

**Konstruktion und Etablierung von AAV-Tet-Vektorsystemen  
für den Gentransfer in humane Schwannzellen**

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

**vorgelegt von  
Susanne S. Wosch  
aus Neustadt/Opf.**

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

Referent: Prof. H.-W. Müller

Korreferent: Prof. D. Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 13. Juli 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. ONKOGENE .....	3
1.2. TET-REGULIERTE GENEXPRESSIONSSYSTEME.....	4
1.3. ADENO-ASSOZIIERTES VIRUS.....	8
1.4. FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
2.1. MATERIAL .....	12
2.1.1. Bakterienstämme.....	12
2.1.2. Virusstöcke.....	12
2.1.3. Zelllinien .....	12
2.1.4. Vektoren und Linker .....	13
2.1.5. Antikörper .....	13
2.1.6. Nährmedien, Enzyme und Chemikalien.....	14
2.1.7. Sonstige Materialien und Geräte.....	15
2.2. MOLEKULARBIOLOGIE.....	16
2.2.1. Transformation von Bakterien mittels Kälteschock.....	16
2.2.2. Enzymatische Modifikationen der DNA.....	16
2.2.3. Nachweis auf Vollständigkeit der AAV ITRs.....	18
2.2.4. Molekularbiologische Standardmethoden.....	20
2.3. ZELLKULTUR.....	21
2.3.1. Humane Schwanzzell-Kulturen .....	21
2.3.2. Chemosensitivitätstestung gegenüber Antibiotika .....	22
2.3.3. Chemosensitivitätstestung gegenüber den Effektormolekülen .....	24
2.3.4. Transfektion eukaryontischer Zellen.....	24

2.3.5. Nachweis genetisch modifizierter Zellen .....	26
2.3.6. Zellbiologische Standardmethoden .....	26
2.4. VIROLOGIE .....	27
2.4.1. Produktion von rekombinanten Adeno-assoziierten viralen Stöcken .....	27
2.4.2. Titration der rekombinanten AAV-Stöcke .....	28
2.4.3. Herstellung eines Adenovirus-Stocks .....	31
2.4.4. Titration des Adenovirus-Stocks .....	31
2.4.5. Gentransfer mittels Infektion .....	32
2.4.6. Test auf adenovirale Kontamination .....	33
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
3.1. HERSTELLUNG DER AAV-TET-VEKTORSYSTEME .....	34
3.1.1. Konstruktion der Transaktivator- und Zielvektoren.....	34
3.1.2. Überprüfung der AAV <i>inverted terminal repeats</i> .....	47
3.2. ETABLIERUNG DER TET-SYSTEME .....	52
3.2.1. Funktionsfähigkeit der Tet-Systeme .....	52
3.2.2. Zeitverlauf und Regulation der Tet-Systeme .....	53
3.2.3. Expression der Onkogene.....	55
3.2.4. Anwendung bei humanen Schwanzzellen.....	57
3.3. PRODUKTION REKOMBINANTER ADENO-ASSOZIIERTER VIRIONEN .....	58
3.3.1. Herstellung der rekombinanten AAV-Stöcke .....	58
3.3.2. Produktion eines adenoviralen Stocks .....	61
3.4. GENTRANSFER VIA INFEKTION.....	63
3.4.1. Infektion mit dem Chromophor EGFP.....	63
3.4.2. Infektion mit dem Tet-Off-System und den Onkogenen.....	64
3.5. TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HUMANEN SCHWANNZELLEN.....	71
3.5.1. Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene und DOSPER mittels EGFP .....	71
3.5.2. Transfektionen mit den Onkogenen .....	73

3.6. VORAUSSETZUNGEN FÜR EINEN STABILEN GENTRANSFER .....	76
3.6.1. Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen .....	76
3.6.2. Einfluß der Effektormoleküle auf humane Schwannzellen.....	79
3.7. STABILE TRANSFEKTION VON HUMANEN SCHWANNZELLEN .....	81
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
4.1. HERSTELLUNG DER VEKTOREN FÜR DIE AAV-TET-SYSTEME .....	88
4.2. ETABLIERUNG DER AAV-TET-VEKTORSYSTEME.....	91
4.2.1. Etablierung der Tet-Regulationseinheit .....	91
4.2.2. Etablierung des AAV-vermittelten Gentransfers .....	94
4.2.3. Transfektion von humanen Schwannzellen.....	97
4.2.4. Infektion versus Transfektion.....	98
4.3. ANWENDUNG DES AAV-TET-OFF-SYSTEMS .....	100
4.3.1. Humane Schwannzellkulturen .....	100
4.3.2. Verträglichkeit der tetracyclischen Substanzen.....	101
4.3.3. Stabiler Gentransfer.....	101
4.3.4. Wirksamkeit dieser AAV-Tet-Onkogen-Anwendung.....	103
<b>5. AUSBLICK .....</b>	<b>105</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>7. LITERATUR.....</b>	<b>109</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>120</b>

## 1. Einleitung

Schwannzellen sind eine der Hauptkomponenten des peripheren Nervensystems. Während der frühen embryonalen Entwicklung entspringen sie der Neuralleiste und wandern mit den Axonen in die Peripherie. In dieser Phase wird durch eine hohe Proliferationsrate eine adäquate Menge an Schwannzellen angelegt, um so die auswachsenden Axone begleiten zu können. Im Anschluß daran werden die Schwannzellen zu ruhenden Zellen und differenzieren unter dem Einfluß Axon-assoziiierter Signale aus. Dabei entstehen zwei Phänotypen, die nicht-myelinisierenden und die myelinisierenden Schwannzellen, wobei letztere für die Ausbildung der Myelinscheide verantwortlich sind (Scherer, 1997).

Genetische Veränderungen können jedoch zu einem irregulären Verhalten dieser Zellen führen und manifestieren sich beim Menschen in Neuropathien oder Tumorerkrankungen. Zwei dieser Krankheitsbilder werden im Neurochemischen Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf untersucht:

- Bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung vom Typ 1A (CMT 1A) handelt es sich um eine hereditäre demyelinisierende Neuropathie des peripheren Nervensystems, bei der auf einem Chromosom der Chromosomenbereich 17p11.2-p12 dupliziert vorliegt (Timmermann *et al.*, 1992). Auf diesem Genomabschnitt befindet sich das Gen für das periphere Myelinprotein 22 (PMP22; Spreyer *et al.*, 1991). Dieses wird aufgrund seiner durch die Mutation bedingten Triplikation für das Krankheitsbild der CMT 1A verantwortlich gemacht.
- Der Neurofibromatose vom Typ II (NF2; Gutmann, 1997) liegt ebenfalls eine Keimbahnmutation zugrunde. Bei den Betroffenen, die nur über ein funktionelles Allel des NF2-Gens verfügen, kommt es durch eine weitere, somatische Mutation zum Ausfall dieses Allels („two-hit“-Modell; Knudson, 1971). Dabei entstehen bevorzugt bilaterale vestibuläre Schwannome, aber auch das Auftreten von Meningiomen und Astrozytomen ist bei dieser Erkrankung bekannt. Merlin/Schwannomin, das NF2-Genprodukt, ist unterhalb der Plasmamembran mit Proteinen des Zytoskeletts assoziiert und inhibiert Zellproliferation, Adhäsion und Migration (Evans *et al.*, 2000). Als Tumorsuppressorgen führt dessen Inaktivierung zu malignen Veränderungen.

Es ist also von besonderer klinischer Relevanz, die Biologie der humanen Schwannzellen zu verstehen. Dies ist jedoch nicht nur für die Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen von Interesse, sondern gewinnt auch unter anderen Gesichtspunkten an Bedeutung: Schwannzellen

spielen sowohl bei der Nervenregeneration (Levi *et al.*, 1994) als auch in der Therapie nach Nervenschädigung (Stichel *et al.*, 1999) eine zentrale Rolle. Ein detaillierteres Verständnis der Natur der Schwannzellen kann deshalb dazu beitragen, weiterführende neurale Transplantationsmodelle sowie Ansätze für Gentherapien zu entwickeln.

Für solche Studien ist es notwendig, humane Schwannzellen in großer Anzahl untersuchen zu können. Diese Voraussetzung wird allerdings stark durch die schwere Zugänglichkeit des Probenmaterials über Multiorganspenden eingeschränkt. Zudem ist die Expansion dieser primären Zellen *in vitro* durch ihr geringes Proliferationsvermögen sowie durch eine schnell eintretende Seneszenz erschwert. Um die limitierende Verfügbarkeit von humanen Schwannzellen beheben zu können, wäre es wünschenswert, eine permanente, nahe am primären Status gelegene humane Schwannzell-Linie zu generieren. Zu diesem Zweck sollte eine Methode zur Immortalisierung humaner Schwannzellen entwickelt werden.

Da es sich bei humanen Schwannzellen um primäre Zellen handelt, war ein hocheffizientes System nötig, welches folgenden Anforderungen genügen sollte: (a) Das Onkogen sollte immortalisieren, jedoch nicht transformieren; (b) um den physiologischen Zustand weitgehend zu erhalten, sollte die Expression dieses Onkogens regulierbar, d. h. an- und abschaltbar, sein; und (c) das Einschleusen dieser regulierten Onkogen-Einheit erforderte eine effiziente Transfermethode.

Ad (a): Unter den bekannten immortalisierenden Onkogenen (Papillomavirus E6 und E7, SV40 T Antigen, Epstein-Barr Virus-Onkogen, *c-myc* und E1A 12S; Katakura *et al.*, 1998) fiel die Wahl auf *c-myc* und E1A 12S. Mit beiden Tumorgenen konnten Epithelzellen wirksam immortalisiert werden (Bartlett *et al.*, 1988; Quinlan und Douglas, 1992). Dieser Zelltyp entstammt wie die humanen Schwannzellen dem Ektoderm. Diese gemeinsame embryonale Abstammung ließ eine Wirksamkeit auch bei humanen Schwannzellen vermuten.

Ad (b): In den meisten induzierbaren Genexpressions-Systemen für Säuger (z. B. durch Schwermetalle, Steroidhormone oder Hitzeschock reguliert; Yarranton, 1992) treten pleiotrope Effekte auf, und die Expressionsstärke kann nicht präzise reguliert werden. Zusätzlich wird in diesen Systemen generell auch im abgeschalteten Zustand eine geringe Basalaktivität verzeichnet. Die induzierenden Agentien selbst können zudem zytotoxisch wirken. Im Gegensatz dazu ist die Regulation der Genexpression durch das Tet-System sehr spezifisch (Gossen *et al.*, 1993). Es basiert auf heterogenen Kontrollelementen bakterieller Herkunft und kann äußerst exakt reguliert werden. Desweiteren sind die für eine strikte Repression benötigten Effektor-

konzentrationen von Tetracyclin bzw. Doxycyclin - selbst bei kontinuierlicher Gabe - nicht zytotoxisch (Shockett und Schatz, 1996).

Ad (c): Um in einer möglichst großen Anzahl von Zellen einen effizienten Gentransfer zu realisieren, sollte ein virales System eingesetzt werden. Da für das Vorliegen einer permanenten Zelllinie die Integration der Onkogene essentiell ist, kamen nur Retroviren oder Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Genvehikel in Frage (Karpati *et al.*, 1996).

Während Retroviren primär zur Infektion von sich teilenden Zellen verwendet werden (Karpati *et al.*, 1996), ist es AAV-Partikeln möglich, auch ruhende und differenzierte Zellen zu infizieren (Podsakoff *et al.*, 1994; Du *et al.*, 1996). Darüberhinaus wies das Adeno-assoziierte Virus noch weitere Vorzüge auf: Es ist nicht humanpathogen, ermöglicht eine wiederholte Infektion und besitzt eine hohe Transduktionseffizienz (Xiao *et al.*, 1993). Ferner kann mittels AAV-Vektoren eine Langzeitexpression erzielt werden (Habermann *et al.*, 1998; Büeler, 1999). Dies ist unter anderem dadurch begünstigt, da keine viralen Gene übertragen werden und somit keine Immunantwort ausgelöst wird.

Im folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Systeme näher erläutert.

## 1.1. Onkogene

### Adenovirales E1A 12S

Die *adenovirus early region 1A* (E1A)-Genprodukte sind die ersten Regulatorproteine, die während der Infektion durch Adenoviren synthetisiert werden. Durch alternatives Spleißen einer gemeinsamen Vorläufer-mRNA entstehen zwei mRNAs, die für die Kernproteine 13S und 12S kodieren. Letzteres ist in der Lage, bei primären Zellen eine Immortalisierung zu induzieren (Quinlan, 1994). Zusammen mit anderen Onkogenen, wie z. B. dem *ras*-Onkogen (Zerler *et al.*, 1986), wirkt es dagegen transformierend.

Fünf Regionen, die für die immortalisierende Wirkung dieses E1A 12S-Onkogens erforderlich sind, verteilen sich auf zwei Exons. Während das Exon 1 für die Initiation der Immortalisierung verantwortlich ist, wird durch das Exon 2 diese aufrechterhalten und die Lebensspanne verlängert (Gopalakrishnan *et al.*, 1997). Mit dem E1A 12S-Onkogen konnten bereits verschiedene primäre Zellen, darunter Epithelzellen der Ratte (Pasternack *et al.*, 1996) sowie der Maus und des Menschen (Hibi *et al.*, 1991), immortalisiert werden. Dabei behielten diese generierten Zelllinien ihre charakteristischen Eigenschaften als Epithelzellen bei.

## ***c-myc*-Onkogen**

Das *c-myc*-Gen gehört neben *N-myc* und *L-myc* zur Familie der zellulären *myc*-Protoonkogene und kommt in allen Zellen von Wirbeltieren vor. Es weist eine enorme Homologie zu *v-myc*, dem viralen *myc*-Onkogen des Myelocytomatosis-Virus von Vögeln, auf (Morgenbesser und DePinho, 1992).

Die humane zelluläre *c-myc*-Sequenz setzt sich aus drei Exons - einem 5' untranslatierten Exon 1 und zwei kodierenden Exons 2 und 3 - zusammen. Die Transkription wird dabei von zwei Promotoren P1 und P2, die beide auf dem Exon 1 liegen, initiiert. Ausgehend von einem non-AUG- sowie einem AUG-Startcodon, die sich im gleichen Leserahmen befinden, entstehen durch alternative Translation zwei Formen des Proteins (Spotts *et al.*, 1997). Diese werden als c-Myc-1 und c-Myc-2 bezeichnet. Bei diesen Proteinen handelt es sich um nukleäre Phosphoproteine mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 15 bis 30 Minuten (Morello *et al.*, 1993). Sie sind in die Regulation der Proliferation und Differenzierung normaler Zellen involviert. Nach Dimerisierung mit einem Protein namens Max (Amati und Land, 1994) treten sie als Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren auf. Die Tatsache, daß die c-Myc-Proteine die Expression von Genen mit diversen Aufgaben kontrollieren, erklärt, daß verschiedene physiologische Abläufe beeinflußt werden. So kann das endogene *c-myc* bei einer Dysregulation nicht nur tumorerzeugend wirken, sondern wird in einigen Fällen auch mit apoptotischem Zelltod in Verbindung gebracht (Fuhrmann *et al.*, 1999)

Wird eine exogene *c-myc*-Sequenz – als Transgen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors – zusätzlich in Zellen eingeschleust und dort überexprimiert, so kommt es zu malignen Veränderungen. Sowohl Epithelzellen, darunter auch neurale Vorläuferzellen aus der Maus (Bartlett *et al.*, 1988), als auch Zellen mesenchymalen Ursprungs wurden auf diese Weise immortalisiert (Land *et al.*, 1986; Kelekar und Cole, 1987; Strom *et al.*, 1991). Zusammen mit anderen aktivierten Onkogenen, wie z. B. mit dem *ras*-Onkogen (Strom *et al.*, 1991) oder dem adenoviralen E1A (Ruley, 1983) führt eine c-Myc-Überexpression zur Transformation der Zellen.

## **1.2. Tet-regulierte Genexpressionssysteme**

Basis dieser Regulationssysteme sind zwei regulatorische Elemente, die vom Tetracyclin-Resistenz-Operon des *E. coli* Tn10 Transposons stammen: das Tet Repressor-Protein (TetR) und die Tet Operator-DNA-Sequenz (tetO), welche TetR binden kann. Von diesen beiden Komponenten ausgehend wurden die Tet-Regulationssysteme jeweils mit einem Regulatorplasmid und einem Zielplasmid entwickelt.

## Tet-Off-System

In diesem originären System (Abb. 1; Gossen und Bujard, 1992) kodiert das Regulatorplasmid für ein Hybridprotein, welches Gossen *tetracycline-controlled transactivator* (**tTA**) nannte. Dieser Tet-Off-Transaktivator setzt sich zusammen aus der Tet Repressor-Bindungsdomäne (tetR) und der VP16 Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus (VP16). Letztere fungiert als eine Transkriptions-aktivierende Domäne und wandelt, fusioniert mit dem TetR, das Hybridprotein in einen Transaktivator um. Dieser Transaktivator (tTA) tritt als Dimer mit dem Zielplasmid in Wechselwirkung. Dieses Zielplasmid enthält das Zielgen unter der Kontrolle des Promotors  $p_{hCMV*1}$ , der wiederum aus sieben Kopien der tetO-Sequenz (TRE = *tet responsive element*) und einem Minimalpromotor des Zytomegalie-Virus ( $p_{minCMV}$ ) aufgebaut ist. Diesem Minimalpromotor fehlt der starke Enhancer, der normalerweise mit dem CMV IE Promotor assoziiert ist. Deshalb sollte ohne Aktivierung von diesem Element alleine keine Expression ausgehen.

In Abwesenheit des Effektormoleküls Tetracyclin bindet der Tet-Off-Transaktivator an das TRE, und die Transkription ist aktiviert: Das Zielgen wird exprimiert. Wird jedoch Tetracyclin (▼▼▼) dem System zugefügt, bindet sich diese Substanz an den TetR; es kommt zu einer Konformationsänderung. Diese verhindert eine Bindung des Tet-Off-Transaktivators an die tetO-Sequenzen und die Expression des Zielgens ist unterbunden.

### Tetracyclin schaltet die Expression aus = Tet-Off

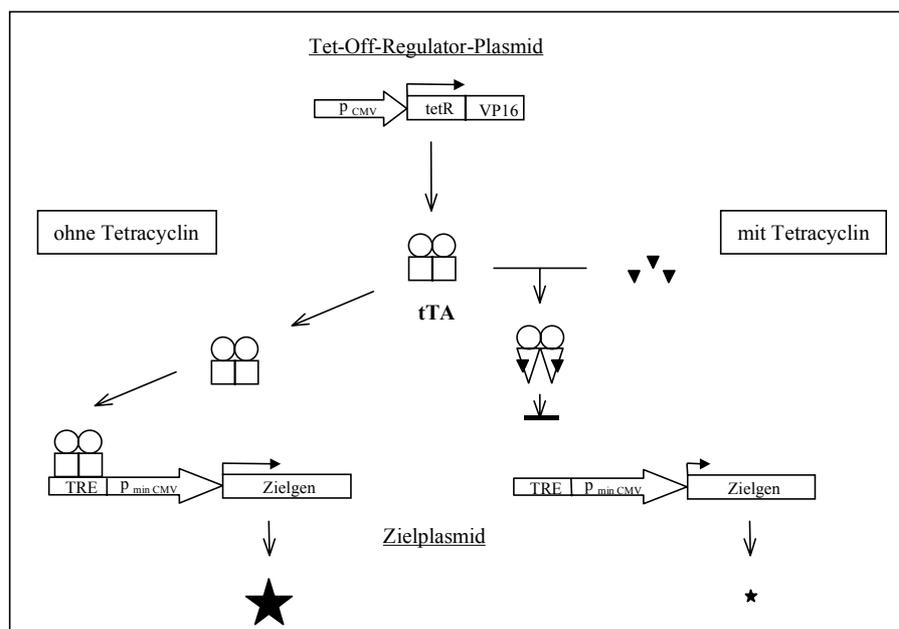


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genregulation durch das Tet-Off-System

## Tet-On-System

Das Tet-On-System (Abb. 2; Gossen *et al.*, 1995) basiert auf einem „reversen“ TetR (rTetR), der durch den Austausch von vier Aminosäuren entstanden ist. Fusioniert mit dem VP16-Protein, ergibt sich daraus der reverse Transaktivator (**rtTA**), der in dieser Arbeit als Tet-On-Transaktivator bezeichnet wird.

Bei diesem reversen Phänotyp kommt es durch die Zugabe von Doxycyclin (◆◆), einem für dieses System effizienteren Tetracyclin-Derivat, zur Expression des Zielgens. Denn erst aufgrund der durch Doxycyclin bewirkten Konformationsänderung kann der Tet-On-Transaktivator an die tetO-Sequenzen (TRE) binden und die Transkription initiieren. Ohne Doxycyclin findet hingegen keine Transkription statt.

### Doxycyclin schaltet die Expression an = Tet-On

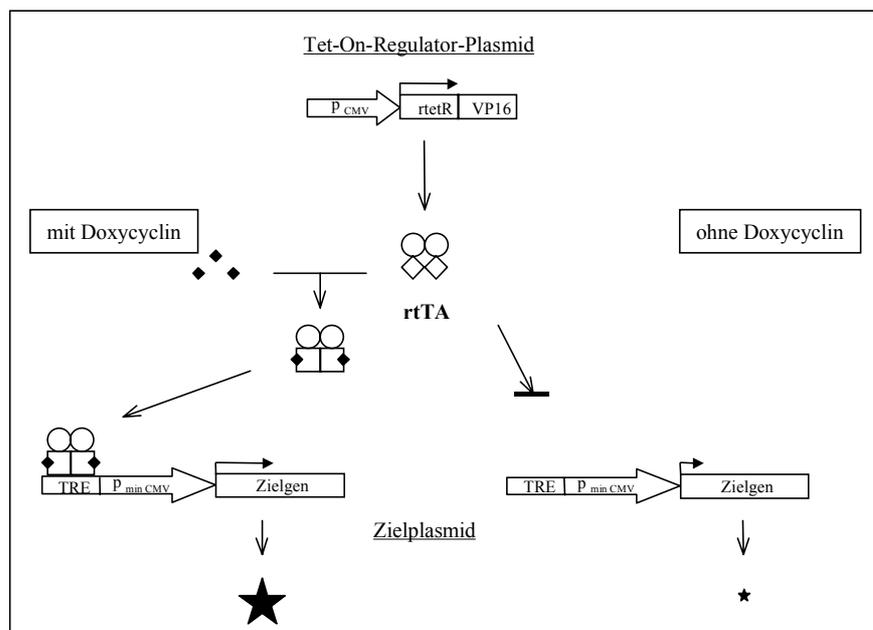


Abb. 2.: Schematische Darstellung der Genregulation durch das Tet-On-System

### Autoreguliertes Tet-Off-System

Diesem System (Abb. 3; Shockett *et al.*, 1995) liegt das Tet-Off-Basissystem zugrunde. Anstelle des konstitutiv exprimierenden CMV Promotors wurde hier der regulierbare  $p_{hCMV^*-1}$ -Promotor vor den Tet-Off-Transaktivator im Regulator-Plasmid gesetzt.

Dies führt dazu, daß der Tet-Off-Transaktivator in *trans* nach wie vor die Expression des Zielgens kontrolliert, in *cis* aber zusätzlich seine eigene Expression. Die Anwesenheit von Tetracyclin verhindert die Bindung des Transaktivators an das TRE, wodurch sowohl die Expression des Transaktivators selbst als auch die Expression des Zielgens unterbunden ist. Diese negative *feedback*-Reaktion gewährleistet, daß nur wenig oder gar kein Transaktivator-Protein bei Tetracyclin-Gabe vorhanden ist. Dagegen führt das Entfernen des Tetracyclins, kleinste Transaktivator-Mengen vorausgesetzt, zu einem positiven *feedforward loop*: Der Transaktivator bindet an den regulierbaren Promotor und stimuliert dadurch seine eigene sowie die Expression des Zielgens.

#### Tetracyclin schaltet Expression des Transaktivators und des Zielgens aus = autoTet-Off

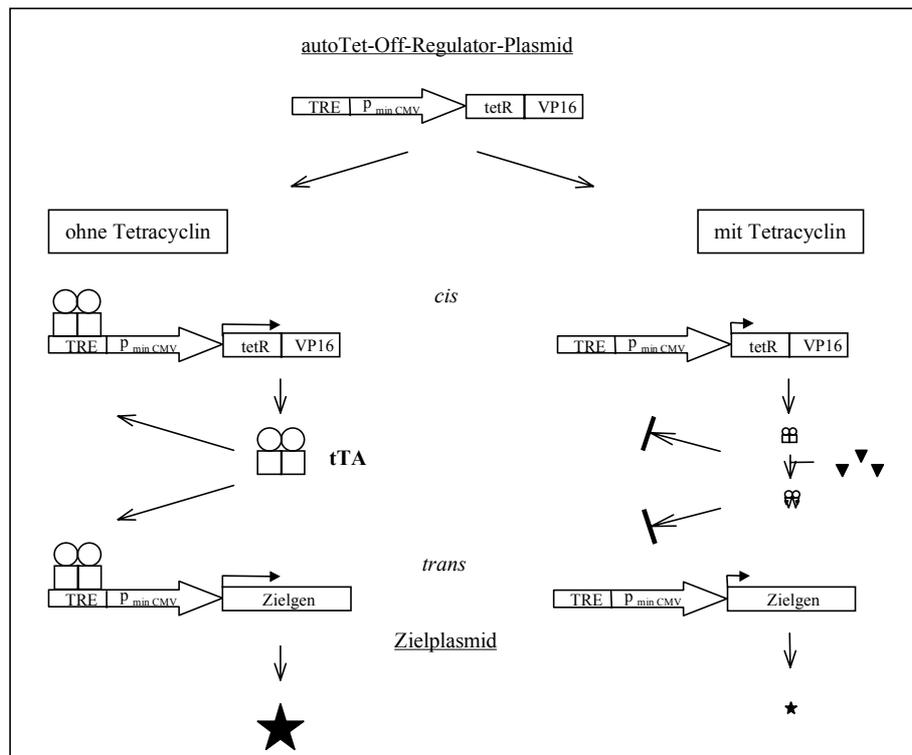


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genregulation durch das autoreguliertes Tet-Off-System

### 1.3. Adeno-assoziiertes Virus

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV; Muzyczka, 1992) ist ein defektes, nichtpathogenes humanes Parvovirus, das zu den kleinsten und strukturell einfachsten DNA-Viren gehört. Es benötigt für seine eigene Replikation die Koinfektion mit einem Helfervirus. Dieses kann zu der Familie der Adeno- oder Herpes simplex Viren gehören. In Abwesenheit eines solchen Helfervirus wird das AAV-Genom vorzugsweise in einen spezifischen Locus auf dem Chromosom 19 in das Genom der Wirtszelle als Provirus integriert (latente Infektion). Kommt es aber zu einer Superinfektion durch ein Helfervirus, wird das AAV-Genom ausgeschnitten und repliziert. Damit wird der lytische Zyklus eingeleitet, in dem neue Adeno-assoziierte Viren entstehen. Obgleich ca 70-85% der Bevölkerung gegenüber dem Virus seropositiv sind, wird keine Erkrankung mit diesem Virus assoziiert (Berns, 1990). Von fünf bekannten Serotypen ist der Typ 2 das AAV, welches am besten charakterisiert ist und in dieser Arbeit verwendet wurde.

Das Adeno-assoziierte Virus ist ein nicht-umhülltes, ikosaedrisches Virus mit einem Durchmesser von 20-25 nm. Es enthält eine lineare Einzelstrang-DNA mit einer Länge von ca. 4680 bp. Stränge beider Polaritäten können dabei mit gleicher Effizienz in neue Virionen verpackt werden. Das AAV-Genom trägt an beiden Enden eine 145 nt lange invertierte Basensequenz (*inverted terminal repeats* = ITR), wobei die ersten 125 nt eine T-Struktur ausbilden können (Abb. 4; Berns und Linden, 1994). Bei diesem Element handelt es sich um das einzige *cis*-Element, das für alle Schritte des AAV-Lebenszykluses erforderlich ist (Xiao *et al.*, 1997). Dies umfaßt das Ausschneiden aus dem Wirtsgenom, die Replikation des Genoms, das Verpacken sowie die Integration der Virionen.

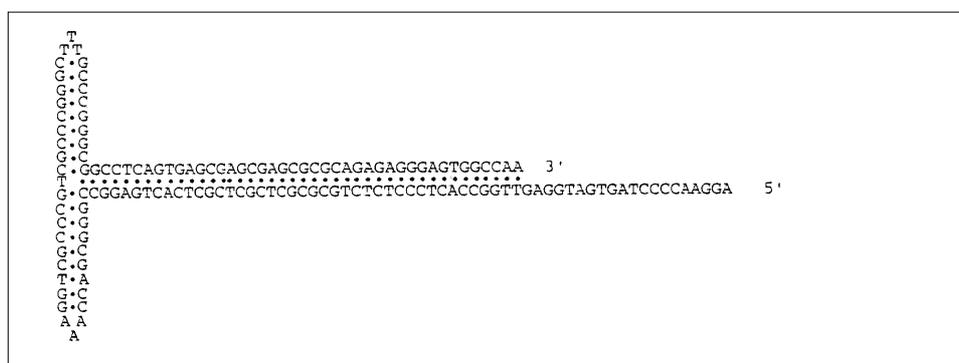


Abb. 4: Die AAV *terminal repeats* sind weitestgehendst selbst-komplementär. Dadurch können sie eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden, bei der von 125 palindromen Basen nur sieben Basen nicht gepaart sind (modifiziert nach Berns, 1994).

Abbildung 5 zeigt die Organisation des AAV-Genoms (Büeler, 1999): Flankiert von den beiden AAV ITRs (■) liegen auf der linken Hälfte der konventionellen Genomkarte die nicht-strukturellen *rep*-Gene. Sie kodieren für die vier Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40, wobei die Synthese der mRNAs von Rep78/68 und Rep52/40 von zwei unterschiedlichen Promotoren, p5 und p19, initiiert wird. Der dritte Promotor p40 führt zur Transkription der drei viralen *cap*-Gene. Von diesen drei Strukturproteinen VP1, VP2 sowie VP3 liegt letzteres mit ca. 90% im Überschuß vor, während die beiden anderen VP-Proteine jeweils zu ca. 5% auftreten.

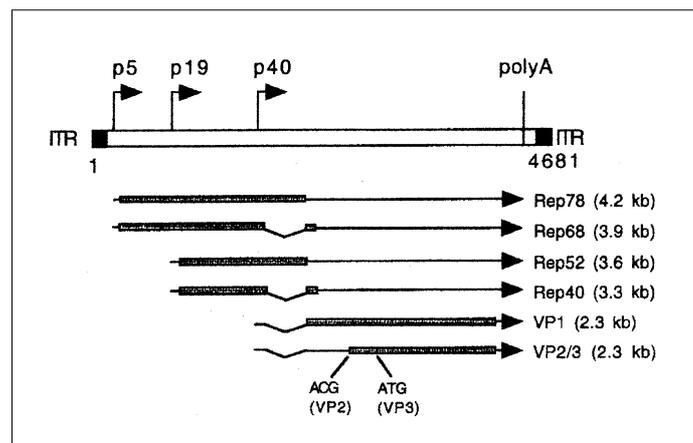


Abb. 5: Aufbau des AAV-Genoms: Während die Initiation für die Transkripte Rep78 und Rep68 am p5-Promotor startet, geht die Transkription für Rep52 und Rep40 vom p19-Promotor aus. Alle mRNAs, welche für die Kapsidproteine VP1, VP2 sowie VP3 kodieren, werden vom p40-Promotor transkribiert. Das Strukturprotein VP3 wird von einem herkömmlichen ATG-Startcodon synthetisiert, wohingegen für VP2 ein davon stromaufwärts gelegenes ACG-Startcodon verwendet wird (Büeler, 1999).

Die Rep-Proteine spielen eine essentielle regulatorische Rolle im Lebenszyklus des Adeno-assoziierten Virus. Sie kontrollieren die drei AAV-Promotoren, sind für Replikation, Verpackung und Integration notwendig und vermitteln die Spezifität der Integrationsstelle auf dem humanen Chromosom 19 (Balagué *et al.*, 1997). Obwohl das Verhältnis der Kapsidproteine bekannt ist, kann bis jetzt nur wenig über die Struktur dieser Proteine im Kapsid ausgesagt werden.

Rekombinante Adeno-assoziierte Viren sind inzwischen sowohl für den Gentransfer als auch für die Gentherapie sehr attraktiv geworden. Bereits verschiedene erfolgreiche Anwendungen dieser viralen „Genfähren“ können aufgezählt werden. Dazu gehören:

- Effiziente Transduktion eines GFP-Proteins und dessen Expression unter Verwendung von Zelltyp-spezifischen Promotoren in Rückenmarksneuronen (Peel *et al.*, 1997)
- Gentransfer eines rekombinanten AAV-Virus durch direkte intramuskuläre Injektion (Fisher *et al.*, 1997)
- Langzeitkontrolle der Erythropoetin-Sekretion via Doxycyclin nach Transduktion von primären Myoblasten und deren Transplantation (Bohl *et al.*, 1997)
- Korrektur des Defektes in Hämophilie B-Modellen bei Hunden und Mäusen (Snyder *et al.*, 1999)

Interessante Weiterentwicklungen zeigen inzwischen auf, in welche Richtung die zweite Generation von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren gehen kann. Durch perorale Gabe eines rAAV-Vektors konnte in einem Tiermodell mit Laktoseintoleranz eine persistente Expression eines  $\beta$ -Galaktosidase-Transgens hervorgerufen werden (During *et al.*, 1998). Andere Versuche gehen dahin, durch den Einsatz von sogenannten „Split-Vektoren“ die Limitierung der effektiv transduzierbaren Insertgröße des AAVs zu überwinden. Dabei wird das Transgen als 5'- und 3'-Hälfte auf zwei rAAV-Konstrukte verteilt und übertragen (Duan *et al.*, 2000).

## 1.4. Fragestellungen und Ziele

Ziel dieser Arbeit war (a) ein Verfahren für einen effizienten Gentransfer mit kombiniertem Regulationssystem zu entwickeln und (b) mittels dieser Methode ein immortalisierendes Onkogen auf humane Schwanzzellen zu übertragen, um eine permanente humane Schwanzzelllinie zu generieren. Zur Realisierung dieser Aufgaben wurden im einzelnen folgende Fragestellungen und Teilschritte bearbeitet.

- Konzeptionelle Entwicklung des AAV-Tet-Vektorsystems
- Klonierung der verschiedenen Tet-Transaktivator- sowie diverser Zielgene in einen AAV-Basisvektor
- Überprüfung der Funktionsfähigkeit, der Effizienz sowie der Regulationsfähigkeit der einzelnen Tet-Systeme in Rattenschwanzzellen
- Herstellung von rekombinanten AAV-Virionen
- Etablierung und Optimierung des AAV-vermittelten Gentransfers bei humanen Schwanzzellen
- Etablierung und Optimierung der Genübertragung durch Transfektion bei humanen Schwanzzellen
- Transfektion und Selektion von humanen Schwanzzellen zur Herstellung einer permanenten Schwanzzell-Linie

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Bakterienstämme

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17 thi-1 relA1 supE44 gyrA96</i> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 $\lambda$ - <i>recA1</i>	Bethesda Research Laboratories, 1986
<i>E. coli</i> JM110	<i>dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup> supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) F <sup>-</sup> [ <i>tra</i> $\Delta$ 36 <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> JC8111	<i>argE3 his-4 leu-6 proA2 thr-1 rpsL31 galK2 lacY1 ara-14 xyl-5 mtl-1 supE44 recB21 recC22 sbcB15 recF143 ilv<sup>-</sup></i>	Boissy und Astell, 1985

#### 2.1.2. Virusstöcke

Virus	Quelle	Referenz
Adenovirus Typ 2	L. Tenenbaum	
Adeno-assoziiertes Virus Typ 2	L. Tenenbaum	Samulski <i>et al.</i> , 1982

#### 2.1.3. Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Referenz
HEK 293	Linie aus primären humanen embryonalen Nierenzellen, transformiert mit gescherter humaner Adenovirus Typ 5 DNA	ATCC, Rockville, MD	Graham <i>et al.</i> , 1977
HEK 293T	Erstbeschreibung 293/tsA1609neo HEK 293-Linie, transformiert mit dem temperatur-sensitiven SV40 T-Antigen tsA1609	L. Tenenbaum	DuBridg <i>et al.</i> , 1987
HeLa	humane zervikale Karzinom-Zelllinie	ATCC, Rockville, MD	

### 2.1.4. Vektoren und Linker

Vektor	Quelle	Referenz
pTR <sub>BS</sub> -UF	S. Zolotukhin	Zolotukhin <i>et al.</i> , 1996
pIM45	S. Zolotukhin	McCarty <i>et al.</i> , 1991
pUHD15-1	H. Bujard	Gossen und Bujard, 1992
pTet-On	Clontech, Palo Alto, CA	Gossen <i>et al.</i> , 1995
pTet-tTAK	Gibco BRL, Rockville, MD	Shockett <i>et al.</i> , 1995
pTRE	Clontech, Palo Alto, CA	Resnitzky <i>et al.</i> , 1994
pTR-EGFP	C. Rosenbaum	Tenenbaum <i>et al.</i> , 1999
phGFP-S65T	Clontech, Palo Alto, CA	Heim <i>et al.</i> , 1995
pEGFP-1	Clontech, Palo Alto, CA	Cormack <i>et al.</i> , 1996
pCMV <sub>12S</sub>	B. Lüscher	Kraus <i>et al.</i> , 1992
pSP <sub>myc</sub>	B. Lüscher	Hann <i>et al.</i> , 1988
pY3	L. Tenenbaum	Blochlinger und Diggelmann, 1984
pBR322	Gibco BRL, Rockville, MD	
pBluescriptII KS <sup>+</sup> ™	Stratagene, La Jolla, CA	

Linker	Sequenz	Endmarkierung	Firma
<i>Bam</i> H I	d(CGGGATCCCG)	phosphoryliert	Stratagene, La Jolla, CA
<i>Bgl</i> II	d(GAAGATCTTC)	phosphoryliert	Stratagene, La Jolla, CA
<i>Hind</i> III	d(CCAAGCTTGG)	phosphoryliert	Stratagene, La Jolla, CA

### 2.1.5. Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Klonalität	Konzentration	Markierung	Firma
anti-cow S100	Kaninchen	polyklonal	95 µg/ml		Dako, Glostrup, Dänemark
anti-NGF-R	Maus	monoklonal	50 µg/ml		Boehringer Mannheim
anti-BrdU	Maus	monoklonal	100 µg/ml		Boehringer Mannheim
anti-Ad-2 E1A (13 S-5)	Kaninchen	polyklonal	100 µg/ml		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

anti- <i>c-myc</i>	Maus	monoklonal	100 µg/ml		Oncogene Science, Uniondale, NY
anti-GFP	Kaninchen	polyklonal			Clontech, Palo Alto, CA
anti-Ad-2	Ziege	polyklonal		Fluoreszein	NMI, San Diego, CA
anti-Kanin- chen-IgG	Ziege	polyklonal		TRITC	Cappel, Durham, NC
anti-Kanin- chen-IgG	Ziege	polyklonal		Cy3	Jackson Immuno, West Grove, PA
biot. anti- Maus-IgG	Ziege	polyklonal			Vector Laboratories, Burlingame, CA
biot. anti-Ka- ninchen-IgG	Ziege	polyklonal			Vector Laboratories, Burlingame, CA

### 2.1.6. Nährmedien, Enzyme und Chemikalien

#### Inkubationsmedium für humane Nerven-Faszikel:

90% DMEM (4,5 mg/l Glucose), 10% FCS, 2 µM Forskolin, 50 U/ml Penicillin/50µg/ml Streptomycin

#### Proliferationsmedium für humane Schwanzzellen (hSC):

90% DMEM (4,5 mg/l Glucose), 10% FCS, 0.5 µM Forskolin, 0.5 mM IBMX, 2,5 ng/ml Insulin, 10 nM Heregulin β1, 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin

#### Proliferationsmedium für Rattenschwanzzellen:

90% DMEM (1 mg/l Glucose), 10% FCS, 2 µM Forskolin, 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin

#### Vollmedium für HeLa- und HEK-Zelllinien:

90% DMEM (4,5 mg/l Glucose), 10% FCS, 1 x NEAA, 1 mM Pyruvat, 1 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin/50 µg/ml Streptomycin

Zur besseren Standardisierung der Medien wurde das fötale Kälberserum (FCS; Boehringer Mannheim) nur aus einer Charge benutzt und vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Als Mitogen für hSC wurde der rekombinant hergestellte Gliawachstumsfaktor Heregulin β1

(rHRG<sub>177-244</sub>; Levi *et al.*, 1995) eingesetzt, der freundlicherweise von der Firma Genentech (San Francisco, CA) zur Verfügung gestellt wurde.

Mit Ausnahme von Forskolin, IBMX und Insulin (alle Sigma, St. Louis, MO) wurden die übrigen Medien und Zusätze bei Gibco BRL, Rockville, MD bezogen.

Alle Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Pharmacia, Piscataway, NJ und Boehringer Mannheim bezogen. Chemikalien ohne Firmenangabe wurden von Sigma, St. Louis, MO bzw. Boehringer Mannheim erworben.

Die radioaktiv markierten Chemikalien [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) und [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) wurden von der Firma Hartmann Analytics, Braunschweig erstanden.

### **2.1.7. Sonstige Materialien und Geräte**

In der Zellkultur verwendete Plastikartikel wie Kulturgefäße und Zentrifugenröhrchen wurden über die Firmen Nunc, Wiesbaden und Greiner, Solingen bezogen.

DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem UV-Spektrometer DU-650 der Firma Beckman, Irvine, CA durchgeführt.

Die Darstellung von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen erfolgte mit dem UV-Transilluminator Chroma 43 (Vetter, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 302 nm. Photographiert wurde mit einer Polaroid-Kamera unter Verwendung von Negativfilmen des Typs 665 (Polaroid, Cambridge, MA).

<sup>32</sup>P-markierte Präparate wurden mit dem Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR der Firma Canberra-Packard, Dreieich vermessen. Die densitometrische Auswertung der Röntgenfilme (X-OMAT, Kodak, Rochester, NY) erfolgte mittels eines Laser-Scanning-Densitometers (Molecular Dynamics, Krefeld) unter Verwendung der Imagequant-Software, während die Exposition der Screens MP anhand des Bio-Image-Analyzers BAS1500 (Raytest, Sprockhövel) und der zugehörigen TINA-Software analysiert wurden.

Die Lebendfärbung bei GFP-markierten Zellen konnte mit Hilfe des Leitz Fluovert-Mikroskops (Wetzlar) beobachtet werden. Immunhistochemische Färbungen hingegen wurden anhand des Fluoreszenzmikroskops Dialux<sup>®</sup>20 (Leitz) beurteilt. In beiden Fällen wurden die Ergebnisse durch den Leitz Vario-Orthomat auf Ektachrome Farbumkehrfilme P1600 (Kodak) aufgenommen.

## 2.2. Molekularbiologie

### 2.2.1. Transformation von Bakterien mittels Kälteschock

Um insbesondere den sehr empfindlichen und sehr langsam wachsenden Bakterienstamm *E. coli* JC8111 (Boissy und Astell, 1985) in ausreichender Effizienz transformieren zu können, wurden kompetente Zellen durch folgende schonende Kälteschock-Methode hergestellt:

3 ml LB-Medium wurden mit dem jeweiligen Bakterienglycerinstock beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation sedimentiert und das Zellpellet in 100 µl eiskalter 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1-10 ng plasmidaler bzw. 20 ng ligierter DNA wurden die Proben 30 min auf Eis gestellt, danach 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt, und der Ansatz für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Transformationsansatzes in 200 µl LB-Medium wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf das geeignete Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Der restliche Ansatz wurde bei 4°C verwahrt.

### 2.2.2. Enzymatische Modifikationen der DNA

#### DNA-Hydrolyse durch Restriktionsenzyme

Für die Konstruktion der verschiedenen Vektoren waren sowohl vollständige als auch partielle Hydrolysen der DNA erforderlich. Bei Vorliegen einer singulären Restriktionsschnittstelle wurde die Linearisierung des Plasmids klassisch nach dem Protokoll von Sambrook (1989) durchgeführt. In einigen Fällen waren jedoch zwei Schnittstellen der gleichen Restriktionsendonuklease auf dem Plasmid vertreten, sodaß für den gewünschten Einfachschnitt ein Partialverdau notwendig war. Dafür wurden je nach Anforderung 5 µg zirkuläre bzw. bereits linearisierte DNA mit 5 U Restriktionsendonuklease, 6 µl 10xRestriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 60 µl bei 37°C inkubiert. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurde für jeden Partialverdau die geeignete Inkubationszeit ausgetestet, indem im Minutenabstand fünfmal 12 µl Probe entnommen wurde. Die jeweiligen Aliquots wurden mit vorgelegtem Gelladepuffer vermengt und sofort bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Proben auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und der durch den gewünschten singulären Schnitt entstandene Fragmentanteil gezielt eluiert.

### **Auffüllen von 5' überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments**

In Anlehnung an Ausubel *et al.* (Kap. 3, 3.5, 1995) wurde 0,5-2 µg linearisierte DNA mit 3 U des Klenow-Fragments, je 1 µl jedes dNTPs (0.5 mM) und 3 µl Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl versetzt und 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 1 µl 0.5 M EDTA gestoppt.

### **Dephosphorylierung der Vektor-DNA**

Vektor-DNA wurde entsprechend der Vorschrift von Sambrook (1989) mit aus Kalbsinnereien gewonnener alkalischer Phosphatase während 1 Std bei 37°C dephosphoryliert.

### **Verschiedene Ligationsansätze**

#### Einfache Ligation

Um Ligationen zwischen Vektor- und Insert-DNA zeitsparend und effizient durchzuführen, wurde der Rapid DNA Ligation Kit von Boehringer Mannheim angewandt. Dessen Standardprotokoll folgend wurde dephosphorylierte Vektor-DNA mit Insert-DNA bis zu einer Gesamtmenge von 200 ng in einem molaren Verhältnis von 1:3 nach Berücksichtigung der Fragmentlängen eingesetzt und mit einfach konzentriertem DNA-Verdünnungspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl vermengt. Nach Zugabe von 10 µl T4 DNA Ligationspuffer und anschließendem Mischen wurde 1 µl T4 DNA Ligase zugefügt und der Reaktionsansatz erneut vermischt. Die Inkubationszeit der unterschiedlichen Ligationen betrug zwischen 30 min und 3 Std bei Raumtemperatur. Überschritt das Gesamtvolumen der DNA-Lösung zusammen mit dem Verdünnungspuffer die angegebenen 10 µl, wurde das Volumen der übrigen Reagenzien entsprechend angepaßt. Um eine Inhibition durch überschüssige DNA zu vermeiden, wurden pro Transformation 20 ng Gesamt-DNA aus dem Ligationsansatz eingesetzt.

#### Sequentielle Ligation

Für ein kontrolliertes Zusammenfügen von drei unterschiedlichen DNA-Fragmenten war es in einigen Klonierungsstrategien von Vorteil, zwei aufeinanderfolgende Ligationsreaktionen durchzuführen. Dafür wurden in einer ersten Ligation zwei verschiedene Insert-DNA-Fragmente mit einer Molarität von 1:1 nach dem oben beschriebenen Verfahren zirkularisiert. Da diese weder über einen *ori* zur Replikation noch über Selektionsgene verfügten, wurde ohne vorhergehende Transformation mit einer ausgesuchten Restriktionsendonuklease linearisiert. Die Abtrennung des gewünschten heterogenen, durch seine Größe ermittelten Konstruktes von

zusätzlichen aus zwei gleichen Inserts bestehenden Ligationsprodukten sowie nicht ligierten DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Nach der Elution dieses Produktes wurde eine zweite Ligation mit dem dephosphorylierten Vektoranteil durchgeführt und eine Transformation angeschlossen.

### Linker-Ligation

Linker sind kurze synthetische Oligomere palindromer Natur, mittels derer eine gewünschte interne Restriktionsschnittstelle geschaffen werden kann. Sie besitzen stumpfe Enden und sind in phosphorylierter und dephosphorylierter Form erhältlich.

Um ein Plasmid mit einer zusätzlich zur Klonierung notwendigen Nukleotidsequenz zu versehen, wurde dieses an der entsprechenden Stelle mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease geöffnet. Die Enden wurden bei Bedarf mit der Klenow-Reaktion aufgefüllt und dephosphoryliert. Die anschließende Ligation mit dem phosphorylierten 10-mer Linker erfolgte wiederum unter Verwendung des Rapid Ligation Kits. Aufgrund der starken Größendifferenz gegenüber dem Plasmidanteil wurden die Oligomere in einem 60-fachen molaren Überschuss angeboten. Nach einer Transformation konnten die gesuchten Klone durch Hydrolyse mit der zum Linker passenden Endonuklease ermittelt werden.

### **2.2.3. Nachweis auf Vollständigkeit der AAV ITRs (*inverted terminal repeats*)**

Da es sich bei den ITR-Sequenzelementen um palindrome Strukturen handelt, kann es bei der Transformation, wie bei Boissy und Astell (1985) beschrieben, teilweise zu Deletionsereignissen kommen. Deshalb hat es sich bei der Isolierung und Propagierung von AAV ITR-Derivaten bewährt, den Bakterienstamm *E.coli* JC8111 zu verwenden, der aufgrund seiner genetischen Charakteristika (*recBCsbcBrecF*) die Integrität der AAV-Enden weitgehend gewährleistet. Dennoch ist es nach Transformationsschritten angeraten, die Plasmid-DNA - ausgehend von einer Einzelkolonie - auf die intakte Form der terminalen Palindrome hin zu überprüfen.

Im folgenden werden die beiden eingesetzten Nachweismethoden beschrieben. Obgleich die Beurteilung üblicherweise mittels Polyacrylamid-Gel durchgeführt wird, stellte sich die einfache Restriktionsanalyse während einiger Simultanversuche als gleichwertig heraus. Weniger aufwendig und zudem ohne Einsatz von radioaktiven Gefahrenstoffen, wurde letztere bevorzugt.

## **Endmarkierung der DNA-Fragmente und Darstellung auf Polyacrylamid-Gelen**

Für diesen Nachweis wurden folgende Schritte nacheinander durchgeführt:

### 1. Restriktion der DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl* II und *Pst* I

3,5 µg DNA der die AAV ITRs enthaltenden Plasmide wurden mit den beiden Restriktionsenzymen vollständig geschnitten (Sambrook, 1989).

### 2. Entfernen des 5'-Phosphats mittels alkalischer Phosphatase

Bei dieser Reaktion wurden die terminalen 5'-Phosphate der DNA-Fragmente unter Verwendung der alkalischen Phosphatase (Kap. 2.2.2.) in Hydroxylgruppen umgewandelt. Dafür wurden 2 µg der zuvor geschnittenen AAV ITR-Proben sowie jeweils 4 µg der Standards (1 Kb-Leiter DNA und pUC *Msp* I) verwendet.

### 3. Radioaktive Markierung der 5'-Enden durch die Phagen T4 Polynukleotidkinase

In dieser sogenannten Vorwärts-Reaktion wurde durch die Phagen T4 Polynukleotid-Kinase das  $\gamma^{32}\text{P}$  eines  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Moleküls auf das 5'-Ende der DNA übertragen und somit das DNA-Fragment radioaktiv gekennzeichnet. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung von  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl) nach Sambrook (1989). Um die eingebaute Radioaktivität zu bestimmen, wurden 2 µl des Reaktionsansatzes in einem Liquid Scintillation Analyzer der Firma Canberra-Packard (Dreieich) vermessen.

### 4. Beurteilung der AAV-Enden anhand eines Polyacrylamid-Gels

Zur Größenvalidierung der terminalen Palindrome wurden  $3 \times 10^5$  cpm der radioaktiv markierten Proben, versetzt mit 4 µl Ladepuffer, auf ein 6%-iges Polyacrylamid-Gel aufgebracht und elektrophoretisch getrennt. Nach Exposition auf Filmmaterial wurde anhand der mitgeführten Längenstandards die Länge der AAV-Fragmente beurteilt. Die Größe der korrespondierenden ITR-Fragmente sollte bei 160 bp liegen: 145 bp ITR-Sequenz und 15 bp eines OligoGC-Anteils. Bei Auftreten von durch Deletion hervorgerufenen, kleineren Satellitenbanden wurde das jeweilige AAV-Derivat ausgesondert.

## **Restriktionsanalyse und Darstellung auf Agarose-Gelen**

Wie im ersten Schritt der vorhergehenden Methode wurden die AAV-Plasmide einem Doppelverdau mit *Bgl* II/*Pst* I unterzogen, jedoch nachfolgend auf einem 3%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Beurteilung der ITR-Integrität wurde wiederum der Fragmentgrößenvergleich mit entsprechenden DNA-Längenstandards herangezogen.

#### 2.2.4. Molekularbiologische Standardmethoden

Für die Isolierung der Klone wurden die Transformationsansätze je nach vorhandener Resistenz auf Selektionsplatten, bestehend aus LB-Medium und Ampicillin (50 µg/ml, Boehringer Mannheim) bzw. Tetracyclin (10 µg/ml; Sigma), ausplattiert.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte entweder in Minipräparationen nach einer modifizierten Version von Birnboim und Doly (1979) oder für eine größere Ausbeute mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Hilden). In beiden Fällen wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit nachfolgender Ethanolpräzipitation (-20°C, ÜN) angeschlossen.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Herstellung und Elektrophorese der Agarose- sowie der Polyacrylamid-Gele ebenfalls nach Sambrook (1989) durchgeführt. Als Längenstandards wurden pUC *Msp* I,  $\lambda$ /*Eco47* I,  $\lambda$ /*Eco91* I (alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und die 1 kb DNA Leiter von Gibco BRL eingesetzt.

Um DNA-Restriktionsfragmente aus den Agarose-Gelen zu extrahieren und zugleich von z. B. Ethidiumbromid, Salzen und Agarose zu reinigen, wurde der QIAEX Gel Extraktion Kit (QIAGEN) verwendet.

Die Sequenzierungen wurden teilweise durch Frau Dr. Finken-Eigen (Biomedizinisches Forschungszentrum, Düsseldorf), teilweise von mir ausgeführt. Entsprechende Primer wurden mit Hilfe der pc gene-Software kreiert. Nach Durchführung der Sequenzierreaktion (ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Thermocycler C480, beide Perkin-Elmer, Weiterstadt) erfolgte die Sequenzanalyse am ABI PRISM 310 Genetic Analyzer von Perkin Elmer.

Für die Hybridisierungen wurden geeignete DNA-Sonden per Restriktion gewonnen. Mit Hilfe des Ready-To-Go DNA Labelling Kits(-dCTP) wurden diese radioaktiv markiert und anschließend mittels Gelchromatographie über Micro-Spin™ S-200HR Säulchen (beides Pharmacia) aufgereinigt.

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Humane Schwannzell-Kulturen

Die für die Gewinnung humaner Schwannzellen benötigten peripheren Nerven wurden mit entsprechender Einwilligung von Multiorganspendern aus den Transplantationszentren Essen und Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die sterile Entnahme der Nerven aus dem Bauchraum (Nn. des Plexus lumbosacralis) erfolgte bis spätestens 3 Std nach Abklemmen der Aorta. Während ein kleiner Teil des Materials zur Abklärung pathologischer Veränderungen histologisch aufgearbeitet wurde, diente der Hauptanteil für die Herstellung von humanen Schwannzellkulturen.

#### **Präparation der humanen Nervenfaszikel**

Die in sterilem RPMI-Medium (Gibco BRL) mit Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin (50 µg/ml) aufbewahrten Nervenstücke wurden bei 4°C maximal 24 Std gelagert und folgendermaßen aufgearbeitet:

Nach Überführen in DMEM/10% FCS wurden aus den zuvor in ca. 1 cm lange Fragmente geschnittenen Nerven unter mikroskopischer Sicht die Faszikel gezogen und von Bindegewebe befreit. Pro Kulturschale wurden fünf bis sechs Faszikel mit 10 ml Inkubationsmedium 14 Tage unter Standardbedingungen (37°C, 94% Luftfeuchtigkeit, 10% CO<sub>2</sub>; Cytoperm, Heraeus, Hanau) inkubiert, wobei das Medium nach 5 Tagen gewechselt wurde. Für den proteolytischen Verdau wurden die Faszikel in ein Medium bestehend aus DMEM/10% FCS, 160 U/ml Kollagenase Typ I aus *Clostridium histolyticum* (Sigma) und 0,8 U/ml Dispase Grad I (Boehringer Mannheim) bei einem Verhältnis von 20 mg Gewebe/ml Enzymgemisch überführt, in ca. 1 mm lange Stücke zerkleinert und bei 37°C 18 Std lang inkubiert. Anschließend wurde das angedaute Gewebe mittels Pasteurpipetten unterschiedlicher Öffnungsweite solange vorsichtig trituiert, bis eine vollständig homogene Zellsuspension entstand. Diese wurde mit dem dreifachen Volumen an DMEM/10% FCS gewaschen, und die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 1500 rpm (Rotana/R, Hettich, Tuttlingen) gesammelt. Die Resuspension der Zellen erfolgte je nach Pelletgröße in einem geeigneten Volumen des Proliferationsmediums. Nach Zellzahlbestimmung und Viabilitätstestung mittels Fluorescein-Diacetat (FAD; 0,042% in Aceton; Sigma; 1:10 in DMEM/10% FCS verdünnt) wurde mit den Zellen, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, weiterverfahren.

### **Kultivierung humaner Schwanzzellen**

Um ein Anheften und Ausbreiten der Zellen zu erleichtern, wurden alle Kulturgefäße für humane Schwanzzellen mit einer Zweifach-Beschichtung versehen. Dafür wurden die Kulturschalen in einem ersten Schritt mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin (mittleres MG 365 000, in PBS; Sigma) für 30 min bei 37°C inkubiert, dreimal mit PBS gespült und nachfolgend ÜN bei 4°C mit 4 µg/ml Maus-Laminin (isoliert aus einem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom, in PBS; Gibco BRL) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS wurden die humanen Schwanzzellen in einer Dichte von 15 000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Proliferationsmedium ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Nachdem die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Platten dreimal mit PBS gewaschen und vorgewärmtes, EDTA enthaltendes 0,05% Trypsin (in PBS; Boehringer Mannheim) zugegeben. Um ein optimales Abstoppen der enzymatischen Trypsin-Reaktion mit DMEM/10% FCS zu gewährleisten und damit größere Zellverluste zu verhindern, wurde das Ablösen der Zellen unter mikroskopischer Kontrolle verfolgt. Danach wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1500 rpm (Rotana/R, Hettich) pelletiert, je nach Pelletgröße in einem geeigneten Volumen Proliferationsmedium aufgenommen und nach Zellzahlbestimmung erneut ausgesät. Anschließend wurde die Proliferationsrate der Zellen über den spezifischen Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU; Boehringer Mannheim) bestimmt. Zur Beurteilung der Reinheit der hSC sowie ihres Wachstumsverhaltens unter Kulturbedingungen wurden sie teils mit, teils ohne vorherige zelltypspezifische NGF-Rezeptor-Färbung (1:35; Boehringer Mannheim) mittels α-S100 (1:1000; Dako, Dänemark) markiert. Dieses Prozedere erfolgte in jeder Passage ([°]) und wird unter Hanemann *et al.* (1998) beschrieben.

### **2.3.2. Chemosensitivitätstestung gegenüber Antibiotika**

Für die Gewinnung einer stabilen Zelllinie ist es erforderlich, zusammen mit dem Funktionsgen ein dominantes Selektionsgen in die Zellen einzubringen. Dieses erlaubt durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums die Isolation der modifizierten Zellen. Da in dieser Arbeit, vom funktionellen Gen räumlich getrennt, auch eine Regulationseinheit übertragen werden sollte, wurden zwei Selektionsmarker für den Beweis des gemeinsamen Vorliegens in einer Zelle benötigt.

Als antibiotische Substanzen wurden die beiden Aminoglykoside Geneticin<sup>®</sup> (Gibco BRL), auch unter der Bezeichnung G418 bekannt, und Hygromycin B (Calbiochem, Bad Soden) ausgewählt. Da die kritischen Konzentrationen für jedes Selektionsreagenz je nach Zelltyp und Wachstumszyklus variieren können, mußten die Arbeitskonzentrationen der beiden Antibiotika gegenüber hSC erst experimentell ermittelt werden. Dies erfolgte zur Eingrenzung der Konzentrationsbereiche zuerst für jedes einzelne Antibiotikum, anschließend wurden die Konzentrationen in Kombination optimiert. Zur sicheren Bestimmung der optimalen Konzentration wurde neben einer optischen, individuellen Begutachtung eine kolorimetrische Auswertung unter Anwendung des CellTiter 96<sup>™</sup> AQ Assay (Promega, Madison, WI) durchgeführt. Dabei ist die anhand eines entstehenden Formazan-Produktes bestimmte Absorptionsmessung bei 490 nm direkt proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

Der nachfolgenden Testung vorangegangen war ein Versuch über acht Tage, in dem, bezogen auf die jeweiligen Herstellerangaben, eine Konzentrationsbreite von 50-1000 µg/ml je Antibiotikum untersucht worden war. Daraus abgeleitet wurden die hier verwendeten Konzentrationsbereiche mit 300-1000 µg/ml Medium für Geneticin<sup>®</sup> und 0,1-50 µg/ml Medium für Hygromycin B. Nach Aussaat der hSC auf beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70% unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die genannten Antibiotika-Verdünnungen in Doppelwertbestimmungen angelegt. Zusätzlich wurden Zellen als Kontrolle mitgeführt, die keinem Antibiotikum ausgesetzt waren. Jeweils nach 4-5 Tagen wurde das Medium unter Zusatz der Selektionsmarker erneuert. Um das Absterben der Zellen zu verfolgen, wurden die Mikrotiterplatten sowohl nach einer Woche als auch kurz vor Abschluß des Versuchs nach 14 Tagen mikroskopisch auf das Vorliegen lebender Zellen durchgesehen. Für die Durchführung des Bioassays wurden 2 ml MTS-Lösung (2 mg/ml PBS) mit 100 µl PMS (0,92 mg/ml PBS) vermengt, vorsichtig gemischt und jeweils 100 µl pro Vertiefung mit einer Multipipette auf die zuvor mit PBS gewaschenen Platten verteilt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 490 nm per ELISA-Platten Lesegerät (MR 500; Dynatech, Deukendorf).

Für den Kombinationsversuch wurden die humanen Schwanzzellen in einer Ausgangsdichte von 30 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 48-Loch-Kulturplatten gesetzt. Zugabe der Selektionsreagenzien erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80%. In Doppelwertbestimmungen wurden für Geneticin<sup>®</sup> die Konzentrationen 100, 150, 200, 300 und 400 µg/ml Medium und für Hygromycin B die Konzentrationen 6, 9, 12 und 15 µg/ml Medium, jeweils in Kombination, ausgetestet. Als

Kontrolle diente eine Vertiefung mit Zellen ohne Antibiotikum-Zusatz. Nach drei Tagen unter Ab-Einfluß wurden die Zellen jeweils von einer Vertiefung der 48-Loch-Platte in eine Vertiefung einer 96-Loch-Kulturplatte umgesetzt, wobei sie, um ein Anheften zu erleichtern, für diesen Tag nur in Proliferationsmedium ohne antibiotische Substanzen gehalten wurden. Visuell überprüft, erfolgte am nächsten Tag die Zugabe der Selektionsagentien. Nach weiteren vier Tagen wurde ein Mediumwechsel und im Anschluß daran eine optische Auswertung durchgeführt. Am 14. Tag wurde der Zustand der Zellen erneut per Mikroskop beurteilt und protokolliert. Anschließend wurde der Bioassay wie beim Eingangsversuch durchgeführt, wobei hier neben einer als Leerwert definierten Kontrolle, die nur aus Medium bestand, noch eine zusätzliche Vertiefung mit Medium inklusive der höchsten Antibiotika-Zusätze mitgeführt wurde.

### **2.3.3. Chemosensitivitätstestung gegenüber den Effektormolekülen**

Um den Einfluß der Effektormoleküle Tetracyclin und Doxycyclin (beide Sigma) auf Wachstumsverhalten und Morphologie humaner Schwanzzellen abschätzen zu können, wurden Kulturen mit einer Plattierungsdichte von 15 000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 96-Loch-Kulturplatten angelegt, nach vier Tagen mit den verschiedenen Konzentrationen der tetracyclischen Substanzen versetzt und anschließend unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde alle 3-4 Tage vollzogen. Sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen wurden die Zellen visuell auf morphologische Auffälligkeiten sowie Verringerung der Zellzahlen hin überprüft. Zudem erfolgte am Ende der Inkubationszeit - unter Einbezug eines Leerwertes (nur Medium) und einer Messung von Zellen ohne Ab-Einwirkung - eine quantitative Analyse des Zellwachstums mittels Bioassay (Kap. 2.3.2.).

### **2.3.4. Transfektion eukaryontischer Zellen**

Für das Einschleusen von Fremd-DNA stehen verschiedene Transfektionsmethoden zur Verfügung, die jedoch unterschiedlich effektiv sein können. Deshalb wurden in dieser Arbeit für das Erreichen größtmöglicher Transfektionseffizienz zwei verschiedene Transfektionsreagenzien (beide Boehringer Mannheim) verwendet. Auf die detaillierten experimentellen Parameter wie Zelltyp, DNA-Konzentration sowie das Verhältnis zwischen Transfektionsreagenz und DNA wird in den einzelnen Versuchen in späteren Kapiteln eingegangen.

### **Transiente Transfektionsversuche mit DOSPER**

Um einen Vergleich der einzelnen Transfektionsversuche zu erleichtern, wurden alle angegebenen DNA/Transfektionsreagenz-Mengen auf eine Vertiefung in einer 6-Loch-Kulturplatte bezogen. Als exemplarisches Beispiel wird im folgenden ein solches Transfektionsexperiment beschrieben. Bei Verwendung anderer Kulturgefäße wurden die Volumina entsprechend angeglichen. Je nach Zelltyp wurden die Zellen mit einer geeigneten Zelldichte in 2 ml Proliferationsmedium ausgesät. Nachdem die Zellen etwa 70-80% Konfluenz erreicht hatten, wurde das Kulturmedium kurz vor der Transfektion durch 1 ml frisches, ebenfalls Serum enthaltendes Proliferationsmedium ersetzt. In getrennten Eppendorfgläsern wurde die DNA und das Reagenz DOSPER mit HEPES-gepufferter Salzlösung (HBS) zu einem Endvolumen von 50 µl verdünnt, dann wurden beide Lösungen vorsichtig zusammengemischt und 15 min bei RT inkubiert. Um hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden und eine einheitliche Verteilung sicherzustellen, wurden die DNA/Liposomenkomplexe nach der Inkubation tropfenweise gleichmäßig auf das Kulturgefäß verteilt und dieses vorsichtig geschwenkt. Die Transfektion fand für 24 Std unter Standardbedingungen statt. Anschließend wurde die Transfektionsmischung durch 2-3 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Expressionsbeginn und -dauer wurden je nach eingebrachtem Genprodukt entweder direkt oder indirekt mittels immunzytologischer Färbung mikroskopisch verfolgt und richteten sich nach Zelltyp und eingesetzter Regulationseinheit.

### **Transiente und stabile Transfektionsversuche mit FuGene**

Dieses aus einem Gemisch von Lipiden bestehende Transfektionsreagenz gewährleistet eine hohe Transfektionsrate bei minimaler Zytotoxizität. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie bei der Transfektion mit DOSPER. Für die Aufbereitung des Transfektionsreagenzes wurden in einem Eppendorfgläser 100 µl DMEM ohne Serum vorgelegt, die dem Versuch entsprechende Menge FuGene Reagenz direkt in das Medium gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dabei war darauf zu achten, einen Kontakt des FuGene-Reagenzes mit dem Plastikröhrchen und eine daraus resultierende Adsorption zu vermeiden. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das verdünnte Transfektionsagens tropfenweise in ein zweites Eppendorfgläser mit DNA (0,1-2 µg/µl) gegeben und der Röhrcheninhalt durch saches Antippen gemischt. Dieses Transfektionsreagenz/DNA-Gemisch ließ man 15 min bei RT inkubieren, bevor es tropfenweise gleichmäßig auf den Zellen verteilt wurde. Nach 48 Std Transfektion bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Proliferationsmedium versorgt.

### 2.3.5. Nachweis genetisch modifizierter Zellen

Der Vorteil, mittels GFP einfach und sofort Genexpression in lebenden Zellen zu visualisieren, wurde bei den einzelnen Gentransfer-Methoden dazu genutzt, um erste Optimierungen durchzuführen. Angeregt durch blaues Licht (Filter I3; 450-490 nm, Leitz) wurde die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen mit Hilfe eines inversen Mikroskops festgestellt. Die dafür auf ihren Kulturgefäßen verbliebenen Zellen konnten anschließend weiterkultiviert werden.

Für die immunzytologischen Färbungen hingegen wurden die Zellen zuerst durch 4% (w/v) gekühltes Paraformaldehyd (PFA, in PBS; Merck, Darmstadt) 5 min bei RT fixiert, danach dreimal mit PBS gewaschen und für 45 min mittels 10% NGS/0,1% Triton X100 (beides Sigma) in PBS permeabilisiert. Die anschließende Reaktion mit den folgenden primären Antikörpern fand in 2% NGS/PBS bei 4°C über Nacht statt:  $\alpha$ -GFP (1:1000; Clontech);  $\alpha$ -*c-myc* (1:300; Oncogene Science) und  $\alpha$ -E1A 13S (1:300; Santa Cruz Biotechnology). Nach Inkubation mit dem jeweiligen biotinylierten zweiten Antikörper (1:100, in PBS, 45 min; beide Vector Laboratories) wurden die modifizierten Zellen durch Zugabe von FITC-Avidin (1:500, in PBS; 45 min) detektierbar. Für eine leichtere Beurteilung wurden die Kerne mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Merck) gegengefärbt.

### 2.3.6. Zellbiologische Standardmethoden

Die Gewinnung und Kultivierung von Rattenschwanzzellen entsprach dem Protokoll von Brockes *et al.* (1979). Kulturen von HeLa- und HEK-Zelllinien wurden gemäß der Vorschrift aus Cells: A Laboratory Manual (Spector *et al.*, 1998) gehalten.

## 2.4. Virologie

Alle folgenden Arbeiten mit bioaktiven oder möglicherweise bioaktiven Viren wurden entsprechend des GenTR in einem Sicherheitslabor der Stufe S2 durchgeführt.

### 2.4.1. Produktion von rekombinanten Adeno-assoziierten viralen Stöcken

Wie bei Kaplitt *et al.* (1994) wurden die rekombinanten Virusstöcke aus sogenannten Rohlysaten, die aus dem gesamten, ungereinigten Zellysat bestehen, hergestellt. Dabei wurde nach folgendem Prinzip vorgegangen (Abb. 6).

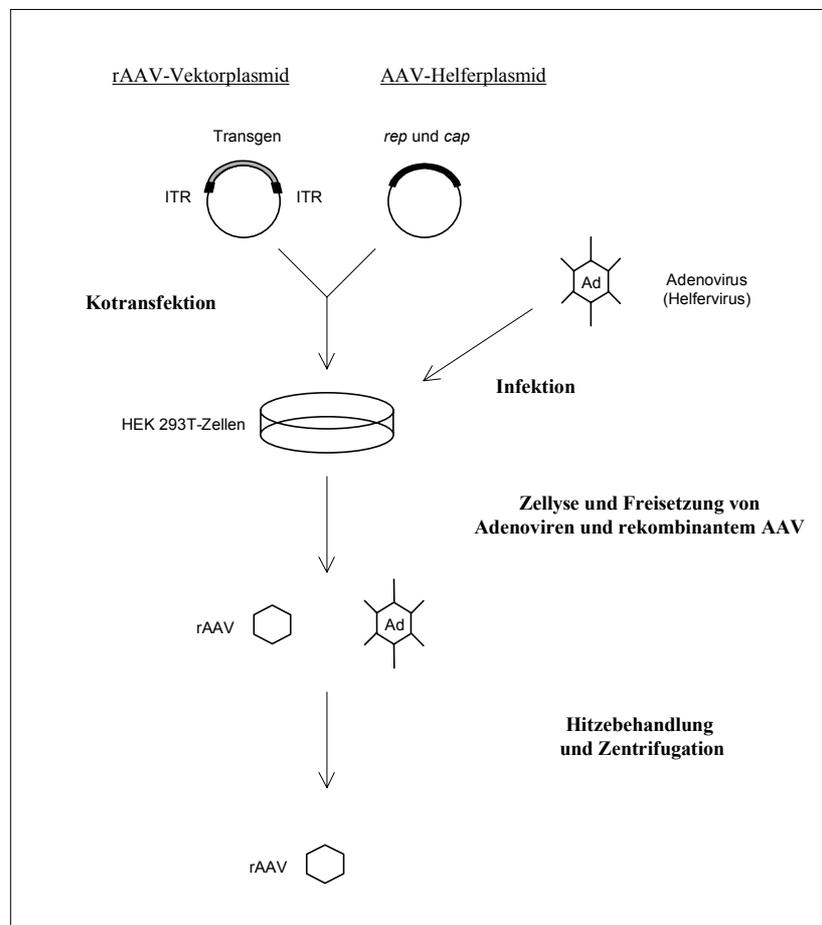


Abb. 6: Dargestellt ist der rAAV Produktionsprozess. HEK-Zellen werden mit zwei unterschiedlichen Plasmiden kotransfiziert. Das eine enthält das Transgen, das von den beiden AAV ITRs flankiert wird, und das zweite trägt - unter der Kontrolle eines heterologen Promotors - die *rep*- und *cap*-Gene des AAVs. Nach Infektion mit dem Adenovirus wird das rekombinante AAV-Genom repliziert und in rAAV-Partikel verpackt. Nach der Zellyse führt man eine Hitzebehandlung durch, um den hitzelabileren Adenovirus zu inaktivieren, und erhält so einen rekombinanten AAV-Stock.

Als Verpackungslinie wurden HEK 293T-Zellen (DuBridg e *et al.*, 1987) mit Vollmedium in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $8,5 \times 10^5$  Zellen auf 100 mm Kulturplatten ausgesät. Diese wurden am nächsten Tag bei 60-70% Konfluenz per CaPO<sub>4</sub>-Kopräzipitationstechnik mit 1 µg rAAV-Vektorplasmid, 3 µg Helferplasmid pIM45 und 6 µg Träger-DNA (Lachssperm DNA, Stratagene) transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Std wurde das Präzipitat durch zweimaliges Waschen mit DMEM ohne Serum entfernt und Vollmedium hinzugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen nach Spülen mit serumfreien Medium mit dem Adenovirus Typ 2 mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 2,5-3 infiziert. Während der 90-minütigen Infektionszeit wurde das Inokulat alle 30 min durch Schwenken neu verteilt. Anschließend wurde wiederum Vollmedium zugegeben. Nach Eintreten des zytopathischen Effekts (CPE) - ca. 48-60 Std nach Infektion - wurden die Zellen geerntet, und nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1000 rpm (Rotana/R, Hettich) das gesammelte Zellpellet von 10 Platten in 1 ml DMEM/1 mM Tris/HCl pH 8.0 (1:2) aufgenommen. Die Zellen wurden durch vier Zyklen Einfrieren/Auftauen (F/T) aufgebrochen, und der Adenovirus durch Erhitzen des Zellysats für 30 min auf 56°C inaktiviert. Durch anschließendes mehrmaliges Zentrifugieren bei 7000xg wurde der Virusstock als klarer Überstand gewonnen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.4.2. Titration der rekombinanten AAV-Stöcke**

Mit Hilfe des Replication Center Assays (RCA) ist es möglich, das infektiöse Potential der Virionen zu bestimmen. Nach Infektion der rAAV-Partikel zusammen mit dem Wildtyp AAV und dem Adenovirus wird das rekombinante Genom repliziert und dessen Vorliegen mittels Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 7 (a)). Gegenüber der Testung auf Transgenexpression bietet diese indirekte Titrationsmethode den Vorteil, trotz verschiedener Promotoren und Transgenkonstrukte die Titer der unterschiedlichen rAAV-Stöcke miteinander vergleichen zu können. Die Expression der Genprodukte kann allerdings erst im Anschluß an die Titration durch immunzytochemische Methoden bewiesen werden.

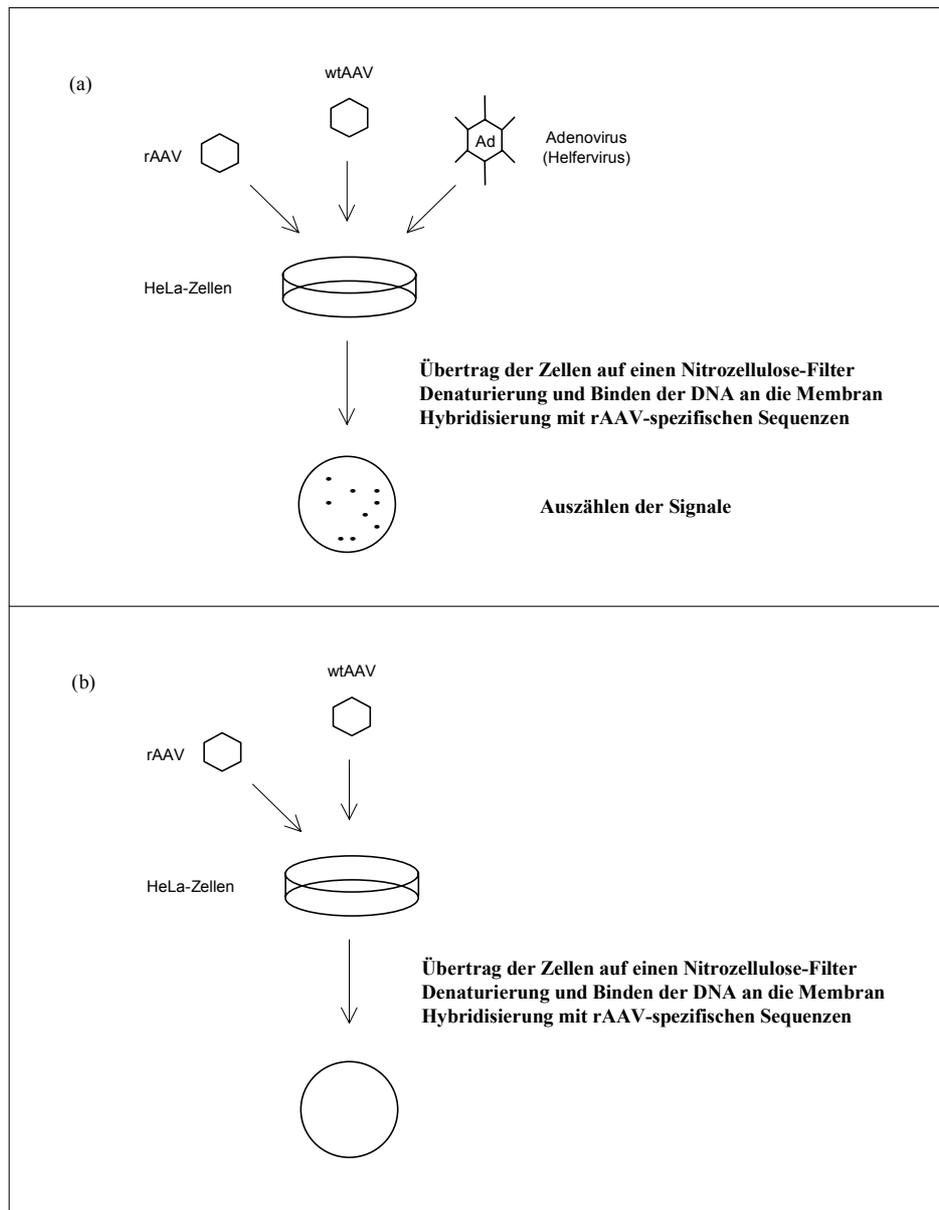


Abb. 7: Schematische Darstellung des Replication Center Assays

(a) HEK-Zellen werden mit den drei essentiellen viralen Komponenten rAAV, wtAAV und Adenovirus infiziert. Nach erfolgter Replikation des rekombinanten AAV-Genoms kann dieses durch Hybridisierung mit Transgenspezifischen Sonden radioaktiv markiert werden. Anschließend wird durch Zählen der auftretenden Signale der Titer des rAAV-Stocks ermittelt.

(b) Als Kontrolle wird für jeden rAAV-Stock eine Bedingung ohne Zugabe des Adenoviruses mitgeführt. Dadurch ist keine Replikation möglich. Werden keine Signale detektiert, kann von einer völligen Inaktivierung des bei der Herstellung des rAAV-Stocks eingesetzten Adenoviruses ausgegangen werden.

Basierend auf der Beschreibung von Yakobson *et al.* (1987) wurde die Titration folgendermaßen durchgeführt:  $1,2 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit Vollmedium auf 60 mm Kulturschalen ausgesät, für 24 Std inkubiert und vor der Infektion einmal mit serumfreien Medium gewaschen. Für die Titerbestimmung wurden zwei Serienverdünnungen des rekombinanten AAV-Stocks hergestellt, mit denen die konfluenten Kulturen in 1 ml DMEM ohne Serum infiziert wurden. Um alle für die Replikation notwendigen Komponenten in ausreichenden Mengen bereitzustellen, wurden das Wildtyp-AAV mit einer MOI von 4 und das Adenovirus mit einer MOI von 20 im Überschuß zugegeben (beide Grundstöcke von Liliane Tenenbaum). Zum Ausschluß einer Kontamination des rekombinanten Stocks durch nicht inaktivierte Adenoviren wurde eine weitere Kulturschale mit dem verdünnten rAAV und dem wtAAV, aber ohne Zusatz des Adenoviruses mitgeführt (Abb. 7 (b)). Nach zwei Std Adsorption wurden die Zellen mit Vollmedium versorgt und nach weiteren 28 Std die kompletten Zellrasen auf Nitrozellulose-Filter der Firma Schleicher & Schüll (Dassel) übertragen. Zur Denaturierung wurden die Membrane mit der Zellseite nach oben jeweils dreimal für 1 min auf Whatman Filterpapier gelegt, welches mit 1.5 M NaCl und 0.5 M NaOH getränkt war. Anschließend wurde durch die gleiche Prozedur mit 1 M Tris/HCl pH 7.0 in 2xSSC neutralisiert. Unter Verwendung eines UV-Stratalinkers (Stratagene) wurde die DNA an der Membranoberfläche fixiert.

Unterdessen wurde für jedes Resistenzgen eine spezifische DNA-Probe kreiert. Für die Hybridisierung der Filter wurden diese Sonden unter Anwendung des Ready-To-Go DNA Labelling Kits (Pharmacia) mit  $^{32}$ Phosphor radioaktiv markiert und anhand des Protokolls von Amersham, Piscataway, NJ bei 68°C an die Membrane gebunden. Nach ÜN-Exposition bei -70°C wurden die Titer teilweise anhand von Röntgenfilmen, teilweise über intensivierende Screens anhand des Bio-Image-Analyzers BAS1500 (Raytest) analysiert, indem die einzelnen autoradiographischen Punkte ausgezählt wurden, und deren Anzahl mit dem korrespondierenden Verdünnungsfaktor multipliziert wurde.

Definitionsgemäß entspricht bei diesem Replication Center Assay ein Signal einer infizierten Zelle, wofür als Maßeinheit *infectious unit* festgelegt ist. Bezogen auf das Volumen wird die Höhe des Titters mit *infectious units/ml* (IU/ml) angegeben.

### 2.4.3. Herstellung eines Adenovirus-Stocks

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, benötigt das AAV als abhängiges Parvovirus für eine produktive Infektion bestimmte Helferfunktionen. Diese können sowohl von Herpesviren als auch von Adenoviren zur Verfügung gestellt werden.

In dieser Arbeit wurde als Helfervirus das Adenovirus Typ 2 eingesetzt, das nach einem Protokoll von Yakobson *et al.* (1987) propagiert wurde.

In einem ersten Schritt wurde ein sogenannter adenoviraler „Ministock“ hergestellt. Für diesen wurden HeLa-Zellen in einer 100 mm Kulturschale ausgesät und bei 70-80% Konfluenz mit 15 µl Adenovirus (Grundstock von Liliane Tenenbaum) in 2 ml serumfreien DMEM infiziert. Nach einer Infektionszeit von 2 Std wurden 8 ml Vollmedium zugegeben. Circa drei Tage später, nach Eintreten des zytopathischen Effekts, wurden die Zellen inklusive des Kulturüberstands geerntet und fünfmal wiederholt eingefroren sowie aufgetaut. Mit jeweils einem Milliliter dieses Zellysats konnten nun 10 Platten auf dieselbe Weise infiziert werden. Wiederum nach drei Tagen wurden die Zellen und das Medium geerntet und mit 2 M Tris/HCl pH 7.5 bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M gepuffert. Diese Zellsuspension wurde ebenfalls einem fünffachen Einfrier-/Auftau-Prozedere unterzogen, um die Zellen aufzuschließen und die Viren freizusetzen. Anschließend erfolgte für die Aufreinigung der Adenoviren eine Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation. Dafür wurden 6g Cäsiumchlorid (CsCl) mit jeweils 10 ml Stock unter Erhitzen auf 37°C vermischt und mit einem Beckman SW41-Rotor bei 30 000 rpm und 18°C während 48 Std zentrifugiert. Die im oberen Drittel auftretende Bande wurde gesammelt, mit gleichen Teilen Glycerin versetzt und aliquotiert bei -20°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen ist eine Lagerung des Adenovirus-Stocks ohne Stabilitätsverlust bis zu einem Jahr möglich.

### 2.4.4. Titration des Adenovirus-Stocks

Diese dafür entwickelte Nachweismethode beruht auf dem Prinzip, virale Genprodukte nach Infektion mittels Immunfärbung detektieren zu können. Nach einer Auswertung kann daraufhin eine Aussage über die Infektionseffizienz getroffen werden.

Zu diesem Zwecke wurden HeLa-Zellen auf LabTek<sup>TM</sup> 8-Loch-Kulturobjektträger (aus Permanox, Nunc) ausgesät und bei 80% Konfluenz 2 Std lang mit Serienverdünnungen des neu gewonnenen Adenovirus-Helferstocks infiziert. Nach 28 Std wurde die Inkubationszeit beendet, indem die Zellrasen mit gekühltem 4% (w/v) Paraformaldehyd 5 min bei RT fixiert wurden.

Nach Permeabilisierung mit 10% NGS/0,1% Triton X100 während 2 Std erfolgte der Nachweis der Infektion mit einer 1:300-Verdünnung eines polyklonalen Antikörpers gegen das frühe adenovirale Protein E1A (in 2% NGS/PBS; Santa Cruz Biotechnology). Neben einem infizierten Areal ohne Zugabe des spezifischen Antikörpers wurden als Kontrollen sowohl eine Verdünnung des Ad-Grundstocks als auch eine Kammer ohne Infektion mitgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einem biotinylierten anti-rabbit IgG (1:100 in PBS, 45 min; Vector Laboratories) und nachfolgendem FITC-Avidin (1:500 in PBS; Vector Laboratories) markiert. Zur Darstellung der Gesamtzellzahl wurden die Kerne mit dem Fluorochrom DAPI für 2 min gegengefärbt und mit Vectashield Mounting Medium von Vektor Laboratories eingedeckt. Nach Beurteilung der Kontrollen wurden bei zwei geeigneten viralen Verdünnungen die E1A-positiven Ereignisse pro 100 Zellen ermittelt, und unter Einbezug der eingesetzten Volumina an Adenovirus konnte der Titer des Ad-Helferstocks in IU/ml angegeben werden.

#### **2.4.5. Gentransfer mittels Infektion**

Zur Übertragung von Fremd-DNA wurde neben der Transfektion von rAAV-Plasmiden auch die Infektion mit rekombinanten adeno-assoziierten Viren durchgeführt. Neben dem generellen Beweis, daß humane Schwannzellen durch rAAV-Vehikel infiziert werden können, wurde in einer Reihe von Versuchen untersucht, welchen Einfluß die Parameter Vorbehandlung der AAV-Stöcke, *multiplicity of infection* (MOI), Infektionsdauer und Serumgehalt im Medium auf einen erfolgreichen Infektionsprozeß haben. Genaue Details zu nachfolgendem Infektionsablauf werden in den diversen Versuchsanordnungen im Kapitel Ergebnisse genannt.

Am Vortag der Infektion wurden hSC mit einer Zelldichte von 30 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 8-Loch-Kulturobjektträger in Proliferationsmedium ausgesät. Um die aus Gesamtzelllysaten hergestellten rAAV-Stöcke von kontaminierenden Zelldebris zu befreien, wurden diese üblicherweise bei 7000xg für 10 min abzentrifugiert. Mit den so erhaltenen klaren Überständen wurden die ca. 70-80% konfluenten Zellpopulationen infiziert. Dabei variierten sowohl die MOIs (2-100) als auch der Serumgehalt im Infektionsmedium (0,5% und 15%). Je nach Infektionszeit (12 Std oder 22 Std) wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und erneut in Proliferationsmedium kultiviert. Beginn und Beobachtungszeitraum der Proteinexpression sowie deren Detektion wurden auf das jeweilige Infektionssystem abgestimmt.

#### **2.4.6. Test auf adenovirale Kontamination**

Zwar waren die Stöcke bei der Titerbestimmung bereits auf eine mögliche Ad-Kontamination hin überprüft worden. Doch mußte dort das Ereignis eintreffen, daß eine Zelle gleichzeitig von einem rekombinanten AAV-Partikel, einem wt AAV sowie einem kontaminierenden Adenovirus infiziert wurde. Da es aber für die Kultivierung von permanenten Zelllinien unerläßlich ist, daß sie - um einer Lyse vorzubeugen - absolut von Adenoviren frei sind, war besonders in den durch rAAV-E1A 12S infizierten humanen SC die Herkunft des E1A-Proteins wichtig. Für diese Untersuchung wurde deshalb zum einen die bereits in Kap. 2.3.5. aufgeführte Immunfärbung mit dem E1A-Antikörper (Transgen-Nachweis) angewandt, zum anderen wurde ein mit FITC direkt markierter Antikörper gegen das adenovirale Hexon-Hüllprotein (Adenovirus-Nachweis) eingesetzt.

Für die letztgenannte Färbung wurden die hSC entweder mit dem rAAV-E1A 12S-Stock oder mit dem Adenovirus (Kontrollbedingung) infiziert. Danach wurde der Zellrasen für 10 min mit 100% eiskaltem Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 1:25-Verdünnung des Antikörpers gefärbt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Herstellung der AAV-Tet-Vektorsysteme

#### 3.1.1. Konstruktion der Transaktivator- und Zielvektoren

Am Anfang der vorliegenden Arbeit stand die teilweise sehr umfangreiche Klonierung der verschiedenen Vektoren. Dazu gehörten sowohl die Regulatorplasmide mit den drei Transaktivatoren als auch die Konstrukte mit den Onkogenen sowie dem Chromophor EGFP. Ausgehend von dem Vektor pTR<sub>BS</sub>-UF, der freundlicherweise von S. Zolotukhin zur Verfügung gestellt wurde, sollten die einzelnen Gene in einen für die rAAV-Produktion notwendigen Rahmen integriert werden. Dafür sind allein die AAV *inverted terminal repeats* (ITR) ausreichend. Zudem wurden alle Transaktivator-Konstrukte mit einem Neomycin-Resistenzgen ausgestattet, wohingegen in den Zielplasmiden das *hph*-Gen gegen Hygromycin (Gritz und Davies, 1983) als Selektionsmarker diente. Insgesamt mußte bei der Klonierung die spätere Verpackungsgröße der rekombinanten Virionen berücksichtigt werden. Dabei galt: Je mehr die Größe des Konstrukts der des Wildtyp AAV-Genoms mit 4680 bp entsprach, umso effizienter und ohne Sequenzverluste würde das Konstrukt in das Virion verpackt werden (Muzyczka, 1992).

#### Klonierung der verschiedenen Tet-Transaktivator-Konstrukte

Da sich die drei Tet-Expressionssysteme (Kap. 1.2.) hinsichtlich bestimmter Charakteristika unterscheiden, wurde für jedes System ein entsprechendes Regulatorplasmid konstruiert. Sinn dieses parallelen Vorgehens war es, für die spätere Anwendung in humanen Schwanzzellen die am besten geeignetste Methode auswählen zu können. Insbesondere die richtige Dosierung zwischen Stimulation und Desaktivierung sollte ausgetestet werden.

Während für die Tet-Off-Version das Tc-kontrollierte Transkriptionsaktivator-Gen (tTA) aus dem Originalplasmid pUHD15-1 von H. Bujard (Gossen und Bujard, 1992) verwendet wurde, wurden die beiden anderen Ausgangsplasmide von den Firmen Clontech (pTet-On) bzw. Gibco BRL (pTet-tTAk) bezogen.

*Erläuterung zu den nachfolgenden graphischen Darstellungen:*

Allen Vektoren sind Sequenzen unterlegt. Die zu deren Erstellung verwendeten Angaben stammen entweder aus der durchgeführten Sequenzanalyse oder wurden der Literatur entnommen. Für eine bessere Übersicht wurden die zum Erhalt eines gewünschten Fragments bzw. zum Öffnen des Vektors verwendeten Schnittstellen in den Abbildungen durch Fettdruck (Bsp. **Bcl I**) hervorgehoben. Restriktionsschnittstellen, die durch Einsetzen einer Linker-Sequenz unbrauchbar wurden und damit wegfielen, wurden durchgestrichen (Bsp. ~~EcoRI~~).

### Konstruktion des AAV-Tet-Off-Transaktivator-Plasmids

Der Basisvektor pTR<sub>BS</sub>-UF (Zolotukhin *et al.*, 1996) enthielt neben den AAV ITRs bereits eine Neo<sup>R</sup>-Selektionseinheit (Abb. 8). Um die Tet-Off-Regulatorsequenz in die von den ITRs flankierte Vektorregion zu klonieren, sollte die *gfp10*-Sequenz samt ihres zugehörigen Promotors lediglich durch den Tet-Off-Regulator ersetzt werden. Zu diesem Zweck wurde der Basisvektor mit *Xho* I geschnitten und dann einem *Bgl* II-Partialverdau (Kap. 2.2.2.) unterzogen. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das *Xho* I-*Bgl* II-Zielfragment aufgrund seiner berechneten Größe eluiert.

Um bei der Integration die Transkriptionsrichtung des tTA-Gens bestimmen zu können, wurde die *Hind* III-Schnittstelle des pUHD15-1 mittels Linker-Ligation (Kap. 2.2.2.) durch *Bgl* II ersetzt und anschließend ein *Xho* I-*Bgl* II-Fragment ausgeschnitten. Letzteres enthielt den konstitutiven IE CMV-Promotor (p<sub>CMV</sub>), das Tet-Off-Regulatorgen (tTA) sowie ein SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA).

Durch Ligation der beiden *Xho* I-*Bgl* II-Fragmente entstand schließlich das Plasmid pATet-Off, in dem das Selektionsgen und das Gen des Tet-Off-Transaktivators zwischen den AAV ITRs eingebunden waren.

### Konstruktion des AAV-Tet-On-Transaktivator-Plasmids

Die reverse Wirkung des Tet-On-Systems (Gossen *et al.*, 1995) begründet sich durch den Austausch von vier Aminosäuren im Wildtyp Tet-Repressor (TetR). Dadurch invertiert dieser in den reversen TetR (rtTA) und somit auch das ursprüngliche tTA, eine Fusion zwischen TetR und der VP16-Aktivierungsdomäne des HSV, in das reverse tTA (rtTA).

Da die Tet-Ausgangsvektoren ähnlich aufgebaut waren, wurde für den Tet-On-Transaktivator (Abb. 9) dieselbe Klonierungstaktik wie für den Tet-Off-Regulator angewandt. Allerdings war durch eine der Substitutionen am TetR eine zusätzliche *Hind* III-Schnittstelle in die kodierende Sequenz des rtTA eingeführt worden. Diese machte im ersten Schritt einen *Hind* III-Partialverdau mit anschließender Fragmentisolierung erforderlich. Nach erfolgter *Bgl* II-Linkerligation wurden die gesuchten Klone dann mit Hilfe einer *Xho* I-*Bgl* II-Restriktion identifiziert. Schließlich konnte durch einen Verdau mit den gleichen Endonukleasen ein Fragment erhalten werden, welches neben dem reversen tTA ebenfalls über den konstitutiven CMV-Promotor sowie eine SV40 polyA-Erkennungssequenz verfügte.

Diese Tet-On-Transkriptionseinheit wurde in den wie für das Tet-Off-System vorbereiteten pTR<sub>BS</sub>-UF fusioniert, woraus der Vektor pATet-On resultierte.

## Konstruktion des AAV-Tet-Off-Transaktivator-Plasmids

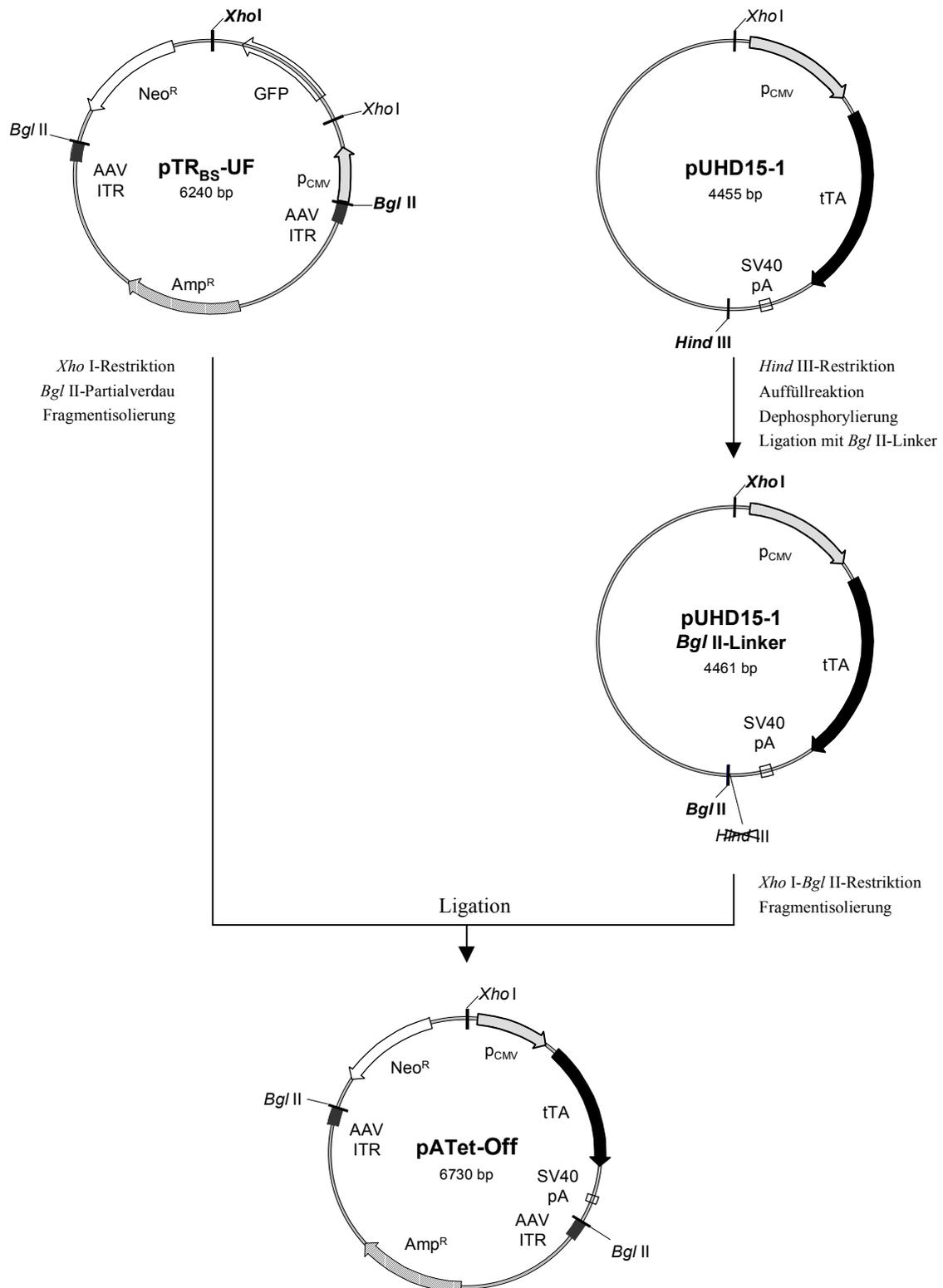


Abb. 8: Schematische Darstellung der Integration des Tet-Off-Transaktivators in den Basisvektor

## Konstruktion des AAV-Tet-On-Transaktivator-Plasmids

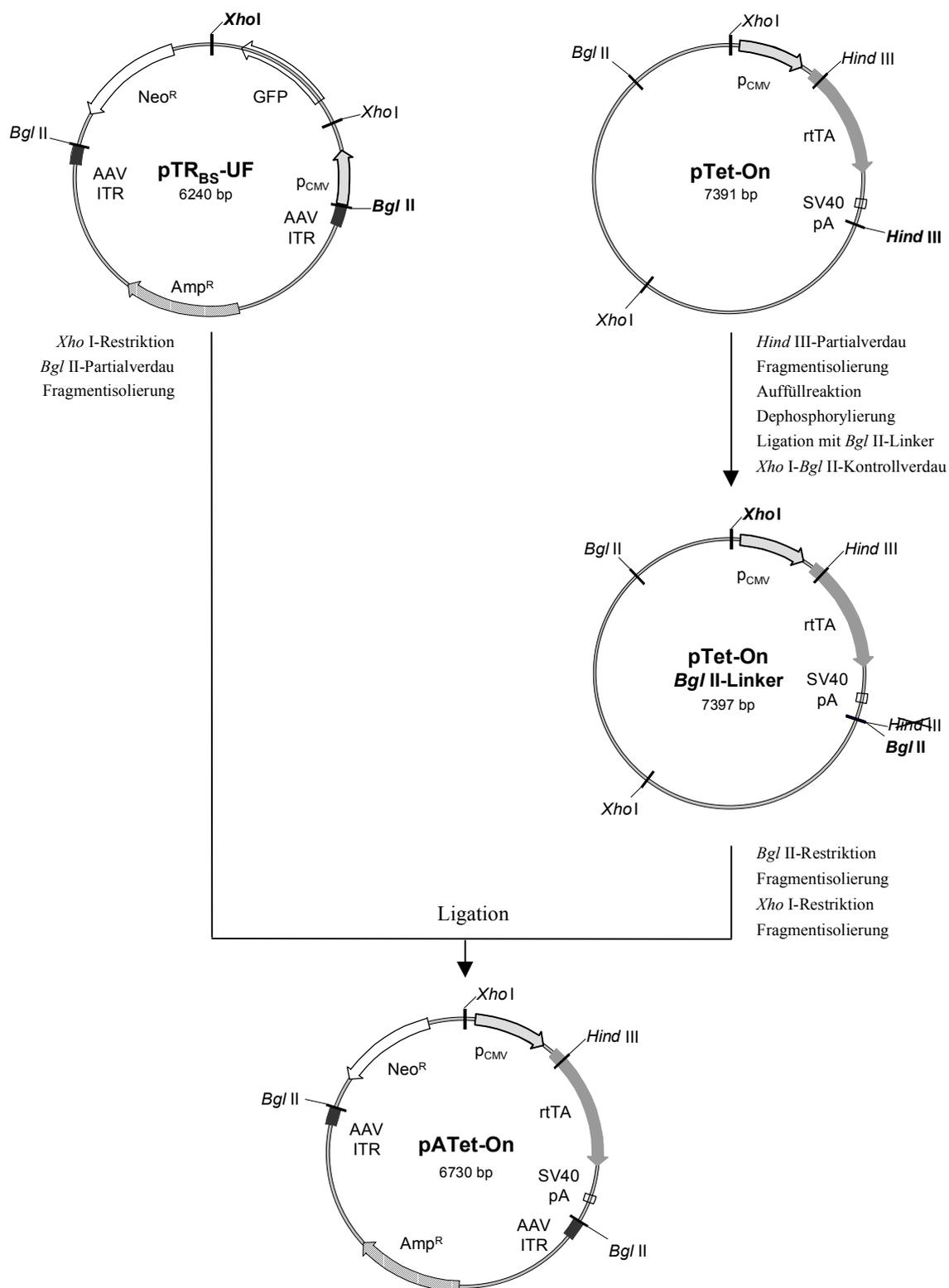


Abb. 9: Schematische Darstellung der Integration des Tet-On-Transaktivators in den Basisvektor

### Konstruktion des AAV-autoTet-Off-Transaktivator-Plasmids

Auch hier folgte die Klonierung demselben Schema, wie der Abb. 10 zu entnehmen ist. Als erstes wurde in das Plasmid pTet-tTAK (Shockett *et al.*, 1995) über die *Not* I-Schnittstelle ein *Bgl* II-Linker eingefügt. Anschließend konnte mittels Doppelverdau wiederum ein *Xho* I-*Bgl* II-Fragment erhalten werden. In diesem Fragment befand sich nun vor dem Tet-Off-Gen der Tet-abhängige Promotor  $p_{hCMV*1}$  (Gossen und Bujard, 1992), auf dessen Aufbau bei der Konstruktion der Zielplasmide nochmals näher eingegangen wird. Zusätzlich enthielt das Fragment neben dem SV40 polyA-Signal ein SV40 Intron, welches zur Stabilität des Transkripts beitragen sollte.

Dieses Fragment wurde in den wie in den beiden vorhergehenden Klonierungen geöffneten Vektor pTR<sub>BS</sub>-UF inseriert und ergab den Vektor pAautoTet-Off.

## Konstruktion des AAV-autoTet-Off-Transaktivator-Plasmids

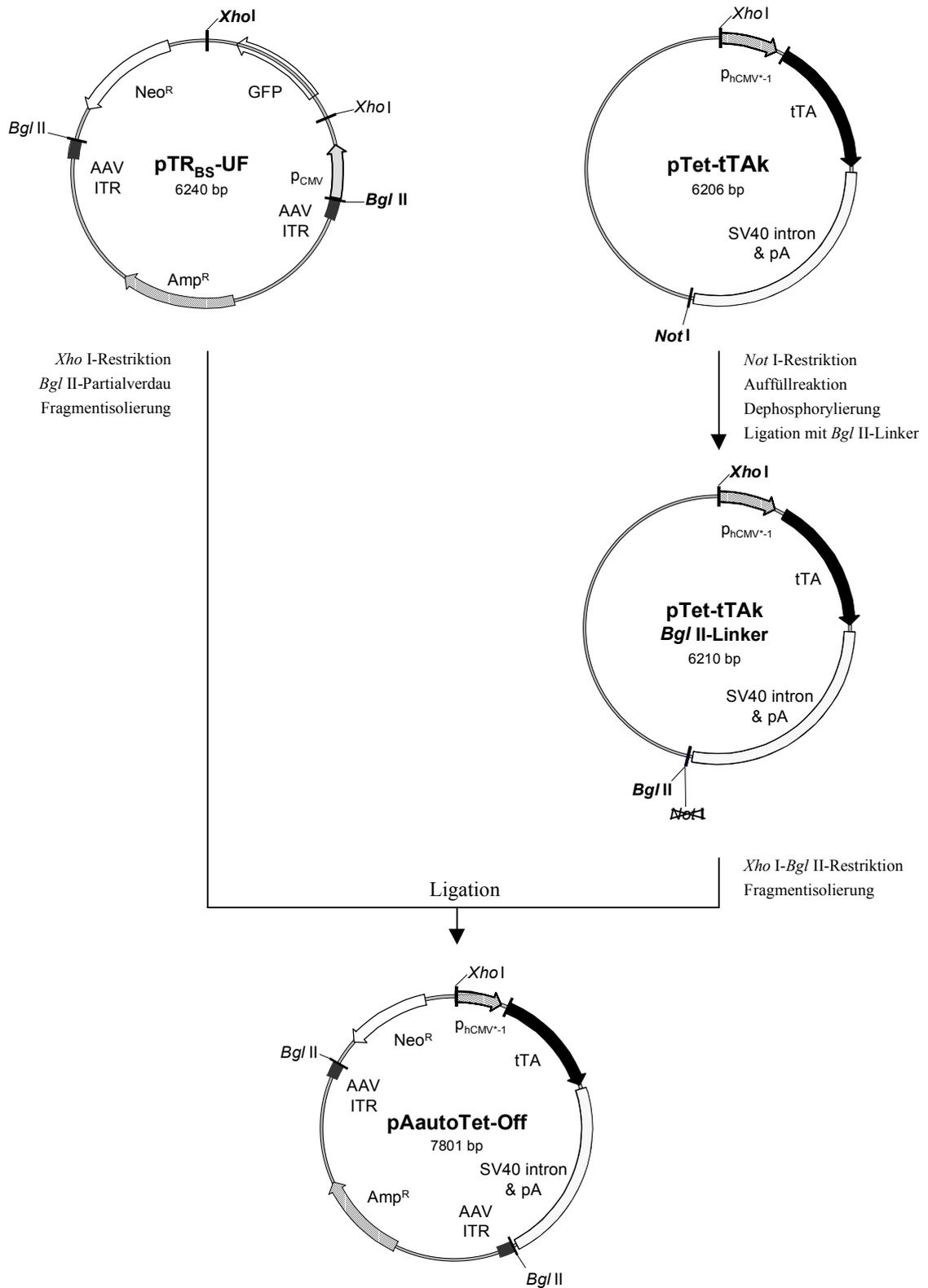


Abb. 10: Schematische Darstellung der Integration des autoTet-Off-Transaktivators in den Basisvektor

### Klonierung der verschiedenen Zielkonstrukte

Für die Installation eines Tet-Systems ist neben dem Regulatorplasmid eine zweite Komponente, das Antwort- oder Zielplasmid, erforderlich. Von diesem wird das individuelle Zielgen unter der Kontrolle des Tet-abhängigen  $p_{hCMV^{*-1}}$ -Promotors (Gossen und Bujard, 1992) exprimiert. Dieser induzierbare Hybridpromotor besteht zum einen aus dem *tet responsive element* (TRE), welches sieben Kopien der 42 bp langen tetO-Sequenz umfaßt, zum anderen aus dem davon stromabwärts gelegenen CMV Minimalpromotor, dem der starke Enhancer fehlt. Dieser Promotor sollte infolgedessen ohne Bindung der Tet-Komponente keine bzw. nur eine marginale Expression zeigen.

Wie verschiedene Arbeiten (Evan *et al.*, 1992; Morgenbesser und DePinho, 1994; Mymryk *et al.*, 1994) zeigen, kann die immortalisierende Wirkung von Onkogenen unterschiedlich ausfallen. Aus diesem Grund wurden mit dem humanen *c-myc* und dem E1A 12S aus dem Adenovirus zwei verschiedene Onkogene als Zielgene ausgewählt. Die beiden Onkogene wurden freundlicherweise in Form der beiden Plasmide pSP $_{myc}$  (Hann *et al.*, 1988) und pCMV $_{12S}$  (Kraus *et al.*, 1992) von Dr. B. Lüscher zur Verfügung gestellt. Zur Vorbereitung der Klonierung in das Zielplasmid wurden die kodierenden Regionen der Onkogene zunächst in einem Zwischenschritt in den BlueskriptII-Vektor KS+ von Stratagene ligiert und von beiden Seiten sequenziert.

Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit das Chromophor EGFP (Clontech, Cormack *et al.*, 1996) als Zielgen unter die Kontrolle des Tet-abhängigen Promotors gestellt. Diese Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP; Chalfie *et al.*, 1994) aus *Aequorea victoria* wurde für die Verwendung in Säugerzellen optimiert und sollte für das Einstellen der Tet-Systeme benutzt werden.

Aufgabe der nachfolgenden Klonierungen war es nun, jede dieser verschiedenen Transkriptionseinheiten zusammen mit dem Hygromycin-Resistenzgen zwischen den AAV ITRs zu plazieren.

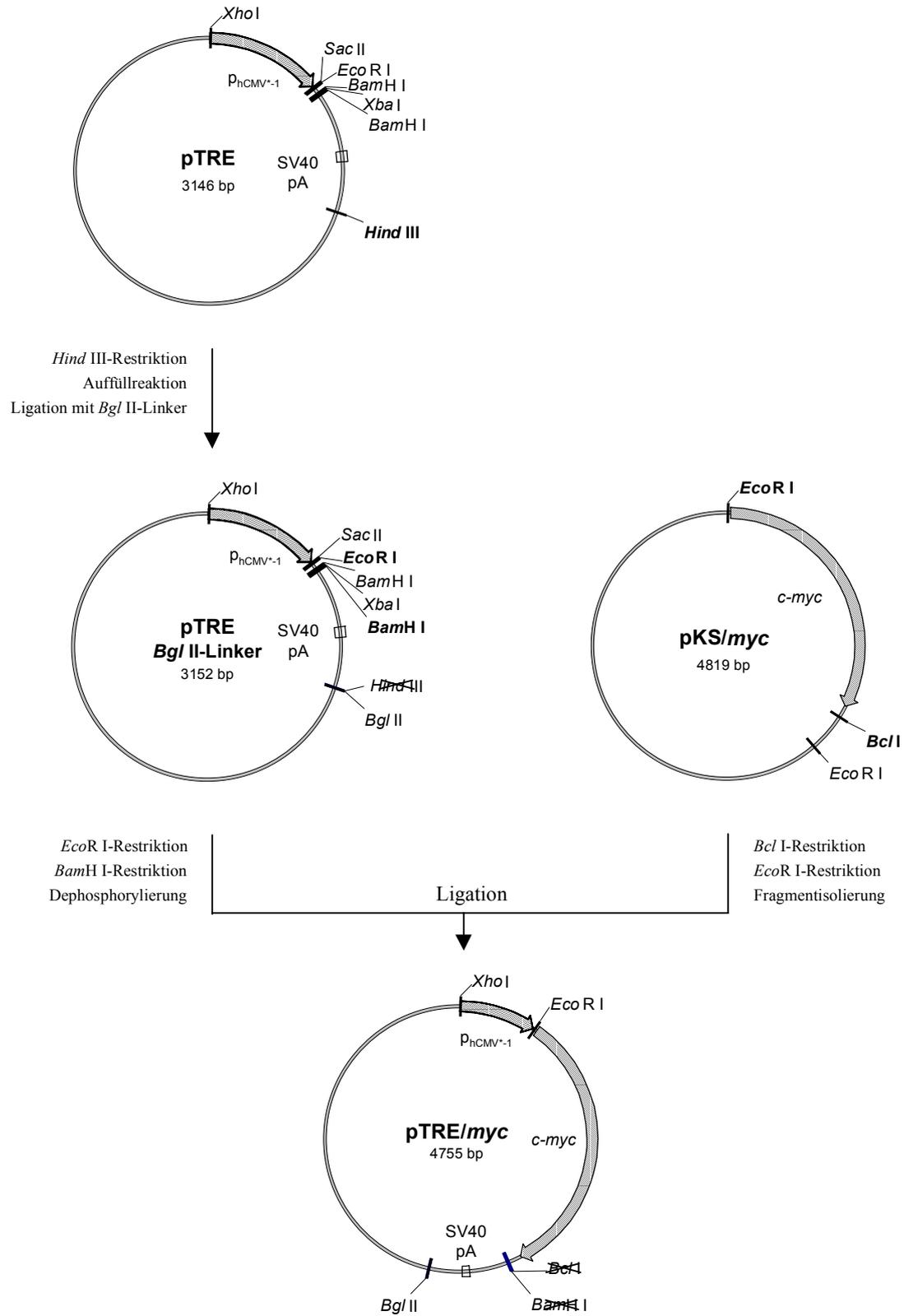
### Konstruktion des AAV-*rmyc*-Zielpasmids

Als Ausgangsvektor für den Tet-abhängigen Promotor ( $p_{hCMV^{*-1}}$ ) diente das pTRE-Plasmid (Resnitzky *et al.*, 1994) von Clontech (Abb. 11 (I)). Für die später beabsichtigte Transkriptionsrichtung wurde dieses Plasmid als erstes über die *Hind* III-Schnittstelle mit einem *Bgl* II-Linker versehen (pTRE/*Bgl* II-Linker). Anschließend wurde das *c-myc*-Gen stromabwärts dieses induzierbaren Promotors eingefügt. Für die gerichtete Integration wurde einerseits die *Eco*R I-Schnittstelle verwendet, andererseits die Kompatibilität von *Bam*H I und *Bcl* I genutzt. Letztgenannte Restriktionsschnittstelle lag 74 Nukleotide hinter dem Stopcodon der *c-myc*-kodierenden Region. Sie wurde auch deshalb gewählt, da bei Verwendung der zweiten *Eco*R I-Schnittstelle im pKS/*myc* die maximal erlaubte Verpackungsgröße des AAVs überschritten worden wäre. Allerdings galt es bei der Restriktion mit *Bcl* I folgendes zu beachten: Diese Endonuklease kann nur Plasmid-DNA erkennen und damit schneiden, die aus einem Methylierungs-defizienten Bakterienstamm wie z.B. dem *E. coli* JM110 gewonnen wurde.

Der daraus entstandene Vektor pTRE/*myc* wurde im weiteren Verlauf (Abb. 11 (II)) mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Bgl* II behandelt und diente als Lieferant für die regulierte *c-myc*-Transkriptionseinheit.

Als zweiter Selektionsmarker stand die Hygromycin B Phosphotransferase (Hygro<sup>R</sup>), kodiert auf dem Ursprungsplasmid pY3 (Blochliger und Diggelmann, 1984), zur Verfügung. Dieses Resistenzgen war vorab inklusive der benötigten Transkriptionselemente in den BlueskriptII-Vektor KS+ integriert (pSHY) und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen worden. Auch hier wurde am 3'-Ende anstelle der *Bam*H I-Schnittstelle über eine Linker-Ligation eine *Bgl* II-Schnittstelle generiert (pSHY/*Bgl* II-Linker).

Anschließend wurde eine sequentielle Ligation (Kap. 2.2.2.) durchgeführt: Das durch *Xho* I-*Bgl* II-Restriktion erhaltene Hygro<sup>R</sup>-Fragment wurde in einer Vorligation mit dem regulierten *c-myc*-Gen zirkularisiert. Da aufgrund der fehlenden Replikations- und Selektionseigenschaften beider Teilstücke eine Transformation jedoch ausgeschlossen war, wurde der Ansatz anschließend mit *Bgl* II linearisiert und die unterschiedlichen Ligationsprodukte per Elektrophorese aufgetrennt. Das gewünschte heterogene Fragment Hygro<sup>R</sup>-*c-myc* wurde anhand seiner berechneten Größe identifiziert und isoliert. Gleichzeitig wurde aus dem Basisvektor pTR<sub>BS</sub>-UF durch einen Doppelverdau ein *Bgl* II-Fragment gewonnen, welches sowohl die AAV *inverted terminal repeats* als auch den Vektoranteil aufwies. Der Doppelverdau verhinderte dabei das Auftreten von zwei gleich großen DNA-Fragmenten. Durch Ligation dieser beiden *Bgl* II-Fragmente und nachfolgender Transformation wurde so das AAV-*rmyc*-Zielploid (pArmyc) gewonnen.

Konstruktion des AAV-*myc*-Zielpasmids (I)

Konstruktion des AAV-*myc*-Zielplasmids (II)

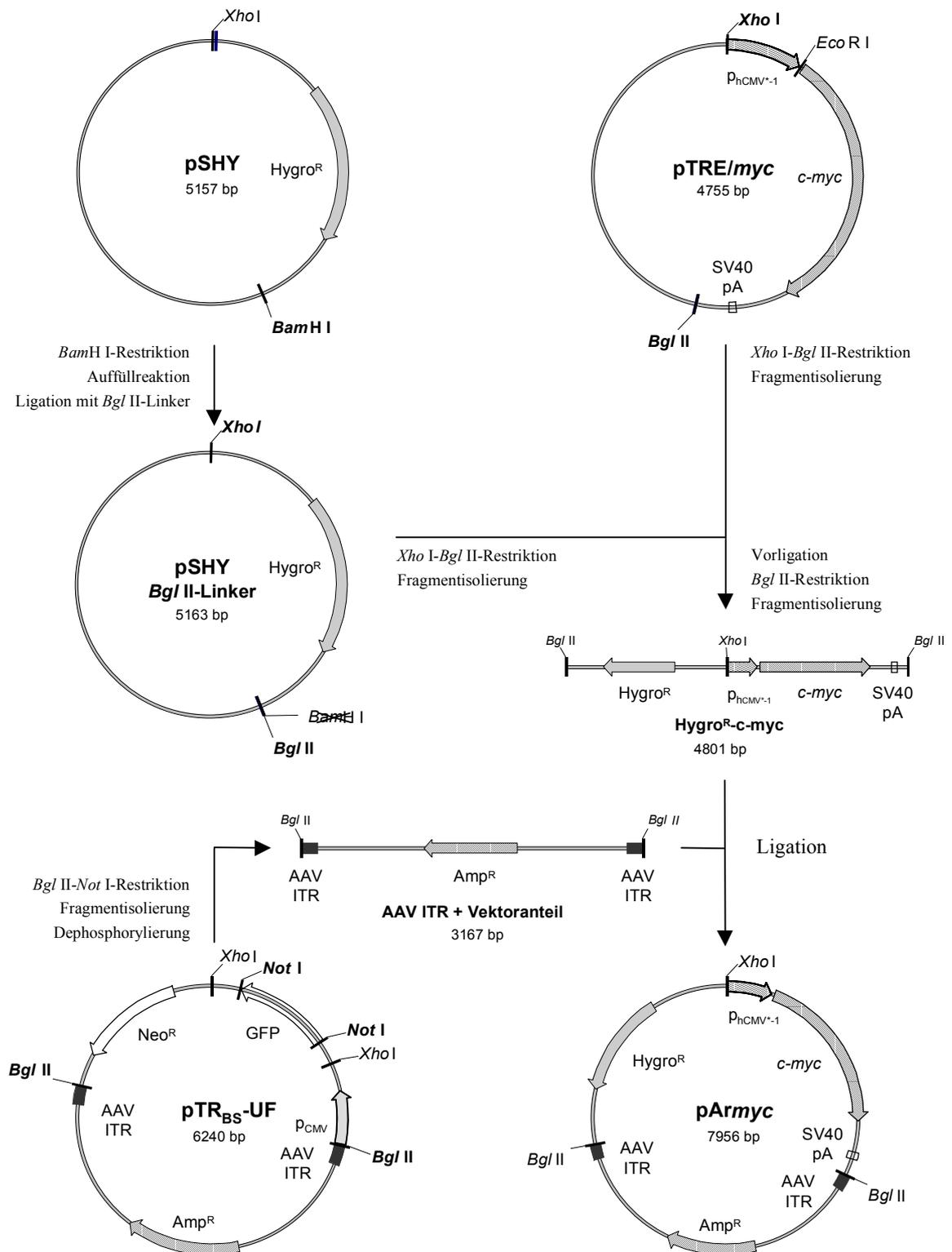


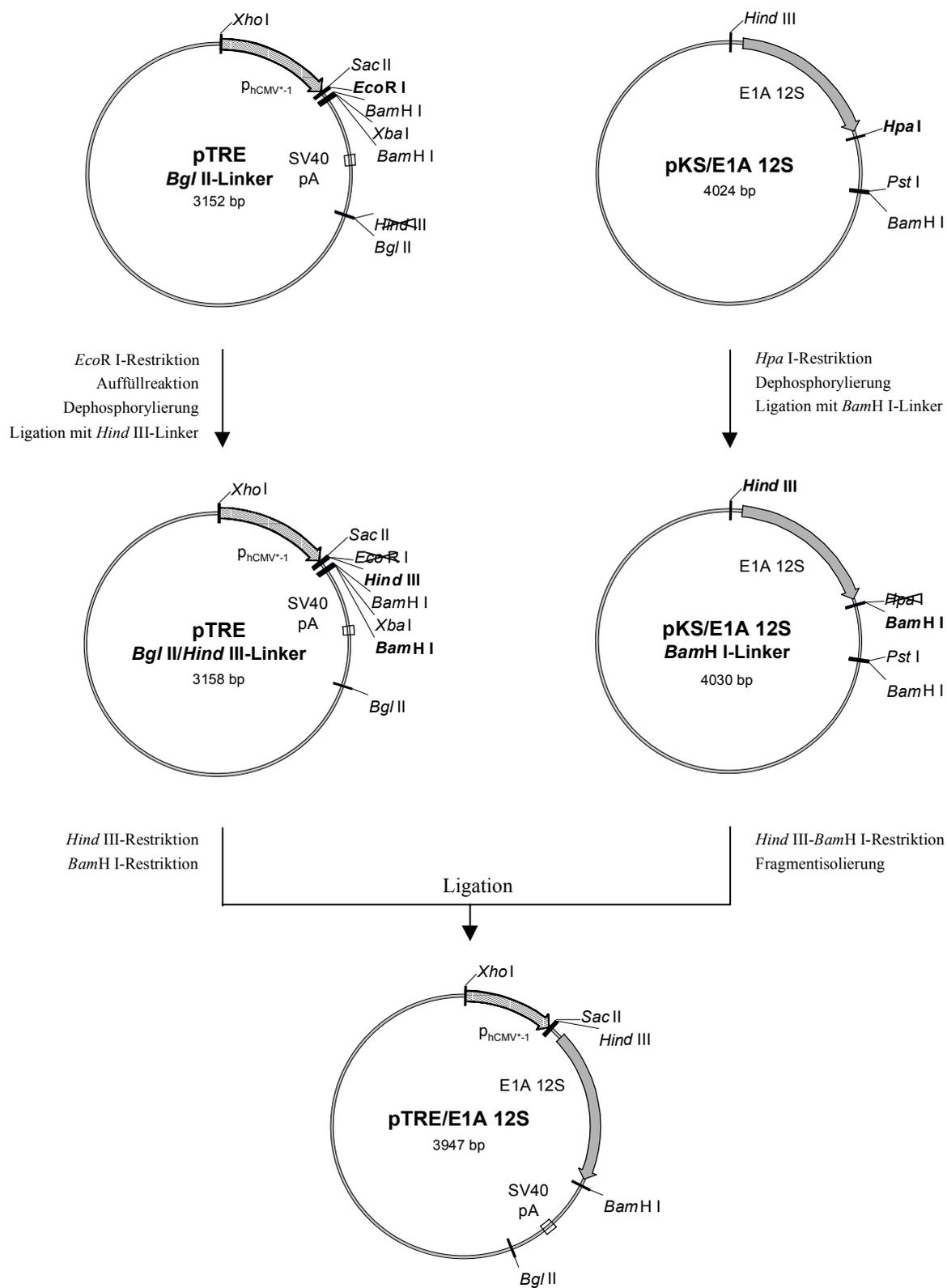
Abb. 11: Schematische Darstellung der Klonierung des AAV-Zielplasmids mit reguliertem *c-myc*

### Konstruktion des AAV-rE1A 12S-Zielplasmids

Aufbauend auf dem pTRE/*Bgl* II-Linker-Plasmid (Abb. 11 (I)), welches keine *Hind* III-Schnittstelle mehr aufwies, konnte diesem Vektor an geeigneter Stelle eine neue *Hind* III-Erkennungssequenz hinzugefügt werden. Das daraus resultierende Konstrukt wurde als pTRE/*Bgl* II/*Hind* III-Linker bezeichnet (Abb. 12 (I)).

Um ausschließlich die kodierende Region des E1A 12S-Gens aus dem Sequenzierungsvektor pKS/E1A 12S ausschneiden zu können, wurde dessen *Hpa* I-Schnittstelle am 3'-Ende in eine *Bam*H I-Restriktionsstelle umgewandelt. Mit diesem Schritt sollte nicht nur das dem Onkogen eigene Polyadenylierungssignal abgetrennt, sondern auch ein möglicher Enhancer-Einfluß von weiteren Sequenzabschnitten vermieden werden. Das 825 bp lange *Hind* III-*Bam*H I-Segment des E1A 12S-Onkogens wurde anschließend in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen vorbereiteten pTRE/*Bgl* II/*Hind* III-Linker-Vektor integriert. Der neu entstandene Vektor pTRE/E1A 12S enthielt somit die regulierbare E1A 12S-Transkriptionseinheit mit dem induzierbaren Promotor, dem adenovirale Onkogen sowie einem SV40 Polyadenylierungssignal. Das abschließende Zusammensetzen der drei einzelnen Komponenten (Onkogen-, Hygro<sup>R</sup>- und AAV-Kassette) erfolgte wiederum über eine sequentielle Ligation (Abb. 12 (II)). Dafür wurde das Onkogen-Element über die Restriktionsenzyme *Xho* I und *Bgl* II ausgeschnitten und mit dem ebenso gewonnenen Hygro<sup>R</sup>-Konstrukt in einer Vorligation verbunden. Der anschließende *Bgl* II-Verdau lieferte dann das linearisierte Fragment Hygro<sup>R</sup>-E1A 12S. Im letzten Schritt wurde diese Fusion aus Selektionsmarker und Onkogen in den bereits beschriebenen, mit *Bgl* II linearisierten AAV-Ausgangsvektor ligiert. Die korrekte Klonierung des pArE1A 12S-Konstrukts wurde anschließend durch Restriktionsanalyse verifiziert.

## Konstruktion des AAV-rE1A 12S-Zielplasmids (I)



## Konstruktion des AAV-rE1A 12S-Zielplasmids (II)

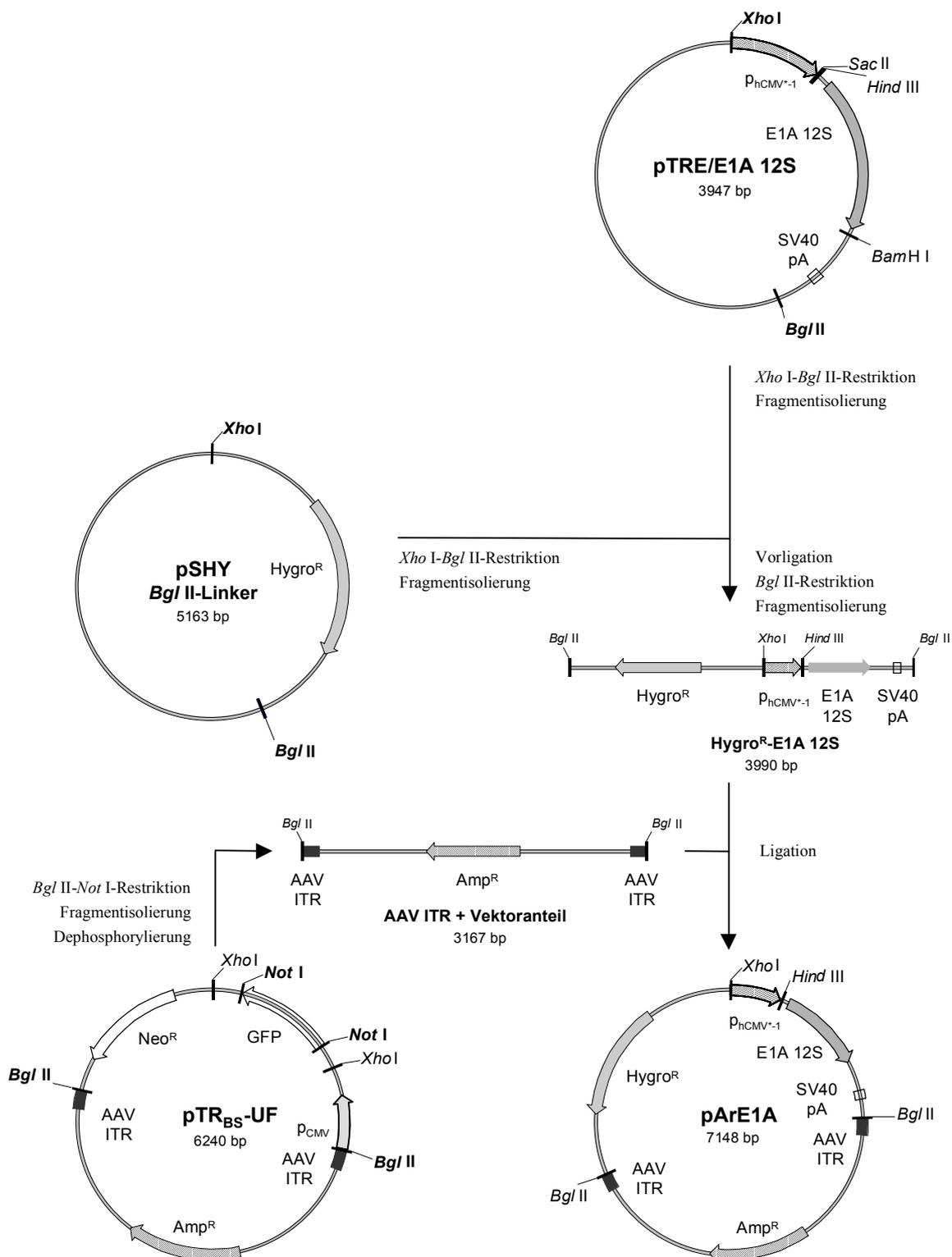


Abb. 12: Schematische Darstellung der Klonierung des AAV-Zielplasmids mit reguliertem E1A 12S

### Konstruktion des AAV-rEGFP-Reporterplasmids

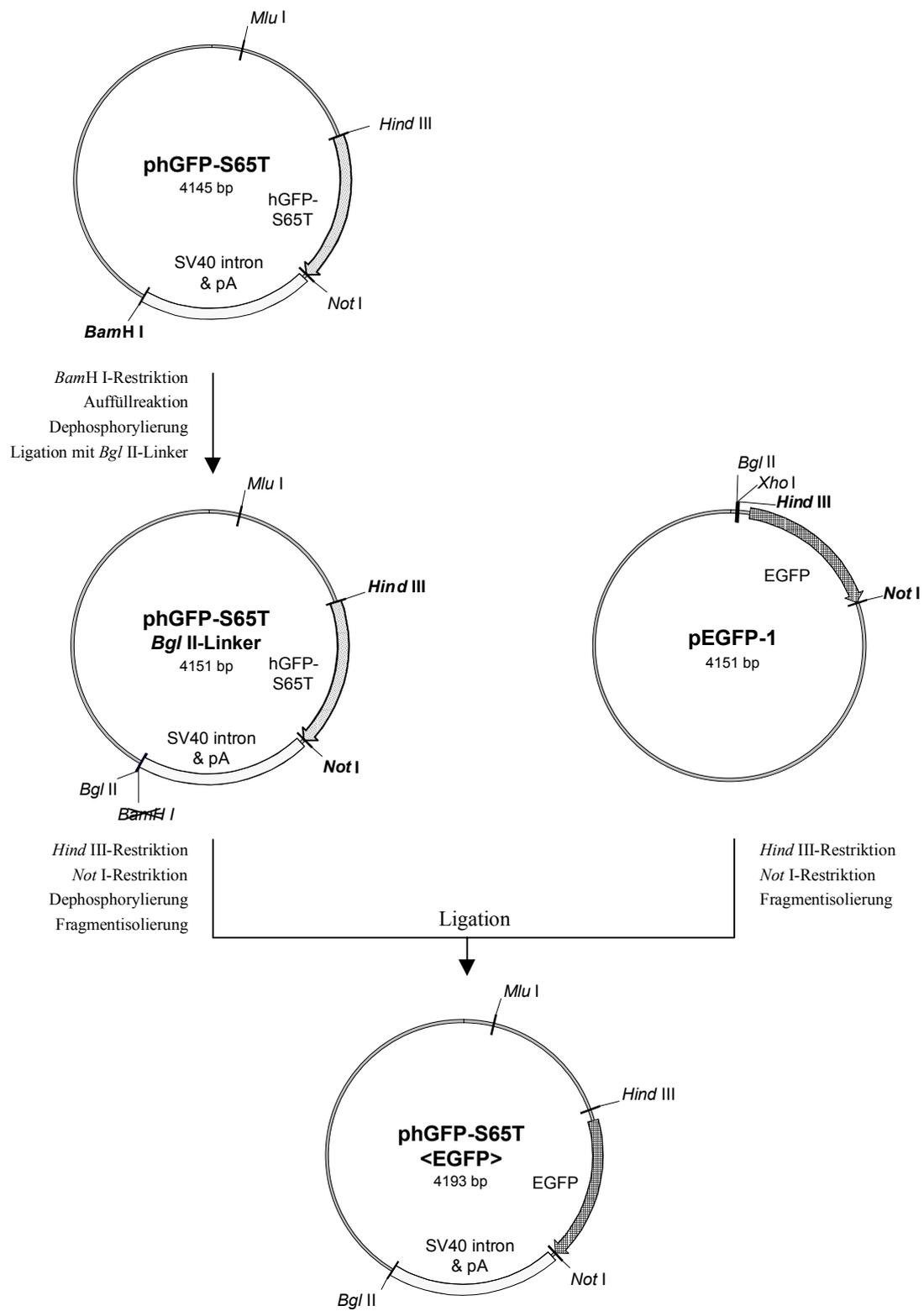
Auch bei dieser Klonierung (Abb. 13 (I)) wurde, um eine spätere Ligation gerichtet durchführen zu können, das Ausgangsplasmid phGFP-S65T (Clontech, Heim *et al.*, 1995) an geeigneter Stelle mit einem *Bgl* II-Linker versehen. Im nächsten Schritt wurde das vorliegende GFP-Gen gegen das für die Verwendung in Zellen höherer Säugetiere optimierte EGFP-Gen ausgetauscht. Mit Hilfe dieses Zwischenvektors (phGFP-S65T<EGFP>) war es im folgenden möglich (Abb. 13 (II)), die Chromogen-Sequenz zusammen mit der SV40 Intron/polyA-Einheit über die Endonukleasen *Hind* III und *Bgl* II auszuschneiden. Dieses Element wurde dann in den bereits bestehenden AAV-rE1A 12S-Vektor anstelle des [Onkogen + SV40 pA]-Segments eingesetzt. Mittels Restriktionsanalyse konnten abschließend die gewünschten Klone des AAV-rEGFP-Reporterplasmids (pArEGFP) ermittelt werden.

### **3.1.2. Überprüfung der AAV *inverted terminal repeats***

Erstmals bei McLaughlin *et al.* (1988) angewandt, wurde auch in dieser Arbeit der *E. coli*-Stamm JC8111 (*recBCsbcBrecF*) für die Isolierung und Propagierung der AAV ITR-Derivate eingesetzt. Dieser Bakterienstamm läßt bei Palindromen deutlich weniger Rekombinations-ereignisse zu und gewährleistet dadurch deren Integrität (Kap. 2.2.3.). Diese Voraussetzung ist essentiell für eine erfolgreiche rAAV-Produktion.

Um sporadisch auftretende Deletionen in jedem Fall ausschließen zu können, mußten die *inverted terminal repeats* sowohl beim Basisvektor pTR<sub>BS</sub>-UF als auch bei allen AAV-Endplasmiden auf ihre Vollständigkeit hin untersucht werden. Aus dem Konstrukt dl3-94 (McLaughlin *et al.*, 1988) stammend, setzen sich diese aus den 145 Nukleotiden der ITR-Sequenz sowie einem OligoGC-Anhang zusammen und ergeben nach *Bgl* II-*Pst* I-Restriktion ein 160 bp langes Fragment. Kleinere, in der Elektrophorese schneller wandernde Satellitenbanden zeigen dagegen den Verlust von Teilen eines oder beider AAV-Enden an.

## Konstruktion des AAV-rEGFP-Reporterplasmids (I)



## Konstruktion des AAV-rEGFP-Reporterplasmids (II)

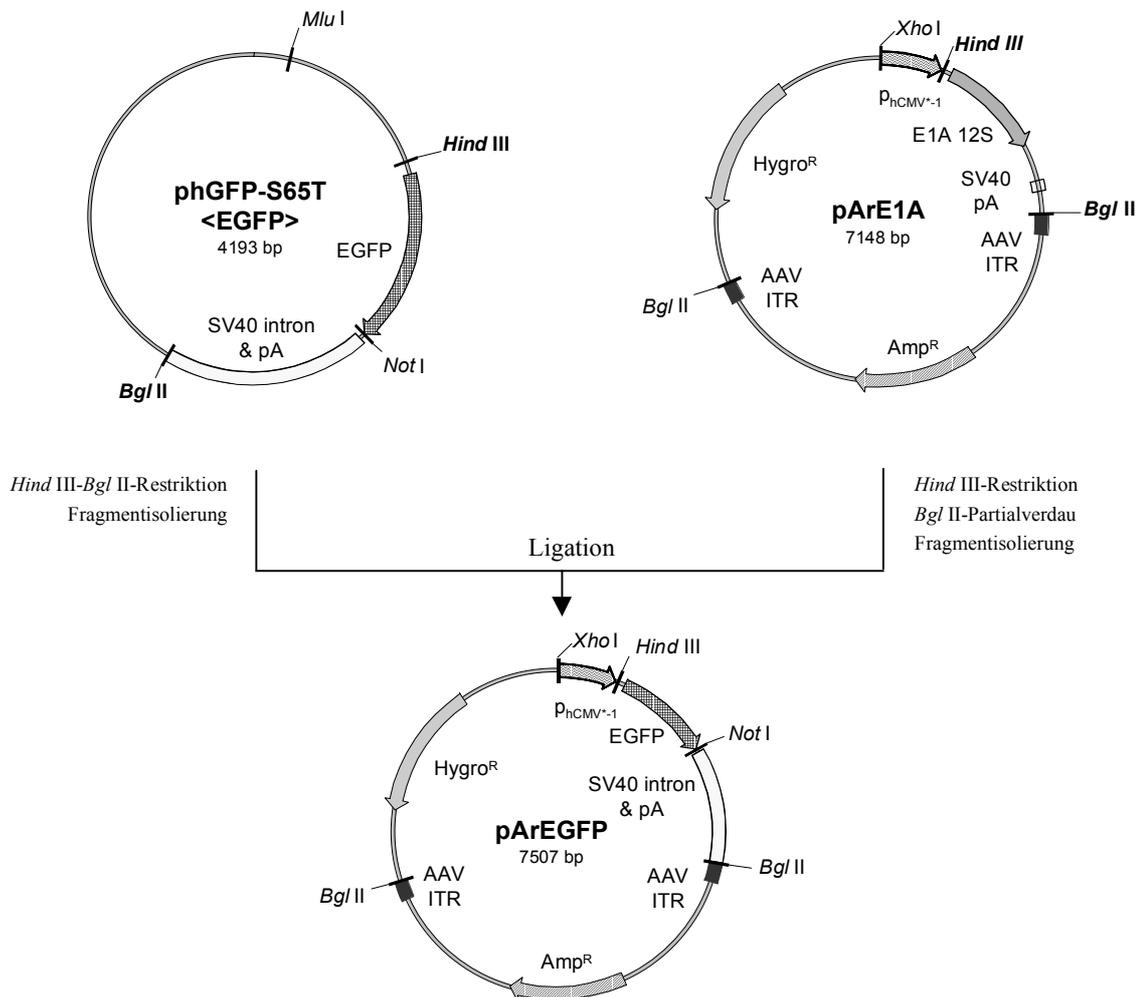


Abb. 13: Schematische Darstellung der Integration des regulierten EGFP in einen AAV ITR-Rahmen

Als Nachweismethode war dafür von S. Zolotukhin (persönliche Mitteilung) die Endmarkierung der DNA-Fragmente mit anschließender Darstellung auf einem Polyacrylamid-Gel (Abb. 14, Kap. 2.2.3.) empfohlen worden. Da diese Methode zum einen sehr zeitintensiv, zum anderen mit dem Umgang radioaktiver Werkstoffe verbunden war, wurde parallel dazu eine einfache Restriktionsanalyse mit nachfolgender Agarosegel-Elektrophorese (Abb. 15) ausgetestet.

Wie in beiden Ansätzen zu sehen ist (Abb. 14 + 15), konnte im Fall des Klon 11 neben den regulär erwarteten AAV-Fragmenten mit 160 Nukleotiden eine weitere, kleinere Bande detektiert werden. Diese zeigte sich etwa in Höhe der 147 bp-Bande des pUC *Msp* I-Markers, einem der mitgeführten DNA-Längenstandards. Somit befand sich tatsächlich unter den ausgewählten Einzelkolonien des AAV-Basisvektors ein Klon mit einem teilweise deletierten Palindrom.

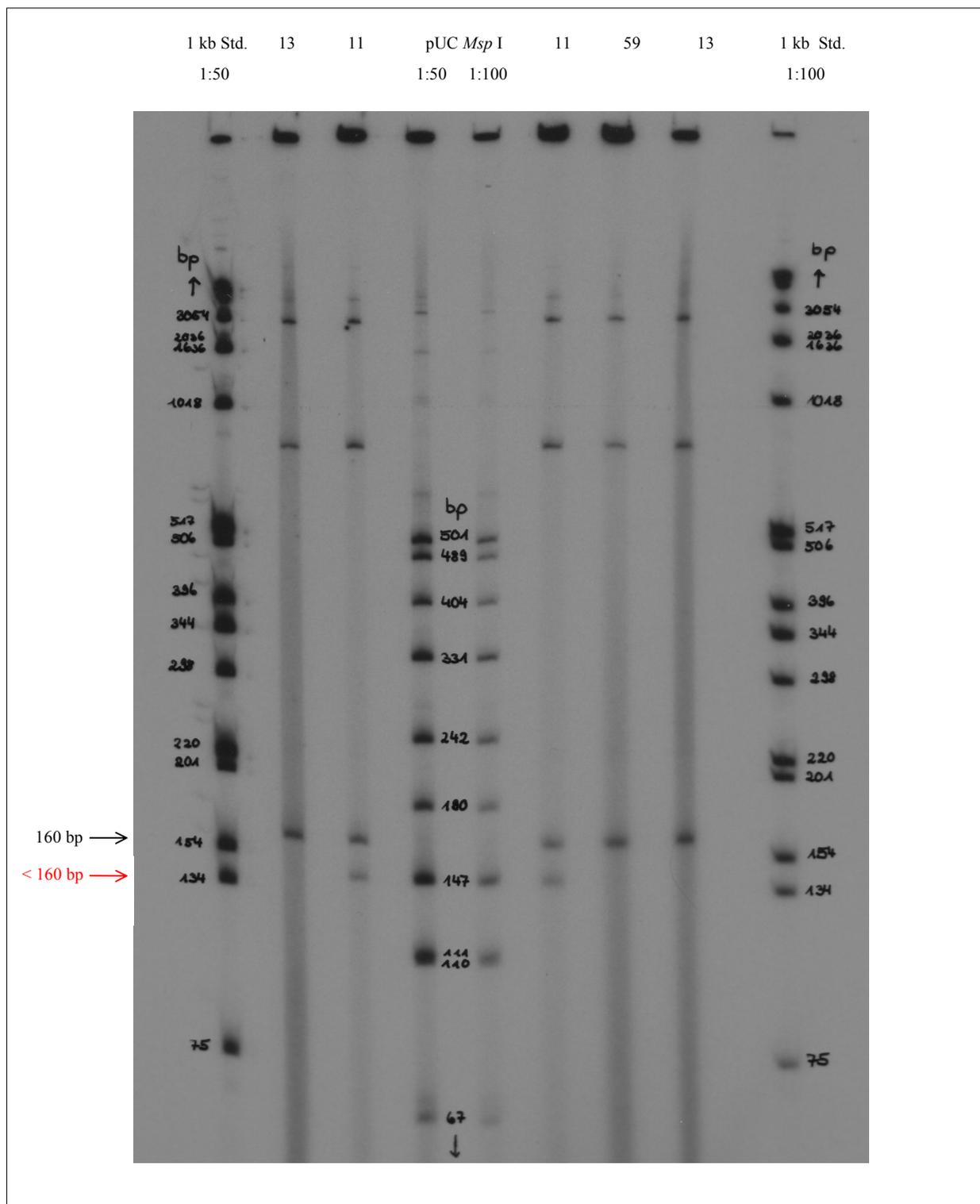


Abb. 14: Verschiedene Einzelklone (11, 13, 59) des Basisvektors wurden einem *Bgl* II/*Pst* I-Verdau unterzogen, die entstandenen Fragmente an ihren 5'-Enden radioaktiv markiert und durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde die Integrität der AAV ITRs beurteilt: Vollständige Palindrome besitzen nach dieser Restriktion eine Größe von 160 bp (Klon 13 + 59). Dagegen zeigen deletierte ITRs aufgrund ihrer geringeren Basenzahl ein Signal unter 160 bp (< 160 bp), wie im Falle des Klons 11 zu sehen ist. Als Größenstandards wurden in verschiedenen Verdünnungen die 1 Kb DNA Leiter sowie der pUC *Msp* I-Marker mitgeführt.

Zudem konnte im Vergleich beider Analysen auf dem 3%igen Agarosegel eine zusätzliche Bande festgestellt werden. Anhand der aus der Literatur abgeleiteten Sequenz des pTR<sub>BS</sub>-UF konnte jenes, ca. 196 bp lange Fragment mittels Berechnung der *Bgl* II-*Pst* I-Restriktion verifiziert werden. Damit konnte das Ergebnis der einfachen Restriktionsmethode bestätigt werden. Zugleich resultierte daraus aber, daß bei der radioaktiven Markierung der 5'-Enden offensichtlich bestimmte Fragmente, wie z. B. jenes 196 bp Fragment, nicht markiert werden konnten.

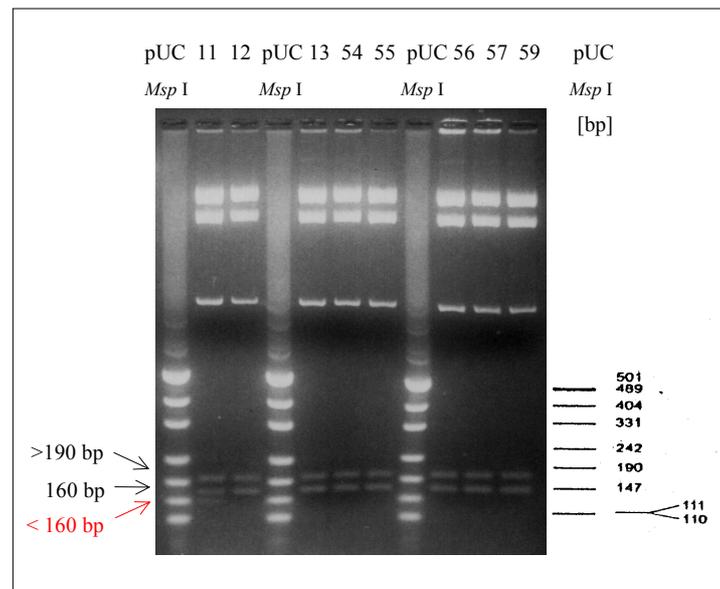


Abb. 15: Zum Vergleich wurden die Einzelklone nach *Bgl* II/*Pst* I-Restriktion auf einem 3%igen Agarosegel untersucht. Anhand des Längenstandards pUC *Msp* I, dessen Laufverhalten schematisch angedeutet ist, konnten unterhalb von 200 bp drei DNA-Fragmente identifiziert werden: (> 190 bp) ein ca. 196 bp umfassendes Fragment, welches durch Berechnung bestätigt werden konnte; (160 bp) das die intakten AAV ITRs enthaltende 160 bp große Fragment und (< 160 bp) ein Fragment, welches kleiner als 160 bp ist und auf ein deletiertes Palindrom hinweist (Klon 11).

Um nochmals die Aussagekraft der beiden Ansätze zu überprüfen, wurden sie in den nächsten Versuchen wiederum parallel eingesetzt - diesmal mit AAV-Endplasmiden. Dabei wurden die Klone zunächst mittels der einfachen Methode getestet. Anschließend wurden die Ergebnisse stichprobenartig anhand der Endmarkierung bestätigt. Da sich die äußerst aufwendige radioaktive Endmarkierung in keinem der Fälle als überlegen erwies, wurde der Nachweis bei allen weiteren AAV ITR-Derivaten mittels Restriktionsanalyse geführt. So konnten viele Klone gleichzeitig und zuverlässig auf die intakte Form ihrer Palindrome hin untersucht werden. Auf diese Weise wurde je ein Klon pro AAV-Endplasmid für die Produktion der rekombinanten Virionen ausgewählt.

## 3.2. Etablierung der Tet-Systeme

Nach Herstellung der AAV-Plasmide mußte zunächst deren Konstruktion überprüft werden. Zudem sollte die Funktionsfähigkeit der Tet-Systeme generell sowie insbesondere in Schwanzzellen sichergestellt werden. Beide Untersuchungen waren unabdingbare Voraussetzung für die Produktion der rekombinanten AAV-Partikel und wurden mittels transienter Transfektionsexperimente durchgeführt. Als Transfektionsreagenz stand mit DOSPER eine Liposomenpräparation zur Verfügung, die eine Transfektion auch in serumhaltigen Medium zuließ (Kap. 2.3.4.).

Hinsichtlich ihrer geringen Verfügbarkeit waren humane Schwanzzellen für diese Vorversuche jedoch nicht geeignet. Aus diesem Grunde erfolgte das Austesten der Tet-Konstrukte in Kombination mit dem regulierten EGFP-Vektor anhand der für diese Systeme bereits erprobten HeLa-Zellen (Clontech Produktprotokoll, 1996). Überdies wurde mit dieser permanenten, etablierten Zelllinie eine Eingrenzung bestimmter Parameter vorgenommen, die den weiteren Versuchen mit primären Schwanzzellen als Grundlage diene. Alle zelltypspezifischen Testungen hingegen wurden an primären Schwanzzellen aus der Ratte durchgeführt und sollen im folgenden vorgestellt werden.

### 3.2.1. Funktionsfähigkeit der Tet-Systeme

Ziel dieses Transfektionsversuchs war es, die Wirksamkeit der drei verschiedenen Tet-Anwendungen in Schwanzzellen zu überprüfen, da dieses regulierbare Genexpressionssystem nicht mit jedem Zelltyp als Wirtszelle kompatibel sein muß (Gossen *et al.*, 1993). Zudem sollte die Basalaktivität des gewählten Minimalpromotors (Ackland-Berglund und Leib, 1995) in dieser Zellspezies untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die drei verschiedenen Tet-Transaktivatoren jeweils mit dem einfach zu detektierenden, regulierten Reporterplasmid pArEGFP (Abb. 13) kotransfiziert, bzw. es wurde eine Einzeltransfektion nur mit diesem Zielploid durchgeführt. Für den Beweis einer generell erfolgreichen Transfektion wurde das konstitutiv exprimierte EGFP-Protein, kodiert auf dem pTR-EGFP-Vektor (Tenenbaum *et al.*, 1999), eingesetzt. Um einen möglichen toxischen Einfluß des DOSPERs ausschließen zu können, wurde außerdem eine Bedingung mit DOSPER, aber ohne DNA-Zusatz, untersucht.

Basierend auf dem Versuchsaufbau in Kap. 2.3.4. wurden Rattenschwanzzellen mit einer Zelldichte von 56 000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Kulturplatten ausgesät und unter Verwendung zwei verschiedener DNA/DOSPER-Mengen (3 µg DNA/15 µg DOSPER und 5 µg DNA/20 µg DOSPER) für 24 Std transfiziert. Dabei enthielt das Kulturmedium von Beginn der Transfektion an 10% Serum sowie, für die Austestung des Tet-On-Systems, Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml (Clontech Produktprotokoll, 1996). Sowohl nach 48 Std als auch nach 72 Std wurden die Zellpopulationen mit Hilfe des inversen Mikroskops durchgemustert und das Auftreten von nativem, grün fluoreszierendem Protein fotografisch dokumentiert (Abb. 17 (a)).

Anhand der erzielten Ergebnisse konnten für die aktivierten Systeme folgende Aussagen getroffen werden: Sowohl die beiden Tet-Off-Systeme als auch das Tet-On-System funktionierten im Zusammenspiel mit dem regulierten Chromophoren in Rattenschwanzzellen. Während mit dem Kontrollplasmid pTR-EGFP viele exprimierende Zellen beobachtet wurden, war keine einzige positive Zelle mit dem regulierten pArEGFP nach Einzeltransfektion registriert worden. Somit konnte im Kontext mit dem EGFP-Gen keine intrinsische Aktivität des p<sub>hCMV</sub>\*-1 in diesem Zelltyp ausgemacht werden. Da mit der größeren DNA/DOSPER-Menge kein zusätzlicher Expressionsanstieg erzielt werden konnte, wurde in den weiteren Versuchen die niedrigere Konzentrationskombination mit 3 µg DNA und 15 µg DOSPER verwendet. Der zeitliche Verlauf der Expression wurde im nachfolgenden Experiment genauer betrachtet.

### 3.2.2. Zeitverlauf und Regulation der Tet-Systeme

Im zweiten Experiment sollte näher auf den Zeitverlauf der Expression sowie die angestrebte Regulation der unterschiedlichen Tet-Systeme in Schwanzzellen eingegangen werden.

Entsprechend der vorhergehenden Durchführung wurden die Rattenschwanzzellen wiederum mit den drei verschiedenen Tet-Systemen + rEGFP transfiziert. Reguliert durch An- oder Abwesenheit des jeweiligen Effektormoleküls wurde sowohl eine Bedingung mit angeschalteter Genexpression als auch eine Bedingung im abgeschalteten Modus angelegt (Kap. 1.2.). Als Kontrolle wurde wiederum das konstitutiv exprimierte EGFP mitgeführt. Mittels inversem Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl der grün leuchtenden und somit natives EGFP enthaltenden Zellen ermittelt. Dabei wurde die Expressionseffizienz in den aktivierten Systemen bzw. von pTR-EGFP über den Zeitraum von 24-120 Std verfolgt, indes wurde unter abgeschalteten Bedingungen das Zeitfenster von 48-96 Std beobachtet.

Wie anhand der Daten in Abb. 16 zu sehen ist, zeigte das Tet-Off-System in diesem Versuch im aktivierten Zustand bereits nach 48 Std die höchste Expression, während in der autoregulierten Tet-Off-Anwendung und im reversen Tet-System die Anzahl der positiven Zellen bis zum dritten Tag nach Transfektion anstieg und dann wieder sank. Bemerkenswert war ferner eine außerordentlich schwach auftretende Fluoreszenz nach 24 Std im autoregulierten System. Dies ist sicherlich auf die verzögerte Initiation dieser Regulationseinheit zurückzuführen. Zudem sahen die Zellen in allen Konditionen, in denen der Tet-On-Transaktivator exprimiert wurde, morphologisch schlechter aus, wobei dies unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin war.

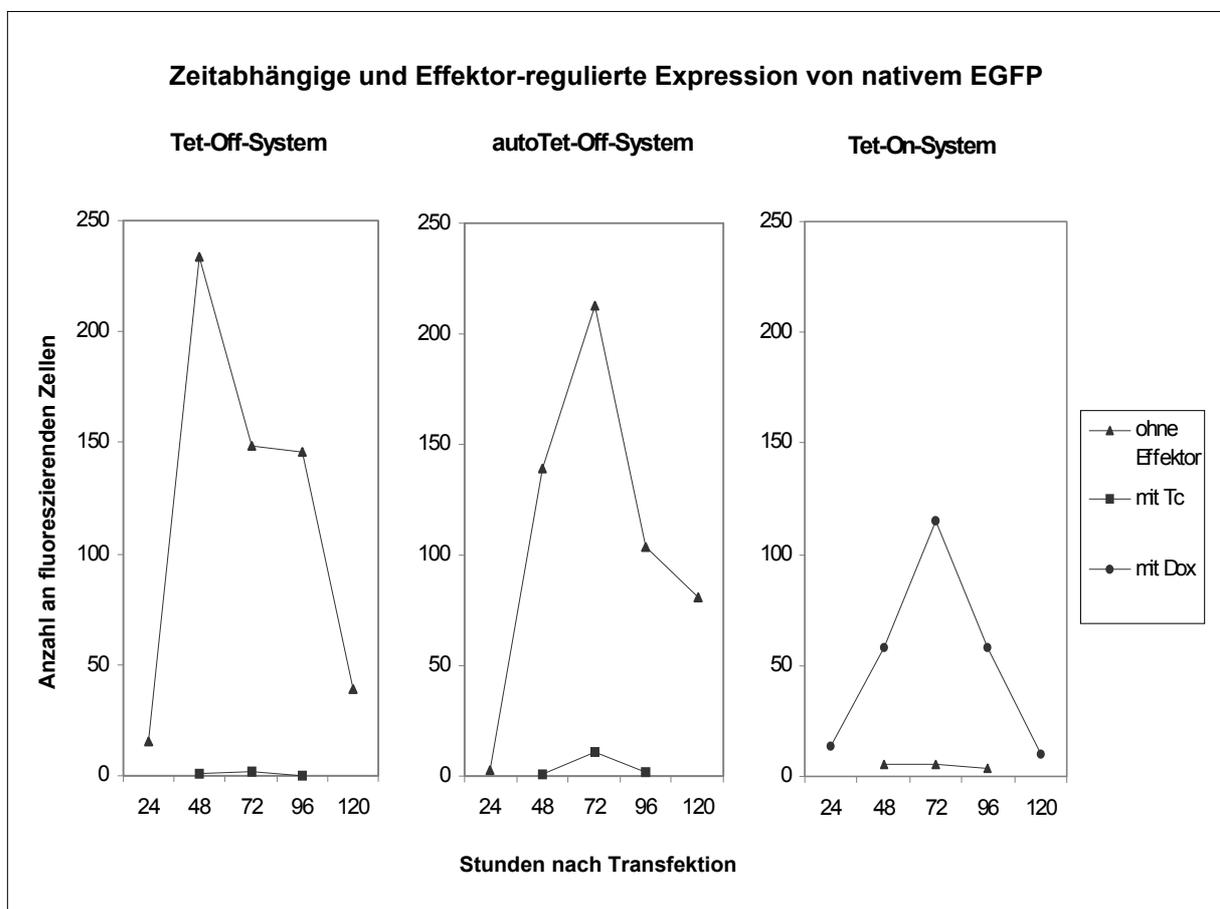


Abb. 16: Nach Transfektion mit den jeweiligen Tet-Varianten (Kap. 1.2.) wurden die Rattenschwanzzellen je nach Bedingung ohne oder mit 2  $\mu\text{g/ml}$  regulierendem Tetracyclin-Derivat (Tc=Tetracyclin, Dox=Doxycyclin) über einen Zeitraum von 120 Std inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der nativen EGFP-Fluoreszenz. Mittels inversem Mikroskop wurden die grün leuchtenden Zellen pro Vertiefung ausgezählt. Dabei wurde die Bestimmung an den gleichen Zellpopulationen vorgenommen.

Im Diagramm deutlich zu erkennen, erwies sich die Regulation der Tet-Systeme über deren Effektoren als äußerst wirkungsvoll. Während jedoch in der auto-Tet-Off-Bedingung am Tag der höchsten Expression ebenfalls eine kleine Spitze im abgeschalteten Modus zu verzeichnen war, zeigte die Tet-On-Anwendung unter dieser Bedingung über den gesamten Verlauf eine gewisse Induktion. Insgesamt betrachtet stellte sich das originäre Tet-Off-System als effektivstes System heraus: Neben der höchsten Stimulation der Genexpression (48 Std) wurde es auch am effizientesten abgeschaltet (73-243-fache Inaktivierung).

### 3.2.3. Expression der Onkogene

Dieser Versuch diente dazu, sowohl die Konstruktion der Onkogen-Vektoren zu überprüfen als auch eine intrinsische Aktivität des Minimalpromotors (= Konstrukt-Basalaktivität) abzuschätzen, die sich aus der Umgebung der Onkogensequenzen ergeben könnte. Um diese Onkogenprodukte detektieren zu können, wurden parallel die jeweiligen immunzytologischen Färbungen etabliert.

Dafür wurde das regulierte E1A 12S- bzw. *c-myc*-Konstrukt entweder alleine oder zusammen mit dem Tet-Off-Transaktivator in Rattenschwanzzellen transfiziert. Um die Effizienz der Transfektion beurteilen zu können, wurde außerdem eine Kontrolltransfektion mit Tet-Off + rEGFP mitgeführt. Für die Durchführung der Transfektion wurden die gleichen Bedingungen wie in den vorangegangenen Untersuchungen verwendet. Anschließend wurden die mit den Onkogen-Konstrukten transfizierten Zellen in einer Immunfärbung unter Verwendung des jeweiligen spezifischen Antikörpers angefärbt (Kap. 2.3.5.). Für ein optimales Färbeergebnis wurde der E1A- ebenso wie der *c-myc*-Antikörper in der Verdünnung von 1:300 eingesetzt.

Als Resümee aus den immunzytologischen Färbungen ist festzuhalten, daß die Konstrukte zur gewünschten Onkogenexpression führten, und ihre Produkte von den entsprechenden Antikörpern erkannt wurden. Interessanterweise konnte ein signifikanter Unterschied in der Transfektionseffizienz der unterschiedlichen Tumorgene sowie des Indikatorgens (161 grün fluoreszierende Zellen via inverses Mikroskop) beobachtet werden. Während nur 11 detektierbare Zellen bei der Anwendung Tet-Off + reguliertes *c-myc* auf eine unzureichende Transfektion hindeuteten, konnte das Tet-Off/rE1A 12S-System mit 591 positiven Zellen überzeugen. Allerdings wurden in der Transfektion mit dem rE1A 12S-Plasmid alleine ebenfalls 16 Zellen detektiert. Somit ließ sich in diesem Fall eine leichte Basalaktivität des  $p_{hCMV*-1}$  aufgrund der benachbarten Onkogenesequenz vermuten.

Ein weiterer Befund betraf die Lokalisation der eigentlichen Kernproteine. Während sich die *c-myc*-Proteine (Kap. 1.1.) der Vorhersage entsprechend im Nukleus der Zellen befanden, wurden beim E1A-Nachweis auch vereinzelt Zellen *in toto* gefärbt (Abb. 17).

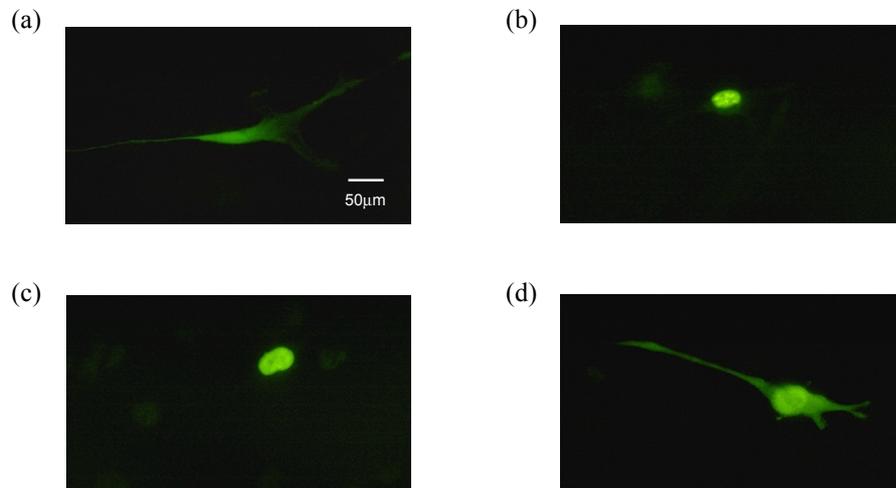


Abb. 17: Zu sehen sind transfizierte Rattenschwanzzellen, in denen durch das Tet-Off-System die Expression des jeweiligen Zielgens aktiviert wurde:

- (a) Durch die zytoplasmatische Verteilung des nativen *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) ist die Formgebung der Rattenschwanzzelle sehr schön zu erkennen. Die Aufnahme erfolgte über ein inverses Mikroskop.
- (b) Eine ausschließlich nukleäre Expression wurde für das *c-myc*-Onkogen beobachtet. Durch die immunzytologische Anfärbung ließen sich sogar Strukturen innerhalb des Kerns darstellen.
- (c) + (d) Während das E1A 12S-Genprodukt in der überwiegenden Mehrzahl der transfizierten Zellen als Kernprotein (c) zu detektieren war, wiesen vereinzelt positive Zellen eine zusätzliche zytoplasmatische Färbung (d) auf.

Um zu überprüfen, ob sich die in Kap. 3.2.2. festgestellten Unterschiede der verschiedenen Tet-Systeme auch in Kombination mit einem Funktionsgen bestätigen lassen, wurde jedes der drei Tet-Regulator-Plasmide ebenfalls mit dem rE1A 12S-Konstrukt unter aktivierten Bedingungen ausgetestet. Wie die Bilder in Abb. 18 zeigen, ließen sich die Tendenzen bestätigen.

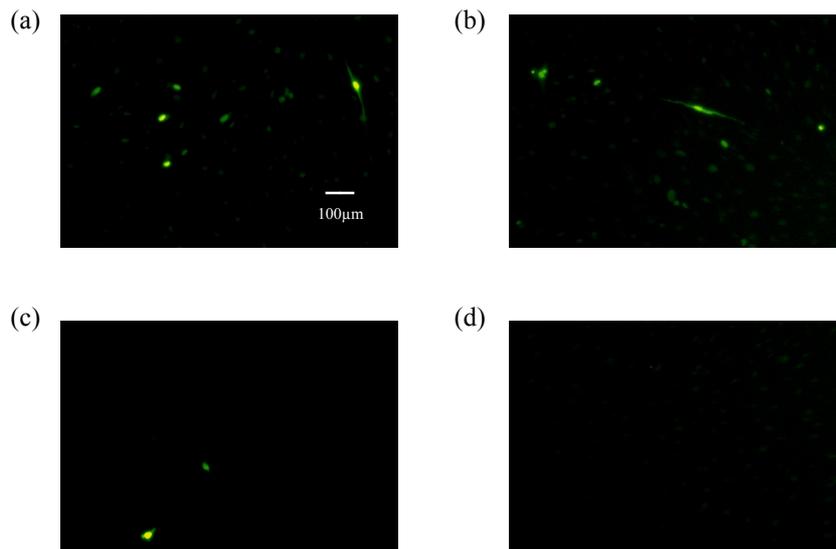


Abb. 18: Die Auswertung der mit den verschiedenen Transaktivator-Konstrukten und dem rE1A 12S-Plasmid transfizierten Rattenschwanzzellen ließ folgende Aussage zu: Während die Transfektionseffizienzen des Tet-Off- (a) und des auto-Tet-Off-Systems (b) etwa gleich hoch ausfielen, konnten unter der Kontrolle des Tet-On-Transaktivators (c) nur wenige positive Zellen nachgewiesen werden. Anhand der mitgeführten Kontrollbedingung ohne DNA-Zusatz (d) konnte die Hintergrundfärbung nach Immunfärbung mit dem  $\alpha$ -E1A überprüft werden.

### 3.2.4. Anwendung auf humane Schwanzzellen

Dieser Vorversuch sollte sicherstellen, daß das System der Tet-regulierten Expression speziesübergreifend auch in humanen Schwanzzellen angewandt werden kann.

Dafür wurden humane Schwanzzellen (Kap. 2.3.1.) in einer Zelldichte von 58 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 24-Loch-Kulturplatten in Proliferationsmedium ausgesät, am nächsten Tag mit pTR-EGFP sowie mit der Kombination Tet-Off + rEGFP für 24 Std transfiziert und nach 48 Std ausgewertet. Pro Bedingung wurde das 1-, 2-, 4,5- und 7,5-fache von 3 µg DNA + 15 µl DOSPER eingesetzt. Die natives EGFP enthaltenden Zellen wurden mit Hilfe des inversen Mikroskops detektiert. Dabei konnten in der Kontrollbedingung mit dem konstitutiv exprimierten Reportergen gerade 10 Zellen im Durchschnitt gezählt werden. Auch das regulierte Genexpressionssystem mit maximal 14 positiven Ereignissen in der 4,5-fach-Bedingung ließ lediglich die Aussage zu, daß das Tet-System offensichtlich in humanen Schwanzzellen funktioniert, aber die bisherige Transfektionsmethode für einen effizienten Gentransfer nicht geeignet ist.

### **3.3. Produktion von rekombinanten Adeno-assoziierten Virionen**

Da zu Beginn meiner Arbeit nur wenige Gruppen in Deutschland mit Adeno-assoziierten Viren experimentierten, war es von Vorteil, mit Frau Dr. Liliane Tenenbaum eine kompetente Kooperationspartnerin zu gewinnen, die selbst ihre AAV-Erfahrungen bei Prof. Winocour (Weizmann Institut, Israel) gesammelt hatte. Während eines dreiwöchigen Aufenthalts im Institut de Recherche Interdisciplinaire in Brüssel (Leiter: Prof. Velu) war es mir aufgrund dieser Kooperation möglich, mich mit der Handhabung von AAV und Adenoviren vertraut zu machen und mir verschiedene Methoden zur Herstellung und Übertragung von AAV-Vektoren anzueignen.

#### **3.3.1. Herstellung der rekombinanten AAV-Stöcke**

Ein bereits in Brüssel propagierter rekombinanter AAV-Stock zur Transduktion von konstitutiv exprimiertem EGFP war vorab in einem Vorversuch eingesetzt worden und hatte gezeigt, daß humane Schwanzzellen einer AAV-Infektion prinzipiell zugänglich sind.

Daraufhin wurde in Düsseldorf mit der Herstellung der rekombinanten AAV-Stöcke begonnen (Kap. 2.4.1., Abb. 6). Als rAAV-Ausgangsvektoren dienten die zuvor konstruierten Regulator- und Zielplasmide sowie der Vektor pTR-EGFP. Dieses Indikatorplasmid enthielt zwischen den AAV ITRs ein EGFP-Gen unter der Kontrolle des IE CMV-Promotors und ließ so eine konstitutive Expression dieses grün fluoreszierenden Proteins zu. Bei der Titration der rekombinanten Stöcke mit Hilfe des Replication Center Assays (Kap. 2.4.2., Abb. 7 (a)) trat jedoch - wie zuvor bei Versuchen in Brüssel mit den gleichen viralen Ad- und wtAAV-Grundstöcken - folgende Problematik auf: Zwar konnte die Titerhöhe einwandfrei mittels neo-Sonde bei den Stöcken mit den verschiedenen Transaktivatoren und mittels hygro-Sonde bei den Stöcken mit den diversen Zielgenen definiert werden. Allerdings zeigten sich in der Kontrollbedingung ohne Adenovirus-Zusatz (Abb. 7 (b)) ebenfalls vereinzelt Signale. Dies wies auf eine Kontamination der Stöcke durch Adenoviren hin, die bei der Herstellung der AAV-Virionen durch die Hitzedenaturierung nicht völlig beseitigt worden waren. Durch weitere Hitzebehandlungen konnten die Stöcke zwar anschließend teilweise bzw. völlig von dieser offensichtlich vorliegenden Ad-Kontamination befreit werden; aber die Titerhöhe der rAAV-Stöcke litt darunter erheblich, worauf sie nicht verwendet werden konnten.

Dieses Phänomen der Ad-Kontamination zog sich in unterschiedlichem Ausmaß durch alle Präparationen. Da kam mir der Verdacht, daß nicht die propagierten rAAV-Partikel mit dem Adenovirus verunreinigt sind, sondern daß möglicherweise Adenoviren über den Wildtyp AAV-Grundstock in die Titrationsen eingeschleppt werden.

Um dies nachzuweisen, wurden HeLa-Zellen mit jenem wtAAV infiziert und zusammen mit einer negativen (ohne Adenoviren) und einer positiven Kontrolle (mit Adenoviren) einer Immunfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen Adenoviren unterzogen. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, konnte damit die vermutete Ad-Kontamination des wtAAV-Stocks eindeutig bewiesen werden, da die in der Bedingung (c) auftretenden positiven Zellen nur von einer adenoviralen Infektion herrühren konnten.

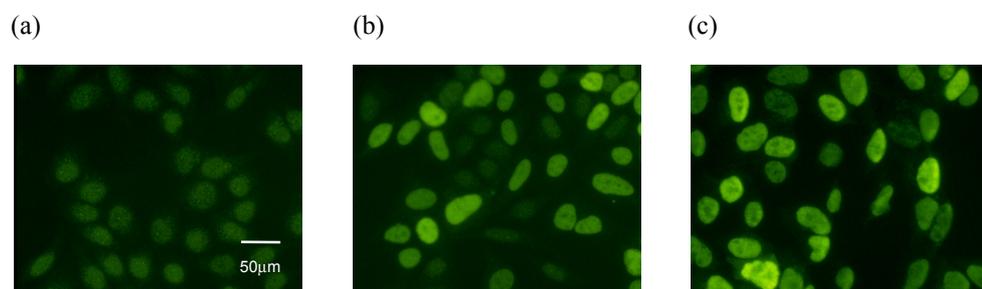


Abb. 19: HeLa-Zellen wurden unter (a) ohne jegliche Viren, unter (b) mit dem Adenovirus-Stock und unter (c) mit dem Wildtyp AAV-Grundstock inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen das adenovirale E1A-Protein (Kap.2.3.5.), bei der beide Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigten. Im Fall der wtAAV-Infektion hingegen traten ebenfalls positiv markierte Zellen auf, wodurch der Verdacht der Ad-Kontamination erhärtet wurde.

Da die Produktion eines neuen AAV Wildtyps sehr aufwendig ist, wurde der vorliegende Stock einer Hitzebehandlung (30 min/56°C) unterworfen, wodurch die Adenoviren deaktiviert wurden. Die angeschlossene Titration eines zuvor offenbar Ad-kontaminierten Tet-Off-rAAV-Stocks (Abb. 20) konnte zeigen, daß die vorgenommene Hitzedenaturierung ausreichend war. Anschließend wurde dieser wtAAV-Stock wieder für die Titration von rAAV-Stöcken verwendet.

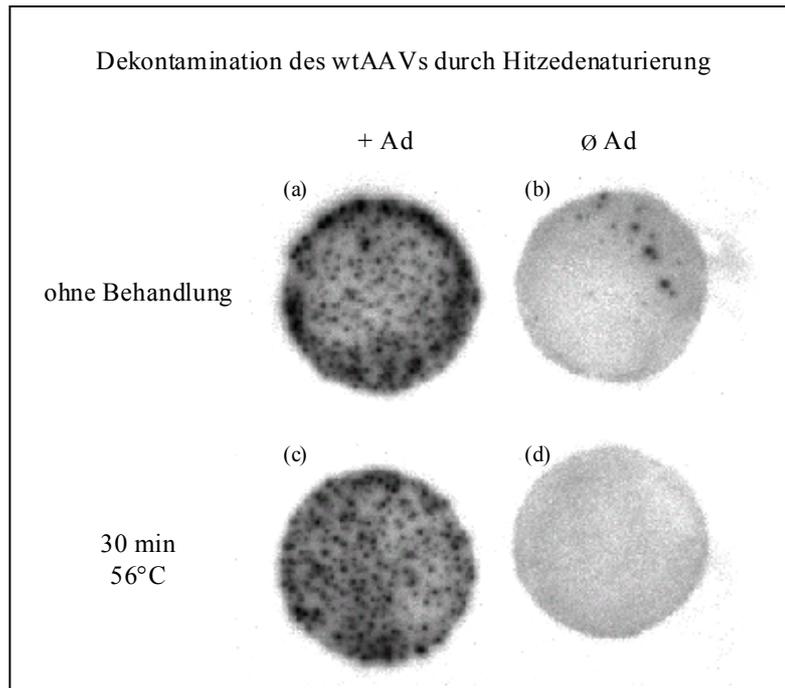


Abb. 20: Gezeigt wird die Titration eines offenbar Ad-verunreinigten Tet-Off-rAAV-Stocks:

(a) + (b): Die Durchführung erfolgte mit dem unbehandelten wtAAV-Grundstock. In der Kontrollbedingung (b) (Abb. 7 (b)) mußte aufgrund der auftretenden Signale von einer Replikation des auf dem Tet-Off-Konstrukt liegenden Neo<sup>R</sup>-Genoms ausgegangen werden. Dies implizierte das Vorliegen der drei viralen Komponenten, obgleich kein Adenovirus zugegeben worden war.

(c) + (d): Auf die gleiche Weise durchgeführt, aber ohne Signale in der Kontrollbedingung (d), bewiesen diese Blots, daß das Wildtyp AAV zuvor mit Adenoviren verunreinigt war, aber durch eine einmalige Hitzedenaturierung von dieser Ad-Kontamination befreit werden konnte.

Da die Titerhöhe der vorhandenen Stöcke durch die vorangegangenen Hitzebehandlungen stark beeinträchtigt war, mußten neue Virusstöcke propagiert werden. Für die weiteren geplanten Infektionsversuche wurde sich dabei auf die in Tab. 1 aufgeführten rAAV-Stöcke konzentriert. Nachdem im ersten Ansatz mit jedem Plasmid aus zehn Platten rekombinante Partikel gewonnen und tritriert worden waren, stellte sich die Anzahl der auto-Tet-Off-Virionen mit  $4 \times 10^4$  IU/ml als äußerst gering heraus. Aus diesem Grund wurde auf diesen Transaktivator bei den folgenden Präparationen verzichtet.

Tab. 1: Titer der diversen rAAV-Stöcke

Angaben beziehen sich jeweils auf den einen Milliliter, mit dem die zehn Platten pro Plasmid aufgenommen worden waren. Tatsächlich lag aber bei jedem Stock aufgrund mehrerer Zentrifugationsschritte ein geringeres Volumen vor.

	Tet-Off	reg. E1A 12S	reg. <i>c-myc</i>	EGFP	autoTet-Off
Ansatz 1 [IU/ml]	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$4 \times 10^4$
Ansatz 2 [IU/ml]	$8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	$9 \times 10^6$	
Ansatz 3 [IU/ml]	$2,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$		
Ansatz 4 [IU/ml]	$1,2 \times 10^8$	$6,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$		
Summe an Virionen [IU]	$5 \times 10^8$	$9,3 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$	$4 \times 10^4$

### 3.3.2. Produktion eines adenoviralen Stocks

Da das Adenovirus als Helfervirus bei den Titrationsen in einer sehr großen Menge zum Einsatz kommt, mußte im Laufe der Untersuchungen ein neuer Ad-Stock Typ 2 propagiert werden. Diese in Kap. 2.4.3. beschriebene Präparation erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Yacobson *et al.* (1987) mit Unterstützung von Frau Dipl.-Biol. Karin Schulze.

Zur Titerbestimmung wurde von L. Tenenbaum vorgeschlagen, den neu hergestellten Ad-Stock mit dem noch vorhandenen Grundstock über deren zytopatische Effekte (CPE) zu vergleichen. Dies ist jedoch mit einer deutlich subjektiven Beurteilung verbunden. Angeregt durch den Artikel von Nyberg-Hoffman *et al.* (1997) wurde daraufhin folgender Nachweis entworfen. Als Referenz diente auch hier der Ad-Grundstock von L. Tenenbaum. Für diesen war bekannt, daß er bei der Herstellung der rAAV-Stöcke mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 3 eingesetzt wurde. Dies bedeutet, daß jede Zelle theoretisch von drei Adenoviren infiziert werden kann. Setzt man diesen Ad-Stock in einer 1:3-Verdünnung ein, so ist ein Verhältnis von einer Zelle zu einem Adenovirus gegeben. Statistisch gesehen sollte damit jede Zelle einmal infiziert und dadurch mittels E1A-Antikörper detektierbar sein.

Dieser Ansatz wurde auf 8-Loch-Kulturobjektträgern entsprechend dem Protokoll in Kap. 2.4.4. durchgeführt. Wichtig dabei war, den Versuch mit einer MOI < 1 durchzuführen, um positive neben negativen Zellen vorliegen zu haben. Diese Bedingung gewährleistete, die mit einem Virus infizierten Zellen pro 100 Zellen auszählen zu können, und ermöglichte so eine verlässliche Aussage. Zu diesem Zweck wurden die beiden Ad-Stöcke in den Verdünnungen 1:3, 1:5 und 1:10 eingesetzt. Entgegen der Annahme, bei der 1:3-Verdünnung des Referenzstocks nahezu alle

Zellen anfärben zu können, stellten sich jedoch nur 85% der Zellen als E1A positiv heraus. Dies ließ auf eine MOI von 0,85 schließen und ergab damit, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, eine MOI von 2,5 für den Einsatz bei den vorangegangenen rAAV-Präparationen. Dieses Ergebnis stimmte vollkommen mit der Auswertung der 1:5-Verdünnung (Abb. 19 b) überein. Anhand der konstanten Zellzahl und dem vorgegebenen Volumen konnte somit für den Ad-Referenzstock ein Titer von  $1,4 \times 10^9$  IU/ml ermittelt werden. Bezogen auf den gleichen Volumeneinsatz wurde mit dem neu hergestellten adenoviralen Grundstock bei derselben Verdünnung eine MOI von 0,3 erzielt. Ausgehend von diesem Wert konnte ein Titer mit  $4,9 \times 10^8$  IU/ml bestimmt sowie die für die Herstellung und Titration benötigten Volumina errechnet werden.

### 3.4. Gentransfer via Infektion

#### 3.4.1. Infektion mit dem Chromophor EGFP

Anhand des einfach zu detektierenden Indikatorproteins EGFP sollte anfangs die Qualität sowie die Infektiösität der erzeugten Stöcke untersucht werden. Dazu wurden sowohl humane Schwanzzellen als auch HEK 293-Zellen infiziert.

Für eine erste Infektionsreihe der humanen Schwanzzellen wurden die *multiplicities of infection* (MOIs) 2, 5, 10, 25, 50 und 100 gewählt, wobei der rAAV-EGFP-Stock unbehandelt eingesetzt wurde. Nach einer Infektionszeit von 22 Std wurden die Zellen weiterhin in Proliferationsmedium gehalten, und nach insgesamt 48 Std wurde die Proteinexpression nach Fixierung ausgewertet. Um eine Aussage über die generelle Infektiösität zu erhalten, wurden vergleichend dazu HEK 293-Zellen mit einer MOI von 2 unter denselben Bedingungen getestet.

Erste Eindrücke bezüglich der Infektionseffizienz konnten über das native EGFP erhalten werden. Während von den HEK 293-Zellen ca. 60% grün fluoreszierten, konnten bei den humanen Schwanzzellen nur vereinzelt positive Ereignisse detektiert werden. Für eine genaue Auswertung wurden die Zellen permanent mit  $\alpha$ -GFP und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt (Abb. 21).

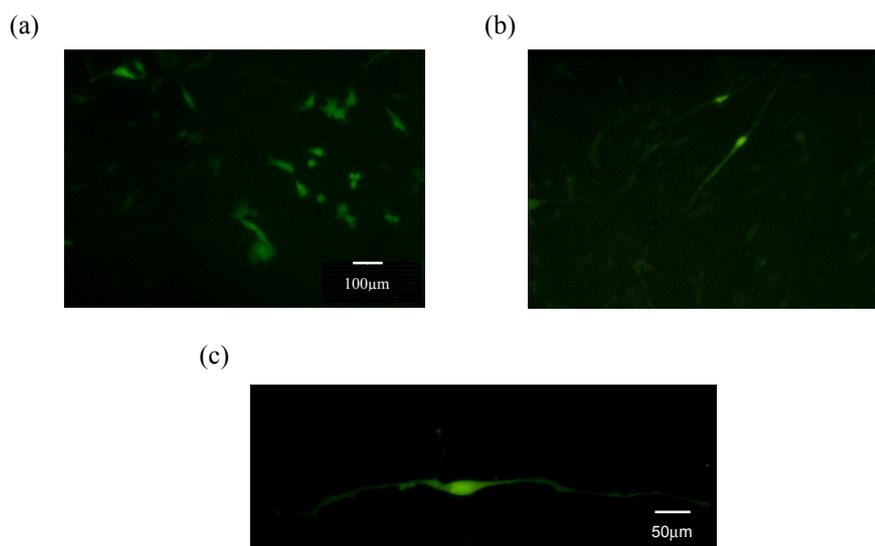


Abb. 21: Nach der Infektion mit dem rAAV-EGFP-Stock und angeschlossener Immunfärbung zeigte sich bei den verschiedenen Zellspezies folgendes Bild:

(a) Etwa 60% der HEK 293-Zellen wiesen eine EGFP-Expression auf, wodurch die Infektiösität des rAAV-Stocks belegt wurde.

(b) + (c) Auch bei den humanen Schwanzzellen konnten grün leuchtende und damit infizierte Zellen beobachtet werden. In der Vergrößerung (c) wird nochmals die Morphologie einer humanen Schwanzzelle mit ihren langen Zellausläufern deutlich. Jedoch fiel die Anzahl der positiven Zellen insgesamt wesentlich geringer aus.

Die für die humanen Schwanzzellen ermittelten Prozentwerte sind in Tab. 2 aufgeführt. Durch Erhöhung der MOI von 2 auf 5 wurde zwar ein Anstieg der Infektionseffizienz um den Faktor 2 verzeichnet. Eine weitere Steigerung konnte allerdings nicht erzielt werden, da bei allen höheren MOI-Bedingungen bei dieser Infektionszeit die Zellen entweder tot waren oder sich bereits abgelöst hatten.

Tab. 2: Infektion humaner Schwanzzellen mit rAAV-EGFP-Virionen

Alle Ergebnisse konnten in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt werden.

MOI	2	5
% infizierter hSC	1,2	2,5

### 3.4.2. Infektion mit dem Tet-Off-System und den Onkogenen

Da aus den Versuchsreihen mit den rAAV-Partikeln von Tet-Off und dem regulierten *c-myc* keine positiven Zellen resultierten, wird auf nähere Erläuterungen dieser Experimente verzichtet. Alle in Folge beschriebenen Untersuchungen basieren deshalb auf Doppelinfektionen des Tet-Off-Stocks mit rE1A 12S-Virionen.

#### Einfluß der Infektionszeit

Dieser Versuch sollte beweisen, daß das Tet-Expressionssystem nach AAV-vermitteltem Transfer funktionsfähig ist, und gleichzeitig klären, inwieweit die Länge der Infektionszeit eine Rolle bei der Infektionseffizienz spielt.

Zu diesem Zweck wurden humane Schwanzzellen sowohl mit dem rAAV-Regulator-Stock als auch mit der rAAV-E1A 12S-Präparation ohne Tetracyclin-Zusatz infiziert. Da jeder einzelne Stock mit einer MOI von 2 eingesetzt wurde, lagen im Infektionsmedium nicht nur rechnerisch vier rAAV-Partikel pro Zelle vor, sondern es nahm auch der Anteil an zusätzlichen Komponenten aus der Stockproduktion zu. Aufgrund dieser Voraussetzung wurde neben den bereits verwendeten 22 Std noch eine kürzere Infektionszeit mit 12 Std gewählt. Zudem wurden die Stöcke vor der Infektion abzentrifugiert, um eventuell toxisch wirkende Schwebeteilchen zu

minimieren. Achtundvierzig Std nach Infektion wurden die Zellen dann fixiert und immunzytochemisch mit einem E1A-Antikörper markiert.

Zwar konnte eine E1A-Expression, die auch mit verlängerter Infektionszeit zunahm, beobachtet werden. Aber insgesamt gesehen war die Infektionseffizienz mit < 1% sehr niedrig (Tab. 3).

Tab. 3: Doppelinfektion humaner Schwanzzellen mit Tet-Off- und rE1A 12S-Virionen

Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt.

Infektionszeit [Std]	12	22
% infizierter hSC	0,15	0,53

### Untersuchung des Expressionsverlaufs unter verschiedenen Konditionen

In dieser Versuchsanordnung wurde die E1A 12S-Expression über den Zeitraum von 48-144 Std beobachtet, um den optimalsten Zeitpunkt für nachfolgende Experimente festzulegen. Gleichzeitig wurde der Einfluß einer unterschiedlichen Vorbehandlung der Stöcke untersucht.

Da die rAAV-Stöcke trotz einer Zentrifugation bei 7000xg für 10 min oftmals noch eine leichte Trübung aufwiesen, sollte die Aufreinigung durch Erhöhung der Umdrehungszahl bei der Zentrifugation (18370xg für 5 min; Du *et al.*, 1996) verbessert werden. Als konstante Parameter wurden eine MOI von 2 und eine Infektionszeit von 22 Std beibehalten.

In beiden Ansätzen (Abb. 22) konnte die höchste E1A 12S-Expression nach 96 Std ermittelt werden. Bei einem Vergleich der Vorbehandlungen bezüglich der Infektionseffizienz konnte durch die Zentrifugation mit größerer g-Zahl eine leichte Steigerung dieser erzielt werden. Mit unter 2% infizierter Zellen blieb die Infektionseffizienz aber unter den Erwartungen, sodaß ein Einsatz von höheren MOIs angezeigt war.

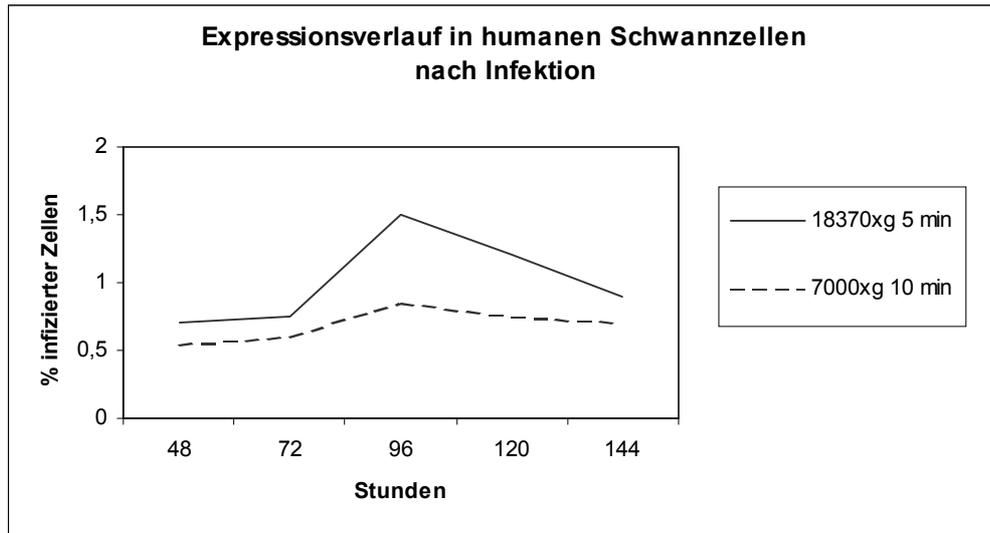


Abb. 22: Humane Schwanzzellen wurden gleichzeitig mit Tet-Off- und rE1A 12S-Virionen ohne Tetracyclin infiziert. Zuvor waren die rAAV-Stöcke unterschiedlichen Zentrifugationsschritten unterzogen worden. Mittels immunzytochemischer Färbung konnte anschließend eine E1A 12S-Expression über den gesamten Zeitraum von 48-144 Std nachgewiesen werden. Die erhobenen Werte konnten durch ein zweites, unabhängig durchgeführtes Experiment bestätigt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieses Versuchs war die Beobachtung einer Klonbildung, die sich ab dem fünften Tag in beiden Bedingungen einstellte (Abb. 23).

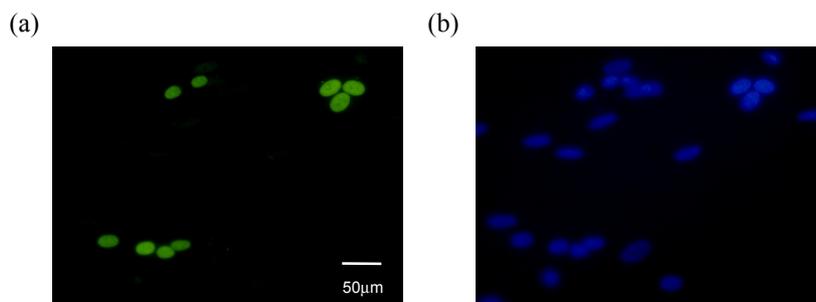


Abb. 23: Zu sehen sind drei E1A 12S-exprimierende Zellgruppen (a), die 5 Tage nach Infektion aufgenommen wurden. Anhand der Kernfärbung (b) wird deren Lage und Verteilung unter den übrigen nicht infizierten Zellen deutlich.

### **Einfluß des Serumgehalts sowie Bestimmung der Basalaktivität des regulierbaren Promotors unter verschieden hohen Virionemengen**

Anhand dieses Versuchsblocks sollte die Infektionseffizienz durch Erhöhung der MOI gesteigert werden. Da ein Einfluß von Serum auf die Infektion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser Parameter ebenfalls variiert. Als Kontrollansatz diente eine Einzelinfektion mit dem rE1A 12S-rAAV-Stock, um eine nicht durch den Transaktivator bedingte, sondern durch die Basalaktivität des Minimalpromotors ausgelöste E1A 12S-Expression erkennen zu können.

Basierend auf den zuvor gewonnenen Erkenntnissen wurden für einen Serumgehalt von 0,5% und 10% die MOIs 2, 5 und 10 sowie für die Einzelinfektion die MOIs 2 und 5 parallel ausgetestet. Allerdings wurde die Infektionszeit auf 12 Std verkürzt, um so ein Überleben der Zellen auch bei höherem Virioneneinsatz zu gewährleisten.

Wie das Säulendiagramm (Abb. 24) zeigt, brachte die Erhöhung der MOIs bei dabei verträglicher Infektionszeit auch den erwarteten Anstieg der Infektionseffizienz (Du *et al.*, 1996). In zwei unabhängig durchgeführten Experimenten konnte so für die Kondition mit 10% Serumbgabe bei Steigerung der MOI von 2 auf 5 eine Anhebung um den Faktor 2, bei Steigerung der MOI von 5 auf 10 um den etwas geringeren Faktor 1,7 festgestellt werden. Allerdings lagen die Ergebnisse des zweiten unabhängigen Parallelversuchs insgesamt um den Faktor 2,5 niedriger. Dadurch wurde nochmals deutlich, daß jedes Infektionsexperiment trotz gleicher Durchführung individuell war und teilweise großen Schwankungen unterlag. Ein Vergleich der unterschiedlichen Serumbedingungen zeigte, daß bei dem höheren und für die Kultivierung der hSC verwendeten Serumzusatz von 10% zum einen die Zellen morphologisch besser aussahen, zum anderen auch die Expressionseffizienz deutlich erhöht war.

Zudem trat wider Erwarten das Problem auf, daß nach Einzelinfektion der rE1A 12S-Partikel ohne Transaktivator eine gleich hohe bzw. sogar höhere Infektionseffizienz - bei zur Doppelinfektion vergleichbar hohem MOI-Einsatz - zu detektieren war. Auch dieses Ergebnis war reproduzierbar. Damit drängte sich der Verdacht auf, daß der immunzytochemische Nachweis des E1A-Proteins nicht auf die rekombinanten E1A 12S-Virionen zurückzuführen war, sondern durch eine nach wie vor bestehende Ad-Kontamination in diesem Stock hervorgerufen wurde.

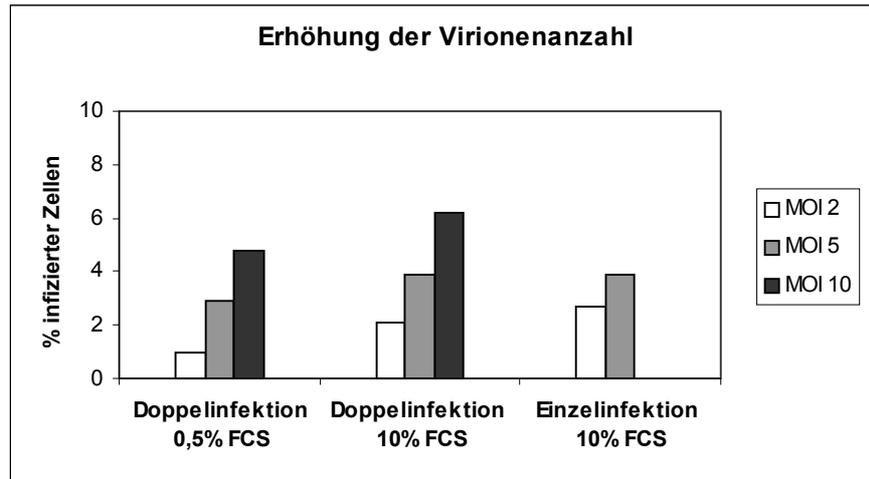


Abb. 24: Nachdem die hSC wie beschrieben infiziert und insgesamt für 96 Std in Kultur gehalten worden waren, wurden die modifizierten Zellen durch einen E1A-Antikörper markiert und anschließend pro 100 Zellen ausgezählt.

Eine weitere Beobachtung betraf das Expressionsmuster. Während bei der Transfektion vereinzelt Zellen mit zytoplasmatischer E1A 12S-Verteilung (Abb. 30) registriert wurden, konnten diese hier nicht detektiert werden. Allerdings gesellte sich zur überwiegend nukleären Anfärbung eine interessante neue Verteilungsform (Abb. 25). Dabei handelte es sich um pyknotische, satellitenartige Zellorganelle, die eine hohe Konzentration an E1A-Protein aufwiesen und sich mit dem Kernfarbstoff DAPI nicht anfärben ließen. Meist ein- oder zweifach angelegt, konnten in seltenen Fällen auch mehrere Exemplare (bis zu sechs) vorhanden sein.

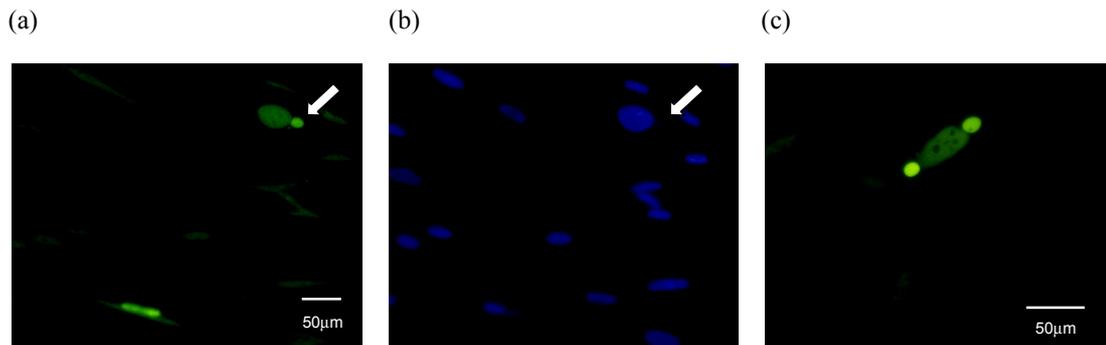


Abb. 25: Dargestellt sind hSC nach Doppelinfection mit Tet-Off- und rE1A 12S-Virionen, die nachfolgend spezifisch angefärbt wurden.

(a) Zur erwarteten Kernfärbung traten – mit dem MOI-Anstieg korrelierend – zunehmend positive Zellen auf, die neben einer schwach ausgeprägten Nukleusfärbung eine zusätzliche, starke E1A-Expression in einem angrenzenden Zellorganell (↗) aufwiesen.

(b) Dieses Bild zeigt die gleichen Zellen wie in (a) nach Färbung der Nuklei mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI. Wie deutlich zu erkennen ist, kann das satellitenartige Organell mit diesem Farbstoff nicht dargestellt werden.

(c) Exemplarisch wurde hier eine positive Zelle in einer höheren Auflösung aufgenommen, die über zwei dieser jeweils an den Polen des Kerns gelagerten Zellorganelle verfügte.

### Überprüfung des rE1A 12S-Virionenstocks

Um bei gleichzeitigem Vorliegen des aus dem Adenovirus stammenden E1A 12S-Gens eine Ad-Kontamination - diesmal in einem rAAV-Stock - ausschließen zu können, mußte darauf geachtet werden, daß der gewählte Antikörper zwar bioaktive Adenoviren nachweisen kann, dabei aber keine Kreuzreaktion mit dem Onkogen zeigt. Für diesen Fall wurde ein gegen das Hexon-Hüllprotein der Adenoviren gerichteter Antikörper herangezogen.

Im Vorfeld wurden anhand einer Ad-Infektion bei hSC die Färbebedingungen für eine Immunfluoreszenzfärbung etabliert. Anschließend wurde die Einzelinfection mit den rE1A 12S-Virionen wiederholt. Dies erfolgte in zweifacher Anlage, um zum einen eine Färbung mit dem Hexon-Ak und zum anderen eine Bedingung im Vergleich dazu mit dem Antikörper gegen das E1A-Protein durchführen zu können (Kap. 2.4.6.). Als Kontrollansatz wurde eine Infektion mit dem Ad-Grundstock mitgeführt.

Auch bei dieser Gegenüberstellung konnte in der Einzelinfektion wiederum eine hohe Anzahl an E1A-positiven Zellen detektiert werden (Abb. 26 (a)), wohingegen sich keine einzige Zelle mit dem Hexon-Antikörper (= bioaktiver Adenovirus) anfärben ließ (Abb. 26 (b)). Indes wurde in der Positivkontrolle, die Adenoviren enthielt, dieser auch von beiden Antikörpern erkannt (Abb. 26 (c) und (d)).

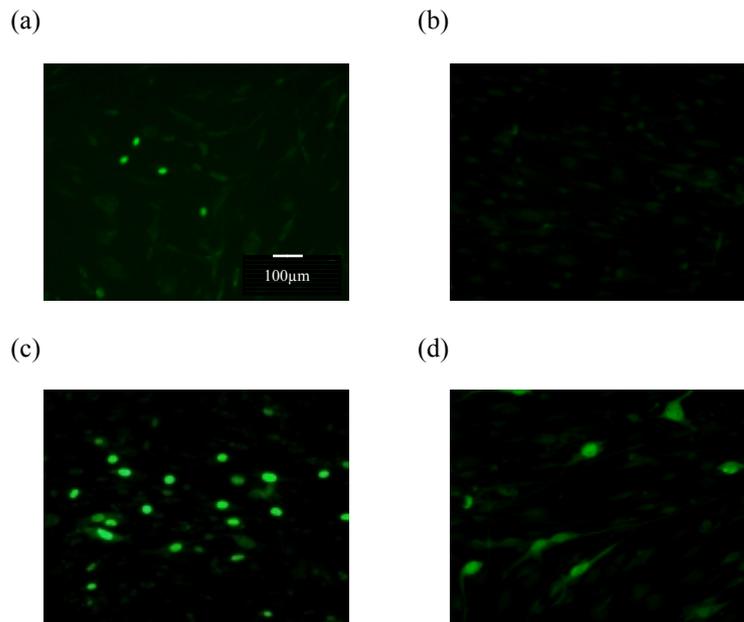


Abb. 26: Durch dieses Nachweisverfahren ließ sich eine Ad-Kontamination im rAAV-E1A 12S-Stock ausschließen. (a) + (b) Nach Infektion der hSC mit rE1A 12S-Virionen wurde die Bedingung (a) einer Immunfärbung mit dem E1A-Antikörper unterzogen, die Zellen unter (b) hingegen mit einem FITC-gekoppelten, Ad-spezifischen Hexon-Antikörper behandelt. Da unter (b) keine infizierten Zellen zu detektieren waren, konnten auch keine bioaktiven Adenoviren vorgelegen haben. (c) + (d) Nach Infektion der hSC mit Adenoviren wurden, wie erwartet, positive Zellen sowohl mit dem  $\alpha$ -E1A als auch mit dem Hexon-Antikörper erhalten.

Damit war bewiesen, daß die allein durch das rE1A 12S-Konstrukt erzielte E1A-Proteinexpression nicht auf eine Ad-Kontamination zurückzuführen ist, sondern von dem induzierbaren Hybridpromotor ausging und damit keine Tet-Regulation trotz Expression des Transaktivators möglich war. Aufgrund dieser Umstände scheiterte das Vorhaben, die humanen Schwanzzellen per Infektion zu immortalisieren.

### 3.5. Transiente Transfektion von humanen Schwannzellen

Aufgrund der anfänglich niedrigen Infektionseffizienzen mit den rekombinanten Virionen wurde bereits parallel zu diesen Versuchen erwogen, physikalische Transfertechniken für die Genübertragung auszutesten. Dieses Vorhaben wurde unter anderem durch eine Arbeit von Philip *et al.* (1994) unterstützt. Auch dort waren Plasmide, die über AAV ITRs verfügten, mittels liposomaler Transfektion in Zellen eingeschleust worden. Da sich bereits herausgestellt hatte, daß die Transfektion von humanen Schwannzellen mit dem Transfektionsagens DOSPER nur einen sehr geringen Erfolg zeigte (Kap. 3.2.4.), entschied ich mich zusätzlich für das neu auf dem Markt erschienene FuGene™ 6 Transfektionsreagenz. Dieses wurde explicit auch für Anwendungen, die serumhaltiges Medium benötigen, angeboten.

#### 3.5.1. Vergleich der Transfektionsreagenzien FuGene und DOSPER mittels EGFP

Um einen ersten Eindruck bezüglich des Konzentrationsverhältnisses DNA zu Transfektionsagens zu bekommen, wurde ein Vorexperiment mit dem konstitutiv exprimierten EGFP durchgeführt.

Für FuGene wurden dabei Kombinationen ausgetestet, welche sich an der empfohlenen Angabe des Herstellers orientierten. Demgegenüber wurde die Konzentrationsserie für die DOSPER-Anwendung aus den früher durchgeführten Transfektionen mit Rattenschwannzellen abgeleitet. Für den Ansatz (Kap. 2.3.4.) wurden 30 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 8-Loch-Kulturobjektträger ausgesät und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von ca. 80% mit den in Tabelle 4 aufgeführten Konzentrationen transient transfiziert. Dabei betrug die Transfektionszeit für DOSPER 24 Std, während die DNA/FuGene-Mischung aufgrund ihrer guten Verträglichkeit für die gesamte Inkubationszeit von 48 Std auf den Zellen verblieb.

Tab. 4: Konzentrationsverhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz

	FuGene						DOSPER					
DNA [µg]	1	2	1	2	2	3	1,5	1,5	3	3	6	6
Agens [µg]	3	3	6	6	9	9	5	10	10	15	15	30

Anschließend wurden die Objektträger mit Paraformaldehyd fixiert und anhand des inversen Mikroskops begutachtet. Da es sich teilweise um sehr viele positive Zellen handelte und dadurch beim Auszählen mit einem Ausbleichen zu rechnen war, wurde diese EGFP-Expression

zusätzlich mittels immunzytochemischer Färbung dokumentiert (Abb. 27). Dadurch war auch ein konkreterer Vergleich zur nachfolgenden Detektion der Onkogene gegeben.

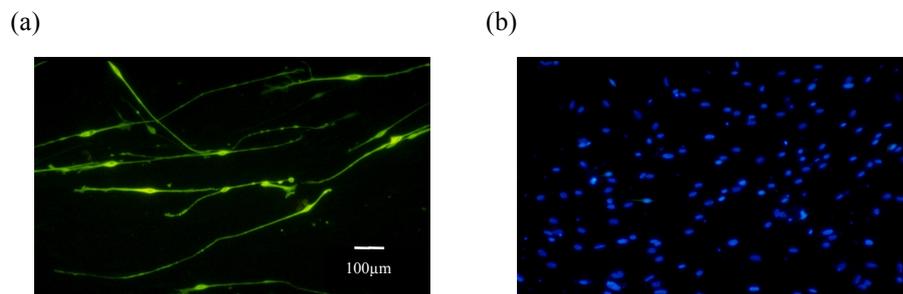


Abb. 27: Humane SC wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGene mit dem konstitutiv exprimierenden EGFP-Plasmid transfiziert. Während in (a) die Zellen nach einer Immunfärbung mit dem GFP-Antikörper abgebildet sind, zeigt die Abbildung (b) die zugehörige Verteilung der Zellen nach DAPI-Kernfärbung.

Während mit DOSPER nur sehr wenige Zellen transfiziert werden konnten, war im Vergleich dazu der Transfektionserfolg mit FuGene signifikant höher. Der in zwei Bedingungen erhaltene Anteil von 8,7% transfizierter Zellen war bis dahin die höchste Effizienz, mit der im Rahmen dieser Arbeit Gene auf humane SC übertragen werden konnten (Abb. 28).

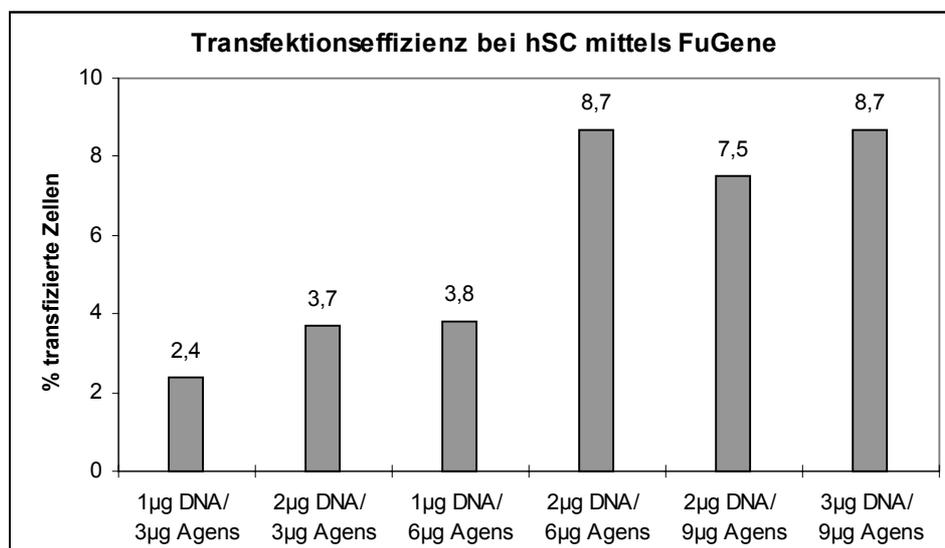


Abb. 28: Humane SC wurden über 48 Std mit den oben genannten EGFP/FuGene-Konzentrationen inkubiert und anschließend einem Färbeprozedere mit  $\alpha$ -GFP unterzogen. Die angegebenen Prozentangaben resultieren dabei aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.5.2. Transfektionen mit den Tet-Onkogen-Systemen

In die Austestungen einbezogen wurden beide Onkogene (E1A 12S und *c-myc*) sowie alle drei Tet-Regulationssysteme. Da aber sowohl die Tet-On- als auch die autoTet-Off-Variante wesentlich geringere Transfektionseffizienzen erzielten, beschränken sich die folgenden Beschreibungen auf das Tet-Off-System. Bedingt durch die limitierende Zahl an humanen Schwanzzellen avancierte dies auch zum Tet-System für die abschließende stabile Transfektion.

#### Nachweis der Funktionsfähigkeit

Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Immortalisierung via Transfektion war nicht nur eine möglichst hohe Transfektionseffizienz, sondern es mußten auch die funktionellen Voraussetzungen abgeklärt werden. Neben einer wirksamen Regulation galt es deshalb insbesondere, die Basalaktivität des Tet-kontrollierten Promotors zu überprüfen. Diese hatte sich nach Infektion mit den E1A 12S-Virionen als Schwachpunkt herausgestellt und damit die Anwendung dieser Gentransfermethode zunichte gemacht.

Untersucht wurden diese kritischen Faktoren mit Hilfe des optimierten FuGene-Transfektionsprotokolls. Neben der Kotransfektion von Tet-Off + Onkogen wurde zusätzlich auch eine singuläre Transfektion pro Onkogenkonstrukt durchgeführt. Mittels Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin sollte die Regulation sowie anhand von drei Zeitpunkten (48 Std, 72 Std und 96 Std) der Verlauf der Expression untersucht werden. Dazu wurden die Zellen zu den genannten Zeitpunkten fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Dadurch konnte sowohl die Anzahl der transfizierten Zellen als auch die Lokalisation der exprimierten Proteine mit Hilfe des jeweiligen spezifischen Antikörpers dargestellt werden.

Die Ergebnisse werden im folgenden anhand des effizienteren, aber auch komplexeren Tet-Off/rE1A 12S-Systems erläutert: Gemäß Abb. 29 wurde die höchste Expression im angeschalteten Modus bei 48 Std mit 9,9% positiven Zellen ermittelt. Danach folgte ein leichtes Absinken auf 6,4% bei 96 Std. Durch die Anwesenheit von Tetracyclin wurde das System hingegen abgeschaltet. Zwar waren nach 48 Std mit 2,5% immer noch ein Viertel der im aktivierten Zustand ermittelten Zellen positiv, doch zeigte sich ein ähnlicher Prozentsatz (2,3%) bereits bei der Einzeltransfektion des regulierten E1A 12S-Vektors (◇ in Abb. 29). Daraus ist abzuleiten, daß zwar eine fast 100%ige Regulation durch den Effektor erzielt wurde, jedoch der Minimalpromotor in der Umgebung der E1A 12S-Sequenz eine gewisse Basalexpression zuläßt.

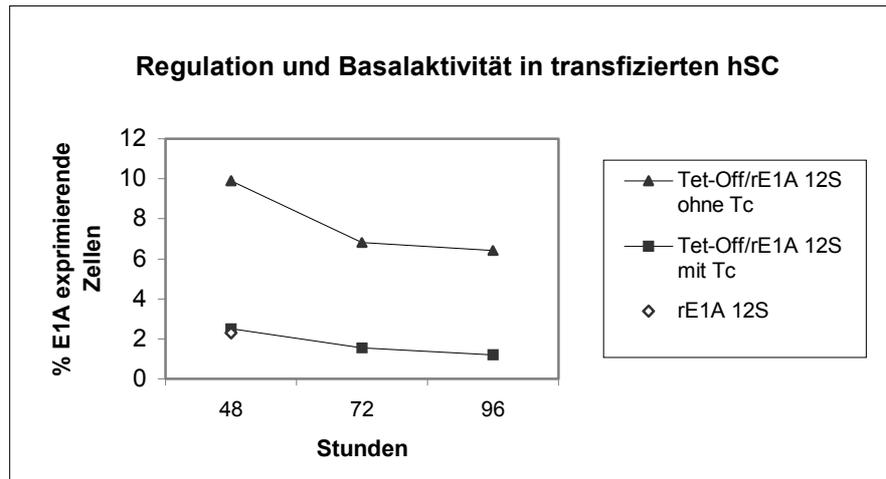


Abb. 29: In diesem Versuch wurde die E1A 12S-Genexpression in humanen SC einerseits im stimulierten (ohne Tc), andererseits im inaktivierten System (mit Tc) über einen Zeitverlauf von 48-96 Std gemessen. Zudem wurde durch Einfachtransfektion des rE1A 12S-Konstrukts die allein vom Tet-abhängigen Element ausgehende Basalexpression (48 Std) bestimmt.

Eine zusätzliche Beobachtung betraf das Expressionsmuster für das E1A 12S-Protein in der Einzelzelle. Obgleich es sich bei diesem Onkogen im eigentlichen Sinne um ein Kernprotein handelt, wurde teilweise auch eine zytoplasmatische Verteilung des E1A 12S-Proteins festgestellt (Abb. 30 (a)). Dieser Befund korreliert mit dem bereits zuvor durchgeführten Versuch bei Rattenschwanzzellen (Abb. 17).

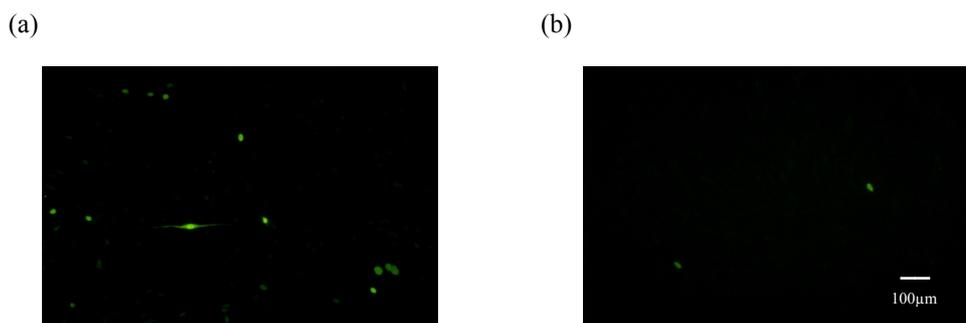


Abb. 30: Die Abbildung zeigt humane SC nach Transfektion des Tet-Off-Transaktivators mit den einzelnen Onkogenen. Deren Expression wurde anschließend mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper nachgewiesen.

(a) Im Fall des E1A 12S-Onkogens konnte eine akzeptable Transfektionseffizienz erreicht werden. Neben einer nukleären Expression wurde jedoch in einigen humane SC auch eine Proteinverteilung in der gesamten Zelle beobachtet.

(b) Im Vergleich dazu war die Anzahl der *c-myc* exprimierenden, ausschließlich nukleär gefärbten Zellen eher gering.

Für die Kombination Tet-Off + reguliertes *c-myc*-Zielgen konnte der höchste Wert ebenfalls bei 48 Std ermittelt werden. Dieser fiel mit 2,2% im Vergleich zwar geringer aus. Dafür wurden aber weder bei den Doppeltransfektionen in Tc-Anwesenheit noch bei Einzeltransfektion mit dem *c-myc*-Onkogen positive Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Außerdem beschränkte sich hier die Expression des Proteins ausschließlich auf den Kern (Abb. 30 (b)).

### Einfluß des Verhältnisses von Onkogen zu Transaktivator

In diesem Ansatz sollte untersucht werden, inwieweit sich das Verhältnis von Zielplasmid zu eingesetzter Tet-Off-DNA auf die Transfektionseffizienz auswirkt (Gossen und Bujard, 1995). Basierend auf den zuvor gewonnenen Kenntnissen wurden die hSC mit den in Abb. 31 angegebenen Verhältnissen transfiziert. Zusammen mit dem Transaktivator wurde dies sowohl für E1A 12S als auch für das *c-myc*-Onkogen durchgeführt. Nach 48 Std wurde die Inkubation durch Fixierung beendet und die Zellen der jeweiligen immunzytochemischen Färbung unterzogen.

Wie die Abb. 31 eindeutig wiedergibt, konnte in beiden Fällen bei einem paritätischen Einsatz von Onkogen zu Tet-Off-Transaktivator (Verhältnis 1:1) die größte Anzahl an transfizierten Zellen ermittelt werden. Für E1A 12S ergab sich dabei ein Wert von 10,3%, für *c-myc* von 2,4%. Im weiteren nahm die Effizienz mit zunehmenden Überschuß an Transaktivator immer stärker ab.

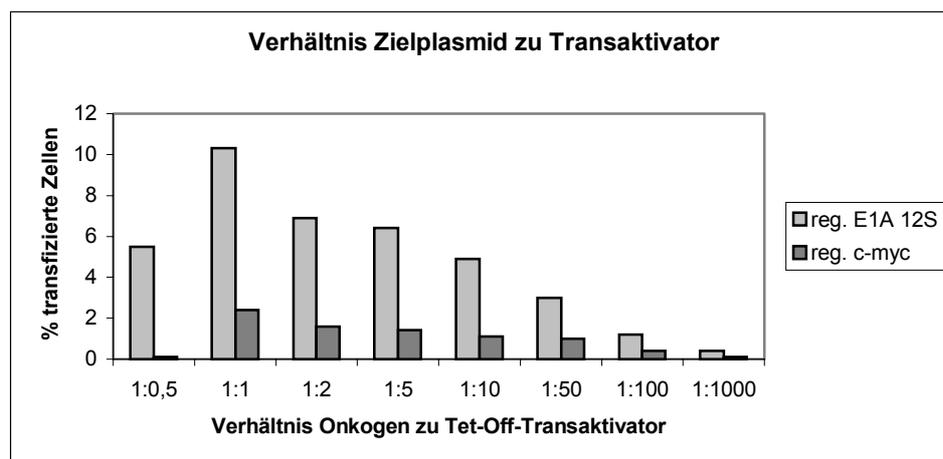


Abb. 31: Humane Schwanzzellen wurden bei konstanter FuGene-DNA-Kombination mit den verschiedenen Verhältnissen der beiden unterschiedlichen Komponenten des Tet-Systems transfiziert. Ohne Zugabe von Tetracyclin, also bei induzierter Genexpression, konnten die oben eingetragenen Werte nach 48 Std beobachtet werden.

### 3.6. Voraussetzungen für einen stabilen Gentransfer

#### 3.6.1. Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen

Da die zur Selektion geeignete Antibiotikummenge für jeden Selektionsmarker bezüglich Zelltyp und Wachstumszyklus variieren kann, sollten die optimalen Arbeitskonzentrationen für G418 und Hygromycin B - sowohl einzeln verabreicht als auch in Kombination - gegenüber humanen Schwanzzellen in Kultur ermittelt werden. Nachdem die Zellen in Gegenwart verschiedener Wirkkonzentrationen für einen bestimmten Zeitraum kultiviert wurden, wurde die Anzahl noch lebender Zellen zum einen mikroskopisch beurteilt und zum anderen photometrisch nach Durchführung des Bioassays (Kap. 2.3.2.) und einer Absorptionsmessung bei 490 nm bestimmt.

Der stete Verlauf des zellulären Absterbens in Anwesenheit von Hygromycin B kann in Abb. 32 (a) verfolgt werden. Im Konzentrationsbereich von 0,1-1 µg/ml lagen die Kulturen subkonfluent (sk) vor und enthielten noch zahlreiche vitale Zellen, wodurch hohe OD-Werte durch Formazan-Bildung metabolisch aktiver Zellen erzielt werden konnten. Unter der Einwirkung von 10 µg/ml machte sich ein Absterben (++) bemerkbar. Bereits bei 20 µg/ml Hygromycin B waren unter optischer Sicht nur noch wenige lebende Zellen (+) festzustellen. In den höheren Konzentrationen ging das Vorhandensein morphologisch intakter Zellen sowie die OD-Werte gegen Null.

Wie die Abb. 32 (b) zeigt, konnten in dem Konzentrationsbereich von 300-1000 µg/ml G418 lediglich in der niedrigsten Konzentration noch wenige intakte humane Schwanzzellen (+) verzeichnet werden. Bei allen weiteren Konzentrationen waren die Zellen hingegen tot.

Als kritische Konzentration bei Einzelgabe wurde aufgrund dieser Resultate für Hygromycin B 20 µg/ml, für G418 300 µg/ml festgelegt.

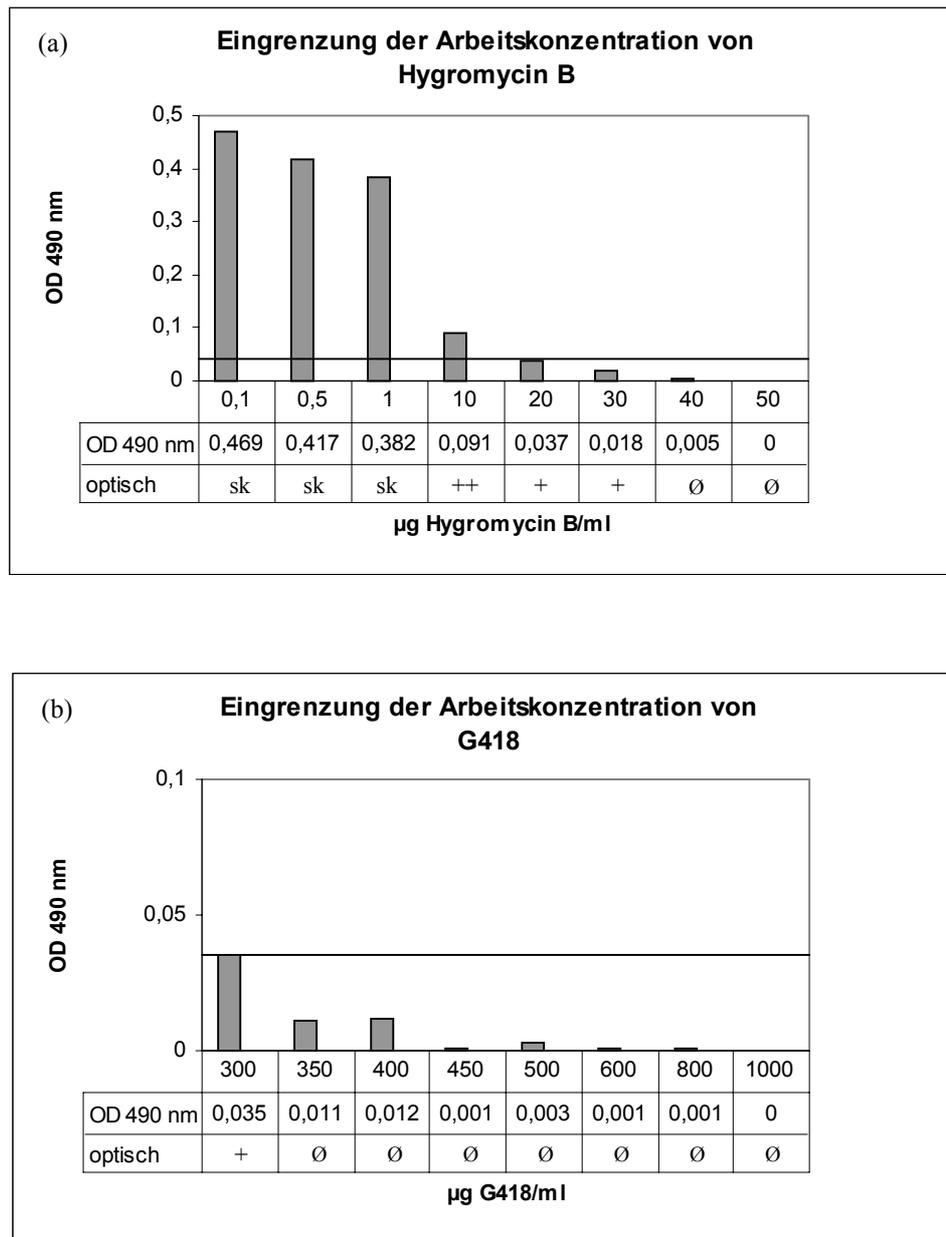


Abb. 32: Dargestellt sind die Bestimmungen der Antibiotikum-Arbeitskonzentration bei Einzelgabe.

Humane Schwanzzellen wurden 12 Tage unter Standardbedingungen den verschiedenen Konzentrationen der angegebenen Antibiotika ausgesetzt. Ein Überleben der Zellen wurde optisch durch Einteilen in 4 Kategorien (sk = subkonfluent, ++ = einige Überlebende, + = wenige Überlebende, ∅ = keine Überlebende) bewertet. Bestätigt wurden diese Beobachtungen mit einer unabhängigen photometrischen Methode (Kap. 2.3.2.). Als Doppelwerte erhoben und nach Abzug des Leerwertes (= Medium ohne Zellen) ergaben sich daraus die oben aufgeführten Diagramme, jeweils mit den dazu gehörenden Zahlenwerten unterlegt. Zur besseren Veranschaulichung wurde eine Referenzlinie eingezeichnet, die den in den kritischen Konzentrationen erreichten  $OD_{490}$ -Wert (= 0,035) markiert.

Ausgehend von diesen Werten, jedoch in der Annahme, daß die Zellen unter der Einwirkung beider Antibiotika weitaus stärkerem Selektionsstreß unterliegen würden, sollten die Konzentrationsbereiche für den Kombinationstest unterhalb der kritischen Einzelkonzentrationen liegen. Um auf jeden Fall ein Überleben der Zellen nachweisen zu können, wurde bei G418 mit einer Konzentration von 100 µg/ml begonnen und als höchste Konzentration 400 µg/ml eingesetzt. Dagegen erstreckte sich der Konzentrationsrahmen für Hygromycin B um 10 µg/ml.

Nach acht Tagen Selektionsdruck konnte ein plötzlich eintretendes, starkes Absterben bemerkt werden. Durch visuelle Beurteilung ergab sich folgende Momentaufnahme:

Tab. 5: Bewertung der Zellpopulationen nach achttägigem Antibiotika-Einfluß  
Die grau unterlegte Tangente markiert einen Grenzbereich, in dem schon sehr viele tote Zellen vorlagen. (sk = subkonfluent, ++ = einige Überlebende, + = wenige Überlebende, ∅ = keine Überlebende)

G418 \ Hygro B	ohne Zusatz	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml	400 µg/ml
ohne Zusatz	sk	sk	sk	++	++	++
6 µg/ml	sk	sk	sk	++	+	+
9 µg/ml	sk	sk	++	++	+	+
12 µg/ml	sk	sk	++	+	+	∅
15 µg/ml	sk	++	+	+	∅	∅

Nach weiteren drei Tagen unter Einfluß der kombinierten Antibiotika wurden die humanen Schwanzzell-Kulturen nochmals optisch bewertet und diese Beobachtungen mit der Absorptionsmessung bei 490 nm verglichen. Dabei ergab sich ein „kritischer“ OD<sub>490</sub>-Wert, der in Abb. 33 mit einer Referenzlinie versehen wurde und anhand dessen sich folgende Aussagen verdeutlichen lassen: Sowohl mit 100 µg/ml als auch mit 150 µg/ml G418 zeigten die Zellen mit jeglicher Hygromycin-Konzentration ein Überleben. Nur noch wenige lebensfähige Zellen konnten jedoch unter dem gleichzeitigen Einfluß von 200 µg/ml G418 und 6 µg/ml Hygro B verzeichnet werden, durch deren geringe Formazanbildung der OD<sub>490</sub>-Grenzwert von 0,024 erzielt wurde. In allen höheren Konzentrationen waren fast alle bzw. alle Zellen abgestorben. Damit ergab sich mit **200 µg/ml G418** und **9 µg/ml Hygromycin B** diejenige Antibiotika-Kombination, bei der die niedrigsten Einzelkonzentrationen vorlagen und keine signifikante Anzahl an metabolisch aktiven Zellen detektiert werden konnte.

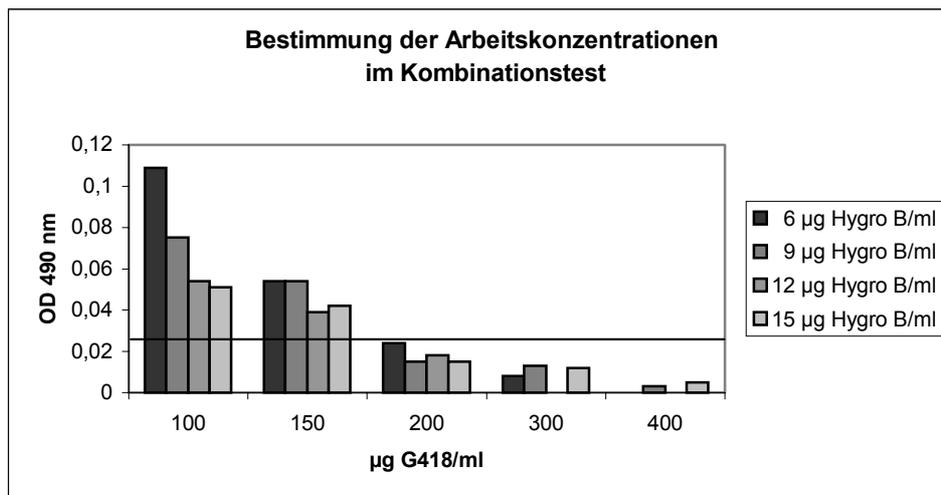


Abb. 33: Nachdem humane Schwanzzellen unter Standardbedingungen den verschiedenen Antibiotika-Kombinationen 12 Tage ausgesetzt waren, wurden die Kulturen zum einen mikroskopisch ausgewertet, zum anderen nach Anwendung des Bioassays photometrisch gemessen. Graphisch dargestellt sind die Absorptionswerte bei 490 nm unter den verschiedenen Bedingungen. Die Daten resultieren aus Zweifachbestimmungen nach Subtraktion des Leerwertes (= Medium ohne Zellen). Korreliert mit den optischen Auswertungen erwies sich ein  $OD_{490}$ -Wert um 0,024 als signifikant, im Diagramm durch eine Referenzlinie hervorgehoben.

### 3.6.2. Einfluß der Effektormoleküle auf humane Schwanzzellen

Um sicherzugehen, daß die zum Einsatz kommenden Konzentrationen von Tetracyclin und Doxycyclin im subtoxischen Bereich liegen und keine morphologischen Veränderungen bei humanen Schwanzzellen hervorrufen, war bereits zu Anfang der Arbeit deren Verträglichkeit zum einen visuell, zum anderen via Bioassay (Kap. 2.3.3.) beurteilt worden. Laut Herstellerangaben wird im allgemeinen im Tet-Off-System mit 1-10 µg/ml Tc oder 5-10 ng/ml Dox eine komplette Repression der Genexpression erhalten, während die volle Aktivierung in Tet-On-Zelllinien mit 1-10 µg/ml Dox erzielt werden kann. Diese therapeutischen Werte plus eine erhöhte Konzentration von 50 µg/ml, die im Falle von Tc eine abtötende Wirkung auf Prokaryonten hat, bildeten den Konzentrationsrahmen.

Bezüglich der Morphologie konnten keine Anomalien festgestellt werden. Anhand der Absorptionsmessung (Abb. 34) war jedoch zu beobachten, daß bei beiden Effektormolekülen in den Konzentrationen von 0,001-10 µg/ml im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne tetracyclische Substanzen ein leichtes Zellwachstum zu verzeichnen war (Referenzlinie = Zellen ohne

Ab-Einfluß). Während es sich bei Tc über den gesamten Bereich erstreckte, waren bei Dox erhöhte Werte im niederen Konzentrationsbereich auffallend. Dies entspricht in etwa den jeweiligen Größenordnungen, in denen die Substanzen im Tet-Off-System regulatorisch wirksam sind. Desweiteren zeigte sowohl Tetracyclin als auch Doxycyclin bei 50 µg/ml eine zytotoxische Wirkung auf die humanen Schwanzzellen.

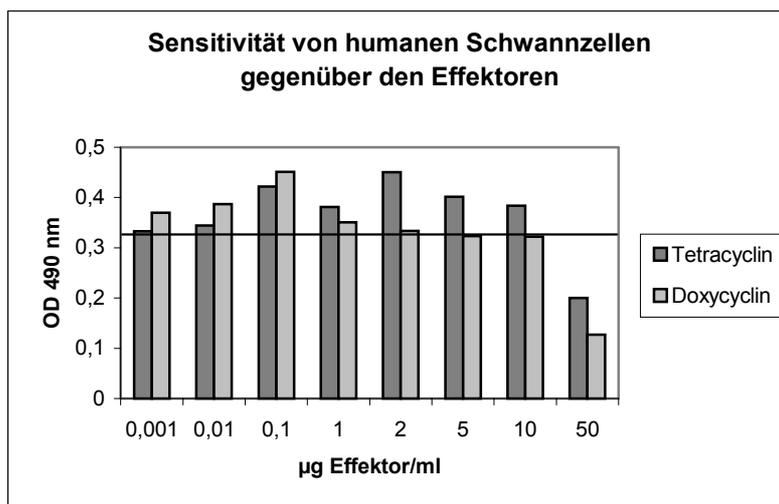


Abb. 34: Nachdem die Kulturen den verschiedenen Verdünnungen der beiden tetracyclischen Verbindungen über 14 Tage ausgesetzt waren, wurde mittels Bioassay die von lebenden Zellen katalysierte Formazanbildung gemessen. Dargestellt sind die Absorptionen bei 490 nm der jeweiligen Konzentrationen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus Dreifachmessungen abzüglich des Leerwertes. (Alle Standardabweichungen lagen jeweils unter 6% des Mittelwertes.) Der als Referenzlinie eingetragene OD<sub>490</sub>-Wert von 0,31 wurde von Zellen erhalten, die keiner Ab-Einwirkung ausgesetzt waren.

### 3.7. Stabile Transfektionen von humanen Schwanzzellen

Ziel der nachfolgenden Versuche war es, mittels Transfektion und Selektion eine stabile, aber zugleich regulierbare Expression der Onkogene herbeizuführen und somit eine immortalisierte humane Schwanzzell-Linie zu generieren. Da die vorhandene Anzahl an humanen SC nur wenige Versuchsansätze zuließ, wurde aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen das Tet-Off-System als effektivstes der drei Regulationssysteme dafür ausgewählt. Dazu sollte sowohl das E1A 12S- als auch das *c-myc*-Onkogen kombiniert werden. In die Durchführung gingen die zuvor erarbeiteten Erkenntnisse aus den diversen Versuchsblöcken ein. Für jeden Ansatz wurde durch Kontrolle des 48 Stunden-Werts die Transfektionseffizienz überprüft. Aus Gründen der besseren Übersicht wurde der Ablauf der Experimente tabellarisch dargestellt.

#### 1. stabile Transfektion

Um eventuelle, anfänglich störende Effekte bei der Klonbildung zu vermeiden, wurde neben dem aktivierten Zustand ( $\emptyset$  Tc) auch ein abgeschalteter Zustand (+Tc) bei der Kultivierung angelegt. Ferner verblieben die transfizierten Zellen auf den Kulturgefäßen, bis sie zu Klonen herangewachsen waren.

Tag der Transfektion: Pro Tet-Off/Onkogen-Anwendung wurden  $4,6 \times 10^5$  humane Schwanzzellen [2°] bei einer Konfluenz von 80% mit dem Transfektionsreagenz FuGene transfiziert. Dabei wurden je zwei parallele Transfektionsansätze ohne und mit **2 µg** Tetracyclin pro ml Medium durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Bedingung ohne DNA, aber mit FuGene-Zusatz mitgeführt.

Tag 2: Nach 48 Std wurde die Transfektionsmischung durch Proliferationsmedium mit oder ohne Tc ersetzt. Nach weiteren 6 Std wurden die Zellpopulationen in zwei unterschiedlichen Dichten (7 500 Zellen und 15 000 Zellen/cm<sup>2</sup>) umgesetzt [3°].

Zur Regeneration wurden sie bis zum nächsten Tag ohne Antibiotika inkubiert.

Medium  $\pm$  Tc

Tag 3: Die Zellen lagen in einer Konfluenz von 40-50% bei geringerer sowie von 60-80% bei höherer Zelldichte vor und sahen vital aus. Um mit der Selektion zu beginnen, wurden die Antibiotika G418 und Hygromycin B dem Proliferationsmedium zugesetzt. Dabei wurde auch die Zugabe von Tc je nach Bedingung weitergeführt.

Mediumwechsel mit **300 µg G418** und **12 µg Hygromycin**,  $\pm$  Tc

Tag 7: Während bei Tet-Off + rE1A 12S bei einem ansonsten diffusen Erscheinungsbild bereits Zellverdichtungen zu erkennen waren, konnten diese „Klone“ bei der Tet-Off/*rc-myc* Kombination nicht entdeckt werden. Zudem war bei der höheren Dichte teilweise bereits ein sehr dichter Zellrasen zu beobachten.

Mediumwechsel mit **300 µg G418** und **12 µg Hygromycin, ± Tc**

Tag 11: Zellen starben massiv ab (8. Tag der Selektion). Überlebende hSC wanderten diffus.

Mediumwechsel mit **300 µg G418** und **12 µg Hygromycin, ± Tc**

Tag 14: Vor allem in den Kulturen, die mit der niedrigeren Zelldichte ausgesät worden waren, waren fast alle Zellen tot bzw. sahen sehr schlecht aus. Bei eventuell vorliegenden Klonen lagen die Zellen weit verstreut auseinander. Nur ein diskreter Klon konnte hier bei Tet-Off/rE1A 12S aus der +Tc-Serie gefunden werden. Dieser stellte sich jedoch anhand seiner veränderten Morphologie als transformiert heraus. In den Bedingungen mit höherer Dichte waren demgegenüber etwas mehr Zellen zu sehen, unter denen auch Zellklone zu vermuten waren.

Während in den Kontrollzellen unter Tc-Einwirkung fast alle Zellen tot waren, wurden in der unbehandelten Bedingung zwar wenige, aber dennoch überlebende hSC beobachtet. Daraus resultierte, daß selbst am 11. Tag nach Selektionsbeginn noch nicht alle untransfizierten Zellen abgetötet worden waren.

Aufgrund des schlechten Zustands der transfizierten Zellen wurde ein Mediumwechsel ohne Antibiotika-Zusatz durchgeführt.

Mediumwechsel **Ø Ab, Ø Tc**

Zur Abklärung, ob generell noch Onkogen exprimierende humane SC vorlagen, wurden die Kulturplatten mit geringerer Dichte den jeweiligen Färbeverfahren unterzogen (Abb. 35). Alle Kulturschalen mit der höheren Dichte wurden hingegen weitergeführt.

Tag 19: Mediumwechsel **Ø Ab, Ø Tc**

Tag 24: In allen noch vorhandenen Kombinationen waren Klone zu sehen. Allerdings hatten auf diese Kulturen 10 Tage lang keine Antibiotika eingewirkt. Demgegenüber konnte jedoch im Kontrollansatz, der ebenfalls nur mit Proliferationsmedium inkubiert worden war, keine einzige lebende Zelle mehr ausgemacht werden. Um auf die Zellen wieder einen leichten Selektionsdruck auszuüben, wurden die halbierten Ab-Mengen dem Medium zugefügt.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin, Ø Tc**

Tag 29: Wie im Durchlicht gut zu sehen war (Abb. 35), hatten die verbliebenen Klone eine gewisse Größe erreicht, die ein Umsetzen der Zellen auf neue Kulturschalen zulassen sollte. Da humane SC auf dieses Prozedere, gerade nach längerem Verbleib auf einem Kulturgefäß,

sehr empfindlich reagieren können, wurde jede einzelne Kombination in ihrer Gesamtheit auf eine 48-Loch-Platte übertragen [4°] und weiterhin unter den Konditionen von Tag 24 kultiviert. Anhand einer mikroskopischen Kontrolle nach dem Umsetzen konnte dabei sowohl von einer ausreichenden Anzahl an Zellen als auch von einer guten Verteilung dieser ausgegangen werden.

Medium mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin, Ø Tc**

Tag 34: Die Zellen starben langsam, aber stetig ab. Neben vielen toten konnten nur noch wenige intakte Zellen gefunden werden.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin, Ø Tc**

Tag 43: Trotz zwischenzeitlicher Zugabe von frischem Proliferationsmedium **Ø Ab** waren an diesem Tag alle Zellen definitiv tot.

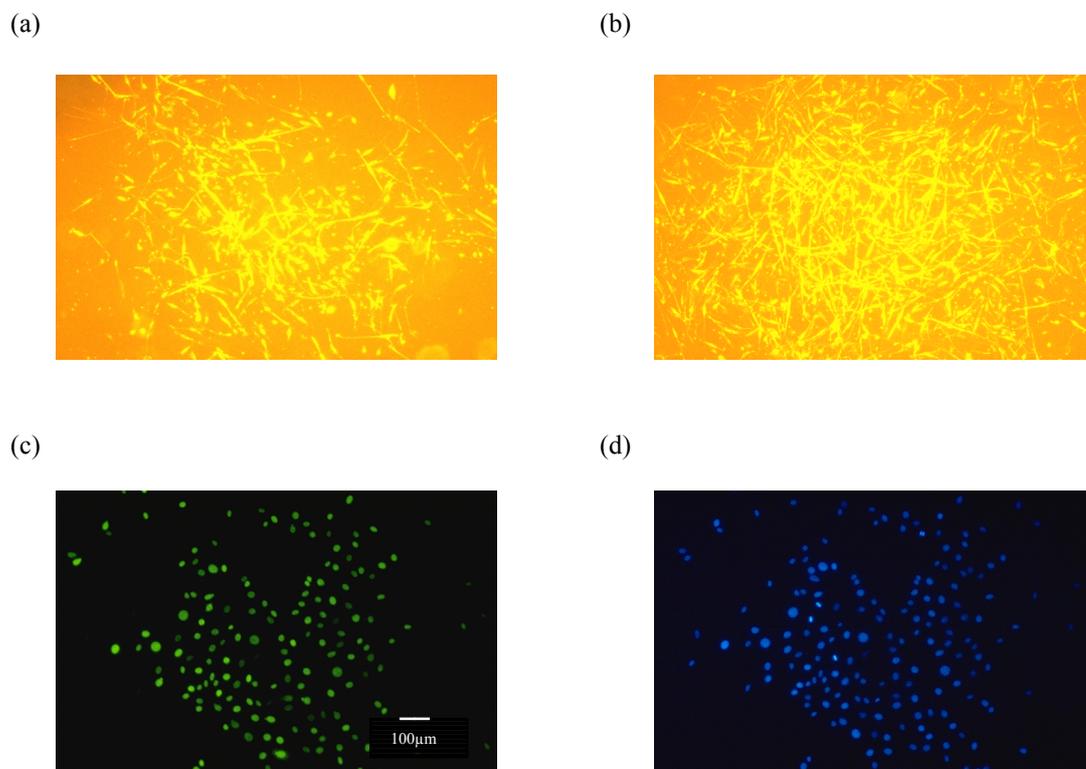


Abb. 35: Nach Transfektion und Selektion der humanen Schwanzzellen konnten mit beiden Anwendungen Tet-Off/rE1A 12S (a) und Tet-Off/r*c-myc* (b) Klone erhalten werden. Aufnahmen erfolgten im Durchlicht.

Ein Teil der entstehenden Klone wurde am Tag 14 einer Immunfärbung mit anschließender Kernfärbung unterzogen. Während in keinem der Klone eine *c-myc*-Expression detektiert werden konnte, wurden in beiden Regulationsmodi E1A 12S-exprimierende Zellen nachgewiesen. Dargestellt ist ein Klon im aktivierten System. (c) zeigt die mit  $\alpha$ -E1A und FITC nachgewiesene E1A 12S-Expression (grün). In (d) sind die Kerne mittels DAPI (blau) gegengefärbt.

## 2. stabile Transfektion

Da sich humane Schwanzzellen mit längerem Verbleib auf einer Kulturplatte auch stärker in die Beschichtungsmatrix einbetten, sollte der routinemäßige Turnus von 7 Tagen beim Umsetzen der Zellen beibehalten und damit einer möglichen Schädigung durch verlängerte Trypsineinwirkung vorgebeugt werden. Damit konnte zwangsläufig nur mit einem Pool von transfizierten humanen SC gearbeitet werden. Ferner sollte eine sukzessive Drosselung der Antibiotika-Mengen zum Überleben der doppeltransfizierten Zellen beitragen.

Tag der Transfektion: Pro Kombination wurden ca.  $1,9 \times 10^5$  am Vortag ausgesäte humane Schwanzzellen bei einer Konfluenz von 70% transfiziert [2°]. Dabei wurde eine gegenüber dem ersten Versuch reduzierte Tc-Konzentration von **0,5 µg/ml** Medium eingesetzt.

Tag 2: Nach 48 Std wurde der Mediumwechsel durchgeführt. Nach einer 6-stündigen Regenerationsphase wurden die Zellpopulationen mit der zuvor getesteten höheren Dichte auf neue Kulturgefäße übertragen [3°].

Medium  $\pm$  Tc

Tag 6: Die teilweise bereits dichten Kulturen wurden mit den Anfangskonzentrationen der Ab versetzt.

Mediumwechsel mit **300 µg G418** und **12 µg Hygromycin**,  $\pm$  Tc

Tag 9: Die Zellen sahen nach 3 Tagen Selektion morphologisch noch normal aus. Auch die Anzahl hatte sich noch nicht verändert. Um das beschriebene verstärkte Einbetten der Zellen zu vermeiden, wurden sie an diesem Tag auf neue 6-Loch-Gefäße ausgesät [4°]. Eine ausreichend hohe Zellzahl sowie eine homogene Verteilung konnten dabei mikroskopisch bestätigt werden.

Medium mit **200 µg G418** und **9 µg Hygromycin**,  $\pm$  Tc

Tag 13: Nachdem sich von den umgesetzten Zellen weit weniger als erwartet adhärent festgesetzt hatten und zudem viele davon auch wieder abgestorben waren, wurde an diesem Tag ein Mediumwechsel ohne jegliche Tc-Zugabe durchgeführt.

Mediumwechsel mit **200 µg G418** und **9 µg Hygromycin**,  $\emptyset$  Tc

Tag 15: Es konnten nur noch sehr wenige intakte Zellen beobachtet werden.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin**,  $\emptyset$  Tc

Tag 23: Alle Zellen waren abgestorben.

### 3. stabile Transfektion

In diesem Versuch wurden von Anfang an die Antibiotika-Konzentrationen von 150 µg G418 und 6 µg Hygromycin eingesetzt. Diese lagen unterhalb des ermittelten Grenzbereichs (Kap. 3.6.1.). Bei Betrachtung der vorhergehenden Versuche war aufgefallen, daß die Zellen immer ca. 7 – 8 Tage nach erster Antibiotika-Einwirkung begannen, *ad hoc* abzusterben. Aus diesem Grund wurden sie am 6. Tag umgesetzt, um sie zu besagtem Zeitpunkt in einer möglichst hohen Konfluenz vorliegen zu haben. Dadurch sollte erreicht werden, daß durch räumliche Nähe der zurückbleibenden, transfizierten humanen SC ein Wachstum begünstigt wird.

Tag der Transfektion: In diesem Fall wurden  $4,4 \times 10^5$  Zellen mit Tet-Off + *rc-myc* und  $8,8 \times 10^5$  Zellen mit Tet-Off + rE1A 12S transfiziert [2°]. Dies erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, mit der Ausnahme, daß keine + Tc-Reihe mitgeführt wurde.

Tag 2: Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Transfektionszeit durch einen Mediumwechsel mit Proliferationsmedium beendet. Das erste Umsetzen nach Transfektion [3°] erfolgte wiederum nach 6 Std, wobei die humanen SC dieses Mal in einer höheren Dichte mit ca. 30 000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät wurden.

Medium Ø Ab

Tag 3: Die Selektion wurde an diesem Tag bei einer Konfluenz von 80% begonnen.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin**

Tag 6: Basierend auf der beschriebenen Beobachtung wurden die Populationen an diesem Tag auf neue Kulturplatten mit einer Zelldichte von 30 000 Zellen/cm<sup>2</sup> übertragen [4°]. Zusätzlich wurde ein 8-Loch-Kulturobjektträger angelegt, der dafür vorgesehen war, nach 2 - 3 Proliferationszyklen die Onkogenexpression zu untersuchen.

Medium Ø Ab

Tag 7: Nachdem sich die Zellen einen Tag lang absetzen und regenerieren konnten, wurde dem Medium erneut die Ab-Kombination hinzugefügt.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin**

Tag 11: Nach visueller Beurteilung wurden folgende Konfluenzwerte abgeschätzt:

Kontrolle Ø DNA	20%
Tet-Off/rE1A 12S	30%
Tet-Off/ <i>rc-myc</i>	20%

Auch in diesem Fall waren die hSC wieder zu dem beobachteten Zeitpunkt in großer Anzahl abgestorben. Zudem schienen die verbliebenen Zellen trotz der erzielten 20-30% Konfluenz weiter langsam abzusterben.

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin**

Zudem konnte beobachtet werden, daß die Zellzahl des am Tag 6 angelegten Objektträgers rapide gesunken war, obwohl die Kultivierung ab diesem Zeitpunkt nur in Proliferationsmedium ohne Zusätze stattgefunden hatte.

Tag 13: Wie die nachfolgenden Angaben belegen, war es bis dahin zu einem weiteren Verlust an Zellen gekommen:

Kontrolle Ø DNA	10%
Tet-Off/rE1A 12S	15%
Tet-Off/rc- <i>myc</i>	15%

Trotzdem wurden die noch vorhandenen Zellen turnusgemäß umgesetzt [5°], wobei die angebotene Fläche um das 4- bis 4,75-fache reduziert worden war. Dies sollte den eventuell wichtigen interzellulären Kontakt zwischen den humanen SC ermöglichen. Außerdem wurde für diesen Tag auf Ab-Zusätze verzichtet.

Medium Ø Ab

Tag 14: Um Wachstum oder Abnahme der Zellen im weiteren beurteilen zu können, wurden die Zellen wiederum mikroskopisch beurteilt.

Kontrolle Ø DNA	fast keine Zellen adhärent
Tet-Off/rE1A 12S	mind. 20% adhärent
Tet-Off/rc- <i>myc</i>	ca. 10% adhärent

Mediumwechsel mit **150 µg G418** und **6 µg Hygromycin**

Tag 18: Eine schleichende Abnahme der humanen SC war zu vermerken:

Kontrolle Ø DNA	keine Zellen mehr
Tet-Off/rE1A 12S	ganz viele abgestorbene Zellen, noch ca. 5% adhärent
Tet-Off/rc- <i>myc</i>	wenige, aber morphologisch intakt aussehende Zellen, ca. 5% adhärent

Die Konzentrationen der Antibiotika wurden weiter reduziert.

Mediumwechsel mit **75 µg G418** und **4 µg Hygromycin**

Mediumwechsel mit der zuletzt genannten Ab-Kombination erfolgte in diesem Zwischenzeitraum 7-tägig.

Tag 48: In der Tet-Off/rc-*myc*-Anwendung waren bis dahin alle Zellen tot. Lediglich in der Tet-Off/rE1A 12S-Bedingung hatten wenige Zellen in flächenmäßig ausgedehnten Zellansammlungen überlebt.

Mediumwechsel mit **75 µg G418** und **4 µg Hygromycin**

Tag 52: Diese Zellen sollten nochmals vorsichtig auf eine neue Beschichtungsmatrix umgesetzt werden [6°]. Dazu wurden alle Lösungen und eine 96-Loch-Platte mit geradem Boden auf 37°C vorgewärmt. Nach dem Ablösen mit Trypsin wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem 20 µl-Volumen bei Schräglage des Kulturgefäßes auf dem kleinstmöglichen Areal ausgesät.

Medium Ø Ab

Tag 53: Trotz erstaunlich hoher Anzahl an übertragenen Zellen konnten sich nur wenige adhären festsetzen. Deshalb wurde ein angedachter Medienwechsel auf den nächsten Tag verlegt.

Tag 54: Bei Durchsicht der 96-Loch-Vertiefung konnten insgesamt 20 morphologisch intakte humane Schwannzellen ausgemacht werden.

Tag 62: Es war nur noch eine einzelne Zelle zu finden.

Mit diesem Befund wurde dieser dritte Versuch der stabilen Transfektion eingestellt und damit das Vorhaben beendet, auf diese Weise einen immortalisierten humanen Schwannzell-Klon zu erhalten.

## 4. Diskussion

Humane Schwannzellen spielen sowohl bei der Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen als auch bei Nervenregeneration und Therapie nach Nervenschädigung eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund ist es von klinischem Interesse, die Natur der humanen Schwannzellen genauer zu untersuchen. Für diese Studien ist es essentiell, eine große Anzahl dieser Zellen zur Verfügung zu haben. Diese Voraussetzung ist allerdings zum einen durch deren schwere Zugänglichkeit über Multiorganspenden, zum anderen durch ein geringes Proliferationsvermögen und eine schnell eintretende Seneszenz eingeschränkt. Um dieses Manko beheben zu können, wäre es wünschenswert, eine permanente humane Schwannzell-Linie zu generieren. Zu diesem Zwecke sollte zur Übertragung eines immortalisierenden Onkogens ein System entwickelt werden, welches eine effiziente Gentransfer-Methode mit einem hochspezifischen Regulationssystem vereint. Ausgewählt wurden dafür als Genvehikel Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV-Vektoren) sowie als Regulationssystem das induzierbare Tet-Genexpressionssystem.

### 4.1. Herstellung der Vektoren für die AAV-Tet-Systeme

Vor Entwicklung der in dieser Arbeit verwendeten AAV-Tet-Konstrukte mußten folgende Punkte berücksichtigt werden: (a) Verwendung der zur Aufrechterhaltung des AAV-Lebenszykluses essentiellen Sequenzen, (b) Aufnahmekapazität an Fremd-DNA durch AAV-Virionen, (c) Zwei-Vektoren-System, (d) Selektionsmöglichkeit und (d) Orientierung der Transkriptions-Kassetten.

Ad (a): Erstmals wurde das Adeno-assoziierte Virus als viraler Transduktionsvektor bei Hermonat und Muzyczka (1984) verwendet. Sie entfernten das AAV Kapsidgen und setzten an dessen Stelle ein bakterielles Neomycin-Gen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors ein. Mit der Absicht, das benötigte Minimum an AAV-Sequenzen, die eine Transduktion zulassen, und damit den größtmöglichen Raum für Fremd-DNA zu eruieren, entwickelte McLaughlin *et al.* (1988) den Vektor dl 3-94. Dieses AAV-Konstrukt enthielt nur das rechte und das linke AAV *inverted terminal repeat* und zusätzliche, dem rechten TR benachbarte 139 bp nichtrepetitive Sequenzen. Aus diesem Vektorkonstrukt waren die AAV ITRs entnommen worden, um den dieser Arbeit zugrundeliegenden AAV-Ausgangsvektor pTR<sub>BS</sub>-UF (Zolotukhin *et al.*, 1996) herzustellen. Wie verschiedene Studien bewiesen haben (McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989), sind diese Sequenzen ausreichend für die AAV DNA Replikation, die Verpackung der viralen DNA, die Integration des AAV-Provirus sowie das Ausschneiden des integrierten

Genoms. Weiterführende Untersuchungen haben inzwischen sogar gezeigt, daß selbst eine 165 bp lange, aus Teilen der TR-Palindrome zusammengesetzte Sequenz als *cis*-Element für den AAV-Lebenszyklus allein ausreichen kann (Xiao *et al.*, 1997).

Ad (b): Vorgabe für die Konstruktion der geplanten Vektoren war desweiteren, daß nur rekombinante AAV-Partikel effizient verpackt werden können, die eine Größe zwischen 50% und 110% des Wildtyp-Genoms (4680 bp) aufweisen. Versuche mit einer Verpackungseinheit von 120% zeigten bereits eine weitaus geringere Verpackungseffizienz (Muzyczky, 1992). Aus diesem Grund wurde bei der Klonierung darauf geachtet, daß alle Vektorinserts in dem tolerablen Bereich von 2340-5150 bp lagen. Während diese Bedingung bei den übrigen Vektoren ohne weiteres eingehalten werden konnte, mußte das *c-myc*-Gen auf geeignete Restriktionsschnittstellen hin untersucht werden, um dieser Limitierung zu genügen. Nach Abzug des pBS-Vektoranteils ergab sich anschließend für das regulierte *c-myc*-Konstrukt eine Verpackungsgröße von ca. 5120 bp, die damit an der äußersten Grenze lag.

Ad (c): Bezüglich der Wahl Zwei-Vektoren-System versus Ein-Vektor-System wurde die binäre Anwendung aus verschiedenen Gründen favorisiert. Ausgangspunkt der Überlegungen war die Beobachtung, daß eine Koinfektion der beiden Konstrukte auch zu einer Tandem-Kointegration führen kann (Yin *et al.*, 1996; Clontech Produktprotokoll, 1996). Dadurch kann es zu einer unerwünschten Basalexpression des benachbarten Zielgens kommen, die durch auf dem Regulatorplasmid gelegene Enhancer-Elemente verursacht werden kann. Deshalb sollte für den angestrebten viralen Gentransfer die Möglichkeit offen bleiben, sowohl eine Simultaninfektion als auch eine in kurzen Abständen nacheinander erfolgende Infektion durchführen zu können. Neben anderen Vorteilen hatte gerade dieses Charakteristikum, Zellen wiederholt infizieren zu können, zu der initialen Entscheidung für das Adeno-assoziierte Virus beigetragen. Für dieses Vorhaben war es somit eine notwendige Voraussetzung, die beiden Tet-Komponenten auf zwei separaten Vektoren unterzubringen. Ein wichtiges Kriterium in diesem Zusammenhang war die Größe der Konstrukte. Einerseits durch die Verpackungskapazität des AAVs limitiert, andererseits aber - zur Selektion der modifizierten Zellen *in vitro* - auf Resistenzgene angewiesen, führte auch dieser Umstand dazu, zwei getrennte AAV-Konstrukte zu verwenden. Zudem erlaubte diese Strategie, das Verhältnis der eingesetzten Plasmide zwischen dem Transaktivator und dem Antwort-Vektor zu variieren.

Allerdings erfordert dieser binäre Versuchsansatz das seltenere Ereignis eines Doppeltransfers beider Komponenten in ein und dieselbe Zelle. Jedoch stellten verschiedene Gruppen bei Verwendung von Einkassetten-Vektoren fest, daß dem Vorteil, beide regulatorische Elemente

auf jeden Fall in einer Zelle vorzufinden, ein erheblicher regulatorischer Nachteil gegenübersteht: Es wurde eine signifikante Basalaktivität detektiert, woraus eine geringere Induzierbarkeit des Systems resultierte (Ho *et al.*, 1996; Fotaki *et al.*, 1997).

Inzwischen wurde das hier bevorzugte Zwei-Vektoren-System auch in Kombination mit einem adenoviralen System erfolgreich eingesetzt. In einer ersten *in vitro*-Arbeit an primären Hippocampus-Neuronen etabliert (Harding *et al.*, 1997), wurde dieses Ad-Tet-System von Harding *et al.* (1998) über stereotaktische Injektion in die Region des Hippocampus von Ratten übertragen. Zum einen durch die Trennung der regulatorischen Einheiten bedingt, zum anderen durch ein unterschiedlich gewähltes Verhältnis von Transaktivator zu reguliertem EGFP-Konstrukt beeinflusst, wurde keine intrinsische Aktivierung des Minimalpromotors verzeichnet. Indem Doxycyclin dem Trinkwasser der Tiere zugegeben bzw. daraus entfernt wurde, konnte die Genexpression an, dann ab und anschließend wieder angeschaltet werden.

Ad (d): Die Verwendung von Selektionsmarkern hatte in dieser Arbeit zwei Aufgaben. Zum einen sollten die modifizierten Zellen selektiert werden, zum anderen sollte durch Selektionsdruck eine Integration gefördert, zumindest aber das Ausschleußen der Transgene aus der Zelle verhindert werden. Dies und die Tatsache, bei Simultantransduktion anstelle von vier nur zwei Vektoren einsetzen zu müssen, begründete das Klonieren von Transgeneinheit und Selektionsmarker in ein gemeinsames Konstrukt. Um die verschiedenen Systeme übergreifend miteinander kombinieren zu können, enthielten die Regulatorkonstrukte das Neomycingen, wohingegen alle Zielplasmide über das Hygromycin B-Resistenzgen verfügten.

Ad (e): Trotz verschiedener Berichte, die den AAV ITRs entweder eine generelle Rolle bei der Transkription absprachen (Labow *et al.*, 1986; Tratschin *et al.*, 1986) oder diese nur bei Anwesenheit der *rep*-Gene und des Adenovirus vermuteten (Beaton *et al.*, 1989), sollte jeglicher, von den TRs ausgehender Transkription vorgebeugt werden. Aus diesem Grund wurden die Vektoren so konstruiert, daß sowohl der Transkriptionsstart der jeweiligen Tet-Komponente als auch der der Selektionskassette von der Mitte des Konstrukts ausging und damit in *antisense*-Richtung zu den *terminal repeats* lagen. Wichtig war diese Klonierungsstrategie vor allem in Bezug auf den Minimalpromotor in der Tet-regulierten Promotoreinheit TRE. Denn so konnte selbst bei angenommener ITR-Induktion eine von dieser Einheit initiierte Basalaktivität sicher ausgeschlossen werden. Zusätzlich gewährleistete die gewählte Lage der beiden genutzten Promotoren zueinander eine jeweils entgegengesetzt gerichtete Transkription, wodurch ein mögliches Überlesen der Stop-Elemente am Ende der Selektionseinheit nicht zu einer Expression des Transgens führen kann.

Diese in der vorliegenden Arbeit gewählte Klonierungsstrategie wird durch die neuesten Untersuchungen von Haberman *et al.* (2000) untermauert: Selbst mit dem Problem der Basalaktivität in ihrem AAV-Tet-System konfrontiert (Haberman *et al.*, 1998), sah sich diese Gruppe veranlaßt, die AAV ITRs genauer zu beleuchten. Ausgangspunkt war die Vermutung, daß in ihrem „in Reihe“ konstruierten Vektor mit der Folge [AAV ITR/TRE/GFP/polyA-Signal/AAV ITR] der Minimalpromotor oder *cis*-aktive Elemente wie die AAV ITRs zur detektierten Aktivität beitragen. Mittels Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, daß bereits - ohne Vorliegen des Tet-abhängigen Promotors - eine Initiation der GFP-Expression von den AAV ITRs alleine ausgehen kann. Damit wurde bewiesen, daß die AAV ITRs über Transkriptionselemente verfügen und die in der vorliegenden Arbeit gewählte Transkriptfolge eine Basalaktivität, ausgehend von den ITRs, vermeiden kann.

## 4.2. Etablierung der AAV-Tet-Vektorsysteme

### 4.2.1. Etablierung der Tet-Regulationseinheit

Nach der Konstruktion der AAV-Tet-Vektoren mußte deren Wirksamkeit bewiesen werden. Im Hinblick auf die spätere Anwendung wurden diese Etablierungsversuche bereits am ausgewählten Zelltyp, den Schwanzzellen, vorgenommen. Bedingt durch die limitierende Anzahl an humanen Schwanzzellen, wurden die Austestungen bezüglich der Tet-Regulation vorerst jedoch anhand von Schwanzzellen aus der Ratte durchgeführt.

Da bekannt war, daß nicht jeder Zelltyp mit dem Tet-Regulationssystem kompatibel sein muß (Gossen *et al.*, 1993; Howe *et al.*, 1995), sollte die Wirksamkeit anhand von transienten Transfektionsanalysen überprüft werden. Dabei sollte sowohl auf die maximal erzielte Expressionshöhe als auch auf eine eventuell vorliegende Basalexpression geachtet werden (Ackland-Berglund und Leib, 1995; Yin *et al.*, 1996). Letztere kann durch zwei verschiedene Prinzipien verursacht werden: Liegen in der Zelle sowohl der Transaktivator als auch das Zielplasmid vor, und wird über ein Tetracyclin-Derivat die Expression reguliert, so kann anhand der verbleibenden Basalaktivität die Effektivität der Regulation abgelesen werden (= Basalaktivität nach Regulation). Hingegen geht nach singulärer Transfektion des Zielplasmids die intrinsische Aktivität allein vom Tet-regulierten Element TRE (= Konstrukt-Basalaktivität) aus und gibt Auskunft darüber, inwieweit der vorliegende Minimalpromotor für den favorisierten Zelltyp geeignet ist (Hoffmann *et al.*, 1997).

Um die genannten Punkte abzuklären, wurde das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) als Indikatorgen verwendet. Dieses bot den Vorteil, einerseits schnell detektiert werden zu können, andererseits ermöglichte es eine Beobachtung der EGFP-Expression über einen längeren Zeitraum an den gleichen unfixierten, lebenden Zellpopulationen.

Aus den in Kap. 3.2. durchgeführten Versuchen ist zusammenzufassen, daß alle drei Tet-Regulations-Systeme zu einer signifikanten EGFP-Expression führen und durch tetracyclische Substanzen effizient reguliert werden. Eine allein vom Minimalpromotor ausgehende intrinsische Aktivität war in den Rattenschwanzzellen nicht gemessen worden.

Als effektivstes System stellte sich das originäre Tet-Off-System heraus. Es erzielte nach 48 Std die höchste Expression und zeigte über den beobachteten Verlauf die niedrigste Basalexpression nach Regulation. Daraus resultierte die größte Induzierbarkeit (243-fach nach 48 Std).

Im Vergleich dazu konnte die auto-Tet-Off-Variante mit ähnlich hohen Expressionswerten aufwarten. Diese waren allerdings einen Tag später zu beobachten, da das System erst „anlaufen“ mußte. Diese Verzögerung wurde auch dadurch belegt, daß die Intensität innerhalb einer Zelle am ersten Tag nur verhältnismäßig schwach war. Das gegenüber dem Basis-System beschriebene höhere Expressionsmaximum, welches aber auch mit einer induzierten Transaktivator-Konzentration einhergeht, konnte in meinen Versuchen nicht festgestellt werden. Damit korreliert aber auch, daß Effekte wie morphologische Veränderungen oder ein vermindertes Zellwachstum, die von einer anderen Gruppe beobachtet wurden (Gallia und Khalili, 1998), ausblieben. Jedoch trat bei dieser Anwendung im reprimierten Zustand verstärkt eine Basalaktivität auf. Diese wurde auch von Shockett und Schatz (1996), die dieses System propagierten, beobachtet.

Ebenfalls erst nach 72 Std und zudem im Vergleich niedriger, war ein EGFP-Maximum beim Tet-On-System zu registrieren. Diese zeitliche Verzögerung könnte am Prinzip dieses Systems liegen: Durch Doxycyclin wird die Transkription des Transgens erst in Gang gesetzt und das Verstoffwechsell des Tetracyclin-Derivats braucht in Rattenschwanzzellen offenbar Zeit. Insgesamt gesehen – niedrigster Expressionsgrad gepaart mit durchaus meßbarer Basalaktivität nach Regulation – konnte diese Tet-Variante in Schwanzzellen am wenigsten überzeugen. Ein von Harding vorgelegter Vergleich zwischen dem Tet-Off-System und dessen reversem Pendant (Harding *et al.*, 1997) ergab bezüglich der Expressionshöhe sowie der Induzierbarkeit die gleichen Ergebnisse: Tet-Off > Tet-On. Allerdings wurden keine Unterschiede nach Regulation in der Höhe der basalen Aktivitäten registriert.

Um die Wirksamkeit auch im Zusammenhang mit weiteren Funktionsgenen zu demonstrieren, war das Tet-Off-System mit den für die verschiedenen Onkogene E1A 12S und *c-myc* kodierenden Zielkonstrukten kombiniert worden. Dabei stellten sich zwei interessante Beobachtungen heraus: Erstens waren im stimulierten Zustand ganz erhebliche Unterschiede in der Anzahl an positiven Zellen zu verzeichnen. Zweitens schwankte die Konstrukt-Basalaktivität signifikant.

Eine Transfektionseffizienz von rE1A 12S >> rEGFP >> *rc-myc* macht deutlich, daß die zu erreichende maximale Expressionshöhe immer im Bezug zum verwendeten Transgen steht. Diese Erfahrung beschreiben auch Sturtz *et al.* (1998), bei denen sich die Expression von drei sezernierten Proteinen unter ansonst gleichen Bedingungen stark unterschied.

Ebenfalls in diesem Kontext muß die Beurteilung der Minimalpromotor-Einheit gesehen werden. Während weder für das rEGFP-Konstrukt noch für das regulierte *c-myc*-Plasmid eine intrinsische Aktivität detektiert wurde, verhielt sich dies beim regulierten E1A 12S-Konstrukt nicht so. Zwar war eine 37-fache Repression erzielt worden, doch stellte sich anhand vereinzelter E1A-exprimierender Zellen heraus, daß die Undurchlässigkeit des Tet-abhängigen Elements TRE immer im Zusammenhang mit den umliegenden Transgensequenzen steht. Interessanterweise sahen Harding *et al.* (1997) bei ihrem Ad-Tet-System nur eine marginale Basalexpression, obgleich deren reguliertes EGFP-Konstrukt ebenfalls mögliche störende Enhancer-Elemente auf dem adenoviralen Anteil enthielt.

Als Fazit kann aus diesen Untersuchungen mit transfizierten Rattenschwanzzellen festgehalten werden:

- (a) Die konstruierten AAV-Tet-Vektoren sind funktionsfähig und mit Rattenschwanzzellen kompatibel.
- (b) Die induzierte Basalaktivität des Minimalpromotors wird bei diesen Transfektionsversuchen nicht durch Komponenten der Wirtszelle hervorgerufen, sondern resultiert aus Wechselwirkungen des verwendeten Minimalpromotors mit seiner direkten Sequenzumgebung.

## 4.2.2. Etablierung des AAV-vermittelten Gentransfers

### Infektion von humanen Schwanzzellen

#### Produktion der rAAV-Virionen

Für den AAV-vermittelten Gentransfer wurden die rekombinanten AAV-Stöcke als Rohlysat-Präparationen hergestellt. Diese Aufarbeitung wurde in verschiedenen Studien (Walsh *et al.*, 1992; Kaplitt *et al.*, 1994; Doll *et al.*, 1996) für die *in vitro*-Infektion bevorzugt, da z. B. noch Rep-Proteine in geringen Mengen und andere, nicht genau definierte Komponenten enthalten waren. Diesen wurde eine Infektions-stimulierende Wirkung zugeschrieben (Tenenbaum *et al.*, 1999). Allerdings ist bei dieser Methode nicht immer ausgeschlossen, daß - bei zu hohem Anteil dieser Komponenten - auch eine toxische Wirkung von den erzeugten Stöcken ausgehen kann.

Mit den folgenden rAAV-Vektoren wurden Virusstöcke produziert und deren Titer bestimmt: Mit dem Tet-Off- und dem auto-Tet-Off-Transaktivator wurden die Regulatorkonstrukte ausgewählt, die in den Vorversuchen am effizientesten waren. Von den Tet-abhängigen Zielpasmiden wurde im Hinblick auf die angestrebte Anwendung jeweils von beiden Onkogen-Konstrukten ein rekombinanter Virusstock propagiert. Darüberhinaus wurde für Standardisierungsversuche ein rAAV-Stock mit dem konstitutiv exprimierten EGFP hergestellt.

Während für das Tet-Off-Konstrukt mit dieser Methode (Kaplitt *et al.*, 1994) sehr hochtitrige Virusstöcke im Bereich von  $10^8$  IU/ml erzeugt werden konnten und damit für die anschließenden Versuche mit  $5 \times 10^8$  IU/ml aus 4 Präparationen genügend Virionen zur Verfügung standen, fiel das Resultat bei der Titerbestimmung des autoregulierten Transaktivators deutlich niedriger aus. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf diesen Regulator-Vektor verzichtet. Die geringe Ausbeute bei diesem Konstrukt als auch die Ausbeute an regulierten *c-myc*-Virionen, die gegenüber den anderen Viruspräparationen ebenfalls etwas niedriger lag, standen sicherlich in Zusammenhang mit der begrenzten Aufnahmekapazität des AAVs. Obgleich beide Konstrukte mit 106% und 109% der Größe des wtAAV-Genoms noch im tolerablen Bereich (bis 110%) lagen (Hermonat und Muzyczka, 1984), ist die Verpackung von rekombinanten Virus-Partikeln mit einer Gesamtgröße von über 100% offensichtlich trotzdem erschwert.

Da das Adeno-assoziierte Virus inzwischen für die Gentherapie „entdeckt“ wurde, bestand in den letzten Jahren ein starkes Interesse an Verbesserungen bezüglich der Herstellung dieser Virionen. Klar zu favorisieren, gerade im Hinblick auf Applikationen *in vivo*, sind die durch effizientere

Methoden aufgereinigten Stöcke. Zwar fehlen dergleichen zuvor beschriebene Komponenten, aber die erzielten Titer sind um Potenzen höher und, durch zusätzliche Elimination von toxischen Einflüssen, können sie in hohen *multiplicities of infections* (MOIs) eingesetzt werden. Bei Verwendung *in vivo* ist diese Abtrennung sogar unerlässlich, um einer möglichen Immunantwort vorzubeugen. Ein weiterer Meilenstein bei der Herstellung der viralen Stöcke war die Entwicklung eines Helfervirus-freien Systems (Xiao *et al.*, 1998). Bei diesem liegen die essentiellen Helferfunktionen auf einem Plasmid, wodurch kein bioaktiver Adenovirus mehr eingesetzt werden muß. Diese Möglichkeit der Produktion sowie die genannte verbesserte Aufreinigung ermöglichen es inzwischen, absolut Adenoviren-freie, hochtitrige rAAV-Stöcke zu generieren. Darüberhinaus konnten auch effizientere Verpackungs-Zelllinien für deren Propagierung etabliert werden (Inoue und Russell, 1998).

#### Infektion mit den rAAV-Virionen

Um die Permissivität von Schwanzzellen gegenüber rAAV-Virionen zu testen, wurden keine Schwanzzellen aus der Ratte, sondern sofort humane Schwanzzellen verwendet. Dies sollte jeglichen Einfluß von Speziesunterschieden ausschalten.

Erste Versuche wurden mit dem konstitutiv exprimierten EGFP durchgeführt. Damit konnten eventuelle Schwierigkeiten außer acht gelassen werden, die sich aus einer nicht erfolgten Doppelinfektion oder einer unwirksamen Regulation mit dem binären System ergeben würden. Als Kontroll-Zelllinie wurden HEK 293-Zellen mitgeführt. Diese ließen sich zu 60% infizieren und bewiesen damit die Infektiosität des in dieser Arbeit propagierten Virusstocks. Demgegenüber waren bei humanen Schwanzzellen zwar ebenfalls EGFP-exprimierende Zellen gefunden worden, aber in einer überraschend geringen Transduktionseffizienz. Die maximale Infektionseffizienz in diesem Versuch lag bei 2,5% bei einer *multiplicity of infection* von 5. Eine weitere Erhöhung der MOI bei gleicher Infektionszeit brachte nicht die erwartete Infektionssteigerung, sondern ließ die Zellen absterben. Dieser Befund machte deutlich, daß MOI und Infektionszeit stark miteinander assoziiert sind und aufeinander eingestellt werden müssen.

Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden die humanen Schwanzzellen mit der Kombination Tet-Off/rE1A 12S sowie der Kombination Tet-Off/*rc-myc* infiziert. Für eine Optimierung wurden unter anderem die Parameter MOI, Infektionszeit und Serumgehalt im Medium variiert. Leider konnte in keinem der Ansätze eine Expression des humanen *c-myc*-Gens bei der Doppelinfektion mit dem Transaktivator und diesem Onkogen gefunden werden. Anders dagegen beim kombinierten Einsatz des Regulators mit dem E1A 12S-Onkogen: Bei Erhöhung der MOI

bzw. der Infektionszeit konnte - immer unter Berücksichtigung der jeweils anderen Komponente - eine geringe Steigerung der Infektionseffizienz erzielt werden. Ebenfalls war ein leichter Anstieg an positiven Zellen bei einem Serumgehalt von 10% sowie einem strikteren Zentrifugationsschritt zu registrieren. Letztendlich konnten aber nicht mehr als 6% E1A 12S-infizierte humane Schwannzellen detektiert werden.

Zudem mußte festgestellt werden, daß die Höhe der E1A 12S-exprimierenden Zellen sowohl mit als auch ohne den Tet-Off-Transaktivator im aktivierten System gleich hoch war und damit der Transaktivator in diesem Fall offensichtlich keine Regulationsfunktion besaß.

Die Möglichkeit, daß diese unregulierbare E1A-Expression von einer Adenovirus-Kontamination verursacht wurde, konnte definitiv ausgeschlossen werden.

In der Zwischenzeit sind zahlreiche mögliche Ursachen bekannt, die diese äußerst schwache Permissivität von humanen Schwannzellen bewirken können. Die anfängliche Euphorie bezüglich der Transduktionskraft von Adeno-assoziierten Viren, die noch zu Beginn der vorliegenden Arbeit vorherrschte, mußte im Laufe der Zeit einer differenzierteren Sicht weichen. Während man ursprünglich davon ausgegangen war, daß das AAV eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen (Lebkowski *et al.*, 1988; Muzyczka, 1992; Podsakoff *et al.*, 1994), darunter auch differenzierte Zellen, sich nichtteilende Zellen sowie Zellen primären Ursprungs infizieren kann, ist zwischenzeitlich bekannt, daß die Transduktionseffizienz der AAV-Vektoren in verschiedenen Zellen und Geweben *in vitro* wie *in vivo* starken Schwankungen unterliegt. Früher auf das einfache Schema (a) Virus-Aufnahme und Auspacken des Genoms, (b) Konversion des Einzelstrang-Genoms in seine Doppelstrang-Form und (c) Integration des proviralen Genoms reduziert, ist das heutige Wissen bis zum Integrationsprozeß auf mehrere Stationen ausgedehnt: Bindung des Virus, Endozytose, Prozessieren in den Endosomen, Transport zum Nukleus, Auspacken, Genkonversion. Nach wie vor wird die Konversion des viralen Einzelstranggenoms in ein für die Transkription geeignetes Doppelstrang-Intermediat als größtes Hindernis gesehen (Ferrari *et al.*, 1996). Verschiedene Ansätze physikalischer (Alexander *et al.*, 1994), chemischer (Russel *et al.*, 1995) sowie biologischer Natur (Fisher *et al.*, 1996) haben sich bereits mit diesem Problem befaßt.

Fortschritte wurden auch auf der Suche nach Rezeptoren und Korezeptoren erzielt: Ausgehend von der Arbeit über ein 150 kD großes Zellmembranprotein (Mizukami *et al.*, 1996) wurden inzwischen ein Heparinsulfat-Proteoglycan-Rezeptor (Summerford und Samulski, 1998), FGFR-1 (Qing *et al.*, 1999), ein  $\alpha V\beta 5$  Integrin Korezeptor (Summerford *et al.*, 1999) und EGF-R,

interagierend mit ssD-BP, (Mah *et al.*, 1998) als solche identifiziert. Nach neuesten Erkenntnissen kann auch die Polarität von Zellverbänden eine wichtige Rolle spielen, wie Untersuchungen an Epithelien der Luftwege zeigen (Duan *et al.*, 2000).

Abschließend ist anzumerken, daß Untersuchungen bezüglich der genannten Rezeptoren und beeinflussenden Faktoren für den Zelltyp 'Schwanzzelle' bis jetzt noch nicht vorliegen. Ein eventuell auch auf die humanen Schwanzzellen anwendbarer, interessanter Ansatz der Transduktionssteigerung ist die Manipulation der Virushülle. Indem Teile von Rezeptorliganden beim AAV-Gentransfer mitübertragen werden, kann die Virusaufnahme erleichtert werden (Bartlett *et al.*, 1999).

#### **4.2.3. Transfektion von humanen Schwanzzellen**

Bereits in mehreren Arbeiten vorgestellt und nach den ersten Infektionsergebnissen parallel durchgeführt, sollten die rAAV-Vektoren durch Transfektion in humane Schwanzzellen übertragen werden. Ebenfalls mittels konstitutiv exprimiertem EGFP eingeführt, konnte mit dem Transfektionsreagenz FuGene eine Transfektionseffizienz von 8,7% erreicht werden. Unter Einbezug verschiedener Versuchsparameter wie DNA/FuGene-Konzentration, Verhältnis Transaktivator/Zielgen, mit und ohne Tetracyclin sowie Zelldichte (Daten nicht gezeigt) wurden im folgenden nach Doppeltransfektion für die Tet-Off/rE1A 12S-Kombination 10%, für die Anwendung Tet-Off/*rc-myc* 2,2% an transfizierten Zellen ermittelt. Zudem wurde über Tetracyclin für beide Kombinationen eine 100%ige Regulation erreicht. Zwar war im Falle des E1A 12S-Onkogens wiederum eine Basalexpression zu verzeichnen, aber durch Vergleich konnte diese Basalaktivität allein dem rAAV-Konstrukt zugeschrieben werden. Bei einem stabilen Gentransfer können derartige Zellklone durch Regulationsversuche ausgemustert werden und deshalb ist dieser Befund vernachlässigbar.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß der Tet-Off-Transaktivator und das jeweilige Onkogen in humane Schwanzzellen mittels Transfektion eingebracht werden kann, und eine Regulation möglich ist. Damit wurde die Basis für die nachfolgende Anwendung geschaffen. Mit 7,6% für E1A 12S (9,9% E1A 12S-positive Zellen bei Doppeltransfektion im aktivierten System – 2,3% E1A 12S-positive Zellen durch die Konstrukt-Basalaktivität) und 2,2% für *c-myc* wurde von dem anfänglichen Vorhaben eines sequentiellen Transfers abgerückt.

Aber eine Simultantransfektion von Tet-Off und Onkogen konnte auch bei diesen Effizienzwerten durchaus erfolgversprechend sein. Einerseits durch Selektion konzentriert, andererseits auf eine immortalisierende Wirkung abzielend, sollte der Versuch unternommen werden, eine humane Schwanzzell-Linie zu generieren.

#### 4.2.4. Infektion versus Transfektion

Betrachtet man diese Transferversuche nicht nur von der Warte der Anwendung, so sind neben den Funktionsparametern Effizienz und Regulation noch weitere interessante Unterschiede zwischen Transfektion und Infektion auszumachen. Ein Vergleich des zeitlichen Expressionsverlaufs z.B. untermauert den unterschiedlichen Mechanismus, dem die jeweilige Methode unterliegt. Die Plasmide werden nach Transfektion aufgenommen, und es kann sofort eine Transkription von ihnen ausgehen (gemessenes Maximum der Expression am zweiten Tag). Hingegen müssen die rAAV-Virionen erst ihrem biologisch vorgegebenen Weg des aktiven Virus folgen, bis von ihnen als Provirus oder - wie verschiedentlich gezeigt – von der episomalen Form das Fremdgen exprimiert werden kann.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist je nach Transfermethode die unterschiedliche basale E1A-Expression. Vergleicht man bei der Transfektion die Konstrukt-Basalaktivität mit der Basalaktivität nach Regulation, so muß ein Enhancer-Element auf der E1A 12S-Sequenz als Auslöser vermutet werden. Denn das System zeigt im aktivierten Zustand eine hohe Expression und wird damit auch durch den Tet-Off-Transaktivator reguliert. Demgegenüber ist nach Infektion die - eigentlich durch den Transaktivator - stimulierte Expression genauso hoch wie die Konstrukt-Basalaktivität. Damit geht keine Regulation durch den Tet-Off-Aktivator aus. Dies kann zweierlei Ursachen haben: Entweder der Transaktivator ist unwirksam oder die E1A 12S-Expression wird durch eine physiologische Wechselwirkung zwischen E1A 12S und den AAV ITRs hervorgerufen. Durch diese Interaktion bedingt, wäre auch eine gleichzeitige Initiation der Transkription sowohl durch einen zellulären als auch durch den Tet-Off-Hybridaktivator denkbar.

In eine ähnliche Richtung deuten die Beobachtungen hinsichtlich des Expressionsmusters von E1A 12S. Bei der Transfektion sind erwartungsgemäß in der Mehrzahl die Nuklei der transfizierten Zellen angefärbt, und nur vereinzelt wird eine irreguläre zytoplasmatische Expression registriert. Diese weist vermutlich auf stattgefundenere Mutationsereignisse hin. Wie Douglas und Quinlan (1994) anhand von Mutationsversuchen zeigen konnten, ist eine nukleäre Lokalisation des E1A 12S-Proteins ausschlaggebend für die immortalisierende Wirkung.

Während diese zytoplasmatische Verteilung nach Infektion ausbleibt, fällt - neben der nukleären - jedoch ein weiteres Expressionsmuster auf. Dabei handelt es sich um dicht mit E1A 12S gepackte, extranukleäre Organellen. Verfolgt man deren Auftreten, so ergeben sich interessante Beobachtungen:

- 48 Stunden nach Infektion noch kaum zu bemerken, nimmt deren Anzahl bis zum vierten Tag, dem Tag des Expressionsmaximums zu.
- Ebenfalls ein Anwachsen dieser „Pünktchen“ ist bei Erhöhung der MOI festzustellen. Ersteres steht hierbei in einem überproportionalen Verhältnis zu letzterem.
- Demgegenüber ist diese Expressionsform bei keinem der in diesen Infektionsversuchen entstandenen Klonen gesehen worden. Auch die Bedingung E1A 12S ohne Transaktivator weist gegenüber Tet-Off/rE1A 12S nur wenige dieser Zellorganellen auf.

Subsumiert man diese Beobachtungen, so können folgende Aussagen und Vermutungen getroffen werden:

- (a) Bereits das isolierte E1A 12S-Gen ist nach Infektion am viralen Weg der rAAV-Vektoren beteiligt, obgleich diese nur über die AAV ITRs verfügen und keinerlei AAV *rep*-Sequenzen - den eigentlichen Interaktionspartnern des E1A-Proteins - enthalten.
- (b) Bei diesen Zellorganellen könnte es sich um einen zellulären Schutzmechanismus handeln. Zellen mit diesem eingekapselten E1A 12S-Protein sind nicht teilungsfähig oder verlieren das Gen beim Teilungsvorgang. → Die E1A 12S-exprimierenden Zellen der entstandenen Klone besitzen diese Organellen nicht.
- (c) Ein Überschuß an Transaktivator-Protein könnte dabei eine Rolle spielen.

### 4.3. Anwendung des AAV-Tet-Off-Systems

In diesem Teil der Arbeit sollte das AAV-Tet-kontrollierte System angewandt werden. Durch stabilen Gentransfer sollten die jeweiligen regulierbaren Onkogen-Systeme auf humane Schwanzzellen übertragen und so eine immortalisierte humane Schwanzzell-Linie etabliert werden. Verschiedene Aspekte sind dabei für eine erfolgreiche Umsetzung entscheidend:

- Menge des Zellmaterials
- hinreichende Transfektionseffizienz
- Verträglichkeit des Tetracyclins
- Selektion durch optimale Antibiotika-Konzentrationen
- Zell-Zell-Kommunikation
- immortalisierende Wirkung der Onkogene

#### 4.3.1. Humane Schwanzzellkulturen

Da die humanen Schwanzzellen verschiedentlich als limitierender Faktor genannt werden, soll hier kurz auf die Hintergründe eingegangen werden. Bei humanen Schwanzzellen handelt es sich um primäre, gliale Zellen aus dem peripheren Nervensystem. Einerseits durch ihre geringe Proliferationsfähigkeit, andererseits durch einen schnellen Alterungsprozeß bedingt ist eine Kultivierung dieser Zellen schwierig. Erst verbesserte Zellkulturbedingungen, insbesondere die Anwendung eines rekombinant hergestellten Heregulins (Rutkowski *et al.*, 1995) machen es heute möglich, humane Schwanzzellen in größeren Mengen in Kultur zu halten. Nach wie vor können sie aber nur über relativ kurze Zeiträume propagiert werden. Mit der von uns angewandten Methode ist es möglich, sie über ca. sechs Passagen zu führen, wobei sie einmal in der Woche auf neue Kulturgefäße umgesetzt werden (Hanemann *et al.*, 1998). Dabei können die humane Schwanzzellen bis zur zweiten Passage expandiert werden, bevor ihre Anzahl durch Zelltod langsam absinkt.

Während primäre SC aus der Ratte bereits unter Mitogeneinfluß eine Spontanimmortalisierung erfahren können (Porter *et al.*, 1987), ist dies bei humanen Schwanzzellen nicht möglich. Diese Beobachtungen werden auch durch einen Vergleich der spontanen Immortalisierungsrate bestätigt: Bei Nagern liegt diese bei  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$ , beim Menschen hingegen ist sie mit  $10^{-12}$  deutlich geringer (Katakura *et al.*, 1998).

Darüberhinaus wurde von Peden *et al.* (1990) eine Rattenschwanzzell-Linie beschrieben, die durch ein SV40 *large tumor antigen*-Gen unter einem regulierbaren Maus Metallothionin I-Promotor immortalisiert wurde. Der Versuch, dieses System auf den humanen Zelltyp zu übertragen, scheiterte (persönliche Mitteilung von L. Rutkowski).

Neben der Verwendung möglichst niedriger Passagen spielte auch die Verfügbarkeit sowie die Herkunft des Ausgangsmaterials eine Rolle. Aus den Nerven des Plexus lumbosacralis von Multiorganspendern (ca. 4 Spenden/Jahr) konnten humane Schwanzzellen mit einer Zellausbeute von  $2 \times 10^3$ /mg Faszikelgewicht gewonnen werden. Wie hinsichtlich der Proliferationsrate und der Lebensspanne gezeigt wurde (Boyer *et al.*, 1994), hat ebenso das Alter des Spenders einen Einfluß auf diese Zellen. Für die Vorversuche stammten die humane SC dabei von Multiorganspendern, die meist ca. 50 Jahre und älter waren. Die Durchführung des stabilen Gentransfers erfolgte dagegen mit humanen Schwanzzellen von jüngeren Spendern.

#### **4.3.2. Verträglichkeit der tetracyclischen Substanzen**

Desweiteren sollte generell - auch im Hinblick auf weitere Anwendungen - gewährleistet sein, daß die Effektoren Tetracyclin und Doxycyclin weder in kurzen Perioden noch unter Langzeitkultivierung toxisch auf humane Schwanzzellen wirken. Anhand des Chemosensitivitätstests in Kap. 3.6.2. konnte jeglicher zytotoxischer Effekt im für die Regulation therapeutischen Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden. Interessanterweise kam es sogar zu einem leichten Anstieg der Absorptionmessungen unter dem Einfluß der tetracyclischen Substanzen. Dies kann entweder auf eine Stimulierung der Dehydrogenasen in den metabolisch aktiven Zellen zurückgeführt werden, oder begründet sich auf einen milden positiven Effekt, der durch die Tetracyclinderivate auf das Zellwachstum ausgeübt wird. Eine ähnliche Beobachtung, detektiert durch leicht erhöhte Mengen an sezernierten Proteinen, beschrieben auch Sturtz *et al.* (1998). Bemerkenswert bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch ist, daß dieser Zuwachs für die jeweilige Substanz gerade mit deren Wirkbereich vergesellschaftet ist.

#### **4.3.3. Stabiler Gentransfer**

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Transfektion mit angeschlossener Selektion wurde erfolgreich auf Rattenschwanzzellen angewandt. Es ließ sich dabei ein EGFP-Klon herstellen, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Mikroinjektion in den postkommissuralen Fornix über sechs Monate das grün fluoreszierende Protein exprimierte (Wosch *et al.*, 2001,

Manuskript in Vorbereitung). Zwar konnten bei den humanen Schwanzzellen - sowohl mit dem E1A 12S- als auch mit dem *c-myc*-Onkogen - Klone gefunden werden (Abb. 35), aber eine Expansion dieser Klone war leider nicht möglich. Die auftretenden Schwierigkeiten werden im folgenden kurz diskutiert:

- Bis dahin proliferierend, starben etwa am achten Tag nach Selektionsbeginn die Mehrzahl der Zellen ab, wodurch anschließend kein ausreichender Zell-Zell-Kontakt mehr gegeben war. Deswegen wurden die Zellen am sechsten Tag umgesetzt, damit am achten Tag die größtmögliche Zelldichte vorlag. Dies sollte eine weitere Kommunikation zwischen den verbleibenden humanen Schwanzzellen erleichtern.
- Die Mobilität der vorhandenen Zellen führte zu einem Auseinanderdriften der erhaltenen Klone. Durch eine mindestens vierfache Reduktion der Aussaatfläche sollten die Zellen nach Passage dementsprechend wieder konzentriert werden.
- Trotz sukzessiver Antibiotika-Reduktion bis unter den ermittelten Grenzbereich starben die Zellen ab. Selbst der Einsatz der darunter liegenden Konzentrationskombination von 150 µg/ml G418 und 6 µg/ml Hygromycin B von Beginn an im dritten Ansatz brachte jedoch keinen Erfolg.
- Die in der ersten Transfektion entstandenen Klone befanden sich 23 Tage auf ein und derselben Kulturschale, starben aber nach dem Umsetzen ab. Dies läßt sich möglicherweise auf eine verstärkte Einbettung der Zellen in die Lamininmatrix zurückführen. Aus diesem Grunde wurden die humanen Schwanzzellen in den beiden folgenden Ansätzen routinemäßig im 7-Tages-Rhythmus passagiert.
- Zellen starben auch bei der geringsten Ab-Kombination nach dem Passagieren ab. Auch ein Kultivieren mit Proliferationsmedium ohne Antibiotika-Zusatz konnte das Zellsterben nach dem Umsetzen nicht verhindern.
- Nach dem Passagieren der Klone wurde nur ein schwaches Anheften der transfizierten Zellen verzeichnet. Deswegen sollte das Anwärmen sämtlicher Lösungen und Gerätschaften diese Adhäsion unterstützen.

Bei dieser Transfektion mit nachfolgender Selektion konnten für beide Onkogene Klone hergestellt werden; diese ließen sich aber nicht expandieren. Nach dem Passagieren setzten sich die Zellen entweder nicht ab oder starben langsam als adhärenente Zellen ab. Dies kann verschiedene Ursachen haben:

- Die Antibiotika wirken - einzeln oder zusammen - irreparabel schädigend auf die humanen Schwanzzellen.
- Die Komponenten AAV/Transaktivator/Onkogen sind - einzeln oder im Zusammenspiel - dafür verantwortlich: Anfangs durch die Selektionsmarker gegenüber den nicht transfizierten humanen Schwanzzellen zunächst im Vorteil, können kurzfristig Klone ausgebildet werden. Mit der Zeit entfaltet der AAV-Transaktivator-Onkogen-Komplex aber eine toxische Wirkung, wodurch die humanen transfizierten Schwanzzellen schließlich absterben.
- Die Klone unterliegen dem normalen Alterungsprozeß, da entweder die Expression der Onkogene ausbleibt oder die exprimierten Onkogene nicht immortalisierend wirken.

#### **4.3.4. Wirksamkeit dieser AAV-Tet-Onkogen-Anwendung**

Obwohl eine Klonierung reliabel erzielt wurde, konnten die erhaltenen Klone nicht expandiert werden. Von zentraler Bedeutung ist hierbei das Ausbleiben einer durch Immortalisierung induzierten Proliferation der geklonten Zellen. Zur Abklärung einer dafür nötigen Expression wurden Klone der ersten Transfektion am Tag 14 einer Immunfärbung unterzogen.

Anhand der Beobachtungen konnten folgende Schlüsse gezogen werden: Es wurden unter Verwendung des Kernfarbstoffs DAPI sowohl für das humane *c-myc* als auch für das E1A 12S-Onkogen Zellansammlungen nachgewiesen, welche von Einzelzellen und Zellgrüppchen begleitet waren. Die Anzahl an distinkten Klonen belief sich dabei auf <10 bei Tet-Off/*rc-myc* und <25 bei Tet-Off/rE1A 12S-Einsatz.

Obgleich bei der transienten Transfektion der humanen Schwanzzellen mit der *c-myc*-Anwendung positive Zellen ermittelt wurden (Kap. 3.5.2.), konnte bei keinem der Klone - weder im angeschalteten noch im abgeschalteten Modus - eine c-Myc-Expression detektiert werden. Dadurch konnte auch keine immortalisierende Wirkung auf die humanen Schwanzzellen ausgeübt werden.

Anders dagegen bei der E1A 12S-Anwendung. Hier wurden E1A 12S-exprimierende Zellen sowohl im Verband als auch als Einzelzellen nachgewiesen. Wie aus den Vorergebnissen nach transients Transfektion erwartet, war dies für beide Regulationsmodi, mit und ohne Tetracyclin, der Fall. Dabei standen 3 Klone im abgeschalteten System ca. dreimal sovielen Klonen im über

den gesamten Zeitraum aktivierten System gegenüber. Die mittels DAPI detektierten zusätzlichen Klone zeigten hingegen keine E1A 12S-Expression. Verschiedene Ursachen könnten in diesem Fall für eine ausbleibende Immortalisierung verantwortlich sein. E1A 12S kann mit den unterschiedlichsten zellulären Transkriptionsfaktoren (z. B. NF  $\kappa$ B) und Koaktivatoren (z. B. p300, pRB) interagieren (Parker *et al.*, 1997). Aufgrund eines unterschiedlich vorliegenden Expressionsmusters je nach Zelltyp und Wirtsspezies wird möglicherweise die Stimulation der DNA-Synthese in humanen Schwannzellen durch derartige Wechselwirkungen in eine Repression umgekehrt. Auch ist eine Interaktion mit dem Tet-Off-Hybridaktivator selbst denkbar - sei es direkt oder indirekt z. B. über das multifunktionelle Protein p300. Auch der Einfluß des Transaktivator-Proteins bei Langzeitexpression selbst ist bei humanen Schwannzellen bis dato nicht bekannt.

Ein weiterer, entscheidender Faktor bei diesem Versuch war die sehr geringe Anzahl der erhaltenen Klone. Wie in verschiedenen Studien beschrieben wurde, müssen - selbst bei einem vorliegenden Tet-Off-Klon und unter Verwendung von permanenten Zelllinien - eine große Anzahl an mit dem Zielplasmid transfizierten Klonen untersucht werden, um optimal regulierte Klone zu erhalten. Als Gründe dafür werden die Integrationsumgebung sowohl des Transaktivators als auch des regulierten Zielgens genannt (Yin *et al.*, 1996).

Zusammengefaßt ergab sich bei der Anwendung von Onkogenen auf humane Schwannzellen folgendes:

- (a) Im Falle des adenoviralen Onkogens konnten E1A 12S-exprimierende Klone gefunden werden. Eine Immortalisierung der Zellen blieb aber offensichtlich aus.
- (b) Beim *c-myc*-Onkogen wurden ebenso Klone erzeugt; mangels Expression konnte aber keine Immortalisierung erzielt werden.
- (c) Ein limitierender Faktor dieses Versuchs war die geringe Anzahl an erhaltenen Klonen. Ein Ansatz mit einer größeren Menge an Ausgangszellen ist folglich prinzipiell erfolgversprechender.

## 5. Ausblick

Das AAV-Tet-System vereinigt die wichtigen Eigenschaften hocheffizienter Regulierbarkeit und wirksamen Gentransfers in ausgezeichneter Weise. Bei der ersten Anwendung auf humane Schwanzzellen konnte zwar infolge deren diffiziler Biologie keine Immortalisierung erreicht werden; dies schmälert aber nicht das immense Potential des AAV-Tet-Systems. Insbesondere ist diese Methode für die Gentherapie prädestiniert. Dies resultiert vor allem aus der Möglichkeit einer Langzeit-Genexpression ohne Toxizität und ohne Immunantwort gepaart mit einer präzisen Langzeit-Regulation.

Inzwischen haben dieses AAV-Tet-System folgende Arbeitsgruppen ausgetestet: Rendahl *et al.* (1998) koinfizierten zwei separate rAAV-Vektoren direkt in den Skelettmuskel von adulten immunkompetenten Mäusen. Während der eine Vektor den Tet-Off-Transaktivator kodierte, enthielt das zweite Konstrukt ein induzierbares Erythropoetin-Transgen aus der Maus. Durch Zugabe oder Entfernen von Tetracyclin wurde die Transkription über das Trinkwasser gesteuert. Weder eine zelluläre noch eine humorale Immunantwort konnte festgestellt werden.

Ebenfalls mit dem Ziel, durch eine kontrollierte Erythropoetin-Expression die Erythropoese zu stimulieren, beschäftigte sich die Gruppe um J. M. Heard. Während sie in einer ersten Studie (Bohl *et al.*, 1997) das Tet-On/Epo-System durch zwei retrovirale Vektoren *in vitro* auf Muskelzellen übertrug und diese anschließend transplantierte, wurde dieser Transfer - im Hinblick auf eine praktikierbare Applikation beim Menschen - in den weiteren Arbeiten (Bohl *et al.*, 1998; Bohl und Heard, 2000) via eines AAV-Einkassetten-Konstrukts direkt ins Muskelgewebe von Mäusen ausgeführt. Auch hier konnte durch An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin als Effektor die Serumkonzentration von Epo über einen Zeitraum von 29 Wochen reguliert werden. Mit dem Bestreben, neurologische Erkrankungen beeinflussen zu können, wurde ein AAV-autoTet-Off-Vektor im Labor von R. J. Samulski eingesetzt. Dazu wurde ein Einzelvektor konstruiert, auf dem sowohl der Tet-Off-Transaktivator als auch ein GFP-Gen unter der Kontrolle eines Tet-regulierten Promotors standen. Nach Mikroinjektion ins Gehirn von Ratten konnte anhand der Transkription des Chromophors einerseits eine Langzeit-Expression untersucht werden. Andererseits wurde durch Einfluß von Doxycyclin die Regulation sowie der Wechsel zwischen an- und ausgeschaltetem System beobachtet. Die in dieser Studie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufgetretene Basalaktivität im inaktivierten Modus ist möglicherweise durch die bereits angesprochene regulatorische Funktion der AAV ITRs hervorgerufen worden. (Haberman *et al.*, 2000).

---

Neben den AAV-Vektoren wurden auch andere virale Systeme – in der Mehrzahl retroviralen Ursprungs - mit dem Tet-System kombiniert. Dabei erfolgte die Transduktion der beiden Tet-Komponenten entweder über zwei separate Vektoren (Lindemann *et al.*, 1997) oder mittels eines Einkassetten-Konstrukts (Paulus *et al.*, 1996; Hoshimaru *et al.*, 1996). Auch bei dem Adeno-vermittelten Gentransfer gibt es diese beiden Varianten (Harding *et al.*, 1998; Corti *et al.*, 1999).

Aufbauend auf dieser Arbeit sollte zur Immortalisierung humaner Schwannzellen ein modifizierter Zwei-Vektoren-Ansatz gewählt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sind humane Schwannzellen für rekombinante AAV-Vektoren nur gering permissiv. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, bietet es sich an, die rAAV-Vektoren durch GALV-pseudotypische Retroviren zu ersetzen. Letztere werden primär bei sich teilenden Zellen verwendet; inzwischen konnte aber gezeigt werden, daß humane Schwannzellen für diese Form der Retroviren permissiv sind: Es kommt zu einer 55 %-igen Transduktionseffizienz (Schulze *et al.*, 2001, Manuskript in Vorbereitung). Bei einem derartigen Ansatz ist die Erfolgsaussicht *a priori* als gut einzuschätzen.

## 6. Zusammenfassung

Schwannzellen sind eine der Hauptkomponenten des peripheren Nervensystems. Sie entstammen der Neuralleiste und wandern mit den Axonen in die Peripherie. Im Anschluß daran werden die Schwannzellen zu ruhenden Zellen und differenzieren unter dem Einfluß Axon-assoziiierter Signale aus. Dabei entstehen zwei Phänotypen, die nicht-myelinisierenden und die myelinisierenden Schwannzellen. Letztere sind für die Ausbildung der Myelinscheide verantwortlich. Genetische Veränderungen können jedoch zu einem pathologischen Verhalten dieser Zellen und damit zu Neuropathien oder Tumorerkrankungen beim Menschen führen. Aus diesem Grund ist es klinisch relevant, die Biologie der humanen Schwannzellen besser zu verstehen. Für solche Studien ist es notwendig, diese Zellen in großer Anzahl untersuchen zu können. Diese Voraussetzung ist allerdings zum einen durch deren schwere Zugänglichkeit über Multiorgan-spenden eingeschränkt, zum anderen durch ein geringes Proliferationsvermögen und eine schnell eintretende Seneszenz erschwert. Um diesen Umstand beheben zu können, wäre es wünschenswert, eine permanente humane Schwannzell-Linie zu generieren. Zu diesem Zwecke sollte zur Übertragung eines immortalisierenden Onkogens ein System entwickelt werden, welches eine effiziente Gentransfer-Methode mit einem hochspezifischen Regulationssystem vereint.

Für die Genübertragung wurde der Transfer mittels Adeno-assoziiertem Virus (AAV) gewählt, als Regulationssystem diente das induzierbare Tet-Genexpressionssystem. Dabei standen mit Tet-Off, Tet-On und autoTet-Off verschiedene Varianten des Regulationssystems zur Verfügung. Basierend auf der Zwei-Vektor-Strategie, wurde für jedes Transaktivatorprotein jeweils ein Regulatorplasmid und für die beiden ausgewählten Onkogene E1A 12S und *c-myc* sowie für das Chromophor EGFP ein Zielplasmid konstruiert.

Mittels transienter Transfektionsversuche konnte die Funktionsfähigkeit und das Regulationsvermögen dieser AAV-Tet-Vektorsysteme in Schwannzellen der Ratte und des Menschen bestätigt werden. Insgesamt betrachtet stellte sich das originäre Tet-Off-System als effektivstes System heraus: Neben der höchsten Stimulation der Genexpression war die Inaktivierung ebenfalls am effizientesten.

Daraufhin wurden von den verschiedenen Konstrukten rekombinante AAV-Partikel hergestellt. Nach Infektion dieser Virionen stellte sich jedoch heraus, daß - im Gegensatz zu ebenfalls untersuchten HEK 293-Zellen - humane Schwannzellen eine geringe Permissivität gegenüber Adeno-assoziierten Viren aufweisen. Wie inzwischen aufgrund des verstärkten Interesses an AAV-Vektoren bekannt wurde, hängt deren Aufnahme und Transport zum Teil von bestimmten Rezeptoren, zum Teil von verschiedenen Abbauprozessen ab, die wiederum in den einzelnen Zelltypen variieren.

Via Transfektion und nachfolgender Selektion konnten dennoch pro Tet-Off/Onkogen-Kombination mehrere humane Schwannzell-Klone gewonnen werden. Diese konnten jedoch nicht propagiert werden. Ob dies in einer fehlenden immortalisierenden Wirkung der Onkogene begründet war, oder ob das *in vitro*-Verhalten von humanen Schwannzellen dafür verantwortlich war, konnte aufgrund der limitierenden humanen Schwannzell-Menge nicht abschließend geklärt werden.

## 7. Literatur

- Ackland-Berglund, C.E. & Leib, D.A. (1995). Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* **18**, 196-200.
- Alexander, I.E., Russell, D.W. & Miller, A.D. (1994). DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J.Virol.* **68**, 8282-8287.
- Amati, B. & Land, H. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**, 102-108.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1995). *Curr.Protocols.Mol.Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Balague, C., Kalla, M. & Zhang, W.W. (1997). Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J.Virol.* **71** , 3299-3306.
- Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C. & Samulski, R.J. (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat.Biotechnol.* **17**, 181-186.
- Bartlett, P.F., Reid, H.H., Bailey, K.A. & Bernard, O. (1988). immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**, 3255-3259.
- Beaton, A., Palumbo, P. & Berns, K.I. (1989). Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J.Virol.* **63**, 4450-4454.
- Berns, K.I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiol.Rev.* **54**, 316-329.
- Berns, K.I. & Linden, R.M. (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* **17** , 237-245.
- Bethesda Research Laboratories. (1986). BRL pUC host: E. coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> competent cells. *Bethesda Research Laboratories Focus* **8**, 9
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* **7**, 1513-1523.
- Blochlinger, K. & Diggelmann, H. (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol.Cell Biol.* **4**, 2929-2931.

- Bohl, D., Naffakh, N. & Heard, J.M. (1997). Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat.Med.* **3**, 299-305.
- Bohl, D., Salvetti, A., Moullier, P. & Heard, J.M. (1998). Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* **92**, 1512-1517.
- Bohl, D. & Heard, J.M. (2000). Delivering erythropoietin through genetically engineered cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* **11** Suppl. 16, 159-162.
- Boissy, R. & Astell, C.R. (1985). An Escherichia coli recBCsbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene* **35**, 179-185.
- Boyer, P.J., Tuite, G.F., Dauser, R.C., Muraszko, K.M., Tennekoon, G.I. & Rutkowski, J.L. (1994). Sources of human Schwann cells and the influence of donor age. *Exp.Neurol.* **130**, 53-55.
- Brockes, J.P., Fields, K.L. & Raff, M.C. (1979). Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* **165**, 105-118.
- Bueler, H. (1999). Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol.Chem.* **380**, 613-622.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Clontech Produktprotokoll (1996). *Tet-Off<sup>TM</sup> and Tet-On<sup>TM</sup> Gene Expression Systems and Cell Lines* User Manual. # PT3001-1. Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
- Corti, O., Sabate, O., Horellou, P., Colin, P., Dumas, S., Buchet, D., Buc-Caron, M.H. & Mallet, J. (1999). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat.Biotechnol.* **17**, 349-354.
- Doll, R.F., Crandall, J.E., Dyer, C.A., Aucoin, J.M. & Smith, F.I. (1996). Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther.* **3**, 437-447.

- Douglas, J.L. & Quinlan, M.P. (1994). Efficient nuclear localization of the Ad5 E1A 12S protein is necessary for immortalization but not cotransformation of primary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **5**, 475-483.
- Du, B., Wu, P., Boldt-Houle, D.M. & Terwilliger, E.F. (1996). Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther.* **3**, 254-261.
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J. & Engelhardt, J.F. (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J.Clin.Invest.* **105**, 1573-1587.
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z. & Engelhardt, J.F. (2000). A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat.Med.* **6**, 595-598.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol.Cell Biol.* **7**, 379-387.
- During, M.J., Xu, R., Young, D., Kaplitt, M.G., Sherwin, R.S. & Leone, P. (1998). Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat.Med.* **4**, 1131-1135.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. & Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-128.
- Evans, D.G., Sainio, M. & Baser, M.E. (2000). Neurofibromatosis type 2. *J.Med.Genet.* **37**, 897-904.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J.Virol.* **70**, 3227-3234.
- Fisher, K.J., Gao, G.P., Weitzman, M.D., DeMatteo, R., Burda, J.F. & Wilson, J.M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J.Virol.* **70**, 520-532.
- Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S.E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. & Wilson, J.M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat.Med.* **3**, 306-312.
- Fotaki, M.E., Pink, J.R. & Mous, J. (1997). Tetracycline-responsive gene expression in mouse brain after amplicon-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **4**, 901-908.

- Fuhrmann, G., Rosenberger, G., Grusch, M., Klein, N., Hofmann, J. & Krupitza, G. (1999). The MYC dualism in growth and death. *Mutat.Res.* **437**, 205-217.
- Gallia, G.L. & Khalili, K. (1998). Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* **16**, 1879-1884.
- Gopalakrishnan, S., Douglas, J.L. & Quinlan, M.P. (1997). immortalization of primary epithelial cells by E1A 12S requires late, second exon-encoded functions in addition to complex formation with pRB and p300. *Cell Growth Differ.* **8**, 541-551.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Bonin, A.L. & Bujard, H. (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends.Biochem.Sci.* **18**, 471-475.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1995). Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* **19**, 213-216.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-74.
- Gritz, L. & Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**, 179-188.
- Gutmann, D.H. (1997). Molecular insights into neurofibromatosis 2. *Neurobiol.Dis.* **3**, 247-261.
- Haberman, R.P., McCown, T.J. & Samulski, R.J. (1998). Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther.* **5**, 1604-1611.
- Haberman, R.P., McCown, T.J. & Samulski, R.J. (2000). Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J.Virol.* **74**, 8732-8739.
- Hanemann, C.O., Rosenbaum, C., Kupfer, S., Wosch, S., Stoegbauer, F. & Muller, H.W. (1998). Improved culture methods to expand Schwann cells with altered growth behaviour from CMT1A patients. *Glia* **23**, 89-98.

- Hann, S.R., King, M.W., Bentley, D.L., Anderson, C.W. & Eisenman, R.N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* **52**, 185-195.
- Harding, T.C., Geddes, B.J., Noel, J.D., Murphy, D. & Uney, J.B. (1997). Tetracycline-regulated transgene expression in hippocampal neurones following transfection with adenoviral vectors. *J.Neurochem.* **69**, 2620-2623.
- Harding, T.C., Geddes, B.J., Murphy, D., Knight, D. & Uney, J.B. (1998). Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system. *Nat.Biotechnol.* **16**, 553-555.
- Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Hermonat, P.L. & Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 6466-6470.
- Hibi, T., Fujisawa, T., Kanai, T., Akatsuka, A., Habu, S., Handa, H. & Tsuchiya, M. (1991). Establishment of epithelial cell lines from human and mouse thymus immortalized by the 12S adenoviral E1a gene product. *Thymus* **18**, 155-167.
- Ho, D.Y., McLaughlin, J.R. & Sapolsky, R.M. (1996). Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **41**, 200-209.
- Hoffmann, A., Villalba, M., Journot, L. & Spengler, D. (1997). A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic.Acids.Res.* **25**, 1078-1079.
- Hoshimaru, M., Ray, J., Sah, D.W. & Gage, F.H. (1996). Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 1518-1523.
- Howe, J.R., Skryabin, B.V., Belcher, S.M., Zerillo, C.A. & Schmauss, C. (1995). The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270**, 14168-14174.
- Inoue, N. & Russell, D.W. (1998). Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. *J.Virol.* **72**, 7024-7031.

- Kaplitt, M.G., Leone, P., Samulski, R.J., Xiao, X., Pfaff, D.W., O'Malley, K.L. & During, M.J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat.Genet.* **8**, 148-154.
- Karpati, G., Lochmuller, H., Nalbantoglu, J. & Durham, H. (1996). The principles of gene therapy for the nervous system. *Trends.Neurosci.* **19**, 49-54.
- Katakura, Y., Alam, S. & Shirahata, S. (1998). Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol.* **57**: 69-91.
- Kelekar, A. & Cole, M.D. (1987). Immortalization by c-myc, H-ras, and Ela oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses. *Mol.Cell Biol.* **7**, 3899-3907.
- Knudson, A.G.J. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **68**, 820-823.
- Kraus, V.B., Moran, E. & Nevins, J.R. (1992). Promoter-specific trans-activation by the adenovirus E1A12S product involves separate E1A domains. *Mol.Cell Biol.* **12**, 4391-4399.
- Labow, M.A., Hermonat, P.L. & Berns, K.I. (1986). Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J.Virol.* **60**, 251-258.
- Land, H., Chen, A.C., Morgenstern, J.P., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. (1986). Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* **6**, 1917-1925.
- Lebkowski, J.S., McNally, M.M., Okarma, T.B. & Lerch, L.B. (1988). Adeno-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol.Cell Biol.* **8**, 3988-3996.
- Levi, A.D., Guenard, V., Aebischer, P. & Bunge, R.P. (1994). The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J.Neurosci.* **14**, 1309-1319.
- Levi, A.D., Bunge, R.P., Lofgren, J.A., Meima, L., Hefti, F., Nikolics, K. & Sliwkowski, M.X. (1995). The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J.Neurosci.* **15**, 1329-1340.
- Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S. & Mulligan, R.C. (1997). Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol.Med.* **3**, 466-476.

- Mah, C., Qing, K., Khuntirat, B., Ponnazhagan, S., Wang, X.S., Kube, D.M., Yoder, M.C. & Srivastava, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J.Virol.* **72**, 9835-9843.
- McCarty, D.M., Christensen, M. & Muzyczka, N. (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J.Virol.* **65**, 2936-2945.
- McLaughlin, S.K., Collis, P., Hermonat, P.L. & Muzyczka, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J.Virol.* **62**, 1963-1973.
- Mizukami, H., Young, N.S. & Brown, K.E. (1996). Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* **217**, 124-130.
- Morello, D., Lavenu, A., Pournin, S. & Babinet, C. (1993). The 5' and 3' non-coding sequences of the c-myc gene, required in vitro for its post-transcriptional regulation, are dispensable in vivo. *Oncogene* **8**, 1921-1929.
- Morgenbesser, S.D. & DePinho, R.A. (1994). Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer. *Semin.Cancer Biol.* **5**, 21-36.
- Muzyczka, N. (1992). Use of Adeno-associated Virus for Mammalian Cells. *Curr.Topics.Microbiol.Immun.*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Mymryk, J.S., Shire, K. & Bayley, S.T. (1994). Induction of apoptosis by adenovirus type 5 E1A in rat cells requires a proliferation block. *Oncogene* **9**, 1187-1193.
- Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. & Aguilar-Cordova, E. (1997). Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat.Med.* **3**, 808-811.
- Parker, S.F., Felzien, L.K., Perkins, N.D., Imperiale, M.J. & Nabel, G.J. (1997). Distinct domains of adenovirus E1A interact with specific cellular factors to differentially modulate human immunodeficiency virus transcription. *J.Virol.* **71**, 2004-2012.
- Pasternack, M., Floerchinger, C.S. & Hunninghake, G.W. (1996). E1A-induced immortalization of rat type II alveolar epithelial cells. *Exp.Lung.Res.* **22**, 525-539.
- Paulus, W., Baur, I., Boyce, F.M., Breakefield, X.O. & Reeves, S.A. (1996). Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells. *J.Virol.* **70**, 62-67.
- Peden, K.W., Rutkowski, J.L., Gilbert, M. & Tennekoon, G.I. (1990). Production of Schwann cell lines using a regulated oncogene. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **605**, 286-293.

- Peel, A.L., Zolotukhin, S., Schrimsher, G.W., Muzyczka, N. & Reier, P.J. (1997). Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther.* **4**, 16-24.
- Philip, R., Brunette, E., Kilinski, L., Muruges, D., McNally, M.A., Ucar, K., Rosenblatt, J., Okarma, T.B. & Lebkowski, J.S. (1994). Efficient and sustained gene expression in primary T lymphocytes and primary and cultured tumor cells mediated by adeno-associated virus plasmid DNA complexed to cationic liposomes. *Mol.Cell Biol.* **14**, 2411-2418.
- Podsakoff, G., Wong, K.K.J. & Chatterjee, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J.Virol.* **68**, 5656-5666.
- Porter, S., Glaser, L. & Bunge, R.P. (1987). Release of autocrine growth factor by primary and immortalized Schwann cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 7768-7772.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V. & Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat.Med.* **5**, 71-77.
- Quinlan, M.P. & Douglas, J.L. (1992). Immortalization of primary epithelial cells requires first- and second-exon functions of adenovirus type 5 12S. *J.Virol.* **66**, 2020-2030.
- Quinlan, M.P. (1994). Enhanced proliferation, growth factor induction and immortalization by adenovirus E1A 12S in the absence of E1B. *Oncogene* **9**, 2639-2647.
- Rendahl, K.G., Leff, S.E., Otten, G.R., Spratt, S.K., Bohl, D., Van, R.M., Donahue, B.A., Cohen, L.K., Mandel, R.J., Danos, O. & Snyder, R.O. (1998). Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat.Biotechnol.* **16**, 757-761.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. & Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol.Cell Biol.* **14**, 1669-1679.
- Ruley, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606.
- Russell, D.W., Alexander, I.E. & Miller, A.D. (1995). DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 5719-5723.
- Rutkowski, J.L., Kirk, C.J., Lerner, M.A. & Tennekoon, G.I. (1995). Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat.Med.* **1**, 80-83.

- Sambrook, J.F. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M. & Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**, 2077-2081.
- Samulski, R.J., Chang, L.S. & Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J.Virol.* **63**, 3822-3828.
- Scherer, S.S. (1997). The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr.Opin.Neurol.* **10**, 386-397.
- Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N. & Schatz, D.G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 6522-6526.
- Shockett, P.E. & Schatz, D.G. (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 5173-5176.
- Snyder, R.O., Miao, C., Meuse, L., Tubb, J., Donahue, B.A., Lin, H.F., Stafford, D.W., Patel, S., Thompson, A.R., Nichols, T., Read, M.S., Bellinger, D.A., Brinkhous, K.M. & Kay, M.A. (1999). Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat.Med.* **5**, 64-70.
- Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwand, L.A. (1998). *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Spotts, G.D., Patel, S.V., Xiao, Q. & Hann, S.R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol.Cell Biol.* **17**, 1459-1468.
- Spreyer, P., Kuhn, G., Hanemann, C.O., Gillen, C., Schaal, H., Kuhn, R., Lemke, G. & Muller, H.W. (1991). Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J.* **10**, 3661-3668.
- Stichel, C.C., Hermanns, S., Lausberg, F. & Muller, H.W. (1999). Effects of schwann cell suspension grafts on axon regeneration in subacute and chronic CNS traumatic injuries. *Glia* **28**, 156-165.
- Strom, S.C., Faust, J.B., Cappelluti, E., Harris, R.B. & Lalwani, N.D. (1991). Characterization of liver epithelial cells transfected with myc and/or ras oncogenes. *Dig.Dis.Sci.* **36**, 642-652.

- Sturtz, F.G., Cioffi, L., Wittmer, S., Sonk, M.J., Shafer, A., Li, Y., Leeper, N.J., Smith-Gbur, J., Shulok, J. & Platika, D. (1998). Tetracycline-regulatable expression vectors tightly regulate in vitro gene expression of secreted proteins. *Gene* **221**, 279-285.
- Summerford, C. & Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J.Virol.* **72**, 1438-1445.
- Summerford, C., Bartlett, J.S. & Samulski, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat.Med.* **5**, 78-82.
- Tenenbaum, L., Hamdane, M., Pouzet, M., Avalosse, B., Stathopoulos, A., Jurysta, F., Rosenbaum, C., Hanemann, C.O., Levivier, M. & Velu, T. (1999). Cellular contaminants of adeno-associated virus vector stocks can enhance transduction. *Gene Ther.* **6**, 1045-1053.
- Timmerman, V., Nelis, E., Van, H.W., Nieuwenhuijsen, B.W., Chen, K.L., Wang, S., Ben, O.K., Cullen, B., Leach, R.J. & Hanemann, C.O. (1992). The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat.Genet.* **1**, 171-175.
- Tratschin, J.D., Tal, J. & Carter, B.J. (1986). Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product. *Mol.Cell Biol.* **6**, 2884-2894.
- Walsh, C.E., Liu, J.M., Xiao, X., Young, N.S., Nienhuis, A.W. & Samulski, R.J. (1992). Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 7257-7261.
- Xiao, X., deVlaminck, W. & Monahan, J. (1993). Adeno-associated virus (AAV) vectors for gene transfer. *Adv.Drug Deliv.Rew.* **12**, 201-215.
- Xiao, X., Xiao, W., Li, J. & Samulski, R.J. (1997). A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J.Virol.* **71**, 941-948.
- Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J.Virol.* **72**, 2224-2232.
- Yakobson, B., Koch, T. & Winocour, E. (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J.Virol.* **61**, 972-981.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

- Yarranton, G.T. (1992). Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* **3**, 506-511.
- Yin, D.X., Zhu, L. & Schimke, R.T. (1996). Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal.Biochem.* **235**, 195-201.
- Zerler, B., Moran, B., Maruyama, K., Moomaw, J., Grodzicker, T. & Ruley, H.E. (1986). Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol.Cell Biol.* **6**, 887-899.
- Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W.W., Guy, J. & Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J.Virol.* **70**, 4646-4654.

## 8. Abkürzungen

AAV	<b>A</b> deno-assoziertes <b>V</b> irus
Ab	<b>A</b> ntibiotikum
Ad	<b>A</b> denovirus
Amp	<b>A</b> mpicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	<b>B</b> asenpaar
BrdU	<b>B</b> romdesoxyuridin
Ci	<b>C</b> urie
CMT	<b>C</b> harcot- <b>M</b> arie- <b>T</b> ooth-Neuropathie
CPE	<i>cytopatic effect</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CsCl	<b>C</b> äsiumchlorid
DAPI	4', 6- <b>D</b> iamidino-2- <b>p</b> henylindol-dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	<b>D</b> esoxyribonucleicacid
Dox	Doxycyclin
E1A	<i>early region 1A</i> des Adenovirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<b>E</b> thylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetale calf serum</i>
FITC	<b>F</b> luorescein-5- <b>i</b> sothiocyant
F/T	<i>freezing/ thawing</i>
GAR	<i>goat-anti-rabbit</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HCl	<b>H</b> ydrochlorid
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HSV	<b>H</b> erpes- <b>S</b> implex- <b>V</b> irus
hygro	Hygromycin B Phosphotransferase
IBMX	3- <b>I</b> sobutyl-1- <b>M</b> ethylxanthin
IE	<i>immediate early</i>
IgG	<b>I</b> mmunglobulin <b>G</b>
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
IU	<i>infectious unit</i>
kb	<b>K</b> ilobase
kDa	<b>K</b> ilo <b>D</b> alton
LB	<b>L</b> uria- <b>B</b> roth- <b>M</b> edium
μ	Mikro

m	<b>M</b> eter
m	<b>M</b> illi
M	<b>M</b> ol
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOS	<b>M</b> ultiorganspender
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NEAA	<i>nonessential amino acids</i>
neo	Neomycin-Phosphotransferase II
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
OD	<b>o</b> ptische <b>D</b> ichte
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PFA	<b>P</b> araformaldehyd
PLL	<b>P</b> oly- <b>L</b> -Lysin
PMP	<b>p</b> eripheres <b>M</b> yelinprotein 22 kDa
PMS	<b>P</b> henazin- <b>m</b> ethosulfat
PNS	<b>p</b> eripheres Nervensystem
rAAV	<b>r</b> ekombinantes <b>A</b> denoassoziiertes <b>V</b> irus
RCA	<i>Replication Center Assay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<b>R</b> oswell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute
RT	<b>R</b> aumtemperatur
SD	<b>S</b> pleiß- <b>D</b> onorstelle
Std	<b>S</b> tunde
SV40	<i>simian virus 40</i>
Tc	Tetracyclin
TRITC	<b>T</b> etramethyl <b>r</b> hodamin- <b>5</b> - <b>i</b> sothiocyant
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	<b>ü</b> ber <b>N</b> acht
UV	<b>U</b> ltraviolett
wt AAV	<b>W</b> ildtyp-AAV
ZNS	<b>z</b> entrales Nervensystem