

# Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen

Cordula Leurs, Helmut Hanenberg

## Zusammenfassung

Die Autoren geben einen Überblick über die gegenwärtigen Indikationen, technischen Möglichkeiten und Probleme der Übertragung von Genen in hämatopoetischen Stammzellen. Als Vektoren für die Genübertragung werden derzeit vorwiegend rekombinante, replikationsdefekte Retroviren eingesetzt, welche von dem einfach aufgebauten murinen Leukämievirus abgeleitet sind. Bis zum Jahre 2001 wurden im Rahmen von 212 klinischen Protokollen insgesamt 1755 Patienten einer Genterapie mit retroviralen Konstrukten unterzogen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass onkoretrovirale Vektoren zur Genübertragung in hämatopoetische Stammzellen beim Menschen geeignet sind, wenngleich die Übertragung in Zellen mit niedriger Teilungsaktivität (putative Stammzellen) schwierig ist und echte therapeutische Erfolge bisher nur bei zwei Immundefizienz-Erkrankungen erzielt werden konnten. Auch bei der Behandlung der Fanconi Anämie (FA) konnten mit Hilfe der Genübertragung in CD34+ Zellen bisher keine entscheidenden Durchbrüche erzielt werden. Weltweit wird an der Verbesserung der viralen Vektorsysteme gearbeitet, wobei insbesondere lentivirale Vektoren sowie auf Foamyviren basierende Vektoren getestet werden. Diese Vektoren sind weniger als die klassischen onkoretroviralen Vektoren auf die Teilungsfähigkeit der Zielzellen angewiesen. Neben der Genterapie von monogenen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems gelten die Bemühungen vor allem dem Gentransfer von Resistenzgenen in hämatopoetische Stammzellen, welche das Überleben dieser Zellen während der Chemotherapie von malignen Erkrankungen verbessern sollen.

## Schlüsselwörter

Hämatopoetische Stammzellen, Genterapie, Gentransfer, Onkoretrovirus, Lentivirus, Foamyvirus, Fanconi Anämie

## Summary

The authors review current indications, protocols and problems of gene transfer into hematopoietic stem cells. Most current protocols use recombinant, replication defective retroviral vectors derived from murine leukemia virus. Up to the year 2001, 1755 patients were treated within the framework of 212 approved clinical studies. Gene transfer using oncoretroviral vectors has been shown to be suitable for genetic modification of human hematopoietic stem cells, even though the efficiency of transduction of non-dividing cells (putative stem cells) is rather low and therapeutic success has been limited so far to the treatment of two immunodeficiency diseases. In the case of Fanconi anemia, retroviral vectors have been used for the transfer of FANCC and FANCA c-DNAs into CD34+ cells, albeit with limited success. Many laboratories work on the improvement of viral vector systems. Both, lentivirus- and foamy virus-based vectors have shown promising results. Lentiviral vectors appear to transduce nondividing cells more efficiently than the classical oncoretroviral vectors. In addition to attempts aimed at gene therapy of monogenic diseases of the hematopoietic system, current efforts concentrate on the development of safe and efficient protocols for the transfer of resistance genes into hematopoietic stem cells of patients undergoing chemotherapy for malignant diseases.

## Keywords

hematopoietic stem cells, gene therapy, gene transfer, oncoretrovirus, lentivirus, foamy virus, Fanconi anemia

## 1. Einführung

Die Hämatopoese ist ein streng hierarchisch strukturiertes, dynamisches System, das aufgrund einer Vielzahl von geregelten Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine kontinuierliche Produktion von reifen hämatopoetischen Zellen gewährleistet. Alle Zellen des hämatopoetischen Systems stammen von den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen ab, die dadurch charakterisiert sind, dass sie sich ständig selbst erneuern und in jede Zelle des hämatopoetischen Systems differenzieren können [1-3] (Abbildung 1). Zahlreiche angeborene Erkrankungen des blutbildenden Systems können durch Transplantation von normalen hämatopoetischen Stammzellen geheilt werden [4, 5]. Das Anwachsen einer geringen Anzahl dieser pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen führt zu einer kontinuierlichen Produktion der verschiedenen Blut- und Immunzellen für die gesamte Lebensdauer des Individuums und ermöglicht so eine normale Lebenserwartung [1-3]. Diese Besonderheit des hämatopoetischen Systems legt nahe, dass hämatopoetische Stammzellen ein vielversprechendes Ziel für die somatische Genterapie darstellen [6, 7]. Mit der somatischen Genterapie können zwei potentielle Ziele verfolgt werden: Das Ersetzen eines fehlenden oder defekten Gens in bestimmten Zielzellen und das Versehen von Zellen mit neuen biologischen Eigenschaften [8-10]. Im Fall von hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen für den Gentransfer werden beide Richtungen verfolgt, die Heilung von erblichen monogenen Erkrankungen, die sich im wesentlichen im hämatopoetischen System manifestieren, und die Expression von Resistenzgenen als Schutz vor Chemotherapie-induzierter Myelotoxizität bei verschiedenen onkologischen Erkrankungen.

### 1.1 Monogene Erkrankungen

Analog zu einer Transplantation mit normalen hämatopoetischen Stammzellen sollte das Einbringen der „gesunden“ Kopie eines defekten Gens in die Stammzellen eines Patienten zu einer Heilung der Krankheit führen, wenn die korrigierten Stammzellen das hämatopoetische System des

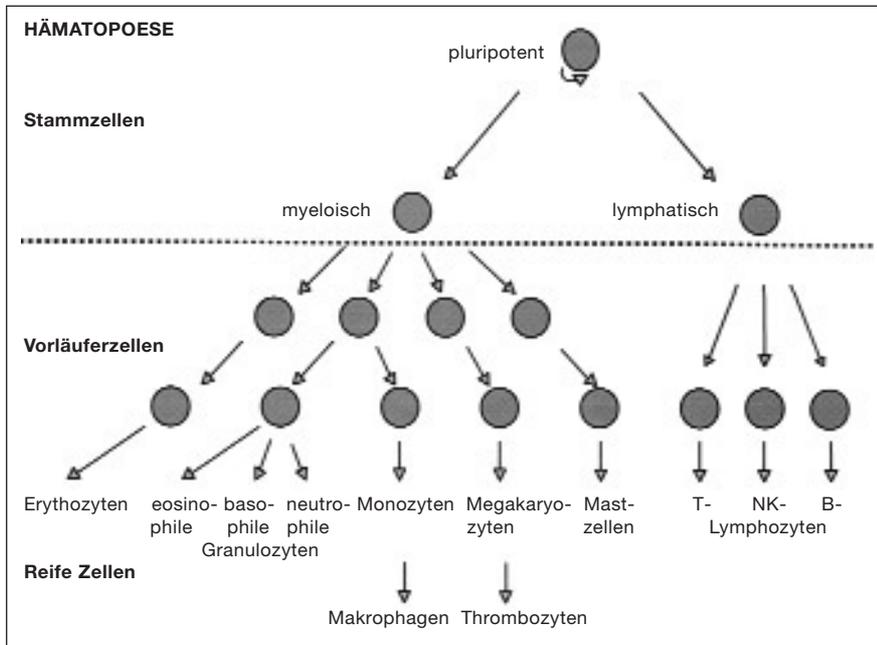


Abb 1 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Patienten repopulieren. Es gibt eine Vielzahl genetischer Erkrankungen, bei denen eine solche Therapie in Frage kommt [11-17]. Die meisten der Krankheiten betreffen hämatopoetische Zellen. Allerdings könnten Patienten mit Erbkrankheiten, die sich außerhalb der Hämatopoese manifestieren, wie zum Beispiel Stoffwechselerkrankungen, ebenfalls von einer Therapie mit genetisch veränderten Stammzellen profitieren, da die korrigierte Nachkommenschaft sich im ganzen Körper verteilt und bei einigen Erkrankungen das korrigierte Protein aus den Blutzellen freigesetzt werden kann [18, 19].

### 1.2 Chemotherapieresistenz

Myelotoxizität ist häufig die dosislimitierende Nebenwirkung der Chemotherapie bei malignen Erkrankungen, insbesondere bei intensiven Behandlungsprotokollen, die zum Beispiel bei hochgradigen Lymphomen [20], Ewing Sarkomen [21], multiplen Myelomen [22] und Keimzelltumoren [23, 24] eingesetzt werden. Häufig ist im Rahmen der Therapie die Bereitstellung autologer Stammzellen, die Transfusion von Blutprodukten und/oder die Verabreichung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren erforderlich. In einer solchen Situation wäre das Einschleusen von Chemotherapieresistenzgenen in autologe hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen eine Option, mit der die hämatopoetische Toxizität verringert und eine Behandlungsintensivierung erleichtert werden könnte. Bislang wurde eine Reihe von Genen identifiziert, deren Produkte die Zellen vor

den toxischen Effekten chemotherapeutischer Agenzien schützen können [25-29]. Diese Gene können abhängig von der Lokalisation und Funktion der Proteine in drei Kategorien unterteilt werden:

- 1) Membrangebundene Proteine wie das „multidrug resistance protein 1“ (MDR-1) oder das „multidrug resistance related protein“ (MRP), die zytotoxische Produkte aus den Zellen pumpen.
- 2) Zytoplasmatische Proteine, die in die Verstoffwechslung oder Entgiftung von Substanzen involviert sind, wie zytosolische Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), Glutathion-S-Transferase (GST) oder mutierte Formen der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR).
- 3) Kernproteine, die an der Reparatur von induzierten DNA-Schäden beteiligt sind, wie O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) oder Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG).

Die Expression dieser Resistenzgene in hämatopoetischen Zellen in Kombination mit Chemotherapie wurde *in vitro* und in Tierstudien untersucht [26-30]. MDR-1 wurde auch in klinischen Studien getestet [31]. Eine klinische Applikation ist vermutlich nicht bei jedem Kandidatengen möglich, da nicht alle Zellen notwendigerweise eine Überexpression der Proteine tolerieren werden. Dies wurde beispielsweise für MPG gezeigt, deren Überexpression zu Zytotoxizität mit genetischer Instabilität, einem Ungleichgewicht im Exzisionsreparatur-

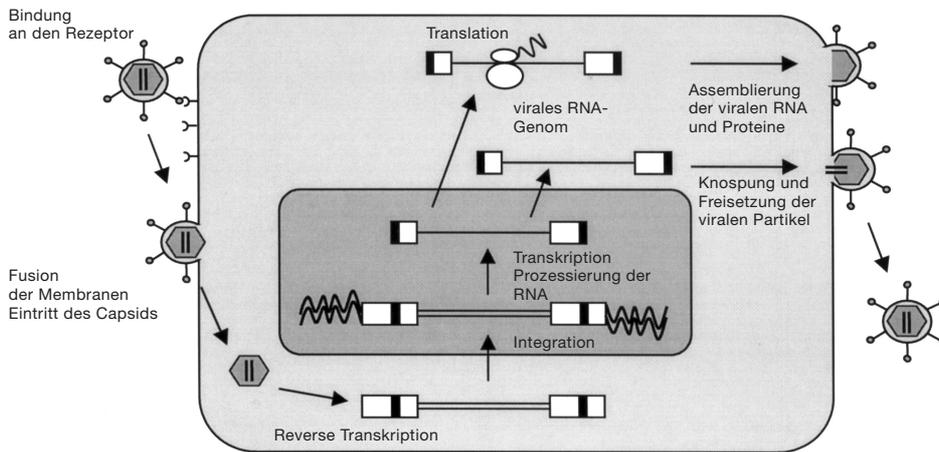
Tab 1 Probleme des retroviralen Gentransfers in Stammzellen

- *In vitro*-Manipulation der Stammzellen
- Interaktion zwischen Vektor und Zielzelle
- Expression des retroviralen Rezeptors auf den Zielzellen
- Art des retroviralen Vektorsystems
- Stabile Langzeitexpression des therapeutischen Gens
- Präklinisches Analysesystem für transduzierte Stammzellen
- Immunantwort gegen das Transgenprodukt
- Insertionsmutagenese

weg, chromosomalen Aberrationen und dem Austausch von Schwesterchromatiden führte [32].

### 2. Probleme des Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen

Auch wenn das Prinzip einfach erscheint, gibt es – neben dem primären technischen Problem, ein gewünschtes Gen stabil in bestimmte Zielzellen einbringen zu wollen – verschiedene Hindernisse (Tab. 1), die für eine erfolgreiche Therapie überwunden werden müssen [7, 33, 34]. Die Vektoren, die derzeit zum Einschleusen der Wildtyp-cDNAs verwendet werden, tragen einen konstitutiv exprimierenden Promotor. Möglicherweise ist bei bestimmten Erkrankungen das Einfügen von regulatorischen Elementen erforderlich, wenn eine erfolgreiche funktionelle Korrektur von transduzierten Zellen eine strenge Regulation der Genexpression erfordert [6]. Des Weiteren könnte das Einbringen genetischer Elemente, die das Abschalten („silencing“) der Expression eingefügter Sequenzen verhindern, für die Langzeitgenexpression erforderlich sein. Zusätzlich zu den die Expression und Regulation betreffenden Schwierigkeiten ist möglich, dass das Wildtyp-Protein durch das Immunsystem des Patienten erkannt wird und eine entsprechende Immunantwort das Protein neutralisieren, oder sogar genetisch korrigierte Zellen vernichten könnte [35, 36]. Da das defekte Genprodukt auch weiterhin in den Zellen des Patienten präsent ist, kann



**Abb 2 Der retrovirale Replikationszyklus**

Das Retrovirus bindet mit seinem Hüllprotein (Env) an den zellulären Rezeptor und die Membran des Virus fusioniert mit der Membran der Zielzelle. Es kommt zur Aufnahme des Capsids und das RNA-Genom der Retroviren wird durch die virale Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Das sogenannte Provirus wird durch die virale Integrase in das Genom der Zielzelle integriert. Als Teil der genomischen DNA wird es dann durch die zelluläre RNA Polymerase II transkribiert, aus dem Kern transportiert und im Zytoplasma translatiert. Die Proteinkomponenten lagern sich an der Plasmamembran mit der viralen RNA zusammen und es kommt zur Knospung unreifer Partikel mit nachfolgender Reifung zu infektiösen Partikeln durch die Protease-vermittelte Spaltung der Gag/Pol-Vorläuferproteine.

es dominant-negativ mit der Funktion des normalen Proteins interferieren und damit die Korrektur des Phänotyps verhindern [37]. Ein weiteres Problem bei der stabilen genetischen Modifikation von Zellen mittels retroviraler Vektoren ist das Risiko der Insertionsmutagenese. Da die Vektoren zufällig in das Genom der Zielzellen integrieren, besteht, wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit, die Möglichkeit der Aktivierung von zellulären Onkogenen und der Ausbildung eines malignen Phänotyps. Lösungsansätze zu diesen Problemen sind für jede Erkrankung spezifisch zu finden, bevor eine Gentherapie erfolgreich sein kann.

Initial hängt der Erfolg einer Stammzellgentherapie ganz entscheidend davon ab, wie hoch bei einer Transplantation der Anteil an genetisch modifizierten Stammzellen im Vergleich zu den nicht korrigierten Stammzellen ist [6, 38]. Längerfristig bestimmt zusätzlich die Tatsache, ob die transduzierten Zellen *in vivo* einen Selektionsvorteil haben oder nicht, über den Erfolg der Gentherapie [6, 38]. Bei einigen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Fanconi Anämie (persönliche Beobachtungen), der Defizienz der  $\gamma$ -Kette des Interleukin (IL)-2 Rezeptors [39, 40] oder dem Adenosindeaminase (ADA)-Mangel [41], gibt es Hinweise auf einen solchen *in vivo* Selektionsvorteil korrigierter Zellen. Auch eine geringe Anzahl gesunder Stammzellen reicht möglicherweise aus, um das gesamte hämatopoetische System zu repopulieren, sofern ausreichend Zeit vor-

handen ist. Bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel der pulmonalen Alveolarproteinose manifestiert sich der Defekt nur in den reifen Makrophagen und Monozyten [11, 42]. Die Stamm- und Vorläuferzellen haben durch die Expression der korrigierenden cDNA weder einen Wachstumsvorteil noch -nachteil. Somit muss die initiale Gentransfereffizienz für einen therapeutischen Nutzen sehr hoch sein. Eine alternative Strategie ist, eines der genannten Chemotherapie-resistenzgene als selektierbaren Marker mit dem therapeutischen Gen zu kombinieren. Auf diese Weise könnten unter Verabreichung des entsprechenden Chemotherapeutikums Zellen angereichert werden, die das gewünschte Gen tragen, obgleich es den Zellen selbst keinen selektiven Vorteil bringt [6, 43].

### 3. Die Methodik des Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen

Um Gene stabil in hämatopoetische Stammzellen einzuführen, werden nahezu ausschließlich rekombinante retrovirale Vektoren benutzt, da Retroviren die Fähigkeit besitzen, ihre genetische Information in das Genom der Zielzellen zu integrieren (Abbildung 2). Mit jeder Zellteilung wird dann das eingeschleuste genetische Material als Teil des Genoms an die Tochterzellen weitergegeben. Die meisten retroviralen Vektoren sind von dem einfach strukturierten Onkoretrovirus „Moloney murine leukemia virus“ (MoMLV) abgeleitet [44, 45]. Die Methodik zur Herstellung von stabilen Produzentenklonen für onkoretrovirale Vektoren, die  $10^5 - 10^6$

infektiöse Partikel/ml produzieren, ist gut etabliert [46] und unter klinischen Bedingungen einsetzbar. Die Ergebnisse aus klinischen Studien zeigen, dass onkoretrovirale Vektoren sich prinzipiell dazu eignen, hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren [7]. Die klinischen Erfolge blieben bisher aber hinter den hohen Erwartungen zurück. Bis September 2001 waren insgesamt 212 klinische Protokolle mit retroviralen Vektoren veröffentlicht, nach denen 1755 Patienten behandelt wurden [47]. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden aber lediglich vier erfolgreiche Studien mit hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen publiziert, davon drei in den vergangenen beiden Jahren [31, 48-52]. Nach wie vor müssen diverse Schwierigkeiten überwunden werden, um die hämatopoetischen Stammzellen effizient mit den rekombinanten Retroviren transduzieren zu können. Dazu gehören die Optimierung der Vektoren und die Optimierung der Transduktionsprotokolle.

#### 3.1 Ein murines Xenotransplantationsmodell

Humane hämatopoetische Stammzellen exprimieren CD34 [53, 54]. Für eine klinische Stammzelltransplantation können CD34+ Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder mit „granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF) mobilisiertem peripheren Blut gewonnen werden. Der Anteil der CD34+ Zellen in den drei Ausgangsmaterialien liegt bei 0,1 – 2% aller nukleären Zellen. Selbst unter zu mehr als 90% aufgereinigten CD34+ Zellen sind Stammzellen allerdings sehr sel-

ten [55]. Da Stammzellen sich phänotypisch nicht von anderen primitiven hämatopoetischen Zellen unterscheiden lassen, kann ihr Nachweis nur funktionell erfolgen: Nach einer Transplantation müssen Stammzellen einen myeloablativ behandelten Organismus in allen Zellreihen langfristig repopulieren [1, 56, 57]. Mit *in vitro*-Tests, die für klinische Studien zur Optimierung des Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen eingesetzt wurden [58-62], wurde die Transduktionseffizienz in klonogene Zellen analysiert. Mit den ersten klinische Phase I-Studien wurde aber deutlich, dass die Ergebnisse solcher Tests keine Aussage über die Zellen erlauben, die nach einer Transplantation im Menschen anwachsen und das hämatopoetische System repopulieren [63]. Vor diesem Hintergrund wurde ein murines Xenotransplantationsmodell entwickelt, bei dem humane CD34+ Zellen in immundefiziente Mäuse, die „nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency“ (NOD/SCID) Mäuse, transplantiert werden [64, 65]. Die in diesen Mäusen Hämatopoese initiiierenden humanen Zellen wurden als „SCID repopulating cells“ (SRCs) definiert und ausschließlich in der Population der CD34+/CD38- Zellen gefunden. Wie hoch der Anteil echter hämatopoetischer Stammzellen an dieser Population ist, ist noch ungeklärt. Das murine Xenotransplantationsmodell wird derzeit verwendet, um präklinisch den Gentransfer in primitive hämatopoetische Zellen zu charakterisieren.

### 3.2 Das Transduktionsprotokoll

Der onkoretrovirale Präintegrationskomplex ist relativ instabil und nicht in der Lage, die Kernmembran zu passieren [66, 67]. Deshalb muss innerhalb weniger Stunden nach der Infektion eine Zellteilung erfolgen, um eine Integration der proviralen DNA zu erreichen. Die geringe Teilungsaktivität der Stammzellen, die sich größtenteils in der G<sub>0</sub> Phase befinden, verhindert daher eine effiziente Integration der MoMLV-basierenden Vektoren. Die wichtigsten Zytokine, die zur Induktion von Proliferation bei hämatopoetischen Stammzellen verwendet werden können, ohne eine Differen-

zierung der Zellen herbeizuführen, scheinen Stammzellfaktor (SCF) und Thrombopoietin (TPO), auch „megakaryocyte growth and development factor“ (MGDF) genannt, zu sein [68-70]. Darüberhinaus gibt es eine Vielzahl weiterer Zytokine, wie G-CSF, „fetal liver tyrosine kinase 3 ligand“ (Flt3-L), IL-6 und IL-3, die erfolgreich bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen eingesetzt wurden [16, 62, 71, 72]. Flt3-L scheint wichtig zu sein, um *in vitro* eine Differenzierung der primitiven Zellen zu vermeiden und somit die Repopulationskapazität transduzierter Zellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse zu erhalten [73]. Die Zugabe von IL-3 zum Zytokingemisch könnte einen gegenteiligen Effekt haben, es scheint Differenzierung zu induzieren und dadurch den Verlust der Langzeit-Repopulationskapazität zu verursachen [74-76].

Neben der Optimierung der Zytokin-kombination zur Proliferationsaktivierung der Zielzellen brachte die Kolo-kalisation der Zielzellen mit den Vektorpartikeln auf rekombinanten Fibronectinfragmenten eine große Verbesserung bei der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen [60, 61]. Das Haften der retroviralen Partikel an die Heparinbindungsdomäne von Fibronectin wird in aktuellen Protokollen genutzt, um mit dem Fibronectinfragment CH-296 beschichtete Zellkulturplatten mit Retroviren zu beladen und somit die Dichte an Vektorpartikeln zu erhöhen, die mit einer einzelnen Zielzelle interagieren können [62].

### 3.3 Retrovirale Vektorsysteme

#### 3.3.1 Optimierte onkoretrovirale Vektoren

Die viralen Elemente, die die Genexpression beeinflussen, liegen in den „long terminal repeats“ (LTRs) und der 5' untranslatierten Region (5'UTR) der Vektoren. In den ursprünglichen MoMLV-basierenden Vektoren wurden verschiedene Elemente charakterisiert und hinsichtlich einer Langzeitexpression der therapeutischen Gene in den Zielzellen verändert. So wurde gezeigt, dass der Enhancer im MoMLV-LTR in primitiven, undifferenzierten embryonalen Zellen nicht funktionell

ist [77-79]. Cis-regulatorische Elemente wie die negative Kontrollregion [80, 81] und die Primerbindungsstelle [82-84] vermitteln nach der Bindung von zellulären Faktoren eine Suppression der Transkription. Diese Elemente wurden in den rekombinanten Vektoren durch den Austausch von Basen in ihrer Aktivität beeinflusst [83, 85]. Die Methylierung von Cytosinresten [86, 87] in den proviralen LTRs führt zur Abnahme der Langzeitexpression *in vitro* und *in vivo* [88, 89]. Hier konnte durch das Einfügen von Demethylierungsfragmenten aus dem murinen thy-1 Gen eine Verringerung der Methylierung der LTR-Sequenzen erreicht werden und die Langzeitexpression des Transgens verbessert werden [90]. Die Aktivität des retroviralen Promotors, der für die Transgenexpression verwendet wird, hängt des weiteren entscheidend von der Art der Zielzellen ab. In einer Vielzahl von Zellen, einschließlich embryonaler und hämatopoetischer Stammzellen, exprimieren die LTRs des „myeloproliferative sarcoma virus“ (MPSV) und des „spleen focus forming virus“ (SFFV) das Transgen besser als der MoMLV-LTR [91-93]. Veränderungen in der 5'UTR schließen das Entfernen aller Startkodons und die Generierung eines artifiziellen Introns ein [94-97]. Das Einfügen eines posttranskriptional regulierenden Elements aus dem Woodchuck Hepatitisvirus [98] oder der „scaffold attachment region“ (SAR) aus dem humanen  $\beta$ -Interferon Gen [99, 100] in die retroviralen Vektoren verbesserte die Transgenexpression, speziell in ruhenden Zellen.

Basierend auf diesen Veränderungen gibt es heute eine Reihe verbesserter onkoretroviraler Vektoren. Im einzelnen sind zu nennen die MESV Vektoren von Grez und Ostertag *et al.* [93], die MSCV Vektoren von Hawley *et al.* [101], der MND Vektor von Kohn *et al.* [89], verbesserte Versionen des MFG Vektors von Kim *et al.* [96, 97], sowie die SF $\beta$  [94, 102] und GR/GRS Vektoren [95] von Baum *et al.*

#### 3.3.2 Die Pseudotypisierung

Die Infektion einer Zelle mit einem viralen Partikel wird durch die Wechselwirkung zwischen dem viralen

Hüllprotein („envelope“, Env) mit den als viralen Rezeptoren fungierenden Oberflächenmolekülen der Zelle initiiert [103]. Bei allen Retroviren, außer bei Foamyviren, ist die Bildung nicht-infektiöser Partikel auch ohne das Env-Protein möglich. Da sich diese Partikel mit Hüllproteinen anderer Viren pseudotypisieren lassen, kann ihnen, abhängig von der Rezeptorexpression auf den Zielzellen, eine effizientere Erkennung der Zellen oder gar ein anderes Wirtsspektrum verliehen werden. In nahezu allen frühen klinischen Studien wurde das Hüllprotein eines amphotropen endogenen murinen Retrovirus verwendet. Erst später wurde gezeigt, dass der mit amphotropen Vektorpartikeln interagierende zelluläre Rezeptor auf reifen hämatopoetischen Zellen zwar stark exprimiert wird, seine Expression auf Vorläuferzellen aber sehr niedrig ist. Dadurch war die Transduktion von Stammzellen mit amphotrop pseudotypisierten Vektoren sehr ineffizient [104-106].

Der Rezeptor für das „gibbon ape leukemia virus“ (GALV) wird auf vielen hämatopoetischen Zellen stärker als der Rezeptor für amphotrop pseudotypisierte Partikel exprimiert [107]. Da der GALV-Rezeptor auch auf unreifen hämatopoetischen Zellen stärker exprimiert wird, transduzieren GALV-pseudotypisierte Partikel sowohl humane Zellen, die in NOD/SCID-Mäusen Hämatopoese etablieren können, als auch Stammzellen von Affen effizienter als amphotrope Partikel [108-111].

Das G-Protein des „vesicular stomatitis virus“ (VSV-G), eines Rhabdovirus, kann ebenfalls verwendet werden, um onkoretrovirale Vektorpartikel zu pseudotypisieren [112, 113]. Die Partikel sind relativ stabil und durch Ultrazentrifugation zu Titern von  $10^9$  infektiösen Einheiten/ml konzentrierbar [114]. Die Transduktion hämatopoetischer Vorläuferzellen erfolgt allerdings mit ähnlicher Effizienz wie bei Verwendung des amphotropen Hüllproteins [115]. Im Zusammenhang mit lentiviralen Vektoren (siehe unten) ist die Verwendung des VSV-G Pseudotyps hingegen erfolgreicher. So wurde die Transduktion von SRCs mit konzentrierten VSV-G-

pseudotypisierten onkoretroviralen und lentiviralen Partikeln beschrieben [116, 117], aber nur mit VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Partikeln war das virale Genom in den menschlichen hämatopoetischen Zellen der NOD/SCID-Mäuse nachweisbar [117]. Ein großes Problem bei der Verwendung dieses Pseudotyps ist, dass die konstitutive Expression des VSV-G zytotoxisch ist, und die Etablierung von stabilen Produzentenzellen nur unter Verwendung induzierbarer Promotoren möglich ist [118].

Eine andere Alternative stellt das Env des felinen endogenen Retrovirus RD114 dar. Das Spektrum an Zielzellen, die mit entsprechend pseudotypisierten Vektoren transduziert werden können, umfasst neben reifen hämatopoetischen Zellen auch klonogene Vorläuferzellen und SRCs [119-122]. Darüber hinaus wurde der effiziente Gentransfer in langzeitrepopulierende Zellen bei autologen Transplantationen von Hunden beschrieben [123]. Besondere Attraktivität erhält dieses Env-Protein dadurch, dass sich entsprechend pseudotypisierte retrovirale Partikel, ebenso wie VSV-G-pseudotypisierte Vektoren, durch Ultrazentrifugation konzentrieren lassen [122].

Weitere Hüllproteine, wie die des „mus dunni endogenous virus“ [124] und „10A1 murine leukemia virus“ wurden untersucht und erste Daten zur erfolgreichen Transduktion von murinen Stammzellen mit 10A1 pseudotypisierten Vektoren erscheinen vielversprechend [125, 126].

Neben der Pseudotypisierung werden auch andere Strategien verfolgt, um das Wirtsspektrum viraler Partikel zu verändern [127-129]. So wurden zum Beispiel Zytokin-Peptidsequenzen von Erythropoitin [127] und IL-2 in Env-Proteine eingefügt. Vektoren, die mit einem chimären amphotropen/IL-2 Env pseudotypisiert waren, transduzierten IL-2 abhängige Zellen effizienter als nur amphotrope Vektorpartikel. Wahrscheinlich ist durch das chimäre Env eine verstärkte Bindung an spezifische Zielpopulationen möglich und außerdem eine Aktivierung

der Zielzellen durch Zytokin-vermittelte Rezeptor Signale [129].

### 3.3.3 Alternative Vektorsysteme

Lentiviren sind komplexe Retroviren. Neben den für die viralen Strukturproteine und Enzyme kodierenden Genen *gag*, *pol* und *env*, die auch Onkoretroviren besitzen, tragen Lentiviren zusätzliche, für regulatorische und akzessorische Proteine kodierende Sequenzen. Lentiviren haben gegenüber den Onkoretroviren zwei potentielle biologische Vorteile hinsichtlich der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen: Zum einen ist der Präintegrationskomplex stabiler als der von Onkoretroviren, so dass ein längeres Persistieren in ruhenden Zellen möglich ist [67]. Zum anderen sind in diesem Komplex mehrere Nukleuslokalisationssignale enthalten, die eine Translokation durch die Kernmembran ermöglichen [130-132]. Die meisten lentiviralen rekombinanten Vektoren basieren auf dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), es werden aber auch von nicht-humanen Immundefizienzviren abgeleitete Vektoren beschrieben [133-137]. Die Komplexität des lentiviralen Genoms und die starke Zytotoxizität einiger Genprodukte erschwert die Herstellung von Produzentenzellen, die effizient und sicher replikationsdefekte Vektorpartikel freisetzen. Mittlerweile gibt es aber verschiedene Verpackungssysteme, die die für die Partikelbildung essentiellen Sequenzen auf mehrere Fragmente verteilt tragen und die toxischen Genprodukte unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren exprimieren [138-143].

Die stabile Transduktion nicht-teilungsaktiver Zellen mit lentiviralen Vektoren konnte gezeigt werden [67]. Der direkte Vergleich der Transduktionseffizienz VSV-G-pseudotypisierter onkoretroviraler und lentiviraler Vektoren mit vergleichbaren Titern in humane CD34+ Zellen zeigte eine signifikante Überlegenheit des HIV-basierenden Vektors in der Abwesenheit von Zytokinen und mit einer kurzen Inkubationsdauer [117, 144, 145]. Allerdings war der Anteil der genetisch modifizierten humanen hämatopoetischen Zellen deutlich niedriger als mit GALV- oder RD114-Env-pseudotypi-

sierten onkoretroviralen Partikeln unter Bedingungen, die für diese Vektoren optimiert waren [108, 109, 111]. Initiale Resultate zur Transduktion von Stammzellen, die in Primaten im Rahmen einer autologen Transplantation mit den VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren erreicht wurden, waren nicht mit den guten Ergebnissen im NOD/SCID-Maus Modell vergleichbar. Auch wenn das Markergen in den einzelnen hämatopoetischen Reihen nachweisbar war, exprimierten nur 1-2% der mononukleären Zellen das lentiviral übertragene Gen [146]. Darüber hinaus zeigen neuere Daten, dass auch bei Lentiviren eine effizientere Integration in das Genom erfolgt, wenn die Zellen teilungsaktiv sind. Die Transduktionseffizienz ist um ein mehrfaches höher, wenn die Zielzellen die G<sub>0</sub> Phase verlassen und in die G<sub>1</sub> Phase eintreten [147, 148].

Die Optimierung der Transduktionsbedingungen sowie der Gebrauch alternativer Pseudotypen wie einer Variante des GALV-Envs [149] oder dem RD114 Env [150] wird zweifellos nötig sein, um das Potential der Lentiviren zur Transduktion hämatopoetischer Stammzellen noch besser ausschöpfen und klinisch anwenden zu können.

Wie Lentiviren werden Foamyviren zu den komplexen Retroviren gezählt. Sie haben das größte Genom aller Retroviren [151] und damit eine potentiell hohe Verpackungskapazität für heterologe Sequenzen. Innerhalb der Retroviren ist für Foamyviren einzigartig, dass die reverse Transkription schon vor der Infektion neuer Zellen erfolgen kann und die viralen Partikel somit teilweise DNA Genome enthalten [152-154]. Es gibt Hinweise darauf, dass die foamyvirale Transduktion weniger als die onkoretrovirale Transduktion von Zellteilung abhängig ist [155]. Foamyviren haben einen sehr breiten Wirts- und Gewebetropismus, es gibt aber keine natürliche Verbreitung von Foamyviren bei Menschen. Bei dem vermeintlich Humanen Foamyvirus (HFV) Isolat geht man heute davon aus, dass es sich um eine Schimpansenvirusvariante handelt [156-158]. Anders als bei allen anderen Retroviren konnte

eine Infektion mit Foamyviren bei den verschiedensten Säugerarten bislang mit keinerlei Erkrankung assoziiert werden [159-162]. Alle diese Aspekte ließen die Etablierung foamyviraler Vektoren als Alternative zu den onko- und lentiviralen Vektoren sinnvoll erscheinen. Helfervirus-freie foamyvirale Vektoren wurden benutzt, um murine Stammzellen zu transduzieren und die Transplantatempfänger zeigten Markierung in den verschiedenen Linien [163]. Dieselbe Gruppe berichtete, dass ähnliche Erfolge mit humanen CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut erzielt wurden [164].

Um das Potential des onkoretroviralen Vektorsystems mit dem von Foamyviren zu vergleichen, benutzten wir zur Transduktion von humanen CD34+ Zellen aus Nabelschnurblut retrovirale Vektoren mit identischen Expressionskassetten, die ein Markergen unter der Kontrolle eines internen SFFV-LTRs exprimierten [165]. Die rekombinanten Vektoren wurden mit dem gleichen chimären foamyviralen Env pseudotypisiert, so dass Unterschiede in der Transduktionseffizienz unabhängig von der Rezeptorexpression auf den Zielzellen waren. Die Zielzellen wurden unmittelbar nach der Isolierung über Nacht auf dem Fibronectinfragment CH-296 in Anwesenheit von SCF, G-CSF und TPO mit den viralen Überständen infiziert. Trotz ähnlicher Titer war die Transduktion klonogener Vorläuferzellen nur mit dem foamyviralen Vektor möglich [165].

Somit könnten Vektoren, die auf den nicht-pathogenen Foamyviren basieren, für die hämatopoetische Stammzellgentherapie eine sichere und effiziente Alternative zu den onkoretroviralen und lentiviralen Vektoren darstellen.

#### 4. Erste Erfolge

Seit der ersten klinischen Gentherapiestudie im Jahr 1989 durch Rosenberg *et al.* [166] dauerte es trotz zahlreicher klinische Phase I-Studien [16, 63, 167-169] gut zehn Jahre, bis Patienten von dem Konzept des Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen profitieren konnten [50-52]. „X-linked severe combined immunodeficiency“ (SCID) ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung, bei der aufgrund des Fehlens der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette des IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 Rezeptors das lymphatische System nicht funktionell ist und T- und NK-Zellen völlig fehlen. Betroffene Kinder sterben meistens im ersten Lebensjahr an schweren Infektionen. Die einzige Heilung besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation [170]. Im Jahr 2000 berichteten Cavazzana-Calvo *et al.* von der Heilung zweier betroffener Kinder durch den Transfer der Wildtyp-cDNA für die  $\gamma$ -Kette in autologe CD34+ Zellen mittels eines retroviralen Vektors [50, 51]. Nach der Isolierung wurden die CD34+ Zellen mit einem Gemisch aus SCF, MGDF, Flt3-L und IL-3 für 24 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen in Anwesenheit des gleichen Zytokingemisches in Gas-permeablen Beuteln auf dem Fibronectinfragment CH-296. Es wurde ein amphotrop pseudotypisierter MFG-Vektor verwendet, bei dem die Expression des Gens für die  $\gamma$ -Kette vom viralen LTR erfolgte. Obgleich die Gentransfereffizienz, die vor der Infusion der Zellen in die Patienten bestimmt wurde, relativ niedrig war, konnten bereits 15 Tage später transduzierte Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Drei Monate nach der Gentherapie exprimierten alle T- und NK-Zellen im peripheren Blut der Patienten die Wildtyp- $\gamma$ -Kette und waren funktionell, so dass die Patienten nach Hause entlassen werden konnten. 150 Tage nach der Infusion wurden Knochenmarkproben entnommen, bei denen CD34+ Zellen nachgewiesen wurden, die das Transgen trugen.

Aiuti *et al.* berichteten von einem erfolgreichen Stammzellgentherapie Ansatz bei zwei Patienten mit ADA-defizienter SCID [52]. Die aus Knochenmark gewonnenen CD34+ Zellen wurden mit den Zytokinen SCF, TPO, Flt3-L und IL-3 stimuliert und auf dem Fibronectinfragment CH-296 mit einem ADA-exprimierenden retroviralen Vektor infiziert. Die Patienten erhielten eine milde Konditionierung mit Busulfan, um den transduzierten Zellen initial einen Wachstumsvorteil zu

verschaffen. Nach dieser Behandlung konnte in allen Blutreihen das Transgen nachgewiesen werden. Beide Patienten wurden als klinisch gesund beurteilt und zeigten eine normale Entwicklung [52].

Hinsichtlich des Einbringens von Chemotherapieresistenzgenen berichteten Abenour *et al.* Von einer – zumindest in Bezug auf den Gentransfer – erfolgreichen klinische Phase I/II-Studie [31]. Erwachsene Patienten mit Keimzelltumoren erhielten autologe Transplantate bei denen die CD34+ Zellen mit der MDR1-cDNA transduziert waren. Die aus peripherem Blut gewonnenen CD34+ Zellen wurden zwei Tage mit SCF und IL-6 oder SCF, MGDF und G-CSF vorstimuliert. Am dritten und vierten Tag wurden die Zellen jeweils zweimal auf CH-296-beschichteten Platten mit den Virusüberständen infiziert. Es handelte sich um amphotrop verpackte Vektoren, die das Transgen unter der Kontrolle des „Harvey murine sarcoma virus“-LTR exprimierten. Die transduzierten Zellen wurden am fünften Tag kryokonserviert und den Patienten nach dem zweiten Chemotherapiezyklus reinfundiert. Die mittlere Gentransfer-effizienz bei dieser Studie war initial vergleichsweise hoch und ein Jahr nach der Infusion konnten Transgen-tragende klonogene Zellen nachgewiesen werden. Es konnte kein durch die Transduktion der CD34+ Zellen bedingter negativer Einfluss auf das Anwachsen des Transplantats festgestellt werden. Eine Aussage bezüglich der Chemotherapieresistenz kann aus dieser Studie allerdings nicht getroffen werden, da aufgrund vorhandener Spleißstellen in der MDR-1-cDNA die Expression des Vollängentranskripts ineffizient war.

### 5. Gentransfer bei Fanconi Anämie

Im Jahr 1999 wurden die Ergebnisse der ersten klinischen Studie mit vier FA-Patienten, die Mutationen in FANCC hatten, veröffentlicht [171]. Drei dieser Patienten erhielten jeweils drei bis vier Transplantationen von autologen CD34+ Zellen, die *ex vivo* mit einem retroviralen FANCC-Vektor transduziert worden waren. Transgen-positive Zellen konnten bis zu vier Monate nach der Transplantation im pe-

ripheren Blut der Patienten nachgewiesen werden. Hinweise auf die Aktivität der übertragenen cDNA ergaben sich aus einer erhöhten Zellularität von Knochenmarksaspiraten und aus einer erhöhten Zahl von hämatopoetischen Zellklonen, die aus den Knochenmarksaspiraten in Anwesenheit von Mitomycin C *in vitro* kultiviert werden konnten. Leider waren diese positiven Effekte nur vorübergehend, was darauf hindeutet, dass mit dem verwendeten Protokoll lediglich hämatopoetische Vorläuferzellen, nicht aber echte Stammzellen transduziert werden konnten. Im Gegensatz zu diesen bisher wenig überzeugenden Ergebnissen der Gentherapie bei FA-Patienten, hat sich die Methode des Gentransfers zum Einschleusen eines intakten Gens in CD34+ hämatopoetische Zellen und andere Zellkulturen *in vitro* bereits vielfach bewährt [z.B. 172-174]. *In vitro* Gentransfer mit retroviralen Vektoren hat sich in den letzten Jahren als Methode der Wahl zur Identifizierung der Komplementationsgruppe von FA-Patienten etabliert [174]. *In vitro* konnte die Übertragung von FANCC-cDNAs auch mittels lentiviraler [175] und foamyviraler Vektoren (persönliche Beobachtungen) erreicht werden.

Gegenwärtig werden die ersten Patienten der Komplementationsgruppe A dem Versuch einer Gentherapie unterzogen (C. Walsh, persönliche Mitteilung). Jedoch werden bei jedem dieser Versuche eine Vielzahl von ungelösten Problemen deutlich, welche die routinemäßige klinische Anwendung der somatischen Gentherapie bei FA noch für absehbare Zeit sehr schwierig gestalten werden. Nicht zuletzt sind es die Fragen nach den Langzeit *in vivo* Effekten einer Transduktion hämatopoetischer Zellen mit retroviralen Vektoren, sowie die Fragen ob bei FA-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung genügend CD34+ hämatopoetische Zellen mobilisiert werden können [176] und inwieweit die Mobilisierung der verbliebenen CD34+ Zellen aus dem Knochenmark der Patienten durch Gabe von Zytokinen (insbesondere G-CSF) das Risiko einer leukämischen Entwicklung beschleunigen [177].

### 6. Zusammenfassung

Die bei Patienten mit Immundefizienzen durchgeführten Studien zeigen, dass gegenwärtige Protokolle den Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen erlauben und retrovirale Vektoren eine ausreichende Expression der Wildtyp-cDNAs ermöglichen. Die Heilung von monogenen Erkrankungen ist offenbar möglich, sofern die korrigierten Zellen *in vivo* einen Wachstumsvorteil haben, der eine relativ niedrige Gentransfer-effizienz ausgleichen kann. Ob die Heilung langfristig ist und die Patienten eine normale Lebenserwartung haben werden, bleibt abzuwarten. Auch muss noch eindeutig gezeigt werden, dass durch den Stammzellgentransfer eine klinisch relevante Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erzielt werden kann. Dennoch erlaubt der derzeitige Wissensstand die Annahme, dass mittels Gentherapie weitere klinische Erfolge erzielt werden können – insbesondere, wenn neuere Erkenntnisse hinsichtlich effizienterer Vektorsysteme und Pseudotypisierungen Eingang in die klinischen Protokolle finden.

### Danksagung

Wir möchten Herrn Prof. Dr. Holger Höhn für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken. Unsere Arbeit wurde unterstützt vom „Forschungsverbund Somatische Gentherapie“ (Koordinator Professor Dr. Ulrich Göbel) an den Universitäten Düsseldorf, Essen und Halle-Wittenberg des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (beo0311661), der Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V., der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation und dem Fanconi Anemia Research Fund, Eugene, OR, U.S.A.

### Literatur

1. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL (1995) The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35
2. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA (1997) The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89:2233
3. Korbling M, Anderlini P, Hematology TA (2001) Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98:2900
4. Auerbach AD (1994) Umbilical cord blood transplants for genetic disease: diagnostic and ethical issues in fetal studies. *Blood Cells* 20:303
5. Parkman R, Crooks G, Kohn DB, Lenarsky C, Weinberg K (1995) Bone marrow transplantation for metabolic diseases. *Cancer Treatment & Research* 76:87

6. Brenner MK (1996) Gene transfer into hematopoietic cells. *N Engl J Med* 335:337
7. Williams DA, Smith FO (2000) Progress in the use of gene transfer methods to treat genetic blood diseases. *Hum Gene Ther* 11:2059
8. Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808
9. Miller AD (1992) Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455
10. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260:926
11. Dirksen U, Moritz T, Burdach S, Flasshove M, Hanenberg H (1999) Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches. *Klin Pädiatr* 211:329
12. Kohn DB (1996) Gene therapy for hematopoietic and immune disorders. *Bone Marrow Transplant* 18 Suppl 3:S55
13. Kohn DB, Weinberg K, Nolte J, Crooks G, Parkman R (2000) Gene therapy with cord blood hematopoietic stem cells for adenosine deaminase deficiency: an update. In: Büchner T, Jürgens H, Berdel WE, van de Loo J, Ritter J, Kienast J, Vormoor J (eds) *Transplantation in Hematology and Oncology*. Berlin Heidelberg:Springer, 287
14. Liu J, Buchwald M, Walsh CE, Young NS (1995) Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood* 84:3995
15. Williams DA (1990) Expression of introduced genetic sequences in hematopoietic cells following retroviral-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 1:229
16. Williams DA, Levitsky HI, Dinauer MC, Russell DW (1997) Genetic therapies in hematology: human diseases, mouse models and new approaches. *ASH Education Book* 12'1997:55
17. Grez M, Becker S, Saulnier S, Knoss H, Ott MG, Maurer A, Dinauer MC, Hoelzer D, Seger R, Hossle JP (2000) Gene therapy of chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2:S99
18. Fairbairn LJ, Lashford LS, Spooncer E, McDermott RH, Lebens G, Arrand JE, Arrand JR, Bellantuono I, Holt R, Hatton CE, Cooper A, Besley GTN, Wraith JE, Anson DS, Dexter TM (1996) Long-term *in vitro* correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2025
19. Ohashi T, Boggs S, Robbins P, Bahnson A, Patrene K, Wei F-S, Wei J-F, Li J, Lucht L, Fei Y, Clark S, Kimak M, He H, Mowery-Rushton P (1992) Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:11332
20. DeVita VT, Jr., Canellos GP (1999) The lymphomas. *Semin Hematol* 36:84
21. Burdach S, van Kaick B, Laws HJ, Ahrens S, Haase R, Korholz D, Pape H, Dunst J, Kahn T, Willems R, Engel B, Dirksen U, Kramm C, Nurnberger W, Heyll A, Ladenstein R, Gadner H, Jürgens H, Göbel U (2000) Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. *Stem-Cell Transplant Programs at Dusseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. Ann Oncol* 11:1451
22. Vescio R, Schiller G, Stewart AK, Ballester O, Noga S, Rugo H, Freytes C, Stadtmauer E, Tarantolo S, Sahebi F, Stiff P, Meharchard J, Schlossman R, Brown R, Tully H, Benyunes M, Jacobs C, Berenson R, DiPersio J, Anderson K, Berenson J (1999) Multicenter phase III trial to evaluate CD34(+) selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 93:1858
23. Nieto Y, Shpall EJ (1999) Autologous stem-cell transplantation for solid tumors in adults. *Hematol Oncol Clin North Am* 13:939
24. Rescorla FJ, Breitfeld PP (1999) Pediatric germ cell tumors. *Curr Probl Cancer* 23:257
25. Moritz T, Mackay W, Glassner BJ, Williams DA, Samson L (1995) Retrovirus-mediated expression of a DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 55:2608
26. Koc ON, Allay JA, Lee K, Davis BM, Reese JS, Gerson SL (1996) Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors to improve chemotherapy tolerance. *Semin Oncol* :46
27. Moritz T, Williams DA (1996) Transfer of drug resistance genes to hematopoietic precursors. In: Bertino R (ed) *Encyclopedia of Cancer*, vol III, Molecular Biology of Cancer. San Diego, CA:Academic Press, Inc., 1765
28. Maze R, Hanenberg H, Williams DA (1997) Establishing chemoresistance in hematopoietic progenitor cells. *Mol Med Today* 3:350
29. Hanenberg H, Moritz T (2001) Gene transfer into hematopoietic stem cells: New perspectives for monogenetic diseases and the treatment of cancer. In: Dall P, Bender HG (eds) *Akt. Onkol*, vol 112. München:W. Zuckschwerdt Verlag, 106
30. Moritz T, Williams DA (1998) Methods for gene transfer: genetic manipulation of hematopoietic stem cells. In: Thomas ED, Blume K, Forman SJ (eds) *Hematopoietic Cell Transplantation*. Malden, MA:Blackwell Science, 79
31. Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Woo D, Mills B, Srour EF, Cornetta K (2000) Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6:652
32. Kaina B, Fritz G, Coquerelle T (1993) Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ Mol Mutagen* 22:283
33. Brenner MK (1995) Human somatic gene therapy: progress and problems. *J Intern Med* 237:229
34. Williams DA, MacNeill E, Hanenberg H, van der Loo H, Pollok K (2000) Defining current strategies for future human trials in gene therapy. In: Büchner T, Jürgens H, Berdel WE, van de Loo J, Ritter J, Kienast J, Vormoor J (eds) *Transplantation in Hematology and Oncology*. Berlin Heidelberg:Springer, 333
35. Lutzko C, Kruth S, Abrams-Ogg AC, Lau K, Li L, Clark BR, Ruedy C, Nanji S, Foster R, Kohn D, Shull R, Dub ID (1999) Genetically Corrected Autologous Stem Cells Engraft, But Host Immune Responses Limit Their Utility in Canine alpha-L-iduronidase Deficiency. *Blood* 93:1895
36. Verzeletti S, Bonini C, Marktel S, Nobili N, Ciceri F, Traversari C, Bordignon C (1998) Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. *Hum Gene Ther* 9:2243
37. Youssoufian H, Li Y, Martin ME, Buchwald M (1996) Induction of Fanconi anemia cellular phenotype in human 293 cells by overexpression of a mutant FAC allele. *J Clin Invest* 97:957
38. Kohn DB (1995) The current status of gene therapy using hematopoietic stem cells. *Curr Opin Pediatr* 7:56
39. Stephan V, Wahn V, Le Deist F, Dirksen U, Broker B, Müller-Fleckenstein I, Horneff G, Schroten H, Fischer A, de Saint Basile G (1996) Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl J Med* 335:1563
40. Bousso P, Wahn V, Douagi I, Horneff G, Panettier C, Le Deist F, Zepp F, Niehues T, Kourilsky P, Fischer A, de Saint Basile G (2000) Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived *in vivo* from a single human T cell precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:274
41. Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang C-K, Kurlandsky LE (1996) Spontaneous *in vivo* reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 13:290
42. Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hatzenhorst U, Noguee L, Murray R, Burdach S (1997) Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J Clin Invest* 100:2211
43. Allay JA, Persons DA, Galipeau J, Riberdy JM, Ashmun RA, Blakley RL, Sorrentino BP (1998) *In vivo* selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med* 4:1136
44. Miller AD (1992) Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:1
45. Baum C, Richters A, Ostertag W (1999) Retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Curr Opin Mol Ther* 1:605
46. Miller AD (1990) Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1:5
47. editorial (2001) Gene therapy clinical trials. *J GeneMed* :www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical
48. Brenner MK, Riill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN (1993) Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 342:1134

49. Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro J, Jr., Anderson WF, Ihle JN (1993) Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 341:85
50. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669
51. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Dupuis-Girod S, Thrasher A, Wulffraat N, Sorensen R, Casanova JL, Le Deist F, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Blood* 96:2533a
52. Aiuti A, Slavina S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Morecki S, Andolfi G, Cattaneo F, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C (2001) Correction of ADA-SCID defect without PEG-ADA therapy by stem/progenitor cell gene therapy combined with a non-myeloablative conditioning. *Blood* 98:3246a
53. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87:1
54. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA (1996) Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* 87:479
55. Wang JCY, Doedens M, Dick JE (1997) Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared to adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell (SRC) assay. *Blood* 89:3919
56. Lord BI, Dexter TM (1995) Which are the hematopoietic stem cells? Don't debunk the history! *Exp Hematol* 23:1237
57. Lansdorp PM (1997) Self-renewal of stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 3:171
58. Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP (1991) Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 352:438
59. Moore KA, Deisseroth AB, Reading CL, Williams DE, Belmont JW (1992) Stromal support enhances cell-free retroviral vector transduction of human bone marrow long-term culture-initiating cells. *Blood* 79:1393
60. Moritz T, Patel VP, Williams DA (1994) Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J Clin Invest* 93:1451
61. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2:876
62. Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, Williams DA (1997) Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8:2193
63. Orkin SH, Motulsky AG (1995) Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. December 7, 1995. [www.nih.gov/news/panelrep.html](http://www.nih.gov/news/panelrep.html)
64. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE (1996) Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2:1329
65. van der Loo JC, Xiao X, McMillin D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1998) VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 102:1051
66. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12:2099
67. Naldini L, Blömer U, Galloway P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263
68. Broudy VC (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90:1345
69. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS (1998) Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1195
70. Eaton DL, de Sauvage FJ (1997) Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. *Exp Hematol* 25:1
71. Luskey BD, Rosenblatt M, Zsebo K, Williams DA (1992) Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* 80:396
72. Crooks GM, Kohn DB (1993) Growth factors increase amphotropic retrovirus binding to human CD34+ bone marrow progenitor cells. *Blood* 82:3290
73. Dao MA, Hannum CH, Kohn DB, Nolte JA (1997) FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after *ex vivo* retroviral-mediated transduction. *Blood* 89:446
74. van der Loo JC, Ploemacher RE (1995) Marrow and spleen-seeding efficiencies of all murine hematopoietic stem cell subsets are decreased by preincubation with hematopoietic growth factors. *Blood* 85:2598
75. Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M (1996) Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4040
76. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T (2000) Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 105:1013
77. Linney E, Davis B, Overhauser J, Chao E, Fan H (1984) Non-function of a Moloney murine leukemia virus regulatory sequence in F9 embryonal carcinoma cells. *Nature* 308:470
78. Gorman CM, Rigby PW, Lane DP (1985) Negative regulation of viral enhancers in undifferentiated embryonic stem cells. *Cell* 42:519
79. Tsukiyama T, Niwa O, Yokoro K (1989) Mechanism of suppression of the long terminal repeat of Moloney leukemia virus in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 9:4670
80. Flanagan JR, Krieg AM, Max EE, Khan AS (1989) Negative control region at the 5' end of murine leukemia virus long terminal repeats. *Mol Cell Biol* 9:739
81. Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ, Appella E, Ozato K (1992) Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* 12:38
82. Loh TP, Sievert LL, Scott RW (1987) Proviral sequences that restrict retroviral expression in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 7:3775
83. Weiher H, Barklis E, Ostertag W, Jaenisch R (1987) Two distinct sequence elements mediate retroviral gene expression in embryonal carcinoma cells. *J Virol* 61:2742
84. Loh TP, Sievert LL, Scott RW (1990) Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 10:4045
85. Petersen R, Kempler G, Barklis E (1991) A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol Cell Biol* 11:1214
86. Boyes J, Bird A (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64:1123
87. Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H (1999) DNA methylation represses transcription *in vivo*. *Nat Genet* 22:203
88. Challita PM, Kohn DB (1994) Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2567
89. Halene S, Wang L, Cooper RM, Bockstoce DC, Robbins PB, Kohn DB (1999) Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector. *Blood* 94:3349
90. Challita PM, Skelton D, el-Khoueiry A, Yu XJ, Weinberg K, Kohn DB (1995) Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J Virol* 69:748
91. Stocking C, Kollek R, Bergholz U, Ostertag W (1985) Long terminal repeat sequences impart hematopoietic transformation properties to the myeloproliferative sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5746
92. Hilberg F, Stocking C, Ostertag W, Grez M (1987) Functional analysis of a retroviral host-range mutant: altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5232
93. Grez M, Akgun E, Hilberg F, Ostertag W (1990) Embryonic stem cell virus, a recombinant murine

retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9202

94. Hildinger M, Eckert H-G, Schilz AJ, John J, Ostertag W, Baum C (1998) FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther* 5:1575

95. Hildinger M, Ostertag W, Abel KL, Baum C (1999) Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73:4083

96. Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, Kim S (1998) Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 72:994

97. Yu SS, Kim JM, Kim S (2000) High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Ther* 7:797

98. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886

99. Agarwal M, Austin TW, Morel F, Chen J, Bohnlein E, Plavec I (1998) Scaffold attachment region-mediated enhancement of retroviral vector expression in primary T cells. *J Virol* 72:3720

100. Dang Q, Auten J, Plavec I (2000) Human beta interferon scaffold attachment region inhibits *De novo* methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J Virol* 74:2671

101. Hawley RG, Lieu FHL, Fong AZC, Hawley TS (1994) Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Therapy* 1:136

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

103. Miller AD (1996) Cell surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11407

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

105. Kurre P, Kiem HP, Morris J, Heyward S, Battini JL, Miller AD (1999) Efficient transduction by an amphotropic retrovirus vector is dependent on high-level expression of the cell surface virus receptor. *J Virol* 73:495

106. MacNeill EC, Hanenberg H, Pollok KE, van der Loo JCM, Bierhuizen MFA, Wagemaker G, Williams DA (1999) Simultaneous infection with retroviruses pseudotyped with different envelope proteins bypasses viral receptor interference associated with colocalization of gp70 and target cells on fibronectin CH-296. *J Virol* 73:3960

107. Lam JS, Reeves ME, Cowherd R, Rosenberg SA, Hwu P (1996) Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope. *Hum Gene Ther* 7:1415

108. van Hennik PB, Versteegen MM, Bierhuizen MF, Limon A, Wognum AW, Cancelas JA, Barquinero J, Ploemacher RE, Wagemaker G (1998) Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. *Blood* 92:4013

109. Barquinero J, Segovia JC, Ramirez M, Limon A, Guenechea G, Puig T, Briones J, Garcia J, Bueren JA (2000) Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *Blood* 95:3085

110. Kiem HP, Andrews RG, Morris J, Peterson L, Heyward S, Allen JM, Rasko JE, Potter J, Miller AD (1998) Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 92:1878

111. Kiem H-P, Heyward S, Winkler A, Potter J, Allen JA, Miller AD, Andrews RG (1997) Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and GALV pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90:4638

112. Emi N, Friedmann T, Yee JK (1991) Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 65:1202

113. Yang Y, Vanin EF, Whitt MA, Fornerod M, Zwart R, Schneiderman RD, Grosveld G, Nienhuis AW (1995) Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther* 6:1203

114. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (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

115. von Laer D, Corovic A, Vogt B, Herwig U, Roscher S, Fehse B, Baum C (2000) Amphotropic and VSV-G-pseudotyped retroviral vectors transduce human hematopoietic progenitor cells with similar efficiency. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2:S75

116. Rebel VI, Tanaka M, Lee JS, Hartnett S, Pulsipher M, Nathan DG, Mulligan RC, Sieff CA (1999) One-day ex vivo culture allows effective gene transfer into human nonobese diabetic/severe combined immune-deficient repopulating cells using high-titer vesicular stomatitis virus G protein pseudotyped retrovirus. *Blood* 93:2217

117. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE (1999) Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice with HIV vectors. *Science* 283:682

118. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC (1996) A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11400

119. Porter CD, Collins MK, Tailor CS, Parkar MH, Cosset FL, Weiss RA, Takeuchi Y (1996) Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Hum Gene Ther* 7:913

120. Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD (1999) The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2129

121. Kelly PF, Vandergriff J, Nathwani A, Nienhuis AW, Vanin EF (2000) Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* 96:1206

122. Gatlin J, Melkus MW, Padgett A, Kelly PF, Garcia JV (2001) Engraftment of NOD/SCID mice with human CD34(+) cells transduced by concentrated oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *J Virol* 75:9995

123. Goerner M, Horn PA, Peterson L, Kurre P, Storb R, Rasko JE, Kiem HP (2001) Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34(+) marrow cells transduced by RD114-pseudotyped oncoretrovirus vectors. *Blood* 98:2065

124. Wolgamot G, Rasko JE, Miller AD (1998) Retrovirus packaging cells expressing the *Mus dunni* endogenous virus envelope facilitate transduction of CHO and primary hematopoietic cells. *J Virol* 72:10242

125. Barrette S, Douglas J, Orlic D, Anderson SM, Seidel NE, Miller AD, Bodine DM (2000) Superior transduction of mouse hematopoietic stem cells with 10A1 and VSV-G pseudotyped retrovirus vectors. *Mol Ther* 1:330

126. Bodine DM, Barrette S, Seidel N, Orlic D, Miller AD (2000) Transduction of mouse hematopoietic stem cells is more efficient with 10A1 retrovirus vectors than with amphotropic vectors. *Stem Cells* 18:152

127. Kasahara N, Dozy AM, Kan YW (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266:1373

128. Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G, Aumailley M, Heard JM, Danos O, Verdier G, Cosset FL (1994) Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol* 68:4609

129. Maurice M, Mazur S, Bullough FJ, Salvetti A, Collins MK, Russell SJ, Cosset FL (1999) Efficient gene delivery to quiescent interleukin-2 (IL-2)-dependent cells by murine leukemia virus-derived vectors harboring IL-2 chimeric envelope glycoproteins. *Blood* 94:401

130. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature* 365:666

131. Galloway P, Swingle S, Song J, Bushman F, Trono D (1995) HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83:569

132. Galloway P, Swingle S, Aiken C, Trono D (1995) HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80:379

133. Mangeot PE, Negre D, Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Mehtali M, Kaiserlian D, Cosset FL, Darlix JL (2000) Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 74:8307
134. Johnston JC, Gasmi M, Lim LE, Elder JH, Yee JK, Jolly DJ, Campbell KP, Davidson BL, Sauter SL (1999) Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J Virol* 73:4991
135. Pandya S, Boris-Lawrie K, Leung NJ, Akkina R, Planelles V (2001) Development of an Rev-independent, minimal simian immunodeficiency virus-derived vector system. *Hum Gene Ther* 12:847
136. Curran MA, Kaiser SM, Achacoso PL, Nolan GP (2000) Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol Ther* 1:31
137. Olsen JC (1998) Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther* 5:1481
138. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463
139. Kafri T, Van Praag H, Ouyang L, Gage FH, Verma IM (1999) A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 73:576
140. Reiser J, Lai Z, Zhang XY, Brady RO (2000) Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol* 74:10589
141. Sparacio S, Pfeiffer T, Schaal H, Bosch V (2001) Generation of a flexible line with regulatable, high-level expression of HIV-Gag/Pol particles capable of packaging HIV-derived vectors. *Mol Ther* 3:602
142. Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L (2001) A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12:981
143. Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T (2001) Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:97
144. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70:2581
145. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecte R, Naldini L, Kohn DB, Crooks GM (1999) Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2988
146. An DS, Wersto RP, Agricola BA, Metzger ME, Lu S, Amado RG, Chen IS, Donahue RE (2000) Marking and Gene Expression by a Lentivirus Vector in Transplanted Human and Nonhuman Primate CD34(+) Cells. *J Virol* 74:1286
147. Korin YD, Zack JA (1998) Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol* 72:3161
148. Sutton RE, Reitsma MJ, Uchida N, Brown PO (1999) Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J Virol* 73:3649
149. Stitz J, Buchholz CJ, Engelstadter M, Uckert W, Bloemer U, Schmitt I, Cichutek K (2000) Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* 273:16
150. Hanawa H, Persons DA, Nathwani AC, Hargrove PW, Kelly PF, Vanin EF, Nienhuis AW (2001) Developmental lentiviral vectors for lineage-specific expression in human hematopoietic cells. *Blood* 98:888a
151. Rethwilm A (1995) Regulation of foamy virus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 193:1
152. Yu SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML (1996) Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271:1579
153. Moebes A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelein M, Lindemann D, Bock M, McClure MO, Rethwilm A (1997) Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71:7305
154. Yu SF, Sullivan MD, Linial ML (1999) Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* 73:1565
155. Russell DW, Miller AD (1996) Foamy virus vectors. *J Virol* 70:217
156. Herchenröder 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
157. Ali M, Taylor GP, Pitman RJ, Parker D, Rethwilm A, Cheingsong-Popov R, Weber JN, Bieniasz PD, Bradley J, McClure MO (1996) No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1473
158. 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
159. Weiss RA (1988) Foamy retroviruses. A virus in search of a disease. *Nature* 333:497
160. Jarrett O (1999) Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet Microbiol* 69:99
161. Winkler IG, Löchelt M, Flower RL (1999) Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: a seroepidemiological study. *J Clin Microbiol* 37:2848
162. Linial M (2000) Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* 8:284
163. Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, Russell DW (2001) Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* 98:604
164. Josephson NC, Vassilopoulos G, Trobridge GD, Priestly GV, Papayannopoulou T, Russell DW (2000) Transduction of SCID repopulating cells with a human Foamy virus vector. *Blood* 96:2257A
165. Leurs C, Lindemann D, Heinkelein M, Rethwilm A, Hanenberg H (2001) Superiority of primate foamy virus (PFV) over murine leukemia virus (MLV) vectors in transducing unstimulated CD34+ CB cells. *Blood* 98:882a
166. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Merino MJ, Culver K, Miller AD, Blaese RM, Anderson WF (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
167. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, et al. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475
168. Brenner MK, McGarrity GJ, Kohn DB, Heslop HE (1995) The practise of clinical gene therapy. *ASH Education Book* 12'1995:93
169. Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270:404
170. Fischer A (2001) Primary immunodeficiency diseases: an experimental model for molecular medicine. *Lancet* 357:1863
171. Liu JM, Kim S, Read EJ, Futaki M, Dokal I, Carter CS, Leitman SF, Pensiero M, Young NS, Walsh CE (1999) Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther* 10:2337
172. Freie BW, Dutt P, Clapp DW (1996) Correction of Fanconi anemia ttype C phenotypic abnormalities using a clinically suitable retroviral vector infection protocol. *Cell Transplant* 5:385
173. Liu JM, Young NS, Walsh CE, Cottler-Fox M, Carter C, Dunbar C, Barret AJ, Emmons R (1997) Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther* 8:1715
174. Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, Cooper RJ, Gottsche K, Haneline L, Clapp DW, Lobitz S, Williams DA, Auerbach AD (2002) Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 30:410
175. Yamada K, Olsen JC, Patel M, Rao KW, Walsh CE (2001) Functional correction of fanconi anemia group C hematopoietic cells by the use of a novel lentiviral vector. *Mol Ther* 3:485
176. Croop JM, Cooper R, Fernandez C, Graves V, Kreissmann S, Hanenberg H, Smith FO, Williams DA (2001) Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia. *Blood* 98:2917
177. Scagni P, Saracco P, Timeus F, Farinasso L, Dall'Aglio M, Bosa EM, Crescenzo N, Spinelli M, Basso G, Ramenghi U (1998) Use of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in Fanconi's anemia. *Haematologica* 83:432