD-WEISS, I., GROSS, F., VALENSI, F., DELABESSE, E., MACINTYRE, E., SIGAUX, F., SOULIER, J., LEIVA, L. E., WISSLER, M., PRINZ, C., RABBITTS, T. H., LE DEIST, F., FISCHER, A. & CAVAZZANA-CALVO, M. 2003c. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-9.
- HAHN, H., BAUNACH, G., BRAUTIGAM, S., MERGIA, A., NEUMANN-HAEFELIN, D., DANIEL, M. D., MCCLURE, M. O. & RETHWILM, A. 1994. Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *J Gen Virol*, 75 (Pt 10), 2635-44.
- HAI, M., ADLER, R. L., BAUER, T. R., JR., TUSCHONG, L. M., GU, Y. C., WU, X. & HICKSTEIN, D. D. 2008. Potential genotoxicity from integration sites in CLAD dogs treated successfully with gammaretroviral vector-mediated gene therapy. *Gene Ther*, 15, 1067-71.

- HALLEK, M., BUENING, H., RIED, M., HACKER, U., KURZEDER, C. & WENDTNER, C. M. 2001. [Basis of gene therapy: principles and state of development]. *Internist (Berl)*, 42, 1306-8, 1311-3.
- HASKILL, S., MARTIN, G., VAN LE, L., MORRIS, J., PEACE, A., BIGLER, C. F., JAFFE, G. J., HAMMERBERG, C., SPORN, S. A., FONG, S. & ET AL. 1991. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3681-5.
- HAWLEY, R. G., LIEU, F. H., FONG, A. Z. & HAWLEY, T. S. 1994. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther*, 1, 136-8.
- HAYNESWORTH, S. E., GOSHIMA, J., GOLDBERG, V. M. & CAPLAN, A. I. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13, 81-8.
- HEINKELEIN, M., DRESSLER, M., JARMY, G., RAMMLING, M., IMRICH, H., THUROW, J., LINDEMANN, D. & RETHWILM, A. 2002. Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol*, 76, 3774-83.
- HEINKELEIN, M., SCHMIDT, M., FISCHER, N., MOEBES, A., LINDEMANN, D., ENSSLE, J. & RETHWILM, A. 1998. Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol*, 72, 6307-14.
- HEINKELEIN, M., THUROW, J., DRESSLER, M., IMRICH, H., NEUMANN-HAEFELIN, D., MCCLURE, M. O. & RETHWILM, A. 2000. Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J Virol*, 74, 3141-8.
- HELPS, C. R. & HARBOUR, D. A. 1997. Comparison of the complete sequence of feline spumavirus with those of the primate spumaviruses reveals a shorter gag gene. *J Gen Virol*, 78 (Pt 10), 2549-64.
- HENDERSON, B., ROWE, F. M., BIRD, C. R. & GEARING, A. J. 1988. Production of interleukin 1 in the joint during the development of antigen-induced arthritis in the rabbit. *Clin Exp Immunol*, 74, 371-6.
- HENDRIE, P. C., HUO, Y., STOLITENKO, R. B. & RUSSELL, D. W. 2008. A rapid and quantitative assay for measuring neighboring gene activation by vector proviruses. *Mol Ther*, 16, 534-40.
- HENEINE, W., SCHWEIZER, M., SANDSTROM, P. & FOLKS, T. 2003. Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 181-96.
- HENEINE, W., SWITZER, W. M., SANDSTROM, P., BROWN, J., VEDAPURI, S., SCHABLE, C. A., KHAN, A. S., LERCHE, N. W., SCHWEIZER, M., NEUMANN-HAEFELIN, D., CHAPMAN, L. E. & FOLKS, T. M. 1998. Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat Med*, 4, 403-7.

- HERCHENRODER, O., RENNE, R., LONCAR, D., COBB, E. K., MURTHY, K. K., SCHNEIDER, J., MERGIA, A. & LUCIW, P. A. 1994. Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology*, 201, 187-99.
- HERCHENRODER, O., TUREK, R., NEUMANN-HAEFELIN, D., RETHWILM, A. & SCHNEIDER, J. 1995. Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology*, 214, 685-9.
- HILL, C. L., BIENIASZ, P. D. & MCCLURE, M. O. 1999. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol*, 80 (Pt 8), 2003-9.
- HIRATA, R. K., MILLER, A. D., ANDREWS, R. G. & RUSSELL, D. W. 1996. Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood*, 88, 3654-61.
- HIRSCH, E., IRIKURA, V. M., PAUL, S. M. & HIRSH, D. 1996. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11008-13.
- HOM, J. T., BENDELE, A. M. & CARLSON, D. G. 1988. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*, 141, 834-41.
- HOM, J. T., COLE, H. & BENDELE, A. M. 1990. Interleukin 1 enhances the development of spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol*, 55, 109-19.
- HOOKS, J. J. & GIBBS, C. J., JR. 1975. The foamy viruses. *Bacteriol Rev*, 39, 169-85.
- HOOKS, J. J., GIBBS, C. J., JR., CUTCHINS, E. C., ROGERS, N. G., LAMPERT, P. & GAJDUSEK, D. C. 1972. Characterization and distribution of two new foamy viruses isolated from chimpanzees. *Arch Gesamte Virusforsch*, 38, 38-55.
- HORAI, R., NAKAJIMA, A., HABIRO, K., KOTANI, M., NAKAE, S., MATSUKI, T., NAMBU, A., SAIJO, S., KOTAKI, H., SUDO, K., OKAHARA, A., TANIOKA, H., IKUSE, T., ISHII, N., SCHWARTZBERG, P. L., ABE, R. & IWAKURA, Y. 2004. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest*, 114, 1603-11.
- HORAI, R., SAIJO, S., TANIOKA, H., NAKAE, S., SUDO, K., OKAHARA, A., IKUSE, T., ASANO, M. & IWAKURA, Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*, 191, 313-20.
- HOWE, S. J., MANSOUR, M. R., SCHWARZWAELDER, K., BARTHOLOMAE, C., HUBANK, M., KEMPSKI, H., BRUGMAN, M. H., PIKE-OVERZET, K., CHATTERS, S. J., DE RIDDER, D., GILMOUR, K. C., ADAMS, S., THORNHILL, S. I., PARSLEY, K. L.,

- STAAL, F. J., GALE, R. E., LINCH, D. C., BAYFORD, J., BROWN, L., QUAYE, M., KINNON, C., ANCLIFF, P., WEBB, D. K., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., GASPAR, H. B. & THRASHER, A. J. 2008. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*, 118, 3143-50.
- HUBER, L. C., DISTLER, O., TARNER, I., GAY, R. E., GAY, S. & PAP, T. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 45, 669-75.
- HYC, A., OSIECKA-IWAN, A., DZIUNYCZ, P. & MOSKALEWSKI, S. 2007. Preparation of rat synovial membrane for studies of cytokine secretion. *Folia Histochem Cytobiol*, 45, 57-60.
- INAZUKA, M., TAHIRA, T., HORIUCHI, T., HARASHIMA, S., SAWABE, T., KONDO, M., MIYAHARA, H. & HAYASHI, K. 2000. Analysis of p53 tumour suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatology (Oxford)*, 39, 262-6.
- JACKSON, R. J., HOWELL, M. T. & KAMINSKI, A. 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*, 15, 477-83.
- JANG, S. K., PESTOVA, T. V., HELLEN, C. U., WITHERELL, G. W. & WIMMER, E. 1990. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*, 44, 292-309.
- JOHNSON, R. H., DE LA ROSA, J., ABHER, I., KERTAYADNYA, I. G., ENTWISTLE, K. W., FORDYCE, G. & HOLROYD, R. G. 1988. Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol*, 16, 25-33.
- JOHNSTONE, B., HERING, T. M., CAPLAN, A. I., GOLDBERG, V. M. & YOO, J. U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238, 265-72.
- JOOSTEN, L. A., HELSEN, M. M., SAXNE, T., VAN DE LOO, F. A., HEINEGARD, D. & VAN DEN BERG, W. B. 1999. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol*, 163, 5049-55.
- JOSEPHSON, N. C., TROBRIDGE, G. & RUSSELL, D. W. 2004. Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum Gene Ther*, 15, 87-92.
- JOSEPHSON, N. C., VASSILOPOULOS, G., TROBRIDGE, G. D., PRIESTLEY, G. V., WOOD, B. L., PAPAYANNOPOULOU, T. & RUSSELL, D. W. 2002. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8295-300.

- KAROOUZAKIS, E., NEIDHART, M., GAY, R. E. & GAY, S. 2006. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett*, 106, 8-13.
- KATO, K., MIYAKE, K., IGARASHI, T., YOSHINO, S. & SHIMADA, T. 2005. Human immunodeficiency virus vector-mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol Int*, 25, 522-9.
- KAUL, G., CUCCHIARINI, M., ARNTZEN, D., ZURAKOWSKI, D., MENGER, M. D., KOHN, D., TRIPPEL, S. B. & MADRY, H. 2006. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med*, 8, 100-11.
- KAY, J. & CALABRESE, L. 2004. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 43 Suppl 3, iii2-iii9.
- KAY, J. D., GOUZE, E., OLIGINO, T. J., GOUZE, J. N., WATSON, R. S., LEVINGS, P. P., BUSH, M. L., DACANAY, A., NICKERSON, D. M., ROBBINS, P. D., EVANS, C. H. & GHIVIZZANI, S. C. 2009. Intra-articular gene delivery and expression of interleukin-1Ra mediated by self-complementary adeno-associated virus. *J Gene Med*, 11, 605-14.
- KEYSTONE, E. C., SCHIFF, M. H., KREMER, J. M., KAFKA, S., LOVY, M., DEVRIES, T. & BURGE, D. J. 2004. Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50, 353-63.
- KIEM, H. P., ALLEN, J., TROBRIDGE, G., OLSON, E., KEYSER, K., PETERSON, L. & RUSSELL, D. W. 2007. Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood*, 109, 65-70.
- KIEM, H. P., WU, R. A., SUN, G., VON LAER, D., ROSSI, J. J. & TROBRIDGE, G. D. 2010. Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. *Gene Ther*, 17, 37-49.
- KIM, D. W., UETSUKI, T., KAZIRO, Y., YAMAGUCHI, N. & SUGANO, S. 1990. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 91, 217-23.
- KIM, J. M., HO, S. H., PARK, E. J., HAHN, W., CHO, H., JEONG, J. G., LEE, Y. W. & KIM, S. 2002a. Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 46, 793-801.
- KIM, S. H., LECHMAN, E. R., KIM, S., NASH, J., OLIGINO, T. J. & ROBBINS, P. D. 2002b. Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *Mol Ther*, 6, 591-600.

- KIM, S. H., YU, S. S., PARK, J. S., ROBBINS, P. D., AN, C. S. & KIM, S. 1998. Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol*, 72, 994-1004.
- KIRCHEIS, R., KICHLER, A., WALLNER, G., KURSA, M., OGRIS, M., FELZMANN, T., BUCHBERGER, M. & WAGNER, E. 1997. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*, 4, 409-18.
- KLARESKOG, L., VAN DER HEIJDE, D., DE JAGER, J. P., GOUGH, A., KALDEN, J., MALAISE, M., MARTIN MOLA, E., PAVELKA, K., SANY, J., SETTAS, L., WAJDULA, J., PEDERSEN, R., FATENEJAD, S. & SANDA, M. 2004. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, 363, 675-81.
- KORB, A., PAVENSTADT, H. & PAP, T. 2009. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*, 14, 447-54.
- KUPIEC, J. J., TOBALY-TAPIERO, J., CANIVET, M., SANTILLANA-HAYAT, M., FLUGEL, R. M., PERIES, J. & EMANOIL-RAVIER, R. 1988. Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res*, 16, 9557-65.
- KUSTIKOVA, O. S., GEIGER, H., LI, Z., BRUGMAN, M. H., CHAMBERS, S. M., SHAW, C. A., PIKE-OVERZET, K., DE RIDDER, D., STAAL, F. J., VON KEUDELL, G., CORNILS, K., NATTAMAI, K. J., MODLICH, U., WAGEMAKER, G., GOODELL, M. A., FEHSE, B. & BAUM, C. 2007. Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways. *Blood*, 109, 1897-907.
- KUTLER, D. I., SINGH, B., SATAGOPAN, J., BATISH, S. D., BERWICK, M., GIAMPIETRO, P. F., HANENBERG, H. & AUERBACH, A. D. 2003. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 101, 1249-56.
- LECHMAN, E. R., JAFFURS, D., GHIVIZZANI, S. C., GAMBOTTO, A., KOVESDI, I., MI, Z., EVANS, C. H. & ROBBINS, P. D. 1999. Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol*, 163, 2202-8.
- LEFEVRE, S., KNEDLA, A., TENNIE, C., KAMPMANN, A., WUNRAU, C., DINSER, R., KORB, A., SCHNAKER, E. M., TARNER, I. H., ROBBINS, P. D., EVANS, C. H., STURZ, H., STEINMEYER, J., GAY, S., SCHOLMERICH, J., PAP, T., MULLER-LADNER, U. & NEUMANN, E. 2009. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*, 15, 1414-20.

- LEHMANN-CHE, J., RENAULT, N., GIRON, M. L., ROINGEARD, P., CLAVE, E., TOBALY-TAPIERO, J., BITTOUN, P., TOUBERT, A., DE THE, H. & SAIB, A. 2007. Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog*, 3, e74.
- LEOMBRUNO, J. P., EINARSON, T. R. & KEYSTONE, E. C. 2009. The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. *Ann Rheum Dis*, 68, 1136-45.
- LEURS, C., JANSEN, M., POLLOK, K. E., HEINKELEIN, M., SCHMIDT, M., WISSLER, M., LINDEMANN, D., VON KALLE, C., RETHWILM, A., WILLIAMS, D. A. & HANENBERG, H. 2003. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther*, 14, 509-19.
- LEVICK, J. R. 1998. A method for estimating macromolecular reflection by human synovium, using measurements of intra-articular half lives. *Ann Rheum Dis*, 57, 339-44.
- LINDEMANN, D. & RETHWILM, A. 1998. Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol*, 72, 4088-94.
- LINDEMANN, D. & RETHWILM, A. 2011. Foamy Virus Biology and Its Application for Vector Development. *Viruses*, 3, no. 5: 561-585.
- LINIAL, M. 2000. Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol*, 8, 284-9.
- LIU, W., HE, X., CAO, Z., SHENG, J., LIU, H., LI, Z. & LI, W. 2005. Efficient therapeutic gene expression in cultured rat hippocampal neurons mediated by human foamy virus vectors: a potential for the treatment of neurological diseases. *Intervirology*, 48, 329-35.
- LIU, W., LIU, Z., CAO, X., CAO, Z., XUE, L., ZHU, F., HE, X. & LI, W. 2007. Recombinant human foamy virus, a novel vector for neurological disorders gene therapy, drives production of GAD in cultured astrocytes. *Mol Ther*, 15, 1834-41.
- LOCHELT, M. 2003. Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 27-61.
- LOCHELT, M., MURANYI, W. & FLUGEL, R. M. 1993. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7317-21.
- LUTZKO, C., KRUTH, S., ABRAMS-OGG, A. C., LAU, K., LI, L., CLARK, B. R., RUEDY, C., NANJI, S., FOSTER, R., KOHN, D., SHULL, R. & DUBE, I. D. 1999. Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility in canine alpha-L-iduronidase deficiency. *Blood*, 93, 1895-905.
- MA, Y. & POPE, R. M. 2005. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*, 11, 569-80.

- MA, Y., THORNTON, S., DUWEL, L. E., BOIVIN, G. P., GIANNINI, E. H., LEIDEN, J. M., BLUESTONE, J. A. & HIRSCH, R. 1998. Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol*, 161, 1516-24.
- MACKENZIE, A., WILSON, H. L., KISS-TOTH, E., DOWER, S. K., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15, 825-35.
- MAKAROV, S. S., OLSEN, J. C., JOHNSTON, W. N., ANDERLE, S. K., BROWN, R. R., BALDWIN, A. S., JR., HASKILL, J. S. & SCHWAB, J. H. 1996. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 402-6.
- MALECH, H. L. & HICKSTEIN, D. D. 2007. Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol*, 14, 29-36.
- MALMQUIST, W. A., VAN DER MAATEN, M. J. & BOOTHE, A. D. 1969. Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res*, 29, 188-200.
- MANN, R., MULLIGAN, R. C. & BALTIMORE, D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, 33, 153-9.
- MARSHALL, E. 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286, 2244-5.
- MEASE, P. J., HOBBS, K., CHALMERS, A., EL-GABALAWY, H., BOOKMAN, A., KEYSTONE, E., FURST, D. E., ANKLESARIA, P. & HEALD, A. E. 2009. Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study. *Ann Rheum Dis*, 68, 1247-54.
- MEASE, P. J., WEI, N., FUDMAN, E. J., KIVITZ, A. J., SCHECHTMAN, J., TRAPP, R. G., HOBBS, K. F., GREENWALD, M., HOU, A., BOOKBINDER, S. A., GRAHAM, G. E., WIESENHUTTER, C. W., WILLIS, L., RUDERMAN, E. M., FORSTOT, J. Z., MARICIC, M. J., DAO, K. H., PRITCHARD, C. H., FISKE, D. N., BURCH, F. X., PRUPAS, H. M., ANKLESARIA, P. & HEALD, A. E. 2010. Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2 Study. *J Rheumatol*, 37, 692-703.
- MEIERING, C. D. & LINIAL, M. L. 2001. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev*, 14, 165-76.

- MERGIA, A. 1994. Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the env gene. *Virology*, 199, 219-22.
- MERGIA, A. & HEINKELEIN, M. 2003. Foamy virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 131-59.
- MERGIA, A., LEUNG, N. J. & BLACKWELL, J. 1996. Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol*, 25, 2-7.
- MERTENS, M. & SINGH, J. A. 2009. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*, 36, 1118-25.
- MIAGKOV, A. V., KOVALENKO, D. V., BROWN, C. E., DIDSBURY, J. R., COGSWELL, J. P., STIMPSON, S. A., BALDWIN, A. S. & MAKAROV, S. S. 1998. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13859-64.
- MIAGKOV, A. V., VARLEY, A. W., MUNFORD, R. S. & MAKAROV, S. S. 2002. Endogenous regulation of a therapeutic transgene restores homeostasis in arthritic joints. *J Clin Invest*, 109, 1223-9.
- MILLER, D. G., ADAM, M. A. & MILLER, A. D. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*, 10, 4239-42.
- MIZUGUCHI, H., XU, Z., ISHII-WATABE, A., UCHIDA, E. & HAYAKAWA, T. 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 1, 376-82.
- MOEBES, A., ENSSLE, J., BIENIASZ, P. D., HEINKELEIN, M., LINDEMANN, D., BOCK, M., MCCLURE, M. O. & RETHWILM, A. 1997. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol*, 71, 7305-11.
- MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., SANVITO, F., PONZONI, M., BARTHOLOMAE, C., SERGI SERGI, L., BENEDICENTI, F., AMBROSI, A., DI SERIO, C., DOGLIONI, C., VON KALLE, C. & NALDINI, L. 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 24, 687-96.
- MOORE, B. B., KOLODSICK, J. E., THANNICKAL, V. J., COOKE, K., MOORE, T. A., HOGABOAM, C., WILKE, C. A. & TOEWS, G. B. 2005. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol*, 166, 675-84.
- MOR, A., ABRAMSON, S. B. & PILLINGER, M. H. 2005. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 115, 118-28.
- MORGAN, R. A., DUDLEY, M. E., WUNDERLICH, J. R., HUGHES, M. S., YANG, J. C., SHERRY, R. M., ROYAL, R. E., TOPALIAN, S. L., KAMMULA, U. S., RESTIFO, N.

- P., ZHENG, Z., NAHVI, A., DE VRIES, C. R., ROGERS-FREEZER, L. J., MAVROUKAKIS, S. A. & ROSENBERG, S. A. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314, 126-9.
- MULLER-LADNER, U. 1996. Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Curr Opin Rheumatol*, 8, 210-20.
- MULLER-LADNER, U., KRIEGSMANN, J., GAY, R. E. & GAY, S. 1995. Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 21, 675-90.
- MULLER-LADNER, U. & NISHIOKA, K. 2000. p53 in rheumatoid arthritis: friend or foe? *Arthritis Res*, 2, 175-8.
- MULLER-LADNER, U., OSPELT, C., GAY, S., DISTLER, O. & PAP, T. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*, 9, 223.
- MULLER-LADNER, U., PAP, T., GAY, R. E., NEIDHART, M. & GAY, S. 2005. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 1, 102-10.
- MULLER-LADNER, U., ROBERTS, C. R., FRANKLIN, B. N., GAY, R. E., ROBBINS, P. D., EVANS, C. H. & GAY, S. 1997. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol*, 158, 3492-8.
- MULLERS, E., UHLIG, T., STIRNNAGEL, K., FIEBIG, U., ZENTGRAF, H. & LINDEMANN, D. 2011. Novel functions of prototype foamy virus Gag glycine- arginine-rich boxes in reverse transcription and particle morphogenesis. *J Virol*, 85, 1452-63.
- MURANYI, W. & FLUGEL, R. M. 1991. Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol*, 65, 727-35.
- MURRAY, S. M., PICKER, L. J., AXTHELM, M. K., HUDKINS, K., ALPERS, C. E. & LINIAL, M. L. 2008. Replication in a superficial epithelial cell niche explains the lack of pathogenicity of primate foamy virus infections. *J Virol*, 82, 5981-5.
- MUTSKOV, V. & FELSENFELD, G. 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J*, 23, 138-49.
- NAKAE, S., SAIJO, S., HORAI, R., SUDO, K., MORI, S. & IWAKURA, Y. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5986-90.
- NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F. H., VERMA, I. M. & TRONO, D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272, 263-7.

- NEIDHART, M., GAY, R. E. & GAY, S. 2000. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 43, 1719-28.
- NETZER, K. O., SCHLIEPHAKE, A., MAURER, B., WATANABE, R., AGUZZI, A. & RETHWILM, A. 1993. Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology*, 192, 336-8.
- NEU, C. P., KOMVOPOULOS, K. & REDDI, A. H. 2008. The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 235-47.
- NICKLIN, M. J., BARTON, J. L., NGUYEN, M., FITZGERALD, M. G., DUFF, G. W. & KORNMAN, K. 2002. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics*, 79, 718-25.
- NIENHUIS, A. W. 2006. Assays to evaluate the genotoxicity of retroviral vectors. *Mol Ther*, 14, 459-60.
- NIENHUIS, A. W., DUNBAR, C. E. & SORRENTINO, B. P. 2006. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther*, 13, 1031-49.
- NIKI, Y., YAMADA, H., SEKI, S., KIKUCHI, T., TAKAISHI, H., TOYAMA, Y., FUJIKAWA, K. & TADA, N. 2001. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Clin Invest*, 107, 1127-35.
- NITA, I., GHIVIZZANI, S. C., GALEA-LAURI, J., BANDARA, G., GEORGESCU, H. I., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 1996. Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*, 39, 820-8.
- NOH, H., AHN, H.-J., LEE, W.-J., KWACK, K. & KWON, Y. 2010. The molecular signature of <i>in vitro</i> senescence in human mesenchymal stem cells. *Genes & Genomics*, 32, 87-93.
- NOTH, U., OSYCZKA, A. M., TULI, R., HICKOK, N. J., DANIELSON, K. G. & TUAN, R. S. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 20, 1060-9.
- NOTH, U., RACKWITZ, L., STEINERT, A. F. & TUAN, R. S. 2010. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 765-83.
- NOWROUZI, A., DITTRICH, M., KLANKE, C., HEINKELEIN, M., RAMMLING, M., DANDEKAR, T., VON KALLE, C. & RETHWILM, A. 2006. Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J Gen Virol*, 87, 1339-47.
- O'DELL, J. R., LEFF, R., PAULSEN, G., HAIRE, C., MALLEK, J., ECKHOFF, P. J., FERNANDEZ, A., BLAKELY, K., WEES, S., STONER, J., HADLEY, S., FELT, J., PALMER, W., WAYTZ, P., CHURCHILL, M., KLASSEN, L. & MOORE, G. 2002. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine,

- methotrexate and sulfasalazine, or a combination of the three medications: results of a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 46, 1164-70.
- OHASHI, S., KUBO, T., KISHIDA, T., IKEDA, T., TAKAHASHI, K., ARAI, Y., TERAUCHI, R., ASADA, H., IMANISHI, J. & MAZDA, O. 2002. Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 1530-5.
- OHMINE, K., LI, Y., BAUER, T. R., HICKSTEIN, D. D. & RUSSELL, D. W. 2010. Tracking of Specific Integrant Clones in Dogs Treated with Foamy Virus Vectors. *Hum Gene Ther*.
- OLIGINO, T., GHIVIZZANI, S., WOLFE, D., LECHMAN, E., KRISKY, D., MI, Z., EVANS, C., ROBBINS, P. & GLORIOSO, J. 1999. Intra-articular delivery of a herpes simplex virus IL-1Ra gene vector reduces inflammation in a rabbit model of arthritis. *Gene Ther*, 6, 1713-20.
- OLSEN, N. J. & STEIN, C. M. 2004. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350, 2167-79.
- ORTENDAHL, M., HOLMES, T., SCHETTLER, J. D. & FRIES, J. F. 2002. The methotrexate therapeutic response in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 29, 2084-91.
- OTANI, K., NITA, I., MACAULAY, W., GEORGESCU, H. I., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 1996. Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol*, 156, 3558-62.
- OTT, M. G., SCHMIDT, M., SCHWARZWAELDER, K., STEIN, S., SILER, U., KOEHL, U., GLIMM, H., KUHLCHE, K., SCHILZ, A., KUNKEL, H., NAUNDORF, S., BRINKMANN, A., DEICHMANN, A., FISCHER, M., BALL, C., PILZ, I., DUNBAR, C., DU, Y., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., LUTHI, U., HASSAN, M., THRASHER, A. J., HOELZER, D., VON KALLE, C., SEGER, R. & GREZ, M. 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*, 12, 401-9.
- OWEN, S. G., FRANCIS, H. W. & ROBERTS, M. S. 1994. Disappearance kinetics of solutes from synovial fluid after intra-articular injection. *Br J Clin Pharmacol*, 38, 349-55.
- PAGNOTTO, M. R., WANG, Z., KARPIE, J. C., FERRETTI, M., XIAO, X. & CHU, C. R. 2007. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther*, 14, 804-13.
- PALMER, G., GUERNE, P. A., MEZIN, F., MARET, M., GUICHEUX, J., GOLDRING, M. B. & GABAY, C. 2002. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res*, 4, 226-31.

- PALMER, G. D., STEINERT, A., PASCHER, A., GOUZE, E., GOUZE, J. N., BETZ, O., JOHNSTONE, B., EVANS, C. H. & GHIVIZZANI, S. C. 2005. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther*, 12, 219-28.
- PAN, R. Y., CHEN, S. L., XIAO, X., LIU, D. W., PENG, H. J. & TSAO, Y. P. 2000. Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 43, 289-97.
- PAN, R. Y., XIAO, X., CHEN, S. L., LI, J., LIN, L. C., WANG, H. J. & TSAO, Y. P. 1999. Disease-inducible transgene expression from a recombinant adeno-associated virus vector in a rat arthritis model. *J Virol*, 73, 3410-7.
- PAP, T., GAY, R. E., MULLER-LADNER, U. & GAY, S. 2002. Ex vivo gene transfer in the years to come. *Arthritis Res*, 4, 10-2.
- PAP, T., MULLER-LADNER, U., GAY, R. E. & GAY, S. 2000a. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2, 361-7.
- PAP, T., SHIGEYAMA, Y., KUCHEN, S., FERNIHOUGH, J. K., SIMMEN, B., GAY, R. E., BILLINGHAM, M. & GAY, S. 2000b. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 1226-32.
- PAP, T., VAN DER LAAN, W. H., AUPPERLE, K. R., GAY, R. E., VERHEIJEN, J. H., FIRESTEIN, G. S., GAY, S. & NEIDHART, M. 2000c. Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 2531-6.
- PARK, J. & MERGIA, A. 2000. Mutational analysis of the 5' leader region of simian foamy virus type 1. *Virology*, 274, 203-12.
- PATTON, G. S., ERLWEIN, O. & MCCLURE, M. O. 2004. Cell-cycle dependence of foamy virus vectors. *J Gen Virol*, 85, 2925-30.
- PELLETIER, J. & SONENBERG, N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334, 320-5.
- PENG, Z. 2005. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 16, 1016-27.
- PERKOVIC, M., SCHMIDT, S., MARINO, D., RUSSELL, R. A., STAUCH, B., HOFMANN, H., KOPIETZ, F., KLOKE, B. P., ZIELONKA, J., STROVER, H., HERMLE, J., LINDEMANN, D., PATHAK, V. K., SCHNEIDER, G., LOCHELT, M., CICHUTEK, K. & MUNK, C. 2009. Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J Biol Chem*, 284, 5819-26.
- PESTOVA, T. V., SHATSKY, I. N. & HELLEN, C. U. 1996. Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol*, 16, 6870-8.

- PETERS, K., BARG, N., GARTNER, K. & RETHWILM, A. 2008. Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology*, 373, 51-60.
- PETERS, K., WIKTOROWICZ, T., HEINKELEIN, M. & RETHWILM, A. 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol*, 79, 7005-13.
- PICARD-MAUREAU, M., JARMY, G., BERG, A., RETHWILM, A. & LINDEMANN, D. 2003. Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol*, 77, 4722-30.
- PIETSCHMANN, T., HEINKELEIN, M., HELDMANN, M., ZENTGRAF, H., RETHWILM, A. & LINDEMANN, D. 1999. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*, 73, 2613-21.
- POLLARD, L., CHOY, E. H. & SCOTT, D. L. 2005. The consequences of rheumatoid arthritis: quality of life measures in the individual patient. *Clin Exp Rheumatol*, 23, S43-52.
- POPOVA, E., RENTZSCH, B., BADER, M. & KRIVOKHARCHENKO, A. 2008. Generation and characterization of a GFP transgenic rat line for embryological research. *Transgenic Res*, 17, 955-63.
- PROCKOP, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-4.
- PUETZER, J. L., PETITTE, J. N. & LOBOA, E. G. 2010. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 435-44.
- QIN, J. Y., ZHANG, L., CLIFT, K. L., HULUR, I., XIANG, A. P., REN, B. Z. & LAHN, B. T. 2010. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5, e10611.
- RAPER, S. E., CHIRMULE, N., LEE, F. S., WIVEL, N. A., BAGG, A., GAO, G. P., WILSON, J. M. & BATSHAW, M. L. 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80, 148-58.
- RATY, J. K., PIKKARAINEN, J. T., WIRTH, T. & YLA-HERTTUALA, S. 2008. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr Mol Pharmacol*, 1, 13-23.
- RAVINDRAN, V., RACHAPALLI, S. & CHOY, E. H. 2009. Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 48, 807-11.

- RENSHAW, R. W., GONDA, M. A. & CASEY, J. W. 1991. Structure and transcriptional status of bovine syncytial virus in cytopathic infections. *Gene*, 105, 179-84.
- RETHWILM, A. 1995. Regulation of foamy virus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 193, 1-24.
- RETHWILM, A. 2003. The replication strategy of foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 277, 1-26.
- RETHWILM, A. 2007. Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*, 7, 261-71.
- RETHWILM, A. 2010. Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol*, 199, 197-207.
- RETHWILM, A., BAUNACH, G., NETZER, K. O., MAURER, B., BORISCH, B. & TER MEULEN, V. 1990. Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res*, 18, 733-8.
- RETHWILM, A., ERLWEIN, O., BAUNACH, G., MAURER, B. & TER MEULEN, V. 1991. The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 941-5.
- RIGGS, J. L., OSHIRLS, TAYLOR, D. O. & LENNETTE, E. H. 1969. Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature*, 222, 1190-1.
- RITCHLIN, C. 2000. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res*, 2, 356-60.
- ROBBINS, P. D. & GHIVIZZANI, S. C. 1998. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther*, 80, 35-47.
- ROBERT-RICHARD, E., RICHARD, E., MALIK, P., GED, C., DE VERNEUIL, H. & MOREAU-GAUDRY, F. 2007. Murine retroviral but not human cellular promoters induce in vivo erythroid-specific deregulation that can be partially prevented by insulators. *Mol Ther*, 15, 173-82.
- ROESSLER, B. J., ALLEN, E. D., WILSON, J. M., HARTMAN, J. W. & DAVIDSON, B. L. 1993. Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo. *J Clin Invest*, 92, 1085-92.
- ROLSTAD, B. 2001. The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? *Immunol Rev*, 184, 136-44.
- ROMEN, F., BACKES, P., MATERNIAK, M., STING, R., VAHLENKAMP, T. W., RIEBE, R., PAWLITA, M., KUZMAK, J. & LOCHELT, M. 2007. Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology*, 364, 123-31.
- ROOBROUCK, V. D., ULLOA-MONTOYA, F. & VERFAILLIE, C. M. 2008. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*, 314, 1937-44.

- ROSENBERG, L. E. 1990. Treating genetic diseases: lessons from three children. *Pediatr Res*, 27, S10-6.
- ROSENBERG, P. S., ALTER, B. P., SOCIE, G. & GLUCKMAN, E. 2005. Secular trends in outcomes for Fanconi anemia patients who receive transplants: implications for future studies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11, 672-9.
- ROSENBERG, S. A., AEBERSOLD, P., CORNETTA, K., KASID, A., MORGAN, R. A., MOEN, R., KARSON, E. M., LOTZE, M. T., YANG, J. C., TOPALIAN, S. L. & 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, 570-8.
- ROSS, C. J., RALPH, M. & CHANG, P. L. 1999. Delivery of recombinant gene products to the central nervous system with nonautologous cells in alginate microcapsules. *Hum Gene Ther*, 10, 49-59.
- ROTHENAIGNER, I., KRAMER, S., MEGGENDORFER, M., RETHWILM, A. & BRACK-WERNER, R. 2009. Transduction of human neural progenitor cells with foamy virus vectors for differentiation-dependent gene expression. *Gene Ther*, 16, 349-58.
- ROY, J., RUDOLPH, W., JURETZEK, T., GARTNER, K., BOCK, M., HERCHENRODER, O., LINDEMANN, D., HEINKELEIN, M. & RETHWILM, A. 2003. Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol*, 77, 11324-31.
- RUBBERT-ROTH, A. & PERNIOK, A. 2003. [Interleukin-1 receptor antagonist anakinra (Kineret) for treatment of rheumatic arthritis]. *Z Rheumatol*, 62, 367-77.
- RUSSELL, D. W. & MILLER, A. D. 1996. Foamy virus vectors. *J Virol*, 70, 217-22.
- RUSSELL, R. A., ZENG, Y., ERLWEIN, O., CULLEN, B. R. & MCCLURE, M. O. 2001. The R region found in the human foamy virus long terminal repeat is critical for both Gag and Pol protein expression. *J Virol*, 75, 6817-24.
- RUSTIGIAN, R., JOHNSTON, P. & REIHART, H. 1955. Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc Soc Exp Biol Med*, 88, 8-16.
- RYAN, M. D., KING, A. M. & THOMAS, G. P. 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, 72 (Pt 11), 2727-32.
- SAIB, A. & DE THE, H. 1996. Molecular biology of the human foamy virus. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 13 Suppl 1, S254-60.
- SANDSTROM, P. A., PHAN, K. O., SWITZER, W. M., FREDEKING, T., CHAPMAN, L., HENEINE, W. & FOLKS, T. M. 2000. Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet*, 355, 551-2.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.

- SANGHA, O. 2000. Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 39 Suppl 2, 3-12.
- SANT, S. M., SUAREZ, T. M., MOALLI, M. R., WU, B. Y., BLAIVAS, M., LAING, T. J. & ROESSLER, B. J. 1998. Molecular lysis of synovial lining cells by in vivo herpes simplex virus-thymidine kinase gene transfer. *Hum Gene Ther*, 9, 2735-43.
- SCHALLMOSER, K., BARTMANN, C., ROHDE, E., BORK, S., GUELLY, C., OBENAUF, A. C., REINISCH, A., HORN, P., HO, A. D., STRUNK, D. & WAGNER, W. 2010. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 95, 867-74.
- SCHENK, T., ENSSLE, J., FISCHER, N. & RETHWILM, A. 1999. Replication of a foamy virus mutant with a constitutively active U3 promoter and deleted accessory genes. *J Gen Virol*, 80 (Pt 7), 1591-8.
- SCHIEKER, M., PAUTKE, C., HAASTERS, F., SCHIEKER, J., DOCHEVA, D., BOCKER, W., GUELKAN, H., NETH, P., JOCHUM, M. & MUTSCHLER, W. 2007. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*, 210, 592-9.
- SCHMIDT, M., HERCHENRODER, O., HEENEY, J. & RETHWILM, A. 1997. Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology*, 230, 167-78.
- SCHMIDT, M. & RETHWILM, A. 1995. Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology*, 210, 167-78.
- SCHUURMAN, H. J., BELL, E. B., GARTNER, K., HEDRICH, H. J., HANSEN, A. K., KRUIJT, B. C., DE VREY, P., LEYTEN, R., MAEDER, S. J., MOUTIER, R. & ET AL. 1992. Comparative evaluation of the immune status of congenitally athymic and euthymic rat strains bred and maintained at different institutes: 1. Euthymic rats. *J Exp Anim Sci*, 35, 16-32.
- SCHWEIZER, M., FALCONE, V., GANGE, J., TUREK, R. & NEUMANN-HAEFELIN, D. 1997. Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol*, 71, 4821-4.
- SCHWEIZER, M., TUREK, R., HAHN, H., SCHLIEPHAKE, A., NETZER, K. O., EDER, G., REINHARDT, M., RETHWILM, A. & NEUMANN-HAEFELIN, D. 1995. Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 11, 161-70.
- SCOTT, D. L., WOLFE, F. & HUIZINGA, T. W. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376, 1094-108.

- SECKINGER, P., KLEIN-NULEND, J., ALANDER, C., THOMPSON, R. C., DAYER, J. M. & RAISZ, L. G. 1990. Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J Immunol*, 145, 4181-4.
- SHERIDAN, C. 2007. Positive clinical data in Parkinson's and ischemia buoy gene therapy. *Nat Biotechnol*, 25, 823-4.
- SI, Y., PULLIAM, A. C., LINKA, Y., CICCONE, S., LEURS, C., YUAN, J., ECKERMANN, O., FRUEHAUF, S., MOONEY, S., HANENBERG, H. & CLAPP, D. W. 2008. Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancs^{-/-} stem cells. *Blood*, 112, 4458-65.
- SILMAN, A. J. & PEARSON, J. E. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3, S265-72.
- SIMKIN, P. A. & PIZZORNO, J. E. 1974. Transynovial exchange of small molecules in normal human subjects. *J Appl Physiol*, 36, 581-7.
- SINGH, J. A., CHRISTENSEN, R., WELLS, G. A., SUAREZ-ALMAZOR, M. E., BUCHBINDER, R., LOPEZ-OLIVO, M. A., GHOGOMU, E. T. & TUGWELL, P. 2009. A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. *CMAJ*, 181, 787-96.
- SKAPENKO, A., LEIPE, J., LIPSKY, P. E. & SCHULZE-KOOPS, H. 2005. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7 Suppl 2, S4-14.
- SMEETS, R. L., VAN DE LOO, F. A., JOOSTEN, L. A., ARNTZ, O. J., BENNINK, M. B., LOESBERG, W. A., DMITRIEV, I. P., CURIEL, D. T., MARTIN, M. U. & VAN DEN BERG, W. B. 2003. Effectiveness of the soluble form of the interleukin-1 receptor accessory protein as an inhibitor of interleukin-1 in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 48, 2949-58.
- SMITH, J. B. & HAYNES, M. K. 2002. Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Ann Intern Med*, 136, 908-22.
- SMITH, M. D., BARG, E., WEEDON, H., PAPENGELIS, V., SMEETS, T., TAK, P. P., KRAAN, M., COLEMAN, M. & AHERN, M. J. 2003. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis*, 62, 303-7.
- SMITH, R. J., CHIN, J. E., SAM, L. M. & JUSTEN, J. M. 1991. Biologic effects of an interleukin-1 receptor antagonist protein on interleukin-1-stimulated cartilage erosion and chondrocyte responsiveness. *Arthritis Rheum*, 34, 78-83.
- SOMIA, N. & VERMA, I. M. 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*, 1, 91-9.

- SONEOKA, Y., CANNON, P. M., RAMSDALE, E. E., GRIFFITHS, J. C., ROMANO, G., KINGSMAN, S. M. & KINGSMAN, A. J. 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 23, 628-33.
- STANGE, A., MANNIGEL, I., PETERS, K., HEINKELEIN, M., STANKE, N., CARTELLIERI, M., GOTTLINGER, H., RETHWILM, A., ZENTGRAF, H. & LINDEMANN, D. 2005. Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol*, 79, 5466-76.
- STEINERT, A. F., GHIVIZZANI, S. C., RETHWILM, A., TUAN, R. S., EVANS, C. H. & NOTH, U. 2007a. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 9, 213.
- STEINERT, A. F., NOTH, U. & TUAN, R. S. 2008. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*, 39 Suppl 1, S97-113.
- STEINERT, A. F., PALMER, G. D., CAPITO, R., HOFSTAETTER, J. G., PILAPIL, C., GHIVIZZANI, S. C., SPECTOR, M. & EVANS, C. H. 2007b. Genetically enhanced engineering of meniscus tissue using ex vivo delivery of transforming growth factor-beta 1 complementary deoxyribonucleic acid. *Tissue Eng*, 13, 2227-37.
- STEINERT, A. F., PALMER, G. D., PILAPIL, C., NOTH, U., EVANS, C. H. & GHIVIZZANI, S. C. 2009. Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A*, 15, 1127-39.
- STENDERUP, K., JUSTESEN, J., CLAUSEN, C. & KASSEM, M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33, 919-26.
- STIRNAGEL, K., LUFTENEGGER, D., STANGE, A., SWIERSY, A., MULLERS, E., REH, J., STANKE, N., GROSSE, A., CHIANTIA, S., KELLER, H., SCHWILLE, P., HANENBERG, H., ZENTGRAF, H. & LINDEMANN, D. 2010. Analysis of prototype foamy virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology*, 7, 45.
- STRANGFELD, A., HIERSE, F., KEKOW, J., VON HINUEBER, U., TONY, H. P., DOCKHORN, R., LISTING, J. & ZINK, A. 2009. Comparative effectiveness of tumour necrosis factor alpha inhibitors in combination with either methotrexate or leflunomide. *Ann Rheum Dis*, 68, 1856-62.
- SUHONEN, J., RAY, J., BLOMER, U., GAGE, F. H. & KASPAR, B. 2006. Ex vivo and in vivo gene delivery to the brain. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 13, Unit 13 3.
- SUNG, R. S., QIN, L. & BROMBERG, J. S. 2001. TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol Ther*, 3, 757-67.

- SUZUKI, M., SUGIMOTO, Y., TSUKAHARA, S., OKOCHI, E., GOTTESMAN, M. M. & TSURUO, T. 1997. Retroviral coexpression of two different types of drug resistance genes to protect normal cells from combination chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 3, 947-54.
- SWACK, N. S. & HSIUNG, G. D. 1975. Pathogenesis of simian foamy virus infection in natural and experimental hosts. *Infect Immun*, 12, 470-4.
- SWITZER, W. M., BHULLAR, V., SHANMUGAM, V., CONG, M. E., PAREKH, B., LERCHE, N. W., YEE, J. L., ELY, J. J., BONEVA, R., CHAPMAN, L. E., FOLKS, T. M. & HENEINE, W. 2004. Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol*, 78, 2780-9.
- SYMMONS, D. P. 2002. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16, 707-22.
- TAKEUCHI, Y., LIONG, S. H., BIENIASZ, P. D., JAGER, U., PORTER, C. D., FRIEDMAN, T., MCCLURE, M. O. & WEISS, R. A. 1997. Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl(alpha1-3)galactosylation. *J Virol*, 71, 6174-8.
- TANIGUCHI, K., KOHSAKA, H., INOUE, N., TERADA, Y., ITO, H., HIROKAWA, K. & MIYASAKA, N. 1999. Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Med*, 5, 760-7.
- TAYLOR, J. A., VOJTECH, L., BAHNER, I., KOHN, D. B., LAER, D. V., RUSSELL, D. W. & RICHARD, R. E. 2008. Foamy virus vectors expressing anti-HIV transgenes efficiently block HIV-1 replication. *Mol Ther*, 16, 46-51.
- TOBALY-TAPIERO, J., BITTOUN, P., NEVES, M., GUILLEMIN, M. C., LECHELLIER, C. H., PUVION-DUTILLEUL, F., GICQUEL, B., ZIENTARA, S., GIRON, M. L., DE THE, H. & SAIB, A. 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol*, 74, 4064-73.
- TOBALY-TAPIERO, J., KUPIEC, J. J., SANTILLANA-HAYAT, M., CANIVET, M., PERIES, J. & EMANOIL-RAVIER, R. 1991. Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J Gen Virol*, 72 (Pt 3), 605-8.
- TOMITA, T., TAKEUCHI, E., TOMITA, N., MORISHITA, R., KANEKO, M., YAMAMOTO, K., NAKASE, T., SEKI, H., KATO, K., KANEDA, Y. & OCHI, T. 1999. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum*, 42, 2532-42.
- TRAISTER, R. S. & HIRSCH, R. 2008. Gene therapy for arthritis. *Mod Rheumatol*, 18, 2-14.
- TRENTHAM, D. E., TOWNES, A. S. & KANG, A. H. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146, 857-68.

- TRIPPEL, S. B., GHIVIZZANI, S. C. & NIXON, A. J. 2004. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther*, 11, 351-9.
- TROBRIDGE, G., JOSEPHSON, N., VASSILOPOULOS, G., MAC, J. & RUSSELL, D. W. 2002a. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther*, 6, 321-8.
- TROBRIDGE, G. & RUSSELL, D. W. 2004. Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol*, 78, 2327-35.
- TROBRIDGE, G., VASSILOPOULOS, G., JOSEPHSON, N. & RUSSELL, D. W. 2002b. Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol*, 346, 628-48.
- TROBRIDGE, G. D. 2009. Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin Biol Ther*, 9, 1427-36.
- TROBRIDGE, G. D., ALLEN, J., PETERSON, L., IRONSIDE, C., RUSSELL, D. W. & KIEM, H. P. 2009. Foamy and lentiviral vectors transduce canine long-term repopulating cells at similar efficiency. *Hum Gene Ther*, 20, 519-23.
- TROBRIDGE, G. D. & KIEM, H. P. 2010. Large animal models of hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther*, 17, 939-48.
- TROBRIDGE, G. D., MILLER, D. G., JACOBS, M. A., ALLEN, J. M., KIEM, H. P., KAUL, R. & RUSSELL, D. W. 2006. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1498-503.
- TROBRIDGE, G. D. & RUSSELL, D. W. 1998. Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther*, 9, 2517-25.
- TUAN, R. S., BOLAND, G. & TULI, R. 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5, 32-45.
- UETSUKI, T., NAITO, A., NAGATA, S. & KAZIRO, Y. 1989. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J Biol Chem*, 264, 5791-8.
- ULFGREN, A. K., GRONDAL, L., LINDBLAD, S., KHADEMI, M., JOHNELL, O., KLARESKOG, L. & ANDERSSON, U. 2000. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis*, 59, 439-47.
- ULRICH-VINTHER, M., DUCH, M. R., SOBALLE, K., O'KEEFE, R. J., SCHWARZ, E. M. & PEDERSEN, F. S. 2004. In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector. *J Orthop Res*, 22, 726-34.
- VAN DE LOO, F. A. 2004. Inflammation-responsive promoters for fine-tuned gene therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Mol Ther*, 6, 537-45.

- VAN DE LOO, F. A., DE HOOGHE, A. S., SMEETS, R. L., BAKKER, A. C., BENNINK, M. B., ARNTZ, O. J., JOOSTEN, L. A., VAN BEUNINGEN, H. M., VAN DER KRAAN, P. K., VARLEY, A. W. & VAN DEN BERG, W. B. 2004a. An inflammation-inducible adenoviral expression system for local treatment of the arthritic joint. *Gene Ther*, 11, 581-90.
- VAN DE LOO, F. A., GEURTS, J. & VAN DEN BERG, W. B. 2006. Gene therapy works in animal models of rheumatoid arthritis...so what! *Curr Rheumatol Rep*, 8, 386-93.
- VAN DE LOO, F. A., SMEETS, R. L. & VAN DEN BERG, W. B. 2004b. Gene therapy in animal models of rheumatoid arthritis: are we ready for the patients? *Arthritis Res Ther*, 6, 183-96.
- VAN DEN BERG, W. B. 2000. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 59 Suppl 1, i81-4.
- VAN DEN BERG, W. B., JOOSTEN, L. A., HELSEN, M. & VAN DE LOO, F. A. 1994. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol*, 95, 237-43.
- VAN DEN BERG, W. B., JOOSTEN, L. A., LUBBERTS, E., VAN DE LOO, F. A. & VAN LENT, P. L. 2000. Cytokine directed targeting in chronic arthritis. *Eur Cytokine Netw*, 11, 481-2.
- VAN DEN BERG, W. B., JOOSTEN, L. A. & VAN DE LOO, F. A. 1999. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 17, S105-14.
- VAN SCHILFGAARDE, R. & DE VOS, P. 1999. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med*, 77, 199-205.
- VASSILOPOULOS, D. & CALABRESE, L. H. 2008. Virally associated arthritis 2008: clinical, epidemiologic, and pathophysiologic considerations. *Arthritis Res Ther*, 10, 215.
- VASSILOPOULOS, G., JOSEPHSON, N. C. & TROBRIDGE, G. 2003. Development of foamy virus vectors. *Methods Mol Med*, 76, 545-64.
- VASSILOPOULOS, G. & RETHWILM, A. 2008. The usefulness of a perfect parasite. *Gene Ther*, 15, 1299-1301.
- VASSILOPOULOS, G., TROBRIDGE, G., JOSEPHSON, N. C. & RUSSELL, D. W. 2001. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood*, 98, 604-9.
- VERWEIJ, C. L. 1999. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58 Suppl 1, I20-6.
- WAGNER, W., BORK, S., HORN, P., KRUNIC, D., WALENDA, T., DIEHLMANN, A., BENES, V., BLAKE, J., HUBER, F. X., ECKSTEIN, V., BOUKAMP, P. & HO, A. D. 2009.

- Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4, e5846.
- WAKABAYASHI-ITO, N. & NAGATA, S. 1994. Characterization of the regulatory elements in the promoter of the human elongation factor-1 alpha gene. *J Biol Chem*, 269, 29831-7.
- WAKITANI, S., IMOTO, K., YAMAMOTO, T., SAITO, M., MURATA, N. & YONEDA, M. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 199-206.
- WATANABE, S., IMAGAWA, T., BOIVIN, G. P., GAO, G., WILSON, J. M. & HIRSCH, R. 2000. Adeno-associated virus mediates long-term gene transfer and delivery of chondroprotective IL-4 to murine synovium. *Mol Ther*, 2, 147-52.
- WEBER, E. L. & CANNON, P. M. 2007. Promoter choice for retroviral vectors: transcriptional strength versus trans-activation potential. *Hum Gene Ther*, 18, 849-60.
- WEHLING, N., PALMER, G. D., PILAPIL, C., LIU, F., WELLS, J. W., MULLER, P. E., EVANS, C. H. & PORTER, R. M. 2009a. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum*, 60, 801-12.
- WEHLING, P., REINECKE, J., BALTZER, A. W., GRANRATH, M., SCHULITZ, K. P., SCHULTZ, C., KRAUSPE, R., WHITESIDE, T. W., ELDER, E., GHIVIZZANI, S. C., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 2009b. Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther*, 20, 97-101.
- WESCHE, H., HENZEL, W. J., SHILLINGLAW, W., LI, S. & CAO, Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7, 837-47.
- WEYAND, C. M. 2000. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39 Suppl 1, 3-8.
- WIKTOROWICZ, T., PETERS, K., ARMBRUSTER, N., STEINERT, A. F. & RETHWILM, A. 2009. Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences. *J Gen Virol*, 90, 481-7.
- WILK, T., DE HAAS, F., WAGNER, A., RUTTEN, T., FULLER, S., FLUGEL, R. M. & LOCHELT, M. 2000. The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol*, 74, 2885-7.
- WILLIAMS, D. A., LEMISCHKA, I. R., NATHAN, D. G. & MULLIGAN, R. C. 1984. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*, 310, 476-80.
- WILSON, J. M. 2005. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther*, 16, 1014-5.

- WILSON, K. P., BLACK, J. A., THOMSON, J. A., KIM, E. E., GRIFFITH, J. P., NAVIA, M. A., MURCKO, M. A., CHAMBERS, S. P., ALDAPE, R. A., RAYBUCK, S. A. & ET AL. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 370, 270-5.
- WIVEL, N. A. & WALTERS, L. 1993. Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science*, 262, 533-8.
- WOLFE, N. D., SWITZER, W. M., CARR, J. K., BHULLAR, V. B., SHANMUGAM, V., TAMOUFE, U., PROSSER, A. T., TORIMIRO, J. N., WRIGHT, A., MPOUDI-NGOLE, E., MCCUTCHAN, F. E., BIRX, D. L., FOLKS, T. M., BURKE, D. S. & HENEINE, W. 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet*, 363, 932-7.
- WONG, M. & CARTER, D. R. 2003. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*, 33, 1-13.
- WU, M., CHARI, S., YANCHIS, T. & MERGIA, A. 1998. cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol*, 72, 3451-4.
- WU, M. & MERGIA, A. 1999. Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol*, 73, 4498-501.
- YAMADA, K., MCCARTY, D. M., MADDEN, V. J. & WALSH, C. E. 2003. Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer. *Biotechniques*, 34, 1074-8, 1080.
- YANG, P., ZEMBA, M., ABOUD, M., FLUGEL, R. M. & LOCHELT, M. 1997. Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes*, 15, 17-23.
- YIN, G., LIU, W., AN, P., LI, P., DING, I., PLANELLES, V., SCHWARZ, E. M. & MIN, W. 2002. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*, 5, 547-54.
- YOUNG, A. & KODURI, G. 2007. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 21, 907-27.
- YOVANDICH, J., O'MALLEY, B., JR., SIKES, M. & LEDLEY, F. D. 1995. Gene transfer to synovial cells by intra-articular administration of plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 6, 603-10.
- YU, S. F., SULLIVAN, M. D. & LINIAL, M. L. 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol*, 73, 1565-72.
- YU, S. F., VON RUDEN, T., KANTOFF, P. W., GARBER, C., SEIBERG, M., RUTHER, U., ANDERSON, W. F., WAGNER, E. F. & GILBOA, E. 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 3194-8.

- ZACHOS, T. A., BERTONE, A. L., WASSENAAR, P. A. & WEISBRODE, S. E. 2007. Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg*, 20, 87-95.
- ZHANG, H. G., XIE, J., YANG, P., WANG, Y., XU, L., LIU, D., HSU, H. C., ZHOU, T., EDWARDS, C. K., 3RD & MOUNTZ, J. D. 2000. Adeno-associated virus production of soluble tumor necrosis factor receptor neutralizes tumor necrosis factor alpha and reduces arthritis. *Hum Gene Ther*, 11, 2431-42.
- ZHANG, H. G., ZHOU, T., YANG, P., EDWARDS, C. K., 3RD, CURIEL, D. T. & MOUNTZ, J. D. 1998. Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver. *Hum Gene Ther*, 9, 1875-84.
- ZHOU, S., MODY, D., DERA VIN, S. S., HAUER, J., LU, T., MA, Z., HACEIN-BEY ABINA, S., GRAY, J. T., GREENE, M. R., CAVAZZANA-CALVO, M., MALECH, H. L. & SORRENTINO, B. P. 2010. A self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy that does not activate LMO2 expression in human T cells. *Blood*, 116, 900-8.
- ZHU, J., MUSCO, M. L. & GRACE, M. J. 1999. Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages. *Cytometry*, 37, 51-9.
- ZWERINA, J., REDLICH, K., POLZER, K., JOOSTEN, L., KRONKE, G., DISTLER, J., HESS, A., PUNDT, N., PAP, T., HOFFMANN, O., GASSER, J., SCHEINECKER, C., SMOLEN, J. S., VAN DEN BERG, W. & SCHETT, G. 2007. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 11742-7.
- ZYCHLINSKI, D., SCHAMBACH, A., MODLICH, U., MAETZIG, T., MEYER, J., GRASSMAN, E., MISHRA, A. & BAUM, C. 2008. Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors. *Mol Ther*.