

Entwicklung einer tumorspezifischen Suizidgentherapie für Neuroblastome

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

vorgelegt von
Sabine Steffens
aus
Bingen/Rhein

Düsseldorf 2001

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

Referent: Prof. Dr. U. Göbel

Koreferent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2001

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	1
I. Material und Methoden.....	7
1. Herkunft der verwendeten Materialien.....	7
1.1. Chemikalien	7
1.2. Enzyme.....	7
1.3. DNA-Oligonukleotide.....	7
1.4. Plasmide.....	8
1.4.1. Prokaryotische Expressionsvektoren.....	8
1.4.2. Eukaryotische Expressionsvektoren.....	8
1.4.3. Retrovirusvektoren.....	9
1.5. Antikörper/Antiseren.....	9
1.6. Zellkultur.....	9
1.6.1. Fibroblasten-Zelllinien	9
1.6.2. Tumor-Zelllinien	9
1.6.3. Retrovirus-Verpackungszelllinien.....	10
1.6.4. Zellkulturmedien.....	10
1.6.5. Transfektionsreagenzien.....	10
1.6.6. Antibiotika, Zytostatika.....	10
1.7. Sonstiges	10
2. Methoden	11
2.1. Molekularbiologische Techniken.....	11
2.1.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation.....	11
2.1.2. Isolierung von Nukleinsäuren	11
2.1.2.1. Plasmid-Midi- und Maxipräparation.....	11
2.1.2.2. Isolierung von genomischer DNA.....	11
2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	11
2.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren	12
2.1.5. Sequenzierung von DNA.....	12
2.2. Zellkulturtechniken	13
2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	13
2.2.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™6.....	13
2.2.3. Transduktion von eukaryotischen Zellen	14
2.2.3.1. Transiente Virusherstellung	14
2.2.3.2. Herstellung stabiler Verpackungszelllinien.....	15
2.2.3.3. Infektion von eukaryotischen Zellen.....	16
2.2.3.4. Bestimmung des Virustiters	17
2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie.....	17
2.2.5. Durchflußzytometrie	18
2.2.5.1. FACS-Messung.....	18

2.2.5.2. Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung.....	19
2.2.6. Isolierung von Zellpopulationen	19
2.2.6.1. Selektion über Neomycin	19
2.2.6.2. Selektion über HAT	20
2.2.6.3. Sortierung von GFP-positiven Zellen mittels FACS	20
2.2.6.4. Isolierung von CD4-positiven Zellen über MACS.....	21
2.2.7. Ganciclovir-Sensitivitätstest.....	22
2.2.7.1. Proliferations-Assay mittels Zellzählung	22
2.2.7.2. MTS-Assay.....	23
2.3. Methoden zum Protein- und Enzymaktivitätsnachweis	23
2.3.1. Westernblot	23
2.3.2. Nachweis der Luciferaseaktivität	24
2.3.2.1. Dualer Assay	24
2.3.2.2. Singulärer Luciferase-Assay	25
2.3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
III. Ergebnisse	27
1. Generierung der Promotorfragmente.....	27
1.1. Generierung der TH- und DBH-Promotorfragmente	27
1.2. Generierung des NSE-Promotorfragments.....	28
2. Klonierung der Luciferase- und EGFP-Konstrukte.....	29
3. Untersuchungen der transienten Reporter-gen-Expression	31
3.1. Luciferase-Experimente	31
3.2. EGFP-Experimente	33
4. Klonierung des tk/egfp-Fusionsgens.....	35
5. Charakterisierung des tk/egfp-Fusionsgens.....	36
5.1. Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der tk/egfp-transduzierten Zellen.....	36
5.2. Selektionierung stabiler Klone	36
5.3. Westernblot.....	39
5.4. Ganciclovir-Sensitivitätstest.....	40
6. Klonierung der Retrovirusvektoren.....	41
7. Charakterisierung der Retrovirus-Vektoren mittels Transduktion muriner Zelllinien	43
7.1. Bestimmung der Virustiter transienter Virusüberstände	43
7.2. Untersuchung der Neuroblastom-spezifischen Expression	45
8. Untersuchung der Neuroblastom-spezifischen Expression nach Transduktion humaner Zelllinien	47
8.1. Transduktion mit transienten Überständen.....	47
8.2. Herstellung stabiler Verpackungszellen.....	49
8.4. Titervergleich der stabilen und transienten amphotropen Virusüberstände	50
8.5. Transduktion humaner Zellen mit den stabilen Virusüberständen.....	51
8.6. Anreicherung der transduzierten Zellen mittels MACS	53
9. Untersuchung der Ganciclovir-Sensitivität der transduzierten Zellen.....	54

IV. Diskussion.....	56
1. Spezifität der Expression verschiedener Promotoren von Neuroblastom-Tumormarkern	56
2. In vitro-Charakterisierung eines Fusionsproteins aus dem „Grün fluoreszierenden Protein“ und der HSV-Thymidinkinase.....	63
3. Generierung und in vitro-Testung eines Retrovirusvektors mit spezifischer Expressionskassette.....	65
V. Zusammenfassung.....	74
VI. Abkürzungen.....	75
VII. Literaturverzeichnis	77

I. Einleitung

Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken zum Einschleusen von Genen in Säugerzellen hat der Medizin ein breites Spektrum neuer Therapiemöglichkeiten eröffnet, die unter dem Begriff der Gentherapie zusammengefaßt werden (Anderson, 1992; Mulligan, 1993). Einen vielversprechenden Ansatz zur gentherapeutischen Behandlung von soliden Tumoren bietet die sogenannte Suizid-Gentherapie (Wicke und Gansbacher, 1996). Das Prinzip dieser therapeutischen Strategie, deren Hauptvertreter das *Herpes simplex Virus* Typ 1 Thymidinkinase-Gen (*HSV-tk*)/Ganciclovir (GCV)-System ist, beruht auf der zytotoxischen Aktivierung nicht- oder nur wenig toxischer Ausgangssubstanzen durch Transfer eines Enzymgenes in Tumorzellen (Moolten, 1986). Umfassende Studien im Zellkultur- und Tiermodell (Culver et al., 1992; Ezzeddine et al., 1991; Ram et al., 1993b) bildeten die Grundlage für die Durchführung klinischer Studien an Patienten mit therapieresistenten Tumoren, insbesondere Hirntumoren, die bereits seit Anfang der 90er Jahre durchgeführt werden. Dabei konnte zwar in Einzelfällen eine Tumorregression nach retroviralem Transfer des *HSV-tk*-Gens erreicht werden, allerdings konnte bisher kein signifikanter therapeutischer Vorteil gegenüber konventionellen Behandlungsmaßnahmen wie Bestrahlungs- und Chemotherapie aufgezeigt werden (Oldfield et al., 1993; Raffel et al., 1994; Rainov, 2000; Ram et al., 1995; Ram et al., 1997). Dies ist vor allem auf die allgemein geringe Transduktionseffizienz des therapeutischen Gens in den Tumorzellen zurückzuführen. So erfaßte im Patienten bei einer nachgewiesenen Transduktionseffizienz von $\leq 0,1$ % der zytotoxische Effekt letztendlich eine zu geringe Tumormasse (Kramm et al., 1995; Ram et al., 1995), was die Diskrepanz zu den guten Therapieergebnissen in der Zellkultur und im Tiermodell, wo in fast alle Zellen das Suizidgen transferiert wurde, erklärt.

Die Transduktionseffizienz ist direkt assoziiert mit den jeweils eingesetzten Gentransfersystemen, den sogenannten Vektoren. In der klinischen Anwendung bei Hirntumorpatienten sind bisher fast ausschließlich retrovirale Vektoren verwendet worden, weil deren gute Verträglichkeit, biologische Sicherheit und geringe Nebenwirkungsrate präklinisch gut belegt ist (Miller et al., 1993; Ram et al., 1993a). Außerdem garantieren Retrovirus-Vektoren gerade zur Behandlung von Hirntumoren einen relativ tumorselektiven Gentransfer, was der Anwendungssicherheit zusätzlich zugute kommt. Retroviren, die zur Unterfamilie der Onkoviren gehören, können nämlich nur proliferierende Zellen infizieren, da sie zum Transfer von genetischem Material in den Zellkern die Zellkernmembran nicht überwinden können und damit auf die Auflösung der Zellkernmembran während der

Zellteilung angewiesen sind (Coffin et al., 1997; Miller et al., 1990). Im Gehirn sind Neurone per se und Gliazellen im Normalzustand mitotisch inaktiv und damit keine Zielzellen des retroviralen Gentransfers. Dagegen sind Tumorzellen, aber auch reaktive Gliazellen im Bereich der Tumor/Hirn-Übergangzone und Gefäßendothelzellen, besonders die der Tumorgefäße, teilungsaktiv. Tumorzellen, reaktive Gliazellen und Tumorgefäßendothelzellen stellen demnach bei intratumoralem retroviralem Gentransfer die Zielzellen dar, in denen die Pharmakotherapie wirksam werden kann (Kramm et al., 1995). Die Einbeziehung von normalen Nerven- und Gliazellen ist bei intracranieller Anwendung dagegen minimal, was die allgemeine geringe Toxizitätsrate erklärt (Culver et al., 1992; Ram et al., 1997; Short et al., 1990).

Zusätzlich vermittelt auch das *HSV-tk/GCV*-System eine auf proliferierende Zellen beschränkte zytotoxische Wirkung (Wicke und Gansbacher, 1996). Durch die herpesvirale Thymidinkinase, die im Gegensatz zur menschlichen Thymidinkinase eine bis zu 1000-fach höhere Affinität zu Nukleosidanalogs wie GCV und Aciclovir aufweist, wird die jeweilige Ausgangssubstanz monophosphoryliert. Das Monophosphatprodukt wird nun von zellulären Kinasen als Substrat erkannt und weiterphosphoryliert. Der Einbau von triphosphoryliertem GCV während der DNA-Synthese proliferierender Zellen führt schließlich zum Kettenabbruch und in der Folge via Apoptoseinduktion zum Zelltod (Beltinger et al., 1999; Beltinger et al., 2000).

Bei Tumoren mit Manifestationen außerhalb des Zentralnervensystems ist diese Tumorselektivität jedoch nicht im gleichen Umfang gegeben, da die Tumorzellen häufig von proliferationsaktiven normalen Körperzellen umgeben sind (z.B. bei Leber- und Lungentumoren, aber auch Knochenmarksmetastasen). Die Anwendung des *HSV-tk/GCV*-Systems würde also in diesen Fällen auch weiterreichende Nebenwirkungen auf normale Körperzellen beinhalten, die Toxizität ließe sich nicht mehr ohne weiteres kontrolliert niedrig halten.

Eine Möglichkeit, die tumorselektive Zytotoxizität zu erhöhen, ist die Verwendung von tumorselektiven Promotorsystemen (Henson, 1998; Reeves, 1998), mit deren Hilfe die *HSV-tk*-Genexpression auf Tumorzellen weitgehend beschränkt werden kann. So konnte gezeigt werden, daß die Anwendung der *HSV-tk/GCV*-Pharmakotherapie zur Behandlung von Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms mit einem nicht-tumorselektiven CMV-Promotor zu schwerwiegender Lebertoxizität führt (Brand et al., 1997; van der Eb et al., 1998). Diese Nebenwirkungen können jedoch komplett dadurch verhindert werden, daß man die *HSV-tk*-Genexpression durch einen tumorselektiven Promotor, in diesem Falle dem für kolorektale

Karzinome spezifischen CEA- (= „carcinogenic embryonal antigen“) Promotor, steuert und damit die Toxizität in der Tat auf die Tumorzellen beschränkt (Brand et al., 1998).

Für die Etablierung einer effektiven, gutverträglichen und sicheren Gentherapiestrategie kann jedoch die gezielte und gesteuerte Genexpression nur durch leistungsstarke Vektorsysteme bewerkstelligt werden. Diese stehen allerdings zur Zeit noch nicht in befriedigendem Umfang zur Verfügung. Am ehesten scheinen noch Vektorsysteme, die sich von viralen Genomen ableiten, einen aussichtsreichen Gentransfer in Aussicht zu stellen. Als virale Vektorsysteme werden vor allem Retro-, Herpes-, Adeno-, Adeno-assoziierte und Lentiviren eingesetzt (Buchsacher und Wong-Staal, 2000; Bueler, 1999; Kay et al., 2001; Reeves, 1998; Sena-Esteves et al., 2000; Zhang, 1999). Allerdings werden aus Gründen der biologischen Sicherheit in klinischen Studien bisher überwiegend Retrovirus- und Adenovirusvektoren eingesetzt. Aus Sicherheitsgründen wurden in den entsprechenden Wildtyp-Viren die für die Replikation und Verpackung essentiellen Strukturgene deletiert. Damit fehlt den sich ableitenden Vektoren die Fähigkeit, sich selbst zu vermehren. Die Generierung infektiöser Viruspartikel für den Gentransfer muß deshalb in der Regel *in vitro* durchgeführt werden. Für den Gentransfer *in vivo* wird dann eine konzentrierte und aufgereinigte virale Vektorsuspension verwendet (Fraefel et al., 1996; Peel et al., 1997; Schiedner et al., 1998). Diese Vorgehensweise birgt den Nachteil, daß der initial applizierbare Virustiter die maximale zum Gentransfer zur Verfügung stehende Vektormenge darstellt, die *in vivo* im weiteren zeitlichen Ablauf schnell abnimmt (Short et al., 1990). Die Transduktionseffizienz läßt sich deswegen nur durch Vermehrung der initialen Virustiter verbessern. Diese Optimierungsmöglichkeit ist allerdings aus technischen Gründen meist erheblich limitiert. Aussichtsreicher erscheint dagegen die Etablierung einer fortgeführten Vektorproduktion im Tumor selbst, also am Ort des therapeutischen Geschehens. Allerdings hat sich diese Strategie aus Gründen der biologischen Sicherheit bisher nur bei Anwendung von Retrovirusvektoren durchgesetzt (Rainov et al., 1996; Ram et al., 1993b; Short et al., 1990).

Da Retrovirusvektoren sehr instabil sind und als Virussuspensionen zu keinem therapeutisch nennenswerten Gentransfer führen, wurden für die intratumorale Anwendung von Retrovirusvektoren sogenannte Produktions- oder Verpackungszelllinien etabliert (Danos und Mulligan, 1988; Markowitz et al., 1988a und b; Pear et al., 1993). Dies sind Zelllinien, in deren Genom alle diejenigen retroviralen Struktur- und Funktionsgene stabil integriert wurden, die den retroviralen Vektoren aus Gründen der biologischen Sicherheit zur Verhinderung einer unkontrollierten Virusreplikation fehlen. Wird die jeweilige retrovirale Vektor-DNA in solche Produktionszellen eingebracht, stehen alle zur Replikation und

Verpackung notwendigen viralen Gene zur Verfügung, und die Produktion des jeweiligen replikationsdefizienten Vektors kann stattfinden.

Arbeitshypothese

Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlagen für einen tumorspezifischen Suizidgentherapie-Ansatz zur Behandlung von Neuroblastomen zu entwickeln. Neuroblastome stellen hinter Leukämien und Hirntumoren die dritthäufigste Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter dar und sind in ihrer bösartigen Erscheinungsform mit konventionellen Chemotherapieprotokollen nur sehr begrenzt therapierbar. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit einem Grad IV-Neuroblastom, der häufigsten Erscheinungsform, beträgt dementsprechend auch bei maximaler konventioneller Therapie einschließlich Hochdosischemotherapie und autologer hämatologischer Stammzelltransplantation leider nur 25-30 %. Es besteht also ein großer Bedarf für neue experimentelle Behandlungsstrategien.

Zur Etablierung einer effektiven und gut verträglichen Suizidgentherapie als neue Behandlungsmöglichkeit stellen sich zwei Probleme, die gelöst werden müssen: (1) Die Suizidgenexpression soll möglichst tumorselektiv erfolgen und (2) möglichst viele Tumorzellen müssen mit dem Suizidgen transduziert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression des therapeutischen Suizidgens *HSV-tk* über Neuroblastom-spezifische Promotoren reguliert werden, um eine möglichst tumorselektive Wirkung zu erreichen. Zur selektiven Transgenexpression bieten sich alle diejenigen Promotorsysteme an, die die Expression von sogenannten Tumormarker-Genen bedingen. Im Gegensatz zu konstitutiv exprimierten Genen, die unabhängig vom Entwicklungs- oder Differenzierungsgrad in allen Zellen gleichermaßen exprimiert werden, werden Tumormarker von Genen kodiert, die nur in bestimmten Tumorzellen (oder zum Teil auch Normalzellen) von Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren angeschaltet werden. Beim Neuroblastom gibt es mehrere solcher Tumormarkergene, deren Promotoren zur Verwendung für eine tumorspezifische Expression in Frage kommen könnten.

Neuroblastome entstehen in der Regel von Neuralrohrzellen des sympathischen Nervensystems (Käser et al., 1990). Aufgrund dieser Abstammung findet in den meisten Neuroblastomzellen die für das sympathische Nervensystem typische Katecholaminbiosynthese statt. Die Messung von erhöhten Katecholaminabbauprodukten im 24h-Sammelurin ist ein etabliertes diagnostisches Verfahren zur Verifizierung der Verdachtsdiagnose Neuroblastom (Chamberlain, 1994). Wichtige Schlüsselenzyme der Katecholaminbiosynthese sind Tyrosinhydroxylase (TH), die die Umwandlung von Tyrosin in

Dopa katalysiert, und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), die Dopamin in Noradrenalin überführt (LaBrosse et al., 1976). Diese Enzyme lassen sich in Neuroblastomzellen spezifisch nachweisen.

Ein weiterer Tumormarker beim Neuroblastom ist das Enzym Neuron-spezifische Enolase (NSE), die physiologischerweise verstärkt in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird (Kirino et al., 1983). Frühere Forschungsarbeiten haben bereits die Verwendung dieses Promotors für eine Neuron-spezifische Expression untersucht und konnten eine Spezifität des Ratten-NSE-Promotors in normalen neuronalen und neuroendokrinen Zellen nachweisen (Andersen et al., 1992; Forss-Petter et al., 1990; Peel et al., 1997; Twyman und Jones, 1997). In humanen Neuroblastomzellen wurde die spezifische Expression dieses Promotors bisher allerdings noch nicht untersucht.

Die zweite Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung tumorspezifischer retroviraler Vektoren, um eine ausreichend hohe Transduktionseffizienz und eine tumorspezifische Genexpression für die Suizidgentherapie von Neuroblastomen zu erzielen. Für diese Fragestellung soll ein einfaches in vitro-Untersuchungsmodell entwickelt werden, mit der die Ausbreitung des therapeutischen Gens nach retroviraler Transduktion visualisiert werden kann. Dazu bietet sich die Verwendung sogenannter Reportergene wie etwa das aus *Aequorea victoria* isolierte „Grün fluoreszierende Protein“ (GFP) bzw. dessen für Säugerzellen und verstärkte Fluoreszenzeigenschaften Codon-optimierte Variante „enhanced“ GFP an (Chalfie et al., 1994; Zhang et al., 1996). Dieses Protein besitzt eine Eigenfluoreszenz, die mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflußzytometrie nachgewiesen werden kann. Durch Kombination der Fluoreszenzeigenschaften des GFP mit der Enzymaktivität des Suizidgens *HSV-tk* innerhalb eines Fusionsproteins soll die Untersuchung der Suizidgenexpression wesentlich vereinfacht werden.

Um das therapeutische Transgen *HSV-tk* nach retroviralem Gentransfer in den Tumorzellen unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimieren zu können, muß sichergestellt sein, daß die transgene Expressionskassette nicht durch retrovirale Promotorelemente des verwendeten Vektors beeinflusst wird. Dies ist das zentrale Problem bei der Entwicklung tumorspezifisch wirksamer Retrovirusvektoren. Zur Lösung dieses Problems gibt es verschiedene Ansatzmöglichkeiten (Reeves, 1998). So kann der 5'-LTR-Promotor durch Deletion von viralen Promotor- und/oder Enhancer-Elementen prinzipiell so verändert werden, daß er die tumorspezifische Therapiegenexpression nicht länger negativ beeinflussen kann (Yu et al., 1986). Dieser Ansatz ist mit einer deutlich niedrigeren Transduktionseffizienz

verbunden, wie frühere Untersuchungen zeigen (Miyao et al., 1995). Daher soll primär ein alternativer Lösungsweg verfolgt werden, bei dem die spezifische Promotor/Transgen-Expressionskassette in „antisense“-Orientierung zum retroviralen 5′-LTR-Promotor ausgerichtet wird. Auf diese Weise soll verhindert werden, daß der starke retrovirale 5′-LTR-Promotor die Spezifität des Neuroblastom-spezifischen Promotors ausschaltet (Belmont et al., 1988; Chang und Roninson, 1996; Ragheb et al., 1999).

II. Material und Methoden

1. Herkunft der verwendeten Materialien

1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Life Technologies (Karlsruhe), Pharmacia Biotech (Freiburg) oder ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen.

Adenosintriphosphat (ATP)	Roche (Mannheim)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Dithiothreitol	Roche
LB-Medium, LB-Fertigagar	Sigma
Luciferin	Roche
Propidiumiodid	MoBiTec (Göttingen)

1.2. Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme	New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Stratagene (Eppelheim Baden)
Taq-DNA-Polymerase („ <i>Taq</i> PCR Core Kit“)	Qiagen (Hilden)
RNase A	Roche

1.3. DNA-Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer sind von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert worden. DNA-Linker mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (BamHI, HindIII bzw. NotI) wurden von New England Biolabs bezogen.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'→3')
T7	taa tac gac tca cta tag gg
M13rev	cag gaa aca gct atg ac
egfp-N-seq	cgt cgc cgt cca gct cga cca g
luc-N-Seq	ctt cca gcg gat aga atg gcg
3'LTR FP	cat aac tga gaa tag aga ag
3'LTR RP	tag tca atc act cag agg ag
TH FP HindIII	aag ctt atg gca ctc cta gga acc
TH RP	atg gct cag tgt gga ggt cc
DBH FP HindIII	aag cttg tac aaa cgg ctc tgc tcg c
DBH RP	act gag ggc ggg aat ggc tgg
NSE 3 XhoI FP	ctc gag ttg gct gga caa gg
NSE 5 EcoRI RP	gaa ttc gtc gag gac tgc aga ctc ag
tk 3 NcoI FP	gca cat tcc atg gct teg tac ccc tgc cat c
tk 2 SmaI-BamHI RP	cgg tgg atc cca gtt agc ctc ccc cat ctc ccg ggc aaa c
BamHI-Linker	cgg gat ccc g
EcoRI-Linker	cgg aat tcc g
HindIII-Linker	cca agc ttg g
NotI-Linker	ttg cgg ccg caa

1.4. Plasmide

1.4.1. Prokaryotische Expressionsvektoren

pCR2.1	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pGEM-T-Easy	Promega
pBluescript KS	Stratagene
pSP73	Promega

1.4.2. Eukaryotische Expressionsvektoren

pEGFP-N1	Clontech (Heidelberg)
pMACS4	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
pGL3-Expressionsvektoren	Promega
pRL-SV40	Promega
NTK	(Moolten und Wells, 1990)

pNSE-lacZ (Andersen et al., 1993)

1.4.3. Retrovirusvektoren

pBABEpuro (MoMuLV-Derivat) (Morgenstern und Land, 1990)

1.5. Antikörper/Antiseren

Anti-humanes CD4-PE Coulter-Immunotech (Hamburg)

Anti-humanes IgG1-PE Coulter-Immunotech

Anti-GFP-Kaninchen-Antiserum (polyklonal) Invitrogen

Anti-Kaninchen-IgG-HRP (polyklonal) Santa Cruz (Heidelberg)

1.6. Zellkultur

1.6.1. Fibroblasten-Zelllinien

L929 (murin) American Type Culture Collection
(ATCC, Manassas, VA, USA)

LMTK⁻ (murin, TK-defizient) ATCC (Hsu und Somers, 1962)

MAVRE (human) PD Dr. Schindler, Institut für Humangenetik
(Würzburg)

NIH/3T3 (murin) ATCC

1.6.2. Tumor-Zelllinien

9L (Ratte, Gliosarkom) University of California, San Francisco, Brain
Tumor Therapy Center (California, USA)
(Weizsaecker et al., 1981)

HeLa (human, Cervixkarzinom) ATCC

HT1080 (human, Fibrosarkom) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig)

KELLY (human, Neuroblastom) DSMZ

MHH-NB11 (human, Neuroblastom) DSMZ

NEURO-2A (murin, Neuroblastom) ATCC

SK-N-SH (human, Neuroblastom) ATCC

SK-N-MC (human, Neuroepitheliom) ATCC

1.6.3. Retrovirus-Verpackungszelllinien

FNXeco/ampho (auf 293 basierend)	ATCC (Nolan, 1997)
PG13 (auf 3T3 basierend)	ATCC (Miller et al., 1991)

1.6.4. Zellkulturmedien

Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden von den Firmen Sigma und Life Technologies bezogen und vor Gebrauch mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Life Technologies), 10 units/ml Penicillin sowie 10 µg/ml Streptomycin (Sigma), 2 mM Glutamin (Sigma) und 1 mM Natriumpyruvat (Sigma) versetzt. Für die Zelllinien wurden folgende Medien verwendet:

- RPMI 1640 (Life Technologies)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l (w/v) Glucose (Life Technologies)
- Dulbecco's HAT-Medium (HAT = Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin; Life Technologies)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma)

1.6.5. Transfektionsreagenzien

FuGENE TM 6	Roche
------------------------	-------

1.6.6. Antibiotika, Zytostatika

G418 (Neomycin-Analogon)	Life Technologies
Ganciclovir (Cymeven®)	Synthex, Aachen

1.7. Sonstiges

Sequenzierkit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
DNA-Längenmarker	Life Technologies
Proteinmarker	Sigma
Nitrozellulosemembran („Hybond-ECL“)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Röntgenfilme („Biomax-MR“)	Kodak (Stuttgart)

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Techniken

Alle nicht gesondert aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel, 1992) durchgeführt.

2.1.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Zur Anreicherung von Plasmiden wurden die *E.coli*-Stämme XL1, DH5 α und GM48 verwendet. Die Transformation der zu amplifizierenden Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Bio-Rad „*E.coli*-Pulsers“ entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.2. Isolierung von Nukleinsäuren

2.1.2.1. Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien ist in verschiedenen quantitativen Größenordnungen möglich. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen für die Transfektion von eukaryotischen Zelllinien (2.2.2.) oder zur Klonierung von Vektoren (Sambrook et al., 1989) wurden Plasmid-Midi- oder Maxi-Präparationen („Plasmid Midi-/Maxi-Preparation Kit“; Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.1.2.2. Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus verschiedenen Zelllinien für präparative PCRs (2.1.3.) wurde der „QIAamp Blood Kit“ von Qiagen verwendet. Dabei wurden etwa 1×10^7 Zellen zur Gewinnung von 30 bis 40 μg DNA eingesetzt.

2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide, die als Primer für eine hitzestabile DNA-Polymerase dienen. Alle Ansätze wurden mit dem „*Taq* PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt

und je nach Bedarf durch Zugabe von „Q-Solution“, Variierung der Primer-Bindungstemperatur oder der DNA-Menge optimiert.

Präparative PCRs zur Generierung von Fragmenten für Klonierungen wurden in der Regel in einem 50 µl Ansatz mit 100 bis 500 ng DNA, je 50 pmol „forward“- und „reverse“-Primer, 200 µM pro dNTP und 2,5 U Taq-Polymerase durchgeführt.

Temperaturprofil: 5 Min. 94°C Denaturierung

25 x {
30 Sek. 94°C Denaturierung
30 Sek. 45-60°C Primer-Bindung
30-60 Sek. 72°C Elongation
5 Min. 72°C terminale Elongation

Die Temperatur zur Primer-Bindung wurde entsprechend der Länge und des GC-Gehaltes der Primer gewählt (pro A oder T +2°C, pro G oder C +4°C). Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Fragmentlänge der zu amplifizierenden Sequenz (pro kb der zu amplifizierenden Sequenz 30 Sek.). Nach Beendigung der PCR wurde die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und das amplifizierte Fragment entsprechend der unter 2.1.4. beschriebenen Vorgehensweise aufgereinigt.

2.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die DNA-Aufreinigung aus PCR-Proben, präparativen Proben nach enzymatischer Modifikation oder aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract“-Kits (Machery-Nagel, Düren) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.1.5. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mittels Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977).

Dazu wurde zunächst eine „Cycle-Sequencing“-PCR mit dem „Terminator-Ready-Reaction“-Mix (TRR; Applied Biosystems) durchgeführt, der abweichend von den Herstellerangaben in einer 1:1-Verdünnung eingesetzt wurde. In einen 20 µl Ansatz wurden somit 4 µl TRR-Mix, 200 bis 500 ng DNA und 5 pmol Primer eingesetzt. Anschließend wurde das PCR-Produkt unter Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 µl TSR (= „Template Supression Reagent“,

Applied Biosystems) resuspendiert. Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA wurden die Proben für 2 Min. bei 90°C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Abbruchprodukte wurden mittels eines automatischen Sequenzierers (ABI PRISM™ 310, Applied Biosystems) aufgetrennt, der die Fluoreszenz der Primer über einen Laser-Scanner analysiert.

<u>Temperaturprofil</u>	{	30 Sek. 96°C Denaturierung
25 x		30 Sek. 45-58°C Primer-Bindung
		4 Min. 60°C Elongation

2.2. Zellkulturtechniken

2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien (1.6.) wurden in Zellkulturflaschen (Corning Costar, Bodenheim) mit entsprechendem Kulturmedium (1.6.4.) bei 37°C unter CO₂-Begasung (5 % v/v) in abgesättigter Atmosphäre kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier PBS-Lösung (PAA, Cölbe) gewaschen und über 2-5 Min. mit einer Trypsin / EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 % w/v; PAA) im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen aus den Flaschen wie beschrieben abgelöst, in 5 ml Kulturmedium zentrifugiert (1400 UpM, 5 Min., RT) und das Pellet in 1 ml Kulturmedium, versetzt mit 10 % (v/v) DMSO (Sigma), resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend mit 5 ml 37°C warmen Kulturmedium versetzt, um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu verringern. Anschließend wurden die Zellen wie vorbeschrieben zentrifugiert und in Kulturflaschen überführt.

2.2.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™₆

Diese Technik erlaubt das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Als geeignete Träger-Substanzen kommen bei der Transfektion vor allem kationische Liposomen und Calciumphosphat in Frage, um Plasmid-DNA in Zellen einzuschleusen. Bei dem von uns

verwendeten kommerziellen Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 (Roche) handelt es sich um kationische Lipide, die nach Bildung von Komplexen mit DNA-Molekülen diese in die Zelle einschleusen. Nur ein Bruchteil des eingeschleusten genetischen Materials wird dauerhaft im Genom integriert und ermöglicht somit eine stabile Expression, während der überwiegende Teil nach kurzer Expression schnell wieder abgebaut wird. Im Gegensatz zur stabilen Expression bezeichnet man die kurzzeitige Expression, die etwa 24-72 Std. nach Transfektion (je nach Transgen) am stärksten ist und anschließend rasch wieder abnimmt, als transient.

Vor Transfektion wurden je nach Zellteilungsrate jeweils 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen pro Ansatz in 6-Loch-Platten oder 5×10^6 Zellen in 10-cm-Platten mit 2 bzw. 10 ml Medium überführt und über Nacht inkubiert, so daß die Zellen vor Transfektion zu 70 bis 80 % konfluent waren. Um ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Platten jeweils $\frac{1}{2}$ Std. vor dem Ausplattieren mit 0,1 %-iger (w/v) Gelatine-Lösung beschichtet. Pro Ansatz wurden 1 µg (6-Loch-Platte) bzw. 10 µg (10-cm-Platte) Plasmid-DNA mit dem 3-fachen Volumen an FuGENE™-Reagenz für die Transfektion eingesetzt. Das Transfektionsreagenz (3 bzw. 30 µl) wurde zunächst mit zusatzfreiem Medium auf Einzelvolumen von jeweils 100 bzw. 300 µl verdünnt. Dabei war zu beachten, daß das FuGENE™-Reagenz direkt ins Medium pipettiert wurde. Die Lösung wurde gemischt und 5 Min. bei RT inkubiert, dann die DNA hinzugegeben, erneut gemischt und für weitere 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das FuGENE™-DNA-Gemisch auf die Zellen getropft. Nach Inkubation der transfizierten Zellen über Nacht im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Achtundvierzig Std. nach Transfektion erfolgte die Untersuchung der Genexpression mittels Luciferasemessung (2.3.2.) oder Durchflußzytometrie (2.2.5.) und gegebenenfalls das Asservieren von Virusüberständen (2.2.3.1.).

2.2.3. Transduktion von eukaryotischen Zellen

2.2.3.1. Transiente Virusherstellung

Zur Gewinnung von infektiösem MuLV-Virus wurde die entsprechende Retrovirusvektor-DNA mittels FuGENE™-Transfektion in Retrovirus-Verpackungszellen eingebracht (2.2.2.). Die Verpackungszellen sollen alle essentiellen viralen Bausteine für die Herstellung und Verpackung der replikationsdefizienten Retrovirusvektoren bereitstellen. Diese viralen Struktur- und Funktionsgene fehlen aus biologischen Sicherheitsgründen in den verwendeten Retrovirusvektoren. Nach erfolgreicher Transfektion der Retrovirusvektor-DNA werden

infektiöse Retroviruspartikel in den Kulturüberstand sezerniert und können hieraus „geerntet“ werden.

Dazu wurde standardmäßig 10 µg Vektor-DNA für eine Zielzellpopulation auf 10-cm-Platten verwendet. Für die geplante Infektion von murinen Zelllinien wurden Phoenix-eco (FNX-E) Zellen als Verpackungszellen verwendet, in denen die zur Replikation und Verpackung essentiellen viralen Gene *gag*, *pol* und *env* stabil ins Genom eingebaut sind (Pear et al., 1993). Das virale *env*-Gen kodiert für ein ekotropes Hüllprotein („envelope“ = Env), durch welches die Wirtsspezifität des verpackten Virus determiniert wird. Die in FNX-E produzierten Viruspartikel können entsprechend des verwendeten *env*-Gens nur Nager-Zellen infizieren. Die Zelllinie Phoenix-ampho (FNX-A) trägt dagegen das amphotrope *env*-Gen, so daß die von FNX-A freigesetzten Viruspartikel neben Nagerzellen auch humane Zellen infizieren können. Einen Tag nach Transfektion wurde das Medium der Verpackungszellen mit der retroviralen Vektor-DNA gewechselt. Anstelle von DMEM wurde nun IMDM (1.6.4.) verwendet, da dieses HEPES-haltige Medium eine deutlich bessere Pufferkapazität aufwies. Die erhöhte Pufferkapazität war erforderlich, um zu gewährleisten, daß das Medium zum Zeitpunkt der „Virusernte“ noch ausreichende Pufferkapazität besaß, damit bei saurem pH keine Virusdegradation eintrat. Achtundvierzig Std. nach Transfektion wurde der vermeintlich virushaltige Überstand abpipettiert und bei 1400 UpM für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der so aufgereinigte zellfreie Überstand bis zur Infektion auf Eis gelagert (max. 5 Std.) oder in Aliquots bei -70°C gelagert. Optional wurden die Überstände zusätzlich zwecks Virusanreicherung für 30 Min. bei 10 000 UpM und 4°C zentrifugiert. Bei diesen Umdrehungszahlen sedimentierten die Viruspartikel als Pellet, das in 1 ml IMDM resuspendiert und damit konzentriert wurde.

Nach Ernten der Überstände wurden die transfizierten Verpackungszellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch und mittels FACS-Messung untersucht (2.2.5.).

2.2.3.2. Herstellung stabiler Verpackungszelllinien

Neben der transienten Virusherstellung (2.2.3.1.) gibt es zur Gewinnung infektiöser Virusüberstände auch die Möglichkeit, stabil virusproduzierende Verpackungszelllinien herzustellen. Dazu wurde die Verpackungszelllinie PG13 verwendet, die zwar auch die MuLV-Gene *gag* und *pol*, aber anstelle des MuLV-Hüllproteins das *env*-Gen des „Gibbon Ape Leukemia Virus“ (GALV) trägt (Miller et al., 1991). Mit den viralen Überständen dieser

Verpackungszelllinie können Zellen verschiedener Säugerspezies, darunter auch humane Zellen, effizient infiziert werden. Murinen Zellen fehlt dagegen der entsprechende Rezeptor für das GALV-*env*, über den das Virus in die Zelle gelangt.

Zur Herstellung stabiler Verpackungszellen muß die zu verpackende Vektor-DNA stabil ins Genom dieser Zellen eingebracht werden. Dies kann durch Transfektion der Vektor-DNA und anschließende Antibiotika-Selektion mit anschließender Einzelklon-Isolierung erfolgen, vorausgesetzt in dem verwendeten Vektor ist eine interne Expressionskassette mit Selektionsmarker enthalten. Eine einfachere Möglichkeit, um die Vektor-DNA stabil ins Genom der auf 3T3 basierenden Verpackungszelllinie PG13 einzuschleusen, ist die Transduktion mittels transient hergestellter FNXeco-Virusüberstände (2.2.3.1.). Der retrovirale Replikationszyklus bedingt, daß die virale DNA nach Infektion stabil ins Genom der Wirtszelle integriert, so daß bei ausreichend hoher Transduktionseffizienz keine weitere Antibiotika-Selektion erforderlich ist.

Zur Erhöhung der Transduktionsrate wurden konzentrierte Virusüberstände verwendet und die transduzierten Verpackungszellen anschließend über MACS (2.2.6.4.) angereichert. Anschließend wurden die Zellen auf 10-cm-Platten überführt und bis zu einer Zellkonfluenz von 80 bis 90 % im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium durch 10 ml frisches IMDM ersetzt und 24 h später der virushaltige Überstand geerntet (2.2.3.1.). Die Zellen wurden anschließend 1:10 (im Verhältnis zur Ausgangszellzahl) verdünnt auf mehrere Platten verteilt, um eine größere Menge viralen Überstands zu ernten oder um Zellaliquots als Reserve einzufrieren und in Flüssigstickstoff zu lagern (2.2.1.).

2.2.3.3. Infektion von eukaryotischen Zellen

Einen Tag vor Infektion wurden die Zellen (je nach Zellteilungsrate 8×10^4 bis 3×10^5) auf Gelatine-beschichtete 12-Loch-Platten überführt. Zur Infektion wurde das Kulturmedium entfernt und anschließend 500 µl Virusüberstand pro Loch auf die Zellen gegeben. Zur Erhöhung der Infektionsrate war es notwendig, den Virusüberstand zuvor mit 5 µg/ml Polybren (Hexadimethrin-Bromid; Sigma) zu versetzen. Die Wirkung dieses Polykations basiert darauf, daß Polybren, wie auch andere kationische Substanzen, die elektrostatische Abstoßung der beiden aufeinandertreffenden, positiv geladenen Bilayer der Zellmembran und der Virushülle neutralisiert und somit die Virusanbindung an die Zelloberfläche erleichtert (Coelen et al., 1983). Die Zellen wurden mindestens 3 Std. mit Virusüberstand inkubiert, der anschließend durch Kulturmedium ersetzt wurde. Dieser Infektionsvorgang kann bis zu

viermal wiederholt werden. 48 Std. nach der ersten Infektion wurden die Zellen für die FACS-Analyse (2.2.5.) geerntet bzw. für die Untersuchung der GCV-Sensitivität (2.2.7.) vermehrt.

2.2.3.4. Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wie viele intakte Viruspartikel pro Volumeneinheit, angegeben als „cfu/ml“ (= „colony forming units“), im Virusüberstand enthalten sind. Die Bestimmung des Virustiters kann durch Auszählen von Kolonien unter Antibiotikaselektion (2.2.6.1.) bestimmt werden, sofern der zu verpackende Vektor ein Resistenzgen enthält. Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung mit Hilfe von Reportergenen, deren Expression in den infizierten Zellen mittels einfacher Nachweismethoden dargestellt werden kann. In dieser Arbeit ist der Virustiter über die durchflußzytometrische Messung (2.2.5.) der GFP- oder CD4-Markergen-Expression ermittelt worden (Flasshove et al., 2000; McLachlin et al., 1993). Dazu wurden 3T3- (für ekotrope Überstände) oder HT1080- Zellen (für amphotrope Überstände) mit seriell verdünntem Virus in Verdünnungen von 10^1 bis 10^{-4} infiziert (2.2.3.3.). Da die Zielzellen bereits einen Tag vor Infektion in die Kulturschalen überführt wurden, erfolgte eine rechnerische Korrektur der Ausgangszellzahl durch Multiplikation mit der Teilungsrate. Diese wurde für jede Zelllinie durch Zellzählung nach eintägiger Inkubation mittels Coulter-Counter (2.2.7.1.) bestimmt.

Berechnung des Virustiters:

$$\text{cfu/ml} = \frac{(\text{Ausgangszellzahl} \times \text{Teilungsrate})}{100 \%} \times \underbrace{\text{positive Zellen} (\%) \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor}}_{\text{(Infektion mit } 500 \mu\text{l Virusüberstand)}}$$

2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob nach einer Transfektion (2.2.2.) oder Infektion (2.2.3.3.) tatsächlich eine Zelltransduktion stattgefunden hat, wurden die transfizierten und infizierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bereits 24 Std. nach Transfektion oder Infektion kann die GFP-Expression als Maß für die erfolgreiche Transduktion auf diese Weise überprüft werden. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem inversen Durchlichtmikroskop

(„Axiovert 25“; Carl Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit einer Quecksilber-Lampe und einem 470 nm Filter.

2.2.5. Durchflußzytometrie

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (FACS = „Fluorescence-activated cell sorting“) können verschiedene Parameter einer Zelle erfaßt werden. Neben der Zellgröße und Granularität ermöglicht es auch den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Molekülen nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie den Nachweis eigenfluoreszierender Proteine (z.B. das Grün-fluoreszierende Protein = GFP) und Farbstoffe in der Zelle. Für die Messung werden die Zellen einzeln an einem Argon-Laser vorbeigeleitet. Nach Anregung bei 488 nm können von verschiedenen Detektoren unterschiedliche Lichtemissionen jeder einzelnen Zelle erfaßt werden: Das Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FSC), das Seitwärtsstreulicht („sideward light scatter“, SSC) und die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe im grünen (525 nm; FL1-Detektor), roten (578 nm; FL2-Detektor) oder dunkelroten Wellenlängenbereich (680 nm; FL3-Detektor). In der vorliegenden Arbeit wurden grün (FITC = Fluorescein-Isothiocyanat oder GFP) bzw. rot fluoreszierende Farbstoffe (PE = Phycoerythin oder PI = Propidiumiodid) einzeln oder als Antikörperkonjugate verwendet.

Das FSC ist ein Maß für die Größe der Zelle, während die intrazelluläre Granularität durch das SSC erfaßt wird. Durch eine Dot-Plot-Darstellung des FSC gegen das SSC können tote Zellen oder Partikel aufgrund ihrer geringen Größe und Granularität von lebenden Zellen unterschieden und dann von der Analyse ausgeschlossen werden. Zusätzlich können tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumiodid (2.2.5.2.) markiert und somit ebenfalls von der lebenden Zellpopulation abgegrenzt werden.

2.2.5.1. FACS-Messung

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit 5 mM EDTA in PBS abgelöst. Pro Ansatz wurden 2×10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) sedimentiert (1600 UpM, 6 Min., RT) und der Überstand vollständig dekantiert. Danach wurden die Zellen zur Antikörperfärbung (2.2.5.2.) in 100 µl PBS / 0,5 % (w/v) BSA (Sigma) bzw. zur direkten Messung in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Zur Datenerfassung von jeweils 10 000 Zellen

pro Ansatz und der anschließenden Auswertung diente ein Apple Power Macintosh G3 und die „CellQuest“ Software (Becton Dickinson).

2.2.5.2. Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung

Zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen (wie z.B. CD4) wurde ein FITC- oder PE-markierter Antikörper gegen das nachzuweisende Molekül entsprechend der vom Hersteller angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Nach Zugabe des Antikörpers zur Zellsuspension wurde der Ansatz gemischt und 15 Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PBS zugegeben, die Proben zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend gemessen (2.2.5.1).

Zur Anfärbung von toten Zellen wurde PI in einer Konzentration von 0,4 µg/ml eingesetzt. Die Färbemethode basiert darauf, daß nur die Membran toter Zellen durchlässig für das PI-Molekül ist, so daß sich der Farbstoff ausschließlich in tote Zellen einlagert. Nach Zugabe des PI und kurzem Mischen wurde die Probe für 5 bis 10 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend gemessen.

2.2.6. Isolierung von Zellpopulationen

2.2.6.1. Selektion über Neomycin

Um Zellen selektionieren zu können, die nach Transfektion (2.2.2.) und genomischer Integration von Plasmid-DNA das Transgen stabil exprimieren, muß der zum Gentransfer verwendete Vektor einen Selektionsmarker tragen. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit Vektoren mit dem Neomycin-Resistenzgen verwendet. Bei dem Antibiotikum Neomycin handelt es sich um ein von Streptomyceten gebildetes Aminoglykosid, das die Elongation während der Translation sowohl bei Pro- als auch Eukaryoten hemmt, da es gleichermaßen bei 70S als auch 80S Ribosomen wirkt. Das *neo*-Resistenzgen, welches für eine Aminoglykosid-3-Phosphotransferase kodiert, ist ursprünglich auf dem bakteriellen Transposon Tn5 lokalisiert (Beck et al., 1982; Southern und Berg, 1982). Die Selektionierung der stabil transfizierten Zellen wurde 48 Std. nach Transfektion durch Zugabe des Neomycin-Analogons G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml ins Kulturmedium begonnen und über einen Zeitraum von 14 Tagen fortgesetzt. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Zur Isolierung von Einzelzellklonen wurden die Zellen aus einem Transfektionsansatz in verschiedenen Verdünnungen (10^{-1} bis

10^{-3}) auf mehrere 10-cm-Platten überführt. Nach 10 bis 14 Tagen Antibiotika-Selektion waren auf den Platten einzelne Kolonien makroskopisch erkennbar. Zur Isolierung von Einzelklonen wurden die Platten ausgewählt, auf denen die Kolonien deutlich voneinander abgrenzbar waren. Die Zellen wurden nach Entfernen des Kulturmediums mit PBS gewaschen, anschließend wurde jeweils ein Tropfen Trypsin auf die Klone gegeben, 1-2 Min. bei RT inkubiert und die Zellen eines einzelnen Klons jeweils in ein eigenes Loch einer 24-Loch-Platte überführt, ohne daß eine Kontamination mit Zellen des Nachbarklons stattfand. Die Zellen wurden im Brutschrank vermehrt und anschließend die Transgenexpression der einzelnen Klone mittels FACS-Analyse (2.2.5.) oder GCV-Sensitivität (2.2.7.) überprüft.

2.2.6.2. Selektion über HAT

Bei dieser Selektionsmethode werden Thymidinkinase-defiziente Zellen (LMTK⁻-Zellen; 1.6.1.) eingesetzt. Bei Inkubation in Hypoxanthin- (100 μ M) / Aminopterin- (0,4 μ M) / Thymidin- (16 μ M) supplementiertem Medium (HAT-Medium; 1.6.4.) sterben diese TK-defizienten Zellen ab. LMTK⁻-Zellen fehlt nämlich die Möglichkeit, in Anwesenheit von Hypoxanthin und Thymidin einen Reserveweg zu nutzen. Der Hauptsyntheseweg wird durch Aminopterin blockiert (Kennett, 1979). Nach erfolgreichem *HSV-tk*-Gentransfer können LMTK⁻-Zellen aber wieder den Reserveweg trotz Kultivierung in HAT-Medium nutzen und überleben. Somit werden *HSV-tk*-transduzierte Zellen in HAT-Medium spezifisch selektioniert und angereichert.

In diesem Versuchsaufbau wurde 48 Std. nach Transfektion mit *HSV-tk* das Kulturmedium der LMTK⁻-Zellen durch HAT-Medium ersetzt. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen. Dabei wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Anschließend wurde die Transgenexpression der angereicherten Zellen mittels FACS-Analyse (2.2.5.) untersucht.

2.2.6.3. Sortierung von GFP-positiven Zellen mittels FACS

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (2.2.5.) können Oberflächen- oder intrazelluläre Moleküle einzelner Zellen nicht nur nachgewiesen und quantifiziert, sondern auch zur Isolierung einzelner Zellen aus einer Zellpopulation genutzt werden. So können zum Beispiel Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern durch eine spezifische Antikörperfärbung und anschließende Sortierung im FACS aus der Gesamtpopulation isoliert werden. Dabei werden die Zellen wie bei der einfachen FACS-Messung einzeln innerhalb eines Flüssigkeitsstromes an einem Argon-Laser vorbeigeleitet und die Lichtemissionen der Zellen durch die verschiedenen

Detektoren erfaßt. Die anzureichernde Zellpopulation wird durch einen Rahmen („Gate“) in der Dot Plot-Darstellung z.B. des FL1-Signals gegen FL2 definiert. Sobald ein Signal innerhalb des festgelegten Rahmens detektiert wird, wird die signalauslösende Zelle mittels elektrostatischer Ablenkung in ein separates Röhrchen abgeleitet.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich GFP-exprimierende Zellen aus inhomogenen Zellpopulationen mit Hilfe des Durchflußzytometers isoliert. Dazu wurden zunächst stabil transfizierte Zellen über Antibiotika-Selektion (2.2.6.1) angereichert und anschließend mittels FACS (FACStar^{Plus}; Becton Dickinson) aufgereinigt. Die Zellen wurden in sterilen FACS-Röhrchen wie in 2.2.5.1. beschrieben sedimentiert. Zum Sortieren wurde der Rahmen so gewählt, daß nur die stark GFP-exprimierenden Zellen berücksichtigt werden. Die Bestimmung des Reinheitsgrades der sortierten Zellfraktion, die in 1 ml Kulturmedium gesammelt wurde, erfolgte durch anschließende durchflußzytometrische Messung der GFP-Expression. Die sortierten Zellen wurden zur Isolierung von Einzelklonen in verschiedenen Verdünnungen in 10-cm-Platten überführt (2.2.6.1.).

2.2.6.4. Isolierung von CD4-positiven Zellen über MACS

Das Prinzip der magnetischen Zellseparierung mittels MACS-Säulen (Miltenyi Biotech) basiert darauf, daß zunächst spezifisch auf den anzureichernden Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle mit Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper sind mit kleinen paramagnetischen Kügelchen („Microbeads“) von 50 nm Durchmesser konjugiert, die aus einer Zuckerhülle mit darin eingeschlossenem Eisenoxid bestehen. Die über die Kügelchen-Antikörper-Konjugate markierten Zellen lassen sich über ein starkes Magnetfeld, welches durch eine Metallmatrix-Säule in einem starken Permanentmagneten erzeugt wird, effizient und schonend anreichern (Miltenyi et al., 1990). Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der FACS-Sortierung (2.2.6.3.) besteht darin, daß dieses Separationsverfahren vollständig unter sterilen Bedingungen durchführbar ist.

In dieser Arbeit wurde anstelle eines Antibiotika-Resistenzgens in einigen Vektoren die trunkierte humane *cd4*-cDNA (aus pMACS4; Miltenyi Biotech) als MACS-Selektionsmarker gewählt. Diese cDNA kodiert für ein trunkiertes CD4-Molekül, bei dem die signalgebende intrazelluläre Domäne deletiert wurde, die Antigen-determinierende extrazelluläre Domäne aber erhalten ist. Da CD4 nur auf humanen T-Helfer-Zellen exprimiert wird, kann die trunkierte Form als Selektionsmarker für nicht-hämatopoetische Zellen verwendet werden. Durch ihre geringe Größe interferieren MACS-„Microbeads“ nicht mit sichtbarem Licht und

sind so auch kompatibel zur Durchflußzytometrie. Dies ermöglicht eine Darstellung MACS-isolierter Zellen in der Durchflußzytometrie mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten CD4-Antikörpers.

Die spezifischen „Microbeads“-vermittelten Anreicherungen wurden mit den magnetischen Zell-Separatoren „MiniMACS“ und den Säulen MS⁺/RS⁺ (Miltenyi Biotech) durchgeführt, deren Kapazität zur Zellaufreinigung bis 2×10^8 Zellen beträgt. Zur Aufreinigung der CD4-positiven Zellen wurden zunächst 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen mit Anti-CD4-PE-konjugierten Antikörper wie in 2.2.5.2. beschrieben gefärbt und nach Waschen mit PBS mit Anti-PE-„Microbeads“ (Miltenyi Biotech) entsprechend den Anweisungen des Herstellers markiert. Die Zellen wurden in 500 µl PBE-Puffer (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA) resuspendiert und über einen Separationsfilter (30 µm Porengröße; Miltenyi Biotech) auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit 500 µl PBE wurden die Zellen mit 500 µl Medium aus der Säule eluiert. Der Reinheitsgrad nach Aufreinigung wurde mittels Durchflußzytometrie ermittelt (2.2.5.1). Die eluierten Zellen wurden in Kulturschalen oder -flaschen ausplattiert bzw. über eine neue Säule ein zweites Mal aufgereinigt.

2.2.7. Ganciclovir-Sensitivitätstest

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung einer GCV-Behandlung auf *HSV-tk*-transduzierte Tumorzellen wurden die Zellen unter Einschluß entsprechender Negativkontrollen über mehrere Tage mit verschiedenen GCV-Konzentrationen behandelt und anschließend mittels verschiedener Verfahren (2.2.7.1. und 2.2.7.2.) die Überlebensrate der Zellen bestimmt.

2.2.7.1. Proliferations-Assay mittels Zellzählung

Die Zellen wurden auf 10-cm-Kulturschalen oder 6-Loch-Platten in Kulturmedium mit verschiedenen GCV-Konzentrationen (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 µg/ml) überführt und über 3 bis 5 Tage im Brutschrank behandelt. Dazu wurden je nach Wachstumsrate 8×10^4 bis 4×10^5 Zellen pro Loch bzw. Platte verwendet. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin pro Ansatz von der Platte abgelöst. Die Zellzahl der Proben wurde in 10 ml Isoton II-Lösung (Coulter; Krefeld; Verdünnung 1:100) mit Hilfe eines Coulter Counters Z1 (Coulter) gemessen. Die Zellzahl der unbehandelten Ansätze als Positivkontrolle

wurde für jede Zelllinie mit 100 % definiert und die Zellzahlen der behandelten Ansätze in Relation dazu gesetzt.

2.2.7.2. MTS-Assay

Im MTS-Assay wird die Anzahl lebender Zellen kolorimetrisch ermittelt. Er basiert darauf, daß daß das Tetrazolium MTS (= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, inneres Salz) in Anwesenheit von PMS (= Phenazinmethosulfat) von stoffwechselaktiven Zellen in lösliches Formazan umgewandelt wird (Cory et al., 1991). Nach Zugabe der Substanzen MTS und PMS und 1- bis 5-stündiger Inkubation bei 37°C kann die Menge an entstandenem Formazan über die Absorption bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen werden.

Zur Bestimmung der GCV-Sensitivität verschiedener *HSV-tk*-exprimierender Zellen sowie nicht-transduzierter Zellen als Negativkontrolle wurden 4×10^3 bis 1×10^4 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten mit jeweils 50 µl Kulturmedium überführt. Pro Loch wurden weitere 50 µl Medium ohne bzw. mit 10 µg/ml GCV zugegeben. Als Nullwert diente ein Ansatz mit 100 µl Medium ohne Zellen. Alle Ansätze wurden in 5-facher Ausfertigung ausplattiert. Nach Inkubation für 4 Tage im Brutschrank bei 37°C wurden zu jedem Ansatz 20 µl MTS (2 mg/ml in PBS) / PMS (0,92 mg/ml in PBS), im Verhältnis von 1:20 gemischt, zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis 5 h wurde die Absorption mit Hilfe eines Spektralphotometers (Tecan, Crailsheim) bei 492 nm gemessen.

2.3. Methoden zum Protein- und Enzymaktivitätsnachweis

2.3.1. Westernblot

Diese Technik ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Dazu werden die Proteine einer Suspension durch ein SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und das gesuchte Protein mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Mit Hilfe eines gegen den spezifischen Antikörper gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörpers können die spezifischen Proteinbanden unter Zugabe eines geeigneten Farbsubstrats nachgewiesen werden.

Die Zusammensetzung der Gellösungen sowie die Durchführung der Elektrophorese, des anschließenden Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran und die Antikörperinkubation erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989).

Die Bindung des Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörpers auf der Membran wurde durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dem Substrat Luminol („Lumi-Light^{Plus}“, Roche) nachgewiesen. Bei der Nachweisreaktion wird H_2O_2 durch die Peroxidase zu Wasser und Superoxidionen reduziert, die das Substrat Luminol unter Freisetzung von blauem Licht oxidieren. Bei dieser Reaktion kommt es zur Schwärzung von Röntgenfilmen. Hierfür wurde in diesem Versuchsansatz die Antikörper-beladene Membran für 5 Min. mit dem Substrat inkubiert und anschließend ein Röntgenfilm für 1 bis 2 Min. aufgelegt.

2.3.2. Nachweis der Luciferaseaktivität

Im Luciferase (Luc)-Assay wird das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1985) als Reporter gen verwendet. Die durch die Luciferase katalysierte Biolumineszenzreaktion basiert auf der Oxidation des Käfer-Luciferin-Leuchtstoffs. In einer von ATP und Magnesium abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert wird. Das angeregte Oxyluciferin fällt nachfolgend in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird. Die Lichtemissionsreaktion wurde in einem Luminometer Typ Microlumat LB96P der Firma Berthold (Bad Wildbad) nach automatischer Injektion des Luciferasesubstrats in die Probe gemessen. Die Luciferaseaktivität wird in RLUs („relative light units“) angegeben.

2.3.2.1. Dualer Assay

Dieser Assay wurde mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) durchgeführt, welches auf der Verwendung der *Renilla*-Luciferase aus dem Coelenteraten *Renilla reniformis* als zusätzliches Reporter gen zur Kotransfektion basiert. Auch die *Renilla*-Luciferase setzt in einer Biolumineszenzreaktion in Gegenwart von Sauerstoff ein Luciferinsubstrat unter Photonenemission um, nämlich das Coelenteraten-Luciferin zu Coelenteramid. Der duale Luc-Assay bietet den Vorteil, daß beide Luciferase-Aktivitäten nacheinander im gleichen Ansatz mit gleicher Methodik gemessen werden können.

Zur Kotransfektion mit FuGENE™ (2.2.2.1) wurde pro Ansatz (in 6-Loch-Platten) insgesamt 1 µg DNA im Verhältnis von 1:4 (*Renilla*- zu *Photinus*-Luc-Plasmid) eingesetzt. Nach 48 Std. Inkubation wurde die Luc-Aktivität in den transfizierten Zellen untersucht. Das Ernten der Zellysate in jeweils 500 µl „Passive Lysis“-Puffer und die anschließende Messung in schwarzen 96-Loch-Platten erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Messung wurden 5 oder 10 µl des geernteten Lysats eingesetzt. Beide Luciferase-Substrate (LARII und Stop & Glo® Reagent) wurden abweichend von den Herstellerangaben vor der Messung 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend über die Dispenser des Luminometers automatisch injiziert.

2.3.2.2. Singulärer Luciferase-Assay

Bei dem singulären Luciferase-Assay wurde pro Ansatz 1 µg des *Photinus*-Luc-Plasmids transfiziert und die Zellextrakte nach 48 Std. geerntet und gemessen. Zum Ernten der Lysate (2.3.2.1.) wurde der „Reporter Gene Assay Lysis“-Puffer (Roche), 1:5 in H₂O dest. verdünnt verwendet.

Glycylglycin-Puffer

25 mM Glycylglycin (pH 7,8)
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
(autoklavieren)

Luciferase-Puffer (pro Loch)

150 µl Glycylglycinpuffer
30 µl 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,8)
2 µl 100 mM DTT
2 µl 200 mM ATP
(frisch ansetzen)

Luciferin

55 mg DTT, auf Eis lösen, in
35,7 ml Glycylglycin-Puffer (pH7,8)
+ 10 mg Luciferin
in Aliquots bei -70°C dunkel lagern

Luciferin-Lösung

1 ml Luciferin
4 ml Glycylglycin-Puffer (pH 7,8)
40 µl 1 M DTT

Die anschließende Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit jeweils 25 µl Zellysat. Unmittelbar vor der Messung wurden 184 µl Luciferasepuffer zu den Proben dazugegeben. Die automatische Injektion der Luciferin-Lösung (pro Loch 100 µl) und die anschließende Messung der Lichtemission erfolgte mit Hilfe des Luminometers.

2.3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die mit dem singulären Luciferase-Assay ermittelten Enzymaktivitäten auf jeweils gleiche Proteinmengen abzugleichen, wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Lysaten bestimmt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des „Bio-Rad DC Protein Assay“ (Bio-Rad) in 1,5 ml Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht). Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Proteinstandard aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/ml in „Lysis-Puffer“) im Bereich von 50 µg bis 1000 µg pro ml angesetzt und jeweils 15 µl Probe (1:5 verdünntes Lysat) verwendet. Hierzu wurden zunächst 75 µl Reagenz A´ und dann 600 µl Reagenz B hinzugemischt, der Gesamtansatz 15 Min. bei RT inkubiert. Die Absorption der Proben wurde anschließend im Photometer (Spektrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld) bei 750 nm gemessen.

III. Ergebnisse

1. Generierung der Promotorfragmente

Zur Entwicklung eines pharmakogentherapeutischen Ansatzes für Neuroblastome wurden verschiedene Promotorfragmente kloniert und deren Eignung für eine Neuroblastom-spezifische Expression untersucht. Dies waren die Promotoren der Tumormarker Neuron-spezifische Enolase (NSE), Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH).

1.1. Generierung der TH- und DBH-Promotorfragmente

Das 504 bp lange TH-Promotorfragment (P_{TH}) sowie das 498 bp lange DBH-Promotorfragment (P_{DBH}) wurden mittels PCR an genomischer DNA aus der humanen Zelllinie HeLa generiert (II.3.11.1.). Die verwendeten Primer, deren Sequenz und Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1) in Tab. 1 angegeben ist, wurden aus früheren Veröffentlichungen ausgewählt (Coker et al., 1988; Kobayashi et al., 1989; Shaskus et al., 1992). An die Sequenz der zum 5'-Ende des TH- und des DBH-Promotors komplementären „forward“-Primer wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Der zum 3'-Ende des DBH-Promotors komplementäre „reverse“-Primer enthielt eine Mutation des Startcodons ATG zu ATT, da dieses Triplet innerhalb des ausgewählten Promotorfragments lag, aber in den klonierten Konstrukten nicht als Startpunkt der Translation dienen sollte. Das Startcodon des TH-Gens befand sich unmittelbar hinter dem 3'-Ende des gewählten Promotorfragments und somit außerhalb der amplifizierten Sequenz.

Die PCR-Fragmente wurden zunächst zur Verifizierung der Nukleotidsequenz in den Klonierungsvektor pCR2.1 kloniert. Dieser Klonierungsvektor liegt in linearisierter Form vor und besitzt überstehende 3'-T-Überhänge, welche die Ligation mit PCR-Fragmenten, die zumeist überstehende A-Nukleotide tragen, ermöglicht. Mit vektorspezifischen Primern (T7 und M13rev) konnten die einklonierten PCR-Produkte vom 5'- und 3'-Ende her vollständig sequenziert werden. Für die weiteren Klonierungsschritte wurden Klone ausgewählt, bei denen keine Abweichungen von der publizierten Originalsequenz nachweisbar waren.

Primer	Bindungsstelle im Gen	Sequenz (5'→3')
TH FP HindIII	-491 bis -473	AAG CTT atg gca ctc cta gga acc
TH RP	+13 bis +31	atg gct cag tgt gga ggt cc
DBH FP HindIII	-474 bis -453	AAG Cttg tac aaa cgg ctc tgc tgc c
DBH RP	+4 bis +24	act gag ggc ggg <u>aat</u> ggc tgg (Originalsequenz: <u>cat</u> = Start-Codon)
NSE 3 XhoI FP	-255 bis -236	ctc gag ttg gct gga caa gg
NSE 5 EcoRI RP	+35 bis +53	GAA TTC gtc gag gac tgc aga ctc ag

Tab. 1: PCR-Primer zur Generierung von P_{TH} , P_{DBH} und P_{NSE-XE} . Die Primerbindungsstellen sind in Bezug zum Transkriptionsstartpunkt (+1) angegeben. Die in Großbuchstaben dargestellten Nukleotide markieren die angefügte Sequenz zur Generierung der HindIII- bzw. EcoRI-Schnittstelle, und das unterstrichene Nukleotid markiert die eingefügte Punktmutation zur Zerstörung des Startcodons. (FP = „forward“-Primer; RP = „reverse“-Primer)

1.2. Generierung des NSE-Promotorfragments

Zur Klonierung des NSE-Promotors stand ein Expressionsvektor (pNSElacZ; (Forss-Petter et al., 1990) mit einem 1,8 kb langen Fragment der 5'-flankierenden Region des Ratten-NSE-Gens zur Verfügung. Nach Twyman und Jones (Twyman und Jones, 1997) ist ein 308 bp langes Fragment zur Vermittlung einer spezifischen Expression in neuronalen und neuroendokrinen Zellen ausreichend, das den Bereich von -255 bis +53 (relativ zum bevorzugten Transkriptionsstartpunkt = +1) umspannt. Dieses als P_{NSE-XH} bezeichnete Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI/HindIII aus dem lacZ-Expressionsvektor isoliert und anschließend in den Luciferase- bzw. EGFP-Vektor kloniert (2.).

Ein weiteres Ratten-NSE-Promotorfragment (P_{NSE-XE}), welches ebenfalls den Bereich von -255 bis +53 umspannt, wurde mittels PCR an dem Plasmid pNSElacZ mit den in Tab. 1 dargestellten Primern generiert. Der „reverse“-Primer enthielt eine EcoRI-Schnittstelle, die an die zum 3'-Ende des NSE-Promotors komplementäre Sequenz des Primers angehängt wurde. Die beiden NSE-Promotorfragmente unterscheiden sich somit nur im 3'-Bereich durch das

Vorhandensein einer zusätzlichen Vektorsequenz aus pNSElacZ (14 bp) im $P_{\text{NSE-XH}}$ -Fragment. Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T-Easy kloniert, der wie der Vektor pCR2.1 (IV.1.1.) überstehende 3'-T-Überhänge besitzt, um die Nukleotidsequenz durch Sequenzierung mit den vektorspezifischen Primern T7 und M13rev (II.1.3.) zu verifizieren.

2. Klonierung der Luciferase- und EGFP-Konstrukte

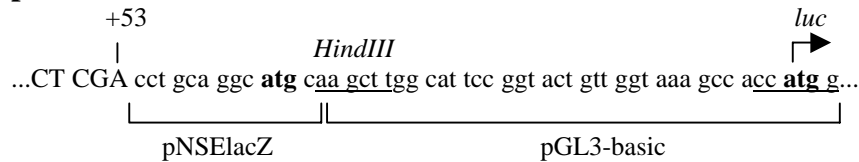
Die Spezifität der klonierten Promotorfragmente sollte in transienten Transfektionsexperimenten mittels Reporterexpression in verschiedenen Zelllinien studiert werden. Um die Eignung des Reportergens *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) für Promotorstudien zu untersuchen, sollte zunächst die durchflußzytometrische EGFP-Messung mit einem etablierten Reporter-Gen-Assay, dem Luciferase-Assay, verglichen werden.

Dazu wurde das XhoI/HindIII-Promotorfragment $P_{\text{NSE-XH}}$ in den XhoI/HindIII-linearisierten Luciferase-Vektor pGL3-basic (II.1.4.2.), in dem keine Promotor- und Enhancer-Elemente vorhanden sind, inkloniert. Die Promotorfragmente P_{TH} und P_{DBH} wurden über die flankierenden EcoRI-Schnittstellen aus pCR2.1 ausgeschnitten und in pGL3-basic kloniert. Die somit generierten Expressionsvektoren wurden als pGL3-NSE-XH, -TH bzw. -DBH bezeichnet. Durch Restriktionsenzymanalyse wurde die richtige, das heißt 5'→3' Orientierung der Promotorfragmente im pGL3-basic-Expressionsvektor verifiziert. Zusätzlich wurde der Übergang zwischen Promotorfragment und *luc*-5'-Ende mit dem „reversen“ Primer *luc*-N-seq (II.1.3.), der an Position +35 bis +55 relativ zum Translationsstartpunkt der *luc*-cDNA bindet, sequenziert. Hierbei fiel auf, daß das 3'-Ende des Promotors $P_{\text{NSE-XH}}$ ein ATG enthielt, das wahrscheinlich schon bei der initialen Klonierung des Ausgangsplasmids pNSElacZ versehentlich mit eingebaut wurde (Abb. 1). Daher wurde das zweite NSE-Promotorfragment $P_{\text{NSE-XE}}$, das dieses ATG nicht mehr enthielt, mittels PCR generiert (1.2.), über EcoRI aus pGEM-T-Easy ausgeschnitten und in pGL3-basic kloniert. Dieses Konstrukt wurde als pGL3-NSE-XE bezeichnet.

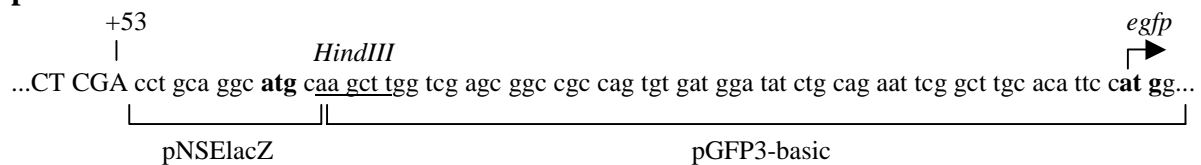
Zur Generierung der Konstrukte mit dem Reportergen *egfp* unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren wurde die *luc*-Sequenz in pGL3-basic durch die *egfp*-cDNA ersetzt. Diese stammt aus dem Plasmid pEGFP-N1. Das neu entstandene Plasmid wurde als pGFP3-basic bezeichnet. Als Positivkontrolle wurde die cDNA auch in dem Plasmid pGL3-control ausgetauscht (= pGFP3-control), in dem die *egfp*-Expression vom konstitutiven SV40-Promotor kontrolliert wird. Zur Generierung von pGFP3-NSE-XH, -NSE-XE, -TH und -DBH

wurden die Promotorfragmente über XhoI/HindIII bzw. EcoRI inkloniert, die Orientierung über restriktionsenzymatische Spaltung getestet und zusätzlich mit dem „reversen“ Primer *egfp-N-seq* (II.1.3.), der an Position +45 bis +66 relativ zum Translationsstartpunkt der *egfp*-cDNA bindet, sequenziert.

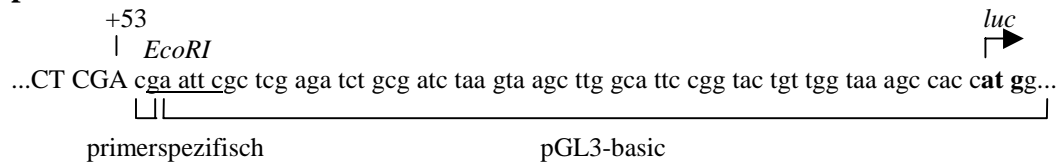
pGL3-NSE-XH:



pGFP3-NSE-XH:



pGL3-NSE-XE:



pGFP3-NSE-XE:

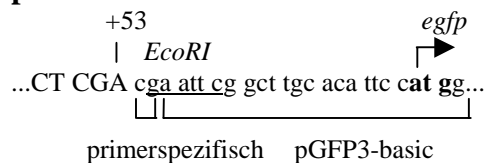


Abb. 1: Ausschnitt aus den 5'-flankierenden Nukleotidsequenzen der *egfp*- bzw. *luc*-Translationsstartpunkte in den verschiedenen pGL3-NSE und pGFP3-NSE-Konstrukten. Die als Großbuchstaben dargestellten Nukleotide entstammen dem Promotorbereich des Ratten-NSE-Gens (bis Position +53, relativ zum bevorzugten Transkriptionsstartpunkt +1), und die aus den Konstrukten pNSElacZ bzw. pGL3- oder pGFP3-basic entstammende Vektorsequenz (jeweils markiert durch die Klammern) ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Der zur Generierung des P_{NSE-XE}-Promotorfragmentes verwendete „reverse“-Primer enthielt eine EcoRI-Schnittstelle, die durch Anfügen zusätzlicher Nukleotide an die zum NSE-Promotor komplementäre Sequenz gebildet wurde (als primerspezifische Sequenz markiert, in Kleinbuchstaben). Die unterstrichenen Nukleotide stellen die Erkennungssequenzen der zur Klonierung der Promotorfragmente verwendeten Restriktionsenzyme HindIII bzw. EcoRI dar. Die Pfeile markieren den jeweiligen Translationsstartpunkt am Startcodon ATG der *egfp*- bzw. *luc*-cDNA (fett gedruckt). Auch die zusätzlich vorhandenen ATGs in den P_{NSE-XH}-Konstrukten sind fett gedruckt.

3. Untersuchungen der transienten Reporter-gen-Expression

3.1. Luciferase-Experimente

Um die Eignung der Promotorfragmente $P_{\text{NSE-XH}}$, $P_{\text{NSE-XE}}$, P_{TH} und P_{DBH} zur Vermittlung einer neuroblastomspezifischen Genexpression zu untersuchen, wurde zunächst die Promotorvermittelte Expression des Reportergens *luc* in transienten Transfektionsexperimenten ermittelt. Die nach Transfektion eines eukaryotischen Expressionsvektors auftretende, kurzzeitige Expression, die je nach Transgen 24 bis 72 h nach Transfektion am stärksten ist und dann rasch wieder abnimmt, wird als transient bezeichnet.

Dazu wurden verschiedene humane und murine Neuroblastomzelllinien und Fibroblastenlinien bzw. nicht-neuronale Tumorzelllinien mit den Photinus-Luciferasekonstrukten pGL3-basic (Negativkontrolle ohne Promotor), pGL3-control (Positivkontrolle mit SV40-Promotor), pGL3-NSE-XH, pGL3-NSE-XE, pGL3-TH und pGL3-DBH transfiziert. Als interner Standard wurde das Plasmid pRL-SV40 kotransfiziert, welches die *Renilla*-Luciferase als Reporter gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors trägt. Dies ermöglicht neben der Messung der zu untersuchenden Promotoraktivität über die *Photinus*-Luciferase die gleichzeitige („duale“) Messung der *Renilla*-Aktivität, exprimiert durch den konstitutiv exprimierenden SV40-Promotor (II.2.3.2.1.). Durch die Abgleichung der spezifischen Photinus-Luciferase-Aktivitäten mit den nicht-spezifischen Renilla-Aktivitäten fielen die von Ansatz zu Ansatz unterschiedlichen Transfektionseffizienzen nicht ins Gewicht und verfälschen die Aussage. Nach Abgleich der Photinus- mit den Renilla-Aktivitäten wurden die Versuchsergebnisse in jeder Zelllinie in Relation zur Positivkontrolle dargestellt, die gleich 100 % gesetzt wurde.

Um jedoch auch auszuschließen, daß die zu untersuchende Promotor-abhängige Expression der *Photinus*-Luciferase nicht durch eine Wechselwirkung mit dem SV40-Promotor des kotransfizierten Plasmids pRL-SV40 beeinflusst wird, wurden neben den Kotransfektionsexperimenten mit der Dual-Messung auch singuläre Transfektionen der pGL3-Konstrukte mit alleiniger Messung der Photinus-Luciferase-Aktivitäten durchgeführt (II.2.3.2.2.). Alle singulären Messungen erfolgten jeweils als Doppelansätze. Zur Standardisierung wurden die singulären *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen abgeglichen.

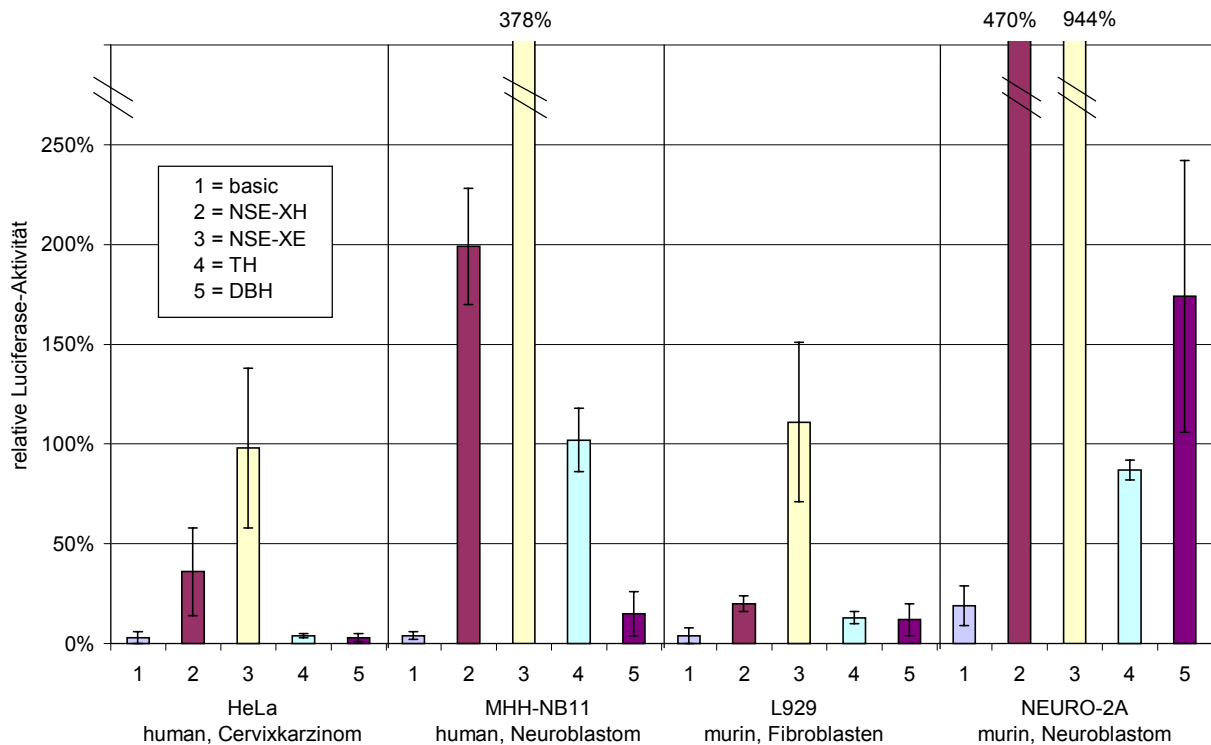


Abb. 2: Zellspezifische Luciferase-Aktivität 48 Std. nach Transfektion mit den Konstrukten pGL3-basic, -NSE-XH, -NSE-XE, -TH und -DBH. Der Luciferase-Assay wurde mit den Zelllinien HeLa, MHH-NB11, L929 und NEURO-2A durchgeführt, die mit den verschiedenen pGL3-Konstrukten transfiziert wurden. Die Werte sind im Bezug zur Positivkontrolle (pGL3-control, nicht gezeigt) dargestellt, die jeweils innerhalb einer Zelllinie gleich 100 % gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten. Da die Werte für MHH-NB11, transfiziert mit pGL3-NSE-XE (378 ± 66 %) sowie NEURO-2A, transfiziert mit pGL3-NSE-XH (470 ± 10 %) und -NSE-XE (944 ± 283 %) deutlich höher lagen als die übrigen Werte, wurde der Höchstwert der Ordinatenachse auf 250 % festgelegt.

In Abb. 2 ist das Ergebnis der relativen Luciferase-Aktivitäten, vermittelt über $P_{\text{NSE-XE}}$, P_{TH} und P_{DBH} zusammengefaßt. Da die Ergebnisse der singulären Messungen mit denen der dualen Messungen übereinstimmten, konnte eine Wechselwirkung der Promotoren bei den Kotransfektionsexperimenten ausgeschlossen werden.

Die Abbildung zeigt, daß das $P_{\text{NSE-XE}}$ -Fragment einen starken Promotor darstellt, der in den untersuchten Neuroblastomzelllinien eine hohe Luciferase-Expression vermittelt, aber auch in den nicht-neuronalen Zelllinien eine deutliche Aktivität besitzt. Während in der humanen Cervixkarzinomzelllinie HeLa und den Maus-Fibroblasten L929 die Luciferase-Aktivität bei 98 ± 40 % bzw. 111 ± 40 % im Vergleich zur Positivkontrolle der *luc*-cDNA lag, war die Expression in den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 (human) mit 378 ± 66 % und NEURO-2A (murin) 944 ± 283 % um ein Vielfaches höher.

Die $P_{\text{NSE-XH}}$ -vermittelte Luciferase-Aktivität war dabei deutlich niedriger als die des $P_{\text{NSE-XE}}$ -Fragments, was auf die inhibitorische Wirkung des akzidentiellen zweiten Startcodons hinweist. So lag die $P_{\text{NSE-XH}}$ -vermittelte Luciferase-Aktivität in den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 und NEURO-2A bei nur 199 ± 29 % bzw. 470 ± 10 % und in den Zelllinien HeLa und L929 bei 36 ± 22 % bzw. 20 ± 4 % im Vergleich zur Positivkontrolle.

Im Gegensatz zu der starken Aktivität des $P_{\text{NSE-XE}}$ -Promotorfragments, die auch in den nicht-Neuroblastom-Zelllinien relativ hoch war, war die P_{TH} -vermittelte Luciferase-Aktivität in den nicht-neuroektodermalen Zelllinien HeLa und L929 gering (4 ± 1 % bzw. 13 ± 3 %). In den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 sowie NEURO-2A war sie dagegen ähnlich wie die des konstitutiven SV40-Promotors (102 ± 16 % bzw. 87 ± 5 % im Vergleich zum pGL3-control-Vektor).

Das P_{DBH} -Promotorfragment zeigte nur in der murinen Neuroblastomzelllinie eine hohe Luciferase-Aktivität von 174 ± 68 %. In HeLa-Zellen lag diese bei 3 ± 2 %, in den Fibroblasten L929 bei 12 ± 8 % und in der humanen Neuroblastomzelllinie bei nur 15 ± 11 %.

3.2. EGFP-Experimente

Die Untersuchung der Promotor-vermittelten EGFP-Expression wurde ebenfalls in transienten Transfektionsexperimenten durchgeführt. Die Messung der Zelltyp-abhängigen EGFP-Expression erfolgte 48 Std. nach Transfektion mit den pGFP3-Konstrukten -basic, -control, -NSE-XH, -NSE-XE, -TH und -DBH mit Hilfe eines Durchflußzytometers. Die Durchflußzytometrie (II.2.2.5.) erfaßt sowohl den prozentualen Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen, als auch die Expressionsstärke, die in Form der „Mean fluorescence intensity“ (MFI) angegeben wird. Die EGFP-MFI der Gesamtpopulation wurde mittels Histogramm-Darstellung des gemessenen FL1-Parameters bestimmt und für jede Zelllinie in Relation zur Positivkontrolle pGFP3-control, die gleich 100 % gesetzt wurde, dargestellt. In Abb. 3 sind die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit den Promotorfragmenten $P_{\text{NSE-XH}}$, $P_{\text{NSE-XE}}$, P_{TH} und P_{DBH} zusammengefaßt.

Ähnlich wie in den Luciferase-Assays zeigte auch im EGFP-Reportergen-Assay $P_{\text{NSE-XE}}$ die höchsten Aktivitäten. Die EGFP-Expressionsstärke vermittelt durch $P_{\text{NSE-XE}}$ lag in den nicht-neuronalen Zelllinien HeLa und L929 bei 24 ± 8 % bzw. 27 ± 5 %. In den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 dagegen waren 101 ± 49 % und in NEURO-2A sogar 267 ± 60 % der Kontroll-EGFP-Expression nachweisbar.

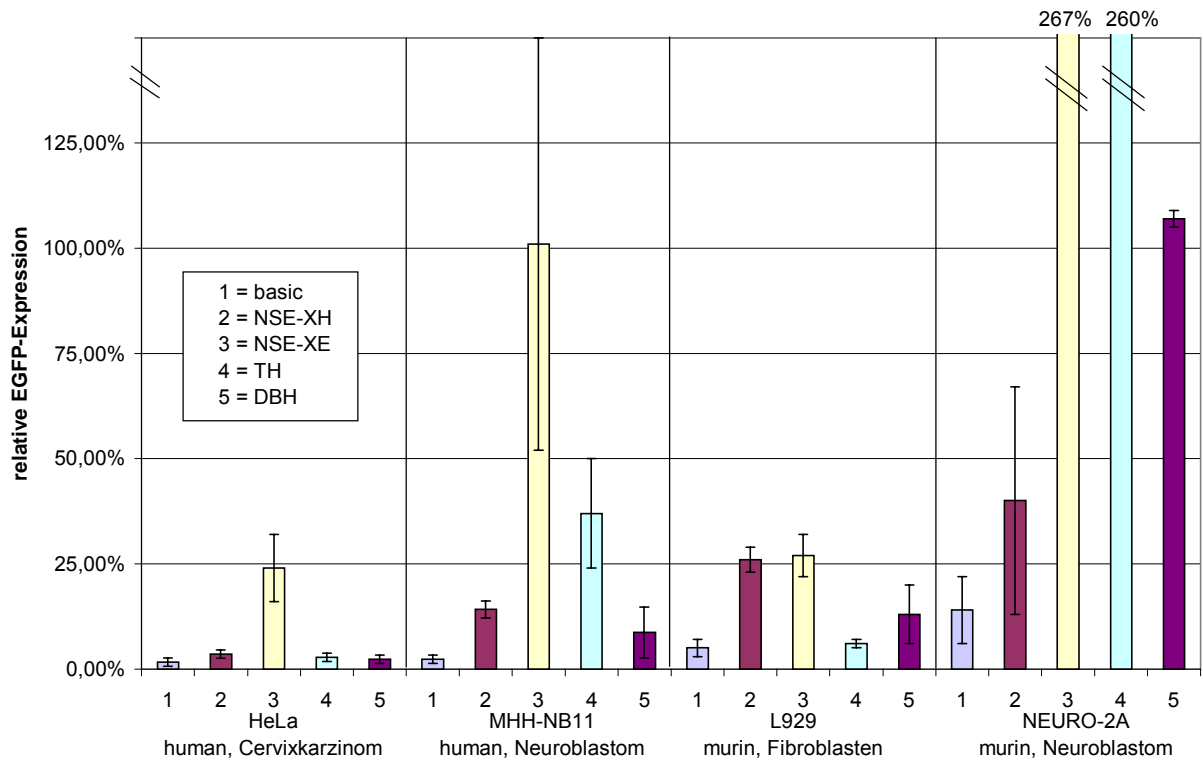


Abb. 3: Zellspezifische EGFP-Expression in den Zelllinien HeLa, MHH-NB11, L929 und NEURO-2A, die mit den pGFP3-Konstrukten –basic, -NSE-XH, -NSE-XE, –TH und -DBH transfiziert wurden (FACS-Analyse 48 Std. nach Transfektion). Die Werte sind im Bezug zur Positivkontrolle (pGFP3-control, nicht gezeigt) dargestellt, die jeweils innerhalb einer Zelllinie gleich 100 % gesetzt wurde. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von 2 bis 6 unabhängigen Versuchsreihen, die jeweils in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Da die Werte für NEURO-2A, transfiziert mit pGFP3-NSE-XE (267 ± 60 %) und -TH (260 ± 34 %) deutlich höher lagen als die übrigen Werte, wurde der Höchstwert der Y-Größenachse auf 125 % festgelegt.

Weiterhin wird deutlich, daß auch die EGFP-Expression durch das Vorhandensein eines zusätzlichen ATGs im $P_{\text{NSE-XH}}$ -Konstrukt wesentlich niedriger ist als beim $P_{\text{NSE-XE}}$ -Konstrukt. In den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 und NEURO-2A lag die EGFP-Expression bei nur 14 ± 2 % bzw. 40 ± 27 % der Positivkontrolle, und in den Zelllinien HeLa und L929 bei 4 ± 1 % bzw. 26 ± 3 %.

Die P_{TH} -vermittelte EGFP-Expression war in den nicht-Neuroblastomzelllinien sehr gering (HeLa = 3 ± 1 %; L929 = 6 ± 1 %); in den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 (37 ± 13 % EGFP-Expression) und NEURO-2A (260 ± 34 % EGFP-Expression) dagegen deutlich erhöht. Das P_{DBH} -Fragment vermittelte nur in der murinen Neuroblastomzelllinie NEURO-2A eine erhöhte EGFP-Expression von 106 ± 2 %, wohingegen die Expression in den anderen Zelllinien sehr niedrig war (MHH-NB11 = 9 ± 6 %; HeLa = 2 ± 1 %; L929 = 13 ± 7 %).

4. Klonierung des *tk/egfp*-Fusionsgens

Um die Transduktionseffizienz und die Wirksamkeit eines therapeutischen Suizidgens in Tumorzellen einfacher überprüfen zu können, wurde ein Fusionsgen aus dem Reporter gen *egfp* und dem Suizidgen *HSV-tk* kloniert. Dazu wurde der Expressionsvektor pEGFP-N1 (II.1.4.2.) verwendet. Dieses Plasmid enthält die *egfp*-cDNA, dessen 5'-Ende von einem Polylinker (MCS = „multiple cloning site“) mit singulären Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme flankiert wird. Zur Expression in eukaryotischen Zellen ist ein Cytomegalievirus (CMV)-Promotor vorgeschaltet, über den das Reporter gen *egfp* bzw. das Fusionsgen transkribiert wird. Eine zweite Expressionskassette enthält als Selektionsmarker zur Isolierung stabil transfizierter Zellen das Neomycinresistenzgen.

Die *HSV-tk*-cDNA wurde vollständig über PCR generiert, für die das Plasmid pBS-tk als Matrize diente. Der zum 5'-Ende des *HSV-tk*-Gens komplementäre „forward“-Primer wies eine NcoI-Schnittstelle auf, und der zum 3'-Ende komplementäre „reverse“-Primer enthielt die Mutation des Stopp-Codons TGA zu TGG, das für die Aminosäure Tryptophan kodiert. Weiterhin wurde eine BamHI-Schnittstelle an den „reverse“-Primer angefügt, um die Klonierung der *HSV-tk*-cDNA in die MCS des Vektors pEGFP-N1 innerhalb des Leserahmens der *egfp*-cDNA zu ermöglichen.

Das *HSV-tk*-kodierende PCR-Fragment wurde zur Überprüfung der Nukleotidsequenz zunächst in den Klonierungsvektor pCR2.1 kloniert. Anschließend wurde die komplette 1130 bp lange Nukleotidsequenz des PCR-Fragments mit Hilfe der Primer T7 und M13 (II.1.3.) sequenziert und auf ihre Korrektheit überprüft.

Zur Herstellung des Fusionsgens *tk/egfp* wurde die *HSV-tk*-cDNA über XhoI/BamHI aus dem Vektor pCR2.1 ausgeschnitten und in den XhoI/BamHI linearisierten Vektor pEGFP-N1 kloniert. Das entstandene Konstrukt wurde als *ptk/egfp* bezeichnet. Die Fusionsstelle zwischen *HSV-tk* und *egfp* wurde mit dem „reversen“ Sequenzierungsprimer EGFP-N-Seq überprüft (2.).

5. Charakterisierung des *tk/egfp*-Fusionsgens

5.1. Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der *tk/egfp*-transduzierten Zellen

Um sicherzustellen, daß die Funktionalität des EGFP durch die Fusionierung mit *HSV-TK* erhalten bleibt, wurde das Konstrukt *ptk/egfp* in die Ratten-Gliosarkom-Zelllinie 9L mittels FuGENETM transfiziert (II.2.2.2.). 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zum Vergleich diente ein Ansatz nicht-transfizierter Zellen als Negativkontrolle.

In den *tk/egfp*-transfizierten 9L-Zellen zeigte sich eine starke grüne Fluoreszenz im Zellkern und eine relativ schwache Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb. 4). Die fluoreszierende Eigenschaft des Reporters EGFP wurde durch die Fusionierung also nicht wesentlich beeinträchtigt.

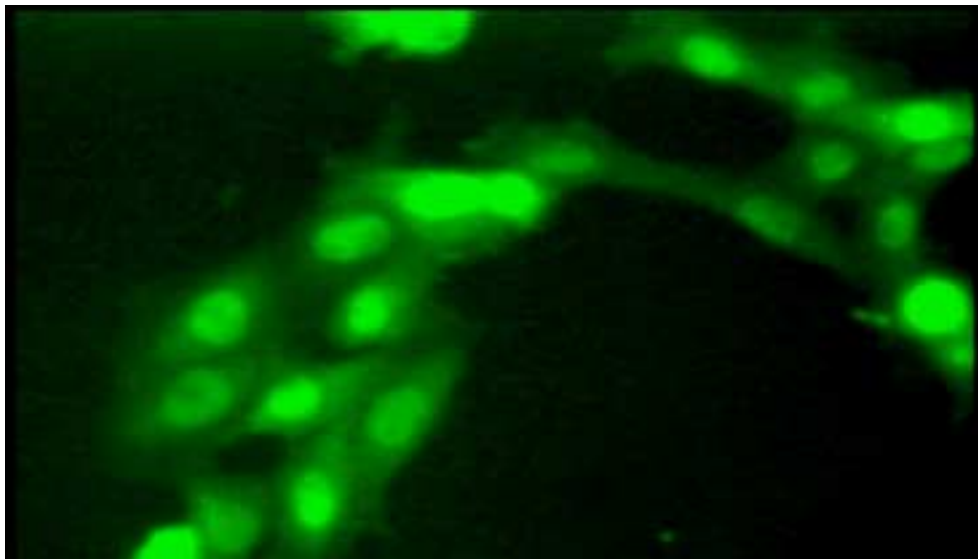


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der EGFP-Expression in *tk/egfp*-transfizierten 9L-Zellen. (Originalvergrößerung: x250)

5.2. Selektionierung stabiler Klone

Um das Fusionsgen-Produkt mittels Westernblot und Nachweis der zytotoxischen Aktivität im GCV-Sensitivitätstest weiter zu charakterisieren, wurden stabil exprimierende Zellklone isoliert. Nach Transfektion des Expressionsvektors *ptk/egfp* blieb nämlich die nach 48 Std. nachweisbare hohe transiente Transgen-Expression nur über einen kurzen Zeitraum von etwa 3 Tagen erhalten und nahm dann wieder ab.

In der Regel kommt es bei Transfektion nur in wenigen Einzelzellen zu einer zufälligen Integration der Plasmid-DNA ins Genom der Zelle und damit zu einer stabilen Transgen-Expression. Zur Isolierung und Amplifikation dieser wenigen Einzelzellen trägt der verwendete Expressionsvektor eine zweite Expressionskassette mit dem Neomycin-Resistenzgen, das der Antibiotika-Selektion (II.2.2.6.1.) dient.

Nach Transfektion des Expressionsplasmids erfolgt bei dieser Methode zunächst eine zweiwöchige Antibiotika-Selektion, unter der nur diejenigen Zellen überleben, welche das Plasmid stabil in ihr Genom eingebaut haben. Dem zufälligen Einbau der Plasmid-DNA geht in der Regel eine ebenso zufällige Linearisierung des DNA-Moleküls voran, so daß das zu untersuchende Transgen durch die Linearisierung inaktiviert werden kann. So wird erwartungsgemäß nicht von allen Antibiotika-resistenten Zellen gleichzeitig auch das zu untersuchende Transgen exprimiert. Daher müssen die Antibiotika-resistenten Zellen mittels Isolierung von Einzelzellklonen nach Ausplattierung unterschiedlicher Verdünnungen („limiting dilution“) weiter aufgereinigt werden. Nach etwa einer Woche, sobald einzelne, makroskopisch sichtbare Klone auf den ausplattierten Platten erscheinen, müssen diese isoliert und zur Untersuchung der Transgenexpression vermehrt werden. Bei der Analyse der Transgenexpression zeigt sich in der Regel, daß nur wenige der isolierten Einzelklone eine hohe Transgen-Expression aufweisen. Diese arbeitsaufwendige Methode nimmt insgesamt mehrere Wochen in Anspruch.

Das *egfp*-Fusionen könnte bei Anwendung des Fluoreszenz-vermittelten Zellsortierens (II.2.2.6.3.) einen deutlichen zeitlichen Vorteil bei der Selektionierung stabiler Zellklone bedeuten und die Generierungszeit deutlich reduzieren. Diese Arbeitshypothese sollte durch Vergleich verschiedener Methoden zur Gewinnung von stabilen 9L-TK/EGFP-Klonen nach Transfektion mit dem Plasmid *ptk/egfp* überprüft werden. Als Kriterien galten der Reinheitsgrad und die Stärke der Transgen-Expression der isolierten Einzelklone, die mittels GFP-Messung durch FACS-Analyse (II.2.2.5.) untersucht wurden.

Nach zweiwöchiger Selektion transfizierter 9L-Zellen mit dem Neomycin-Analogen G418 (II.2.2.6.1.) waren nur 65 % der isolierten Zellpopulation GFP-positiv (Abb. 5a). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) innerhalb der GFP-positiven Fraktion lag bei 88 (relative Fluoreszenzeinheiten).

Die Sortierung dieser GFP-positiven Zellen mit dem FACS-Sorter (II.2.2.6.2.) ergab eine homogene Zellpopulation mit 97 % grün fluoreszierenden Zellen und einer MFI von 347 (Abb. 5b). Damit ist dieses Selektionsverfahren, das etwa 2 bis 3 Wochen in Anspruch nahm und in einer nicht von Einzelzellklonen abgeleiteten Population resultiert, in Bezug auf Stärke

und Reinheit der Transgenexpression der deutlich zeitaufwendigeren Einzelzellklonkultivierung nach Antibiotikaselektion nahezu gleichrangig. Welche Eigenschaften Einzelzellklone besitzen, beschreibt der folgende Abschnitt.

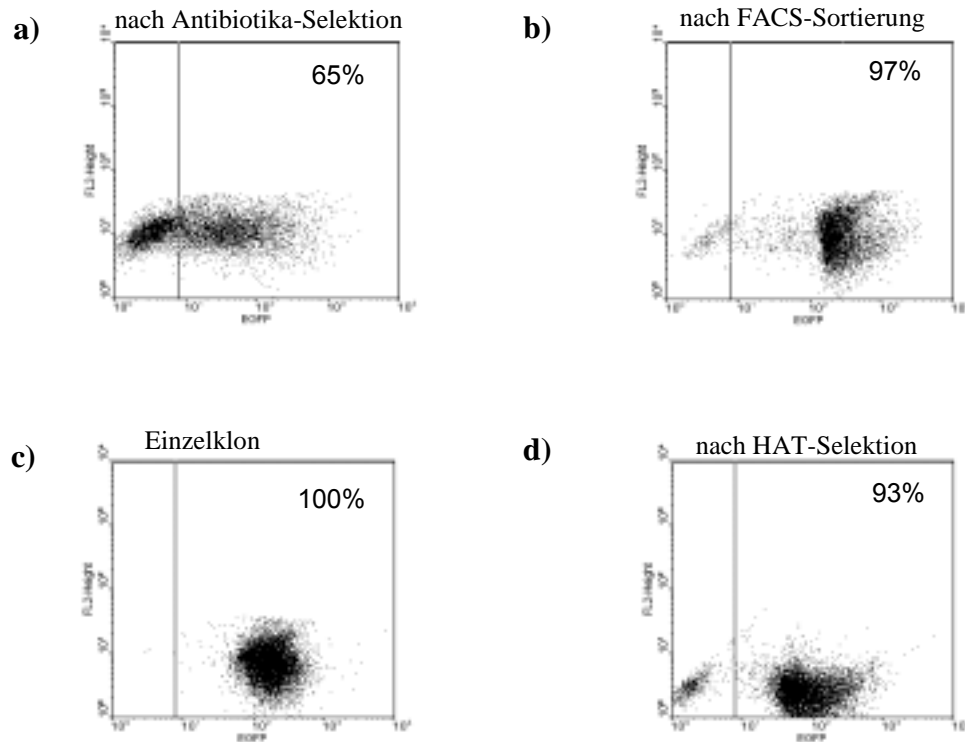


Abb. 5: Dot Plot-Darstellung der EGFP-Expression nach FACS-Analyse in unterschiedlich selektionierten *tk/egfp*-transfizierten Zellklonen. Die Menge an EGFP-positiven Zellen ist als Prozentzahl der lebenden Gesamtzellpopulation angegeben, die MFI bezieht sich auf die EGFP-positive Fraktion. **(a)** *tk/egfp*-exprimierende 9L Zellen, die durch Transfektion mit *ptk/egfp* und 14-tägige Selektion mit 1 mg/ml G418 generiert wurden (MFI = 88). Diese Population zeigt eine heterogene EGFP-Expression von 65 % und wurde weiter durch FACS-Sortierung aufgereinigt. **(b)** Das Fenster zur Sortierung wurde so gewählt, daß nur die stark EGFP-positiven Zellen ausgewählt wurden. Dies resultierte in einer 97 % EGFP-positiven Population mit einer MFI von 347. **(c)** Repräsentativer Einzelklon (100 % positiv), durch „limiting dilution“ der vorselektionierten EGFP-positiven Zellen isoliert (MFI = 206). **(d)** 14-tägige HAT-Selektion von *tk/egfp*-transfizierten LMTK⁻-Zellen, die in einer 93 % EGFP-positiven Population resultierte (MFI = 120).

Aus der vorselektionierten GFP-positiven Zellpopulation wurden nämlich zusätzlich mittels „limiting dilution“ und anschließender Einzelzellklonkultivierung mehrere Einzelzellklone isoliert. Dieses Verfahren ergab zwar 100 % GFP-positive Klone, allerdings mit sehr unterschiedlicher MFI. Ein repräsentativer Einzelklon mit einer MFI von 206 ist in Abb. 5c gezeigt und demonstriert nachdrücklich die fehlende Überlegenheit der Einzelzellklon-

kultivierung gegenüber des FACS-Sorter-unterstützten Selektionsverfahrens einer Mehrzellpopulation (Abb. 5b).

Zum Vergleich wurden LMTK⁻-Zellen (TK-defiziente Mausfibroblasten) nach Transfektion mit dem Plasmid ptk/egfp in HAT-Medium (= Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin; II.2.2.6.2.) kultiviert. Die Anreicherung von TK-exprimierenden Zellen wird dadurch erreicht, daß in HAT-Medium nur die Zellen überleben können, in denen ein erfolgreicher TK-Gentransfer stattgefunden hat. LMTK⁻-Zellen sind in Normalmedium lebensfähig, da die Nukleinsäuresynthese trotz der TK-Defizienz über Alternativwege stattfinden kann. Die Nukleinsäuresynthese ist generell auf zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen möglich, dem Haupt- und dem Reserveweg. Ein Defekt in einem der beiden Stoffwechselwege ist für die Zelle so lange nicht letal, wie der alternative Weg benutzt werden kann. Wird der Hauptstoffwechselweg durch Aminopterin blockiert und der Zelle diejenigen Vorstufen angeboten, die sie für den Reserveweg benötigt, nämlich Hypoxanthin und Thymidin, so kann sie überleben, allerdings nur wenn die TK-Defizienz korrigiert wird.

Unter Ausnutzung des TK-Gentransfers als Überlebensvorteil resultierten nach 14-tägiger Selektion in HAT-Medium 93 % GFP-positive LMTK⁻-Zellen mit einer MFI von 120 (Abb. 5d).

5.3. Westernblot

Um nachzuweisen, daß das TK/EGFP-Fusionsprotein vollständig synthetisiert wird, wurde ein Westernblot-Verfahren durchgeführt (II.2.3.1.). Dazu wurden Lysate aus *tk/egfp*-transfizierten 9L-Zellen hergestellt und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese mit einem Anti-GFP-Serum inkubiert. Eine zweite Membran mit den gleichen Proben wurde mit einem Anti-TK-Serum inkubiert.

Mit beiden Seren konnte in den transfizierten Zellen eine Proteinbande mit der zu erwartenden Größe des TK/EGFP-Fusionsproteins von ca. 70 kDa nachgewiesen werden (Abb. 6, Spalte 2 und 4). In den Lysaten der als Negativkontrolle fungierenden nicht-transfizierten Zellen (Spalte 1 und 3) konnte keine spezifische Proteinbande detektiert werden. Mit dem GFP-Antikörper wurde in den transfizierten Proben zusätzlich zu der erwarteten Proteinbande von 70 kDa eine zusätzliche schwache Bande von etwa 45 kDa dargestellt (Spalte 2), die möglicherweise auf ein Degradationsprodukt des Fusionsproteins zurückzuführen ist.

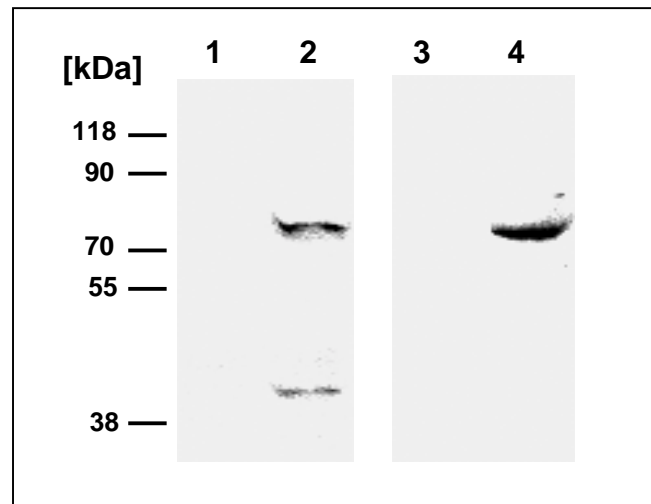


Abb. 6: Westernblot zum Nachweis des TK/EGFP-Fusionsproteins in stabil transfizierten 9L-Zellen. Die Protein-Lysate der *tk/egfp*-transfizierten 9L-Zellen (Spalte 2 und 4) sowie untransfizierten 9L-Zellen (Spalte 1 und 3) wurden durch SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zum Nachweis des Fusionsproteins wurden Spalten 1 und 2 mit einem Anti-GFP-Serum und Spalten 3 und 4 mit einem Anti-TK-Serum inkubiert.

5.4. Ganciclovir-Sensitivitätstest

Um die TK-Enzymaktivität im Vergleich zur Stärke der EGFP-Expression zu untersuchen, wurden einige 9L-TK/EGFP-Einzelklone mit unterschiedlicher MFI ausgewählt und deren GCV-Sensitivität (II.5.7) analysiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils parallele Ansätze mit nativen 9L-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen mit verschiedenen GCV-Konzentrationen behandelt und danach die Überlebensrate der Zellen bestimmt. Dazu wurde die Zellzahl ermittelt und zur graphischen Darstellung auf die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Klons bezogen, die als 100 % definiert wurde.

Das Ergebnis eines repräsentativen Sensitivitätstests ist in Abbildung 7 dargestellt, die zeigt, daß die GCV-Sensitivität mit der GFP-MFI semiquantitativ korreliert: Der sensitivste 9L-TK/EGFP-Klon zeigte auch die stärkste GFP-Expression, während der am wenigsten GCV-sensitive Klon auch die niedrigste MFI aufwies.

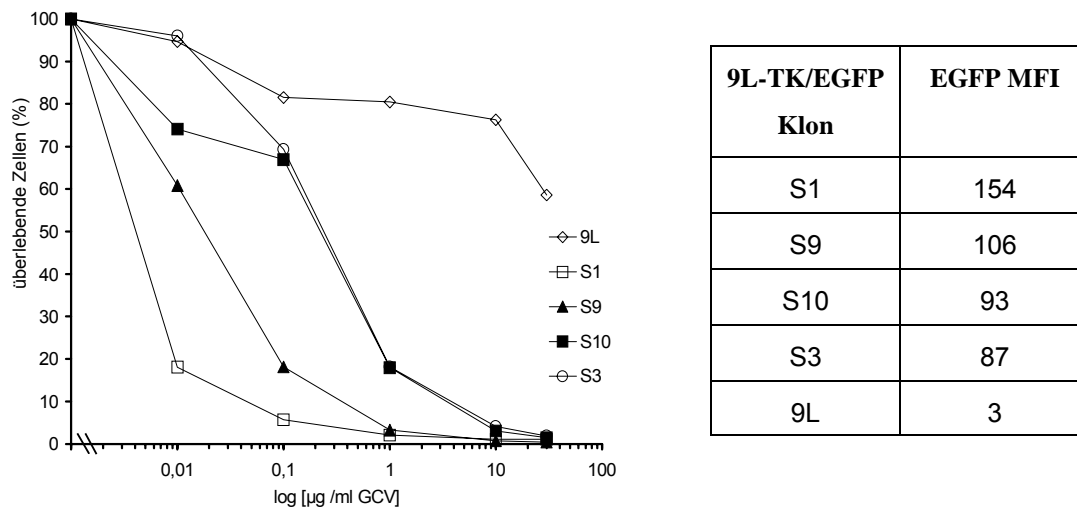


Abb. 7: GCV-Sensitivität verschiedener 9L-TK/EGFP-Klone im Vergleich zur EGFP-MFI. Das Überleben der Zellen wurde für die 9L-TK/EGFP-Klone S1, S3, S9 und S10 sowie untransfizierte 9L-Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit verschiedenen GCV-Konzentrationen bestimmt. Die mittels FACS-Analyse ermittelte MFI korreliert positiv mit der GCV-Sensitivität der 9L-TK/EGFP-Klone, d.h. die höchste MFI ist mit dem sensitivsten Klon nachweisbar.

6. Klonierung der Retrovirusvektoren

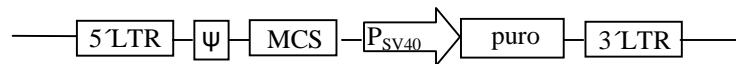
Das Arbeitsziel war die Herstellung eines retroviralen Vektors für einen Neuroblastom-spezifischen Suizidgentherapieansatz. Für dieses Projekt wurde der P_{TH} -Promotor verwendet, der bei den im ersten Teil der vorliegenden Arbeit geschilderten Promotorstudien am zuverlässigsten die beiden Hauptkriterien für einen tumorselektiven Gentherapieansatz erfüllt hat: (1) Eine ausreichend starke Transgenexpression in Neuroblastomzellen. (2) Eine geringe Transgenexpression in nicht-neuronalen Zellen. Der P_{NSE-XE} -Promotor zeigte zwar eine deutlich stärkere Expression in Neuroblastomzellen als P_{TH} , aber dafür auch eine relativ starke Expression in nicht-neuronalen Zellen. Der P_{DBH} -Promotor zeigte nur in der murinen Neuroblastomzelllinie eine zuverlässige Expression.

Beim Einbau des P_{TH} -Promotors in einen retroviralen Vektor zur Neuroblastom-spezifischen Expression des Fusionsgens *tk/egfp* mußte sichergestellt werden, daß die transgene Expressionskassette nicht durch virale Promotorelemente des verwendeten Vektors, insbesondere des starken retroviralen 5'-LTR-Promotors beeinflusst und damit die Tumorspezifität aufgehoben wird.

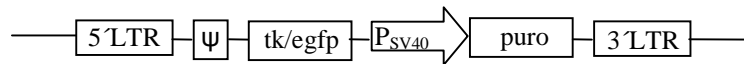
Als Retrovirus-Grundgerüst wurde der in Abb. 8a schematisch dargestellte Retrovirusvektor pBABEpuro (Morgenstern und Land, 1990) verwendet, der auf dem „Moloney Murine

Leukemia Virus“ (MoMLV) basiert. Neben den 5′- und 3′-LTRs (= „long terminal repeats“) trägt dieser Vektor als weiteres retrovirales Element lediglich das Verpackungssignal (Ψ), während die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* trunziert bzw. deletiert wurden. Zum Einbau des therapeutischen Transgens trägt der Vektor eine multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“ = MCS). Zur Selektion der transduzierten Zellen ist eine interne Expressionskassette, bestehend aus SV40-Promotor (P_{SV40}) und dem Puromycin-Resistenzgen (*puro*), enthalten.

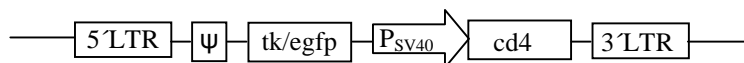
a) pBABEpuro



b) pBABE-tk/egfp-puro



c) pBABE-tk/egfp-cd4



d) pBREV- P_{TH} -tk/egfp-cd4

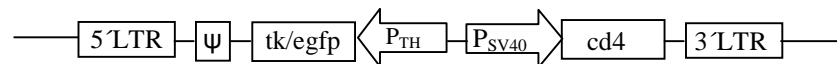


Abb. 8: Schematische Darstellung der klonierten Retrovirusvektoren, die auf dem Retrovirusvektor pBABEpuro (a) basieren. Neben den 5′- und 3′-„long terminal repeats“ (LTR) trägt dieser Vektor nur das Verpackungssignal Ψ als weiteres retrovirales Element. Zum Einbau des zu exprimierenden Transgens enthält der Vektor eine „multiple cloning site“ (MCS) und zur Selektionierung transduzierter Zellen das Puromycin-Resistenzgen (*puro*) unter transkriptioneller Kontrolle eines SV40-Promotors (P_{SV40}). Zur Generierung von pBABE-tk/egfp-puro (b) wurde das Fusionsgen *tk/egfp* in die MCS des Vektors inkloniert, so daß die Transgenexpression über den viralen LTR-Promotor erfolgt. In dem Konstrukt pBABE-tk/egfp-cd4 wurde das *puro*-Resistenzgen durch die cDNA des trunzierten humanen CD4-Gens ersetzt (c). Zur Generierung von pBREV- P_{TH} -tk/egfp-cd4 (pBREV = pBABE mit „revers“ orientierter, spezifischer Expressionskassette; d) wurde die spezifische Expressionskassette, bestehend aus dem Neuroblastom-spezifischen Promotor P_{TH} und dem *tk/egfp*-Fusionsgen, in „antisense“-Orientierung zum 5′LTR-Promotor des Vektors eingebaut.

Als Positivkontrolle wurde der Vektor pBABE-tk/egfp-puro (Abb. 8b) kloniert, bei dem die *tk/egfp*-Expression ohne Zelltypspezifität über den viralen 5′LTR-Promotor erfolgt. Um die Eignung der trunzierten *cd4*-cDNA als Markergen in retroviralen Vektoren zu untersuchen, wurde in dem Konstrukt pBABE-tk/egfp-cd4 das Resistenzgen *puro* durch *cd4* ersetzt (Abb. 8c; pBABE-tk/egfp-cd4). Die verkürzte cDNA des humanen CD4-Oberflächenmarkers mit

deletierter intrazellulärer Domäne kann zur MACS-vermittelten Isolierung CD4-exprimierender Zellen (II.2.2.6.4.) benutzt werden. Gleichzeitig ermöglicht sie auch die Bestimmung der Transduktionsrate mittels FACS (II.2.2.5.). Dies ist besonders für den Vektor mit spezifischer Expressionskassette von Bedeutung, da hier die Expression des *tk/egfp*-Fusionsgens nur über den neuroblastomspezifischen Promotor vermittelt wird und somit die Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS-EGFP-Messung in nicht-neuronalen Zellen nicht möglich ist. Die über den konstitutiven SV40-Promotor vermittelte CD4-Expression erlaubt dagegen die Bestimmung der Transduktionsrate in allen Zelltypen.

Eine Möglichkeit, um die spezifische Expression der Transgenkassette (P_{TH} -*tk/egfp*) ohne Kontrollübernahme („overdriving“) durch virale Promotorelemente sicherzustellen, ist die Ausrichtung der spezifischen Promotor/Transgen-Expressionskassette in „antisense“-Orientierung zum retroviralen 5'-LTR-Promotor. Dieses Konstrukt wurde als pBREV- P_{TH} -*tk/egfp-cd4* (pBREV = pB \underline{A} BE-Vektor mit „revers“ orientierter spezifischer Expressionskassette; Abb. 8d) bezeichnet. Anstelle des *puro*-Resistenzgens trägt dieser Vektor, wie auch das Kontroll-Konstrukt pB \underline{A} BE-*tk/egfp-cd4*, die *cd4*-cDNA.

7. Charakterisierung der Retrovirus-Vektoren mittels Transduktion muriner Zelllinien

7.1. Bestimmung der Virustiter transienter Virusüberstände

Bei der Entwicklung retroviraler Vektoren muß prinzipiell sichergestellt sein, daß ausreichend funktionstüchtige und infektiöse Vektorpartikel hergestellt werden. Ein Maß hierfür ist die Transduktionseffizienz, in die Effizienz der viralen RNA-Synthese, Verpackung und Infektionsfähigkeit retroviraler Partikel einfließen. Deswegen wurde untersucht, ob mit den modifizierten Vektoren mit *cd4*-Markergen und spezifischer Expressionskassette in „antisense“-Orientierung (6.) eine ausreichend gute Transduktionseffizienz erreicht werden kann. Um die Konstrukte pB \underline{A} BE-*tk/egfp-puro*, pB \underline{A} BE-*tk/egfp-cd4* und pBREV- P_{TH} -*tk/egfp-cd4* hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienzen miteinander vergleichen zu können, wurden diese Vektoren zur Generierung infektiöser Virusüberstände in die Verpackungszelllinie Phoenix-eco (FNX-E) transfiziert (II.2.2.3.1.). Die zur Verpackung und Retrovirusreplikation essentiellen viralen Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, welche in den eigentlichen Retrovirusvektoren fehlen, sind nämlich stabil ins Genom dieser und ähnlicher Verpackungszellen eingebaut. Die mittels FNX-E-Transfektion gewonnenen Virusüberstände können zur Infektion muriner Zellen verwendet werden, da das von den Verpackungszellen exprimierte ekotrope Hüllprotein Env eine Wirtsspezifität für Nager-Zellen bedingt.

Das Ergebnis der FNX-E-Transfektionen ist in Tab. 2 dargestellt, in der die nach Virusernte (48 Std. nach Transfektion) mittels FACS-Analyse ermittelte Expression der Markergene *egfp* und *cd4* zusammengefaßt ist. Die Transduktionseffizienz korreliert in Verpackungszellen in der Regel mit dem Virustiter der hergestellten Virusüberstände, wie im weiteren Verlauf für jeden Vektor noch dargestellt wird. Die GFP-Expression war in den pBABE-tk/egfp-puro-transfizierten FNX-E-Zellen nur geringfügig höher als in den pBABE-tk/egfp-cd4- und pBREV-TH-tk/egfp-cd4-transfizierten Zellen. Auch der Anteil CD4-positiver Zellen war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den pBABE-tk/egfp-cd4- oder pBREV-TH-tk/egfp-cd4-transfizierten Zellen.

Vektor	% GFP-positive Zellen	% CD4-positive Zellen
pBABE-tk/egfp-puro	55,6 ± 3 %	-
pBABE-tk/egfp-cd4	47,8 ± 3 %	58,5 ± 0 %
pBREV-TH-tk/egfp-cd4	35 ± 12 %	48 ± 14 %

Tab. 2: EGFP- und CD4-Expression 48h nach Transfektion der Retrovirus-Verpackungszelllinie FNX-E. Angegeben ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus Doppelansätzen.

Die mittels FNX-E-Transfektion gewonnenen transienten Virusüberstände wurden anschließend in seriellen Verdünnungen zur Infektion der murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3 verwendet, um je nach Konstrukt den GFP- bzw. CD4-Titer zu ermitteln (Tab. 3). Diese Zelllinie ist durch ihre gute Infizierbarkeit für diesen Versuchsansatz besonders geeignet.

Durch den Virustiter wird die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Volumeneinheit angegeben. Die Titerbestimmung ist mittels Durchflußzytometrie möglich, da die zu charakterisierenden Vektoren ein im FACS nachweisbares Markergen (*egfp* oder *cd4*) enthalten.

Bei Bestimmung der jeweiligen Virustiter der verschiedenen Retrovirusvektoren zeigte sich, daß der Austausch des *puro*-Resistenzgens durch die *cd4*-cDNA keine signifikante Verringerung des Titers zur Folge hat, wenn man die Titerbestimmung über die GFP-Expression durchflußzytometrisch bestimmt. Hier weichen die ermittelten Titer für pBABE-tk/egfp-puro und pBABE-tk/egfp-cd4 nur geringfügig voneinander ab. Dagegen war der über die GFP-Expression bestimmte Titer von pBREV-TH-tk/egfp-cd4 im Vergleich zur Positivkontrolle pBABE-tk/egfp-cd4 jedoch deutlich erniedrigt in den nicht-neuronalen 3T3-

Zellen (um das ca. 4,7-fache). Dies könnte ein Hinweis auf die neuronal-selektive GFP-Expression des Promotors P_{TH} sein, die in den nachfolgenden Abschnitten weiter untersucht wurde. Um Promotor-abhängige Expressionsunterschiede bei der Titerbestimmung ausschließen zu können, wurde der retrovirale Titer über die CD4-Expression bestimmt. Die CD4-Expression erfolgt in beiden Konstrukten, pBREV-TH-tk/egfp-cd4 und pBABE-tk/egfp-cd4, über den konstitutiven SV40-Promotor. Bei der retroviralen Titerbestimmung über die CD4-Expression zeigte sich, daß der CD4-Titer des spezifischen Konstrukts pBREV-TH-tk/egfp-cd4 nicht signifikant geringer war als der ermittelte Titer der Positivkontrolle pBABEtk/egfp-cd4.

Vektor	„GFP-Titer“	„CD4-Titer“
pBABE-tk/egfp-puro	$1,95 \pm 0,1 \times 10^6$	-
pBABE-tk/egfp-cd4	$1,6 \pm 0,4 \times 10^6$	$2,28 \pm 0,7 \times 10^6$
pBREV-TH-tk/egfp-cd4	$3,4 \pm 2 \times 10^5*$	$1,7 \pm 1 \times 10^6*$

Tab. 3: GFP- und CD4-Titer der transient hergestellten FNX-E-Virusüberstände der Retrovirus-Konstrukte pBABE-tk/egfp-puro, pBABE-tk/egfp-cd4 und pBREV-TH-tk/egfp-cd4, die über Infektion der murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3 ermittelt wurden. Die Infektionen wurden jeweils als Doppelbestimmungen angesetzt. *Der Titerunterschied beim pBREV-TH-tk/egfp-cd4-Vektor in den nicht-neuronalen Fibroblasten könnte ein Hinweis auf die neuronale Selektivität des P_{TH} -Promotors sein.

7.2. Untersuchung der Neuroblastom-spezifischen Expression

Um zu untersuchen, ob der Retrovirusvektor mit P_{TH} -tk/egfp-Expressions-kassette eine ausreichend hohe und spezifische Expression in Neuroblastomzellen vermittelt, wurden murine Neuroblastom- und Fibroblasten-Zelllinien mit dem transienten FNX-E-Virusüberstand des pBREV-TH-tk/egfp-cd4-Vektors infiziert. Als Positivkontrolle für die Transduktion wurde der FNX-E-Überstand des pBABE-tk/egfp-cd4-Vektors verwendet. Neben der murinen Neuroblastom-Zelllinie NEURO-2A wurde die nicht-neuronale murine Fibroblasten-Zelllinie L929 verwendet, die bereits in den Luciferase-Experimenten als Negativkontrolle gedient hatte. Zur Untersuchung der Transduktionseffizienz wurden die Zellen 48h nach Transduktion durchflußzytometrisch analysiert.

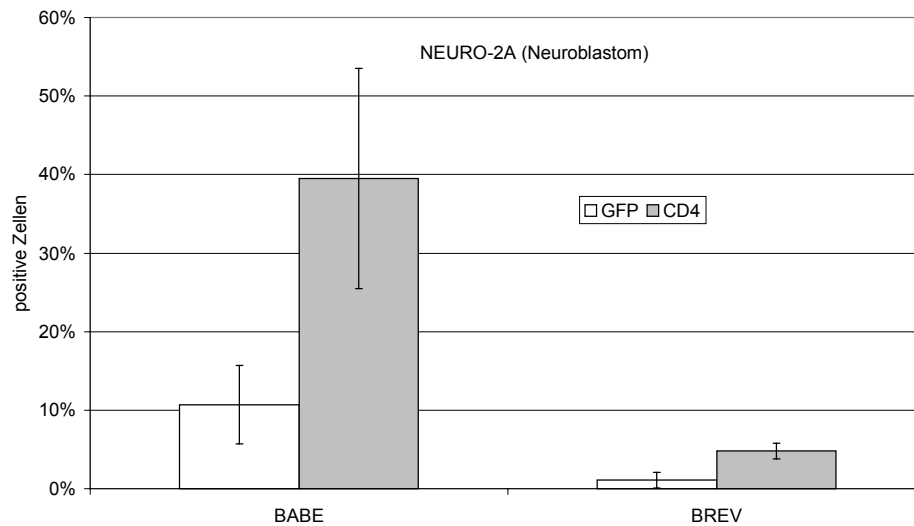


Abb. 9: EGFP- und CD4-Expression 48h nach 2-facher Infektion der murinen Zelllinie NEURO-2A mit FNX-E-Überständen der Retrovirusvektoren pBABE-tk/egfp-cd4 (= BABE) und pBREV-TH-tk/egfp-cd4 (= BREV). Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus 5 Ansätzen.

In ersten Transduktionsexperimenten (nicht dargestellt) war nach einfacher Infektion mit dem viralem FNX-E-Überstand des pBABE-Konstrukts kaum eine meßbare GFP-Expression in den Zelllinien NEURO-2A und L929 nachweisbar (< 1 % GFP-positive). Zur Erhöhung der Transduktionsrate wurden die Zellen in den folgenden Experimenten zweimal mit infektiösem Virusüberstand infiziert. Das Ergebnis nach zweifacher Infektion der Zelllinie NEURO-2A ist in Abb. 9 dargestellt. Hier waren $10,7 \pm 5$ % der Zellen GFP-positiv bzw. $39,5 \pm 14$ % CD4-positiv. Bei der Zelllinie L929 ergab auch die zweifache Infektion eine kaum nachweisbare GFP-Expression (< 1 % GFP-positive).

Die Infektionsrate nach Transduktion des Retrovirusvektors pBREV-TH-tk/egfp-cd4 war in NEURO-2A deutlich schlechter als mit pBABE-tk/egfp-cd4: Es waren kaum GFP-positive Zellen nachweisbar ($1,1 \pm 1$ %), und auch der Anteil CD4-positiver Zellen war mit $4,8 \pm 1$ % sehr gering.

Die Transduktionseffizienz in der murinen Neuroblastom-Zelllinie war damit zu gering, um eine Aussage über die Spezifität der Transgenexpression nach retroviralem Gentransfer machen zu können. Alternativ wurde in den folgenden Untersuchungen die Verwendung humaner Zelllinien überprüft.

8. Untersuchung der Neuroblastom-spezifischen Expression nach Transduktion humaner Zelllinien

8.1. Transduktion mit transienten Überständen

Zur Infektion humaner Zelllinien mit den Retrovirusvektoren pBABE-tk/egfp-cd4 und pBREV-TH-tk/egfp-cd4 wurden zunächst amphotrope Virusüberstände generiert (II.2.2.3.). Dies erfolgte mittels Transfektion der Retrovirusvektoren in die Verpackungszelllinie FNX-ampho (FNX-A). Diese Zelllinie exprimiert ein amphotropes Env, welches eine Wirtsspezifität für humane Zellen bedingt. Die Durchführung der Transfektion und anschließende Untersuchung der Transfektionseffizienz erfolgte in gleicher Weise wie bei Gewinnung der FNX-E-Überstände (7.1.). Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die Transfektionseffizienz war bei beiden Vektoren relativ hoch. Der Anteil CD4-positiver Zellen war beim Konstrukt pBREV-TH-tk/egfp-cd4 etwas höher als beim Konstrukt pBABE-tk/egfp-cd4. Der Anteil GFP-positiver Zellen war dagegen niedriger.

Vektor	% GFP-positive Zellen	% CD4-positive Zellen
pBABE-tk/egfp-cd4	44 ± 8 %	58,3 ± 10,4 %
pBREV-TH-tk/egfp-cd4	22 ± 7,6 %	73 ± 15,3 %

Tab. 4: EGFP- und CD4-Expression 48h nach Transfektion der Retrovirus-Verpackungszelllinie FNXampho. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus 6 verschiedenen Ansätzen.

Die FNX-A-Überstände wurden anschließend zur Infektion der humanen Neuroblastom-Zelllinie MHH-NB11 sowie der nicht-neuronalen Zelllinie HeLa verwendet. Da die Transduktionseffizienz beider Vektoren sowohl nach einfacher als auch zweifacher Infektion mit dem Virusüberstand nur gering war, wurden die Überstände für die weiteren Infektionen konzentriert (II.2.2.3.). Die Transduktion der Zelllinie HeLa mit pBABE-tk/egfp-cd4 ergab in der FACS-Analyse 8 % GFP-positive bzw. 17 % CD4-positive Zellen (Abb. 10). Nach Transduktion mit pBREV-TH-tk/egfp-cd4 waren nur $0,86 \pm 0,36$ % der Zellen GFP-positiv und $4,83 \pm 2,12$ % CD4-positiv. Die Transduktionseffizienz der Neuroblastomzelllinie war dagegen deutlich schlechter: Nur 0,93 % der Zellen waren nach Transduktion mit pBABE-tk/egfp-cd4 GFP-positiv und 1,69 % CD4-positiv. Nach Transduktion mit pBREV-TH-

tk/egfp-cd4 waren ebenfalls kaum GFP-positive ($0,73 \pm 0,24$ %) oder CD4-positive Zellen ($1,98 \pm 0,2$ %) nachweisbar.

Demnach war die Infektionsrate auch bei Verwendung amphotroper transienter Virusüberstände zu niedrig, um anhand der Daten die Eignung des Vektors für eine Neuroblastom-spezifische Expression bewerten zu können.

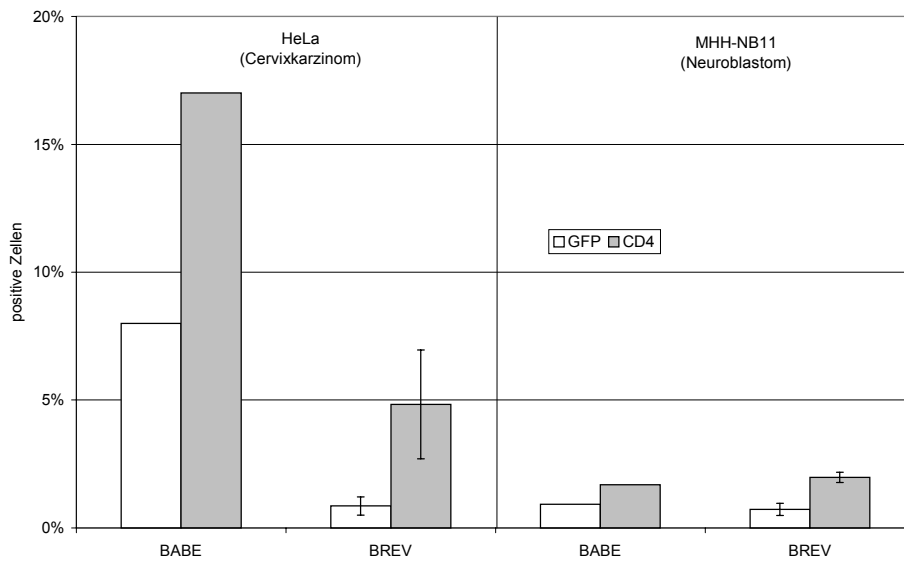


Abb. 10: EGFP- und CD4-Expression nach retroviraler Transduktion mit den Konstrukten pBABE-tk/egfp-cd4 (= BABE) und pBREV-TH-tk/egfp-cd4 (= BREV) in die humane nicht-neuronale Zelllinie HeLa und die humane Neuroblastom-Zelllinie MHH-NB11. Die viralen FNX-A-Überstände wurden zur Infektion konzentriert. Dargestellt ist das Ergebnis eines einfachen Ansatzes (BABE) bzw. der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus 3 verschiedenen Ansätzen (BREV).

8.2. Herstellung stabiler Verpackungszellen

Um das Problem der schlechten Transduktionseffizienz mit transienten Virusüberständen zu umgehen, wurden für die weiteren Untersuchungen stabile Verpackungszelllinien für die Vektoren pBREV-TH-tk/egfp-CD4 und pBABE-tk/EGFP-CD4 generiert (II.2.2.3.2.). Die dazu verwendete Verpackungszelllinie PG13 trägt das *env*-Gen des *Gibbon-Ape-Leukemia-Virus* (GALV), welches unter anderem eine Wirtsspezifität für humane Zellen vermittelt. Der Vorteil gegenüber transient hergestellten Virusüberständen besteht darin, daß die stabil Virusproduzierenden Zellen mittels Selektion angereichert werden können, um auf diese Weise eine deutlich größere Virus-produzierende Zellpopulation zu erhalten. Auf diese Weise können in der Regel Virusüberstände mit höheren Titern als nach transienter Virusherstellung erreicht werden. Zudem kann unbegrenzt oft Virusüberstand von den stabilen Verpackungszellen gewonnen werden, während für jede transiente Virusherstellung jeweils eine Transfektion erforderlich ist.

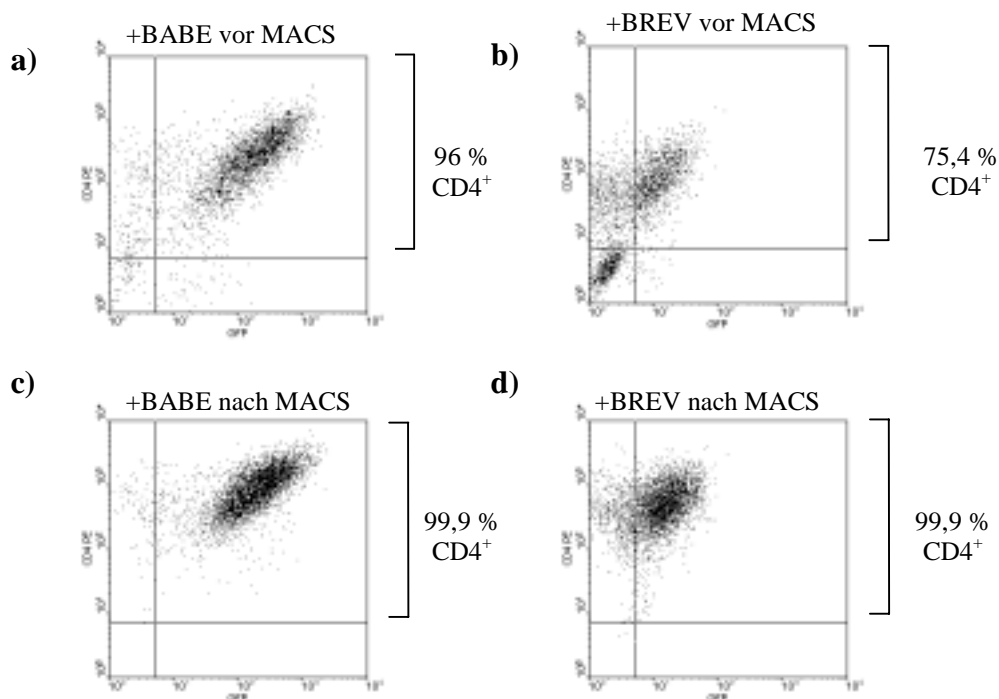


Abb. 11: EGFP- und CD4-Expression nach Transduktion der Verpackungszelllinie PG13 mit den Überständen der pBABE-tk/egfp-cd4- (= BABE; **a**, **c**) bzw. pBREV-TH-tk/egfp-cd4- (=BREV; **b**, **d**) transfizierten FNXeco-Zellen vor (**a**, **b**) und nach (**c**, **d**) CD4-MACS-Säule. Die Abbildung zeigt eine Dotplot-Darstellung der GFP-Fluoreszenz gegen die Fluoreszenz des PE- (Phycoerythin-) konjugierten CD4-Antikörpers. Die Quadranten wurden so festgelegt, daß die nicht-transfizierten Zellen jeweils im unteren linken Quadranten liegen.

Eine einfache Möglichkeit, um die Retrovirusvektor-DNA stabil ins Genom der Verpackungszellen einzubringen, stellt die Infektion mit transient hergestelltem Virusüberstand dar. Zu diesem Zweck wurde die Verpackungszelllinie PG13 mit FNX-E-Überständen der Vektoren pBABE-tk/egfp-cd4 bzw. pBREV-TH-tk/egfp-cd4 infiziert. Die Infektion mit konzentrierten Virusüberständen ergab in der FACS-Analyse 91,5 % GFP- bzw. 96 % CD4-positive pBABE-transduzierte PG13-Zellen (Abb. 11a) und 48,2 % GFP- bzw. 75,6 % CD4-positive pBREV-transduzierte PG13-Zellen (Abb. 11b). Die P_{TH} -vermittelte EGFP-Expression war in den Verpackungszellen also deutlich niedriger als die über den LTR-Promotor vermittelte EGFP-Expression, was dadurch bedingt ist, daß der Neuron-spezifische TH-Promotor in den auf 3T3-Fibroblasten basierenden PG13-Zellen nur geringe Promotoraktivität zeigt.

Zur Anreicherung der transduzierten Zellen wurde anschließend eine MACS-Selektion durchgeführt (II.2.2.6.4.). Die verwendeten Retrovirusvektoren tragen als Selektionsmarker die *cd4*-cDNA, so daß eine magnetische Anreicherung der infizierten Zellen mit Hilfe eines spezifischen „Microbead“-gekoppelten CD4-Antikörpers möglich ist. Die FACS-Analyse des CD4-Reinheitsgrads nach MACS-Aufreinigung ergab eine homogen CD4-exprimierende Zellpopulation. Nach Anreicherung waren 97,6 % der pBABE-transduzierten PG13-Zellen GFP-positiv (Abb. 11c). Bei den pBREV-transduzierten PG13-Zellen lag der Anteil der GFP-Positiven hier bei nur 79,6 % (Abb. 11d).

8.4. Titervergleich der stabilen und transienten amphotropen Virusüberstände

Vor der Infektion von Neuroblastomzellen mit PG13-Überständen sollte untersucht werden, ob mit diesen Virusüberständen tatsächlich eine höhere Transduktionseffizienz als mit den transienten FNX-A-Überständen erreicht wird. Dazu wurden sowohl die GFP- als auch die CD4-Titer der FNX-A- und PG13-Überstände der zu untersuchenden Vektoren bestimmt. Dies erfolgte mittels Infektion der humanen Zelllinie HT1080 mit seriellen Verdünnungen der zu vergleichenden Überstände. Die Auswahl dieser Zelllinie erfolgte aufgrund der Tatsache, daß diese Zelllinie bekannterweise mit retroviralen Überständen gut infizierbar ist.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse in Tab. 5 macht deutlich, daß über die Herstellung stabil transduzierter PG13-Verpackungszellen bessere Titer erreicht wurden als nach transienter FNX-A-Transfektion. Ein besonders deutlicher Unterschied ergibt sich beim Vergleich der Überstände des Vektors pBABE-tk/egfp-cd4. Der über die GFP-Expression ermittelte Titer des PG13-Überstands ist etwa 7-fach höher als der des FNX-A-Überstands.

Betrachtet man den über die CD4-Expression ermittelten Titer, so ist derjenige des PG13-Überstandes ca. 5-fach höher als der des FNX-A-Überstandes. Auch beim Vektor pBREV-TH-tk/egfp-cd4 ergab der PG13-Überstand höhere Virustiter. Allerdings war der Unterschied zum FNX-A-Überstand bei einer Erhöhung um den Faktor 1,6 für den „GFP-Titer“ und um den Faktor 2 für den „CD4-Titer“ weniger deutlich.

Vektor	FNX-A-Überstand		PG13-Überstand	
	„GFP-Titer“	„CD4-Titer“	„GFP-Titer“	„CD4-Titer“
BABE	$1,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,3 \pm 0 \times 10^5$	$1,18 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,17 \pm 0,2 \times 10^6$
BREV	$4 \pm 1,7 \times 10^4$	$2 \pm 0,06 \times 10^5$	$6,5 \pm 0,6 \times 10^4$	$4,3 \pm 1,6 \times 10^5$

Tab. 5: Vergleich der „GFP“- und „CD4-Titer“ der transienten (FNX-A-) und stabilen (PG13-) Virusüberstände, die mit der humanen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 ermittelt wurden. Die Infektionen wurden jeweils als Doppelbestimmungen angesetzt. (BABE = pBABE-tk/egfp-cd4; BREV = pBREV-TH-tk/egfp-cd4)

8.5. Transduktion humaner Zellen mit den stabilen Virusüberständen

Zur Untersuchung der Neuroblastom-Spezifität der Suizidgen-Expression nach pBREV-Transduktion wurden die humane Neuroblastom-Zelllinie MHH-NB11 und die nicht-neuronale Zelllinie HeLa verwendet. Den ermittelten Virustitern zufolge war mit den PG13-Überständen ein höherer Anteil transduzierter Zellen zu erwarten als nach FNX-A-Transduktion. Die Infektion der Zellen erfolgte mit konzentriertem PG13-Überstand des zu untersuchenden Vektors pBREV-TH-tk/egfp-cd4 bzw. des als Positivkontrolle dienenden Vektors pBABE-tk/egfp-cd4. Die Bestimmung der GFP- und CD4-positiven Zellen nach Infektion wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt.

Abb. 12 zeigt, daß der Anteil GFP- und CD4-exprimierender Zellen bei der Zelllinie HeLa sowohl nach Infektion mit pBABE-tk/egfp-cd4 ($71,6 \pm 3,6$ % GFP- und $80,6 \pm 8,2$ % CD4- positive Zellen) als auch nach Infektion mit pBREV-TH-tk/egfp-cd4 ($10,6 \pm 8,4$ % GFP- und $52,9 \pm 23,3$ % CD4- positive Zellen) deutlich höher ist als bei der Zelllinie MHH-NB11. Hier waren nach pBABE-tk/egfp-cd4 -Transduktion nur $41,7 \pm 12,6$ % der Zellen GFP-positiv und $59 \pm 3,7$ % CD4-positiv. Die Transduktion mit pBREV-TH-tk/egfp-cd4 ergab $5,1 \pm 2,4$ % GFP- positive und $22,3 \pm 13,7$ % CD4- positive Zellen.

Vergleicht man die P_{TH} -vermittelte GFP-Expression nach pBREV-Transduktion jeweils bezogen auf die P_{SV40} -vermittelte CD4-Expression als internen Standard, so ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Neuroblastom-Zelllinie und der nicht-neuronalen Zelllinie im Anteil der GFP-exprimierenden Zellen erkennbar: Wenn man man den Anteil der CD4-exprimierenden Zellen nach pBREV-Transduktion als 100 % definiert, so exprimieren in beiden Zelllinien etwa 20 % davon GFP.

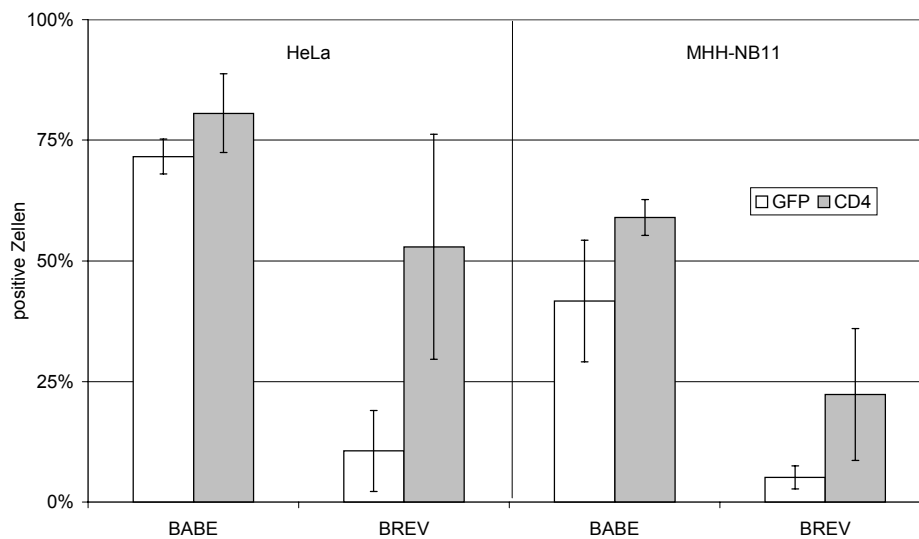


Abb. 12: EGFP- und CD4-Expression nach retroviraler Transduktion mit den PG13-Überständen der Vektoren BABE-tk/egfp-cd4 (= BABE) und PG-BREV-TH-tk/egfp-cd4 (BREV) in die nicht-neuronale humane Zelllinie HeLa und die Neuroblastom-Zelllinie MHH-NB11. Die Infektionen wurden mit konzentrierten Virusüberständen durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus 3 verschiedenen Ansätzen.

Der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen allein scheint demnach kein geeignetes Maß zur Darstellung eines Promotor-abhängigen Expressionsunterschieds zu sein. Ein besseres Maß zur Darstellung der Spezifität besteht möglicherweise in einer Einbeziehung des X-Means der GFP-positiven Zellen, der neben dem prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen ebenfalls durch die FACS-Analyse erfaßt wird. Allerdings besteht bei der Neuroblastom-Zelllinie MHH-NB11 nach wie vor das Problem der zu geringen Transduktionseffizienz, die durch die Verwendung der PG13-Überstände anstelle der FNX-A-Überstände nur unzureichend verbessert wurde. Bei der Zelllinie HeLa dagegen war die Transduktionseffizienz deutlich besser. Daher können mögliche Unterschiede in der GFP-Expression zwischen den beiden Zelllinien nicht allein auf die P_{TH} -vermittelte Spezifität, sondern vielmehr auch auf unterschiedliche Transduktionseffizienzen zurückgeführt werden.

Um dieses Problem zu umgehen, sollten die infizierten Zellen zunächst angereichert werden, um homogene Transgen-exprimierende Zellpopulationen zu erhalten. Mit den angereicherten Zellpopulationen sollten neben der Darstellung des P_{TH} -vermittelten Unterschieds der Reporter-gen-Expression zwischen Neuroblastomzellen und nicht-neuronalen Zellen auch Untersuchungen der GCV-Sensitivität (II.2.2.7) erfolgen.

8.6. Anreicherung der transduzierten Zellen mittels MACS

Die verwendeten Retrovirusvektoren tragen als Selektionsmarker die *cd4*-cDNA, so daß die Anreicherung transduzierter Zellen mittels MACS erfolgen konnte (II.2.2.6.4.). Der Reinheitsgrad nach der magnetischen Säulenaufreinigung sowie die GFP-Expressionsstärke wurden durch FACS-Analyse ermittelt. Bei der Zelllinie MHH-NB11 wurde die Aufreinigung wiederholt, da der CD4-Anteil nach der ersten MACS-Säule unter 90 % lag. Das Ergebnis der FACS-Analyse nach Aufreinigung ist in Abb. 13 dargestellt.

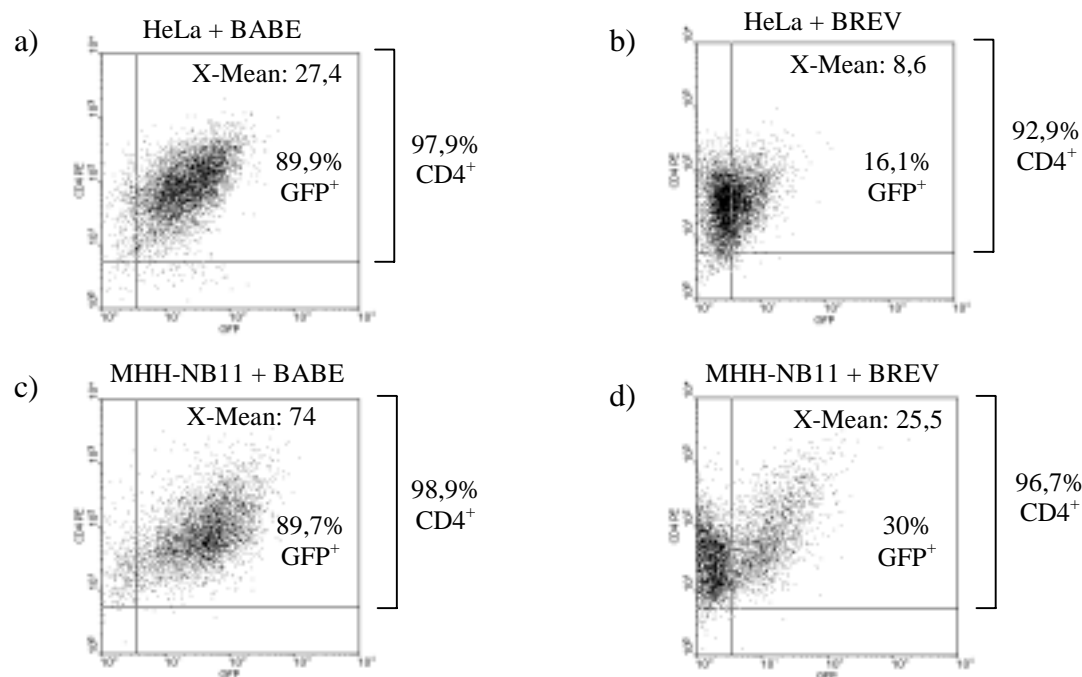


Abb. 13: EGFP-Expression nach MACS-Aufreinigung der mit PG13-Virusüberständen transduzierten Zellen: HeLa, transduziert mit pBABE-tk/egfp-cd4 (a) sowie pBREV-TH-tk/egfp-cd4 (b), nach einmaliger MACS-Säulenaufreinigung und MHH-NB11, transduziert mit pBABE-tk/egfp-cd4 (c) sowie pBREV-TH-tk/egfp-cd4 (d), nach zweimaliger MACS-Säulenaufreinigung. Die Abbildung zeigt eine Dotplot-Darstellung der GFP-Fluoreszenz gegen die Fluoreszenz des PE- (Phycoerythin-) konjugierten CD4-Antikörpers. Die Quadranten wurden so festgelegt, daß die nicht-transfizierten Zellen im unteren linken Quadranten liegen.

Die GFP-Expression ist bedingt durch die Anzahl der GFP-positiven Zellen (= % GFP-positive) als auch durch die Stärke der GFP-Expression (= X-Mean). Sowohl der prozentuale Anteil als auch die Stärke der GFP-Expression waren unter Vermittlung des TH-Promotors in den Neuroblastomzellen höher als in den HeLa-Zellen.

9. Untersuchung der Ganciclovir-Sensitivität der transduzierten Zellen

Ob der Unterschied der P_{TH} -vermittelten GFP-Expressionsstärke zwischen Neuroblastom- und nicht-neuronalen Zellen ausreichend ist, um im Rahmen einer Suizidgenetherapie einen Toxizitätsunterschied zwischen Neuroblastomzellen und normalen Körperzellen zu erreichen, wurde durch die nachfolgende Untersuchung überprüft. Hier wurde ermittelt, ob der TH-Promotor ein deutlich stärkeres Absterben der Neuroblastomzellen nach GCV-Behandlung im Vergleich zu HeLa-Zellen vermitteln kann. Dazu wurden die Überlebensraten der angereicherten pBREV- sowie pBABE-transduzierten Zelllinien HeLa und MHH-NB11 nach GCV-Behandlung mit Hilfe von MTS-Assays untersucht (II.2.2.7.2.). Die eingesetzte GCV-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ entspricht einer Konzentration, wie sie im Rahmen von in vitro-Untersuchungen zum Abtöten *HSV-tk*-positiver Zellen standardmäßig eingesetzt wird. Nach 4-tägiger Inkubation mit GCV wurde die Absterberate der Zellen durch Zugabe des Substrats MTS ermittelt. Dieses wird von lebenden Zellen zu einer Substanz umgesetzt, deren Absorption bei 490 nm gemessen werden kann. Die Absorption dient als indirektes Maß für den Anteil überlebender Zellen. Der Anteil überlebender Zellen wird prozentual im Bezug zu den nicht GCV-behandelten Zellen (= 100 %) angegeben.

Abb. 14 zeigt, daß die GCV-Sensitivität in den pBABE-transduzierten Zelllinien HeLa (70 ± 4 % tote Zellen) und in den pBABE-transduzierten MHH-NB11 (79 ± 7 % tote Zellen) sich nicht signifikant unterscheiden. Zwischen den pBREV-transduzierten Zellen ist aber ein deutlicher Unterschied erkennbar: Bei der Zelllinie MHH-NB11 sind 70 ± 10 % der Zellen nach 4 Tagen Behandlung mit GCV abgestorben, bei HeLa dagegen nur 46 ± 13 % der Zellen. Auf die nicht-transduzierten Zellen (nicht dargestellt) zeigte die eingesetzte GCV-Dosis keine zytotoxische Wirkung.

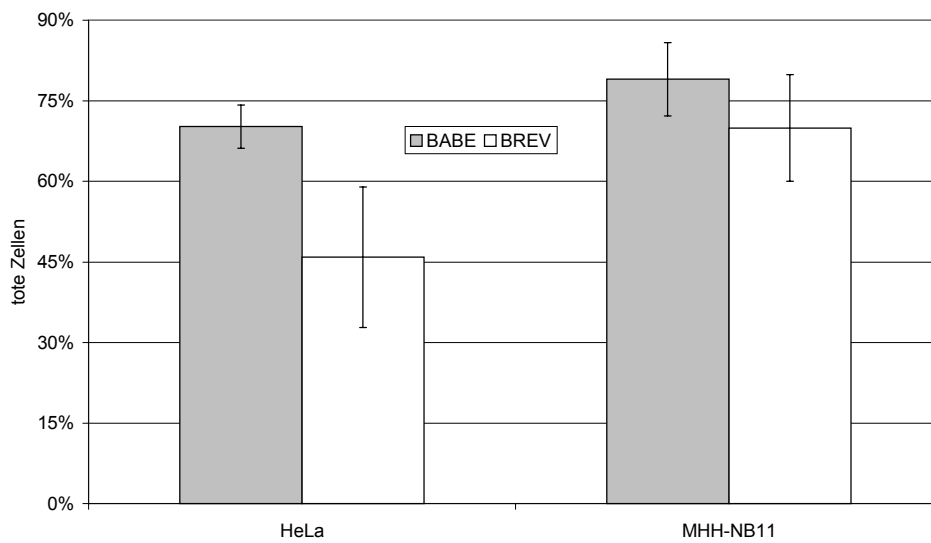


Abb. 14: Absterberate der angereicherten pBABE-tk/egfp-cd4- (= BABE) und pBREV-TH-tk/egfp-cd4- (= BREV) transduzierten HeLa- (nicht-neuronal, Cervixkarzinom) und MHH-NB11-Zellen (Neuroblastom) nach 4-tägiger Inkubation mit der Standard-GCV-Dosis von 10 µg/ml. Angegeben sind jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen.

IV. Diskussion

1. Spezifität der Expression verschiedener Promotoren von Neuroblastom-Tumormarkern

Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für einen tumorspezifischen Suizidtherapie-Ansatz zur Behandlung von Neuroblastomen zu entwickeln. Dabei sollte die Expression des therapeutischen Gens, im vorliegenden Fall des *HSV-tk*-Gens, über Neuroblastom-spezifische Promotoren reguliert werden. Als Kandidatensysteme für eine Neuroblastom-spezifische Genexpression kamen in erster Linie Promotoren von Tumormarkern in Frage, deren Expression in Neuroblastomen spezifisch hochreguliert wird. Die Promotoraktivität sollte in normalen Körperzellen möglichst gering sein. Geeignete Promotorsysteme für eine Neuroblastom-spezifische Transgenexpression waren die jeweiligen Promotoren der Tumormarkergene Neuron-spezifische Enolase (NSE), Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH).

Das Enzym NSE ist eine von drei möglichen Formen des glykolytischen Enzyms Enolase, die bei Säugern und Vögeln sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Organismus differentiell exprimiert werden (Marangos und Schmechel, 1987). Die NSE-Expression beschränkt sich auf terminal differenzierte Neurone und neuroendokrine Zellen. Die Zellspezifität der NSE-Expression wurde schon in einigen Vorarbeiten im Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Neuron-spezifischen Transgenexpression untersucht und getestet (Alouani et al., 1993; Andersen et al., 1992; Andra et al., 1996; Forss-Petter et al., 1986; Klein et al., 1998; Sakimura et al., 1987). Die Klonierung des 5'-flankierenden Bereichs des Ratten-NSE-Gens und die Identifikation wichtiger regulatorischer Promotorbereiche waren hierfür die Basis und erlaubten detaillierte Reporteranalysen zur weiteren Charakterisierung der Neuron-spezifischen Promotorelemente (Forss-Petter et al., 1990; Twyman und Jones, 1997). So konnten Forss-Petter et al. (1990) in transgenen Mäusen, die ein 1,8 kb langes Fragment der 5'-flankierenden Region des Ratten-NSE-Gens in Fusion mit dem *E. coli*- β -Galactosidase- (*lacZ*-) Gen trugen, eine auf postmitotische Neurone und neuroendokrine Hodenzellen beschränkte Expression des Reportergens nachweisen. Der für eine spezifische Expression essentielle Promotorbereich konnte von Twyman und Jones (1997) mittels verschieden großer Deletionen weiter eingegrenzt werden. Sie zeigten, daß lediglich 255 bp des 5'-flankierenden Bereichs des Ratten-NSE-Gens notwendig sind, um eine spezifische Expression in den neuronalen Zelllinien PC12 (Ratte, Phäochromocytom) und NEURO-2A (Maus, Neuroblastom) zu erhalten. Nicht-neuronale Zelllinien wie Ltk- (Maus,

TK-defiziente Fibroblasten) und HeLa (human, Cervixkarzinom) zeigten dagegen keine Promotoraktivität.

Als zweites Kandidatenpromotorsystem wurde ein etwa 500 bp großes Fragment des 5'-flankierenden Bereichs des humanen TH-Gens kloniert (Coker et al., 1988). Das Enzym TH stellt ein Schlüsselenzym der Katecholaminbiosynthese dar und wird vorwiegend in neuroendokrinen Zellen exprimiert (LaBrosse et al., 1976). In Neuroblastomzellen ist die Katecholaminbiosynthese deutlich gesteigert, so daß die erhöhte Konzentration von Katecholaminabbauprodukten im Urin als spezifisches diagnostisches Verfahren zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose Neuroblastom eingesetzt wird (Chamberlain, 1994). Das in der vorliegenden Arbeit klonierte TH-Promotorfragment entspricht dem von Coker et al. (1988) vorbeschriebenen Fragment von -513 bis +11 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des humanen TH-Gens, das eine spezifisch erhöhte Expression in der Ratten-Phäochromocytomzelllinie PCG2 vermittelt. Alternativ wurde gezeigt, daß auch ein Fragment der 3'-flankierenden Region (vom Ende des Exons 14 bis +976) die spezifische Transgenexpression in Neuroblastomzellen verstärken kann (Gardaneh et al., 2000). Diese Daten waren zum Zeitpunkt der Durchführung der transienten Reporter-Gen-Assays und Generierung der Retrovirusvektoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht bekannt und flossen deswegen nicht mehr in die experimentelle Planung und Durchführung ein.

Das Enzym DBH ist ebenfalls an der Katecholaminbiosynthese beteiligt (LaBrosse et al., 1976). Die für eine spezifische Expression wichtigen Transkriptions-regulatorischen Elemente im 5'-flankierenden Bereich des humanen DBH-Gens wurden in früheren Untersuchungen wie beim NSE- und TH-Gen mittels transienter in vitro-Reporter-Gen-Untersuchungen identifiziert. So konnte in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SHSY-5Y eine spezifisch erhöhte Expression des Reportergens Chloramphenicol-Acetyltransferase mit Hilfe eines ca. 500 bp langen Fragmentes des 5'-flankierenden Bereichs des humanen DBH-Gens gezeigt werden (Shaskus et al., 1992).

Für die geplanten Versuche mit den NSE-, TH- und DBH-Promotoren zur Neuroblastom-spezifischen Genexpression sollte *egfp* als Reporter-Gen etabliert werden. Dies bot sich an, da die EGFP-Expression einfach und zuverlässig per FACS-Analyse quantifizierbar ist. Weiterhin läßt sich das Genprodukt direkt in lebenden Zellen nachweisen, und zwar ohne daß ein Substrat zugegeben werden muß oder die Zellen lysiert werden müssen, wie dies beispielsweise beim Luciferase-Assay erforderlich ist. Trotz dieser augenscheinlichen Vorteile ist das *egfp*-System bisher jedoch als Reportersystem keineswegs etabliert. Es gibt nur wenige Vorstudien, in denen *egfp* direkt in Promotorstudien getestet wurde (Lissemore et

al., 2000; Zhang et al., 1998). Deswegen sollten die *egfp*-Daten der verschiedenen Promotorkonstrukte in der vorliegenden Arbeit auch mit den Daten verglichen werden, die in den gleichen Zell- und Promotorsystemen mit dem etablierten Luciferase-Reportergensystem erhoben wurden.

So wurden sowohl Vektoren mit *egfp* als auch mit dem Luciferasegen *luc* hergestellt, bei denen das jeweilige Reportergen mit Hilfe der Promotorfragmente $P_{\text{NSE-XE}}$, P_{TH} und P_{DBH} exprimiert wurde. Die $P_{\text{NSE-XE}}$ -vermittelte Expression beider Reporter gene war jeweils hoch in den Neuroblastomzelllinien und übertraf dabei die Expression des als Kontrolle verwendeten CMV-Promotors um ein Vielfaches. Allerdings war die $P_{\text{NSE-XE}}$ -Promotoraktivität ebenfalls hoch in den nicht-neuronalen Zelllinien.

Mit *luc* und *egfp* wurde auch eine spezifisch erhöhte Promotoraktivität des TH-Promotors in den Neuroblastomzelllinien MHH-NB11 (human) und NEURO-2A (murin) gezeigt. Diese spezifische Expression war im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem NSE-Promotor mit einer nur geringen Aktivität in den nicht-neuronalen Zelllinien HeLa (human, Cervixkarzinom) und L929 (murin, Fibroblasten) verbunden. Das DBH-Promotorfragment zeigte wiederum lediglich in der murinen Neuroblastomzelllinie eine spezifisch erhöhte Aktivität. Zusammengefaßt ergab die Untersuchung der drei Promotorfragmente, daß P_{TH} am zuverlässigsten die Anforderungen für eine Neuroblastom-spezifische Suizidgenexpression erfüllt, das heißt die Vermittlung einer starken Expression in Neuroblastomzellen, begleitet von einer geringen Backgroundexpression in nicht-neuronalen Zellen.

Vergleicht man die über die *luc*- und *egfp*-Reporter gen-Assays ermittelten Prozentwerte (bezogen auf die Expressionsstärke des als Positivkontrolle fungierenden CMV-Promotors, der gleich 100 % gesetzt wurde) als direktes Maß für die Promotoraktivität, so ergeben sich trotz des qualitativ übereinstimmenden Versuchsergebnisses einige quantitative Unterschiede zwischen dem Luciferase- und dem *egfp*-Assay. Mit Ausnahme des Wertes für die P_{TH} -vermittelte EGFP-Expression in der Zelllinie NEURO-2A waren die mittels Luciferase-Assay ermittelten Prozentwerte deutlich höher als die mittels *egfp*-Reporter gen-Assay bestimmten Werte. Betrachtet man aber die Spezifitäten, die sich jeweils aus dem Verhältnis der Reporter genexpression zwischen Neuroblastom- und nicht-neuronaler Zelllinie ergeben, so sind die Abweichungen zwischen den beiden Reporter gen-Assays zum Teil nur gering und bestätigen damit noch einmal das qualitativ übereinstimmende Expressionsmuster beider Reporter gene (Tab. 6). So waren die mittels Luciferase- sowie EGFP-Reporter gen-Assay bestimmten Spezifitäten des $P_{\text{NSE-XE}}$ -Promotorfragments mit einem Faktor (Verhältnis der

Transgenexpression von neuronalen zu nicht-neuronalen Zellen) von 3,9 bzw. 4,2 (in humanen Zellen) sowie 8,5 bzw. 9,9 (in murinen Zellen) relativ ähnlich. Deutliche Unterschiede ergeben sich allerdings in den ermittelten Spezifitäten des P_{TH}-Promotorfragments, insbesondere im murinen System (Tab. 6).

Promotor	spezifische Luc-Aktivität		spezifische EGFP-Expression	
	human	murin	human	murin
P _{TH}	25,5	6,7	12,3	43,3
P _{NSE-XH}	3,9	8,5	4,2	9,9
P _{DBH}	5	14,5	4,5	8,2

Tab. 6: Vergleich der mittels Luc-Assay und *egfp*-Reporter-Gen-Assay ermittelten Promotor-Spezifitäten, die jeweils als Faktor angegeben sind, um den die Promotoraktivität in der Neuroblastomzelllinie im Vergleich zur nicht-neuronalen Zelllinie erhöht ist. Zur Berechnung dieses Faktors wurde jeweils der Mittelwert der prozentualen Reporter-Gen-Expression in der murinen oder humanen Neuroblastomzelllinie durch den Wert der murinen oder humanen nicht-neuronalen Zelllinie dividiert.

Ein Problem, was zum Teil für die Unterschiede verantwortlich sein könnte, sind die relativ großen Standardabweichungen, die durch die Schwankungen zwischen den verschiedenen Einzelmessungen bedingt sind. Diese Schwankungen in der von Versuchsreihe zu Versuchsreihe gemessenen Reporter-Gen-Expression können zum Beispiel durch eine unterschiedliche Vitalität und Anzahl der kultivierten Zellen oder auch unterschiedliche Transfektionseffizienzen zustande kommen. Durch Kotransfektion eines zweiten Reporter-Genes unter der transkriptionellen Kontrolle eines konstitutiven Promotors ist es prinzipiell möglich, die Meßwerte auf diese interne Kontrolle abzugleichen.

Im Luciferase-Assay wurde ein Expressionsvektor mit der *Renilla*-Luciferase kotransfiziert und die ermittelten *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten der zu untersuchenden Promotor-konstrukte mit den Meßwerten für die *Renilla*-Luciferase korrigiert. Durch diesen internen Standard wurden experimentelle Schwankungen zwischen den verschiedenen Ansätzen einer Testreihe, die beispielsweise durch unterschiedliche Effizienzen in der Transfektion und der zur Luciferase-Messung durchgeführten Lyse der Zellen bedingt sein können, kompensiert. Dabei geht man davon aus, daß die verschiedenen Konstrukte, die das Reporter-Gen *Photinus*-Luciferase enthalten, in gleichem Maße von den Zellen aufgenommen werden wie der kotransfizierte *Renilla*-Luciferase-Vektor. Das Problem bei Kotransfektionen ist jedoch, daß

eine gegenseitige Beeinflussung der Promotoren nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Daher wurden auch singuläre Transfektionen durchgeführt, bei denen die Meßwerte anschließend auf jeweils gleiche Proteinkonzentrationen bezogen wurden. Da kein Unterschied zwischen dem Ergebnis der Kotransfektionen und singulären Transfektionen festzustellen war, konnte eine Wechselwirkung zwischen den Promotoren für die gewählte Versuchsanordnung ausgeschlossen werden.

Beim *egfp*-Reportergen-Assay wurden lediglich singuläre Transfektionen durchgeführt, da kein vergleichbares Reportergen zur Verfügung stand, dessen Genprodukt wie das EGFP direkt im Durchflußzytometer ohne Antikörperfärbung oder Substratzugabe gemessen werden konnte. Die Expression verschiedener GFP-Varianten nach Transfektion der kodierenden Expressionsvektoren (alle bezogen von der Firma Clontech) konnte mit den zur Verfügung stehenden Durchflußzytometern FACScan, FACSCalibur oder FACStar^{Plus}, die lediglich mit einem 488 nm Argon-Laser ausgestattet sind, nicht detektiert werden (Experimente nicht gezeigt). Die getesteten Expressionsvektoren enthielten die kodierenden Sequenzen für die Proteine „enhanced blue fluorescent protein“, „enhanced yellow fluorescent protein“ und „enhanced cyan fluorescent protein“ (Matz et al., 1999; Yang et al., 1998). Inzwischen ist ein weiteres fluoreszierendes Protein namens „DsRed“ kommerziell erhältlich, das ursprünglich aus dem Anthozoen *Discosoma* isoliert wurde (Hawley et al., 2001; Mizuno et al., 2001). Dieses Protein kann im PE-Kanal des Durchflußzytometers gemessen werden, so daß die kodierende cDNA möglicherweise als zweites Reportergen in Frage käme, um als interner Standard für die EGFP-Konstrukte in zukünftigen Promotorstudien verwendet werden zu können.

Zwei weitere Aspekte spielen im Bezug auf die zum Teil abweichenden quantitativen Ergebnisse zwischen den *egfp*- und *luc*-Reportergen-Assays möglicherweise ebenfalls eine Rolle. So können verschiedene Halbwertszeiten der beiden Reporter gene ebenso zu unterschiedlichen Expressionsstärken führen wie auch die Tatsache, daß beim Luciferase-Assay die Genexpression indirekt über eine enzymatisch vermittelte Lichtreaktion gemessen wird, während beim *egfp*-Reportergen-Assay das Protein selbst direkt über seine Eigenfluoreszenz detektiert wird.

Abgesehen von den Unterschieden in den absoluten Promotoraktivitäten läßt sich jedoch, wie oben ausgeführt, festhalten, daß mit dem *egfp*-Reportergen-Assay ein qualitativ dem Luc-Assay vergleichbares Expressionsmuster mit den jeweiligen spezifischen Promotoren gezeigt werden konnte. Der *egfp*-Assay ist also ebenfalls für Promotorstudien geeignet, allerdings mit

der Einschränkung, daß bislang noch kein zweites, im Durchflußzytometer gemeinsam mit *egfp* meßbares Reportergen zur Standardisierung mittels Kotransfektion zur Verfügung stand. Eine zusätzliche interessante Beobachtung ergab sich bei der Sequenzierung der verschiedenen *luc*- und *egfp*-Vektoren. Hier fiel auf, daß im 3'-Ende des mittels XhoI-HindIII aus pNSE-lacZ (Forss-Petter et al., 1990) klonierten NSE_{XH}-Promotorfragments ein zusätzliches ATG vorhanden war (Abb. 1). Dieses ATG ist vermutlich ein Überbleibsel, das bei der Klonierung des pNSE-lacZ-Konstrukts unbeabsichtigterweise mit dem NSE-Promotorfragment aus einem früheren Expressionsplasmid ausgeschnitten worden war. Für die geplanten Promotorstudien mußte befürchtet werden, daß dieses zusätzliche ATG einen vorzeitigen Beginn der Translation der Reportergene *luc* bzw. *egfp* zur Folge hat. Dieser frühzeitige Translationsbeginn könnte eine Verminderung der Transgenexpression bedingen, vor allem, wenn er sich nicht im Leserahmen des eigentlichen Translationsbeginns befindet, was bei dem verwendeten Konstrukt pGFP3-NSE-XH tatsächlich der Fall war. Um diese Probleme von vornherein zu umgehen, wurde ein zweites NSE-Promotorfragment kloniert (P_{NSE-XE}), das kein zusätzliches ATG mehr im 3'-Ende enthält.

Um die Frage zu klären, ob das im 3'-Bereich des NSE-Promotors vorhandene ATG tatsächlich einen Einfluß auf die Transgenexpression hat, wurde in den oben beschriebenen Promotorstudien zusätzlich auch die P_{NSE-XH}-vermittelte *luc*- bzw. *egfp*-Expression bestimmt. Interessant zu erwähnen ist, daß in einigen früheren Studien das gleiche P_{NSE}-Konstrukt mit dem zusätzlichen ATG (Forss-Petter et al., 1990) verwendet wurde (Alouani et al., 1993; Andersen et al., 1993; Andersen et al., 1992; Triantaphyllopoulos et al., 1998; Twyman und Jones, 1997). In diesen Arbeiten wurde eine spezifische Expression des NSE-Promotors in verschiedenen neuronalen Zelllinien gezeigt, so daß hier das im 3'-Ende vorhandene ATG scheinbar keine große Auswirkung auf die Promotoraktivität hatte. Eine Erklärung hierfür wäre, daß das zusätzliche ATG im gleichen Leserahmen wie das als Startcodon der *lacZ*-Reportergenexpression vorgesehene ATG lag, so daß der unabsichtlich veränderte Translationsstartpunkt keine Leserasterverschiebung zur Folge hatte.

In unserer Studie machte aber der Vergleich der P_{NSE-XH}- und P_{NSE-XE}-vermittelten Reportergenexpression deutlich, daß sowohl die Luciferase- als auch die EGFP-Expression durch das Vorhandensein des zusätzlichen ATGs deutlich vermindert ist. Nach pGL3-NSE-XH-Transfektion waren die ermittelten Luciferase-Aktivitäten in den Zelllinien HeLa, MHH-NB11 und NEURO-2A nur etwa halb so hoch wie nach pGL3-NSE-XE-Transfektion. In der Zelllinie L929 war der Unterschied sogar noch deutlicher (Faktor 5,5). Beim EGFP-Reportergen-Assay waren die Unterschiede zwischen P_{NSE-XH}- und P_{NSE-XE}-vermittelter

Reportergenexpression außer in der Zelllinie L929 (im Durchschnitt Faktor 1) wesentlich größer als die Unterschiede in den Luciferase-Aktivitäten (Faktor 6-7).

Bedingt durch die Position des zusätzlichen ATGs, das sich im gleichen Leserahmen wie der ursprüngliche Translationsstartpunkt des Reportergens *luc* befindet, wäre nach pGL3-NSE-XH-Transfektion eine vorzeitige Translationsinitiation und somit die Synthese eines am 5'-Ende verlängerten Luciferase-Enzyms zu erwarten. Durch das Vorhandensein von 13 zusätzlichen Aminosäuren am 5'-Ende wird die Aktivität des nativen Luciferase-Enzyms möglicherweise verringert, was die nur etwa halb so große Luciferase-Aktivität nach pGL3-NSE-XH-Transfektion im Vergleich zur Aktivität nach pGL3-NSE-XE-Transfektion erklären würde. Im Gegensatz zum *luc*-Konstrukt ist beim *egfp*-Konstrukt das zusätzliche ATG im Bezug zum Startcodon um ein Nukleotid verschoben. Das würde bei Initialisierung der Translation am akzidentiellen ATG in den pGFP3-NSE-XH-transfizierten Zellen eine Leserasterverschiebung und damit die Synthese eines nicht funktionellen EGFP bedeuten. Tatsächlich war aber eine etwa 6-7-fach schwächere Expression des Reportergens im Vergleich zu den pGFP3-NSE-XE-transfizierten Zellen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß die Initiation der Translation von beiden im 5'-Ende des $P_{\text{NSE-XH}}$ -Transkripts enthaltenen ATGs aus erfolgt sein muß. Allerdings stellt das akzidentielle ATG hier scheinbar den bevorzugten Translationsstartpunkt dar.

Für den Beginn der Translation ist normalerweise nicht allein das Vorhandensein des Startcodons, sondern auch das Vorhandensein bestimmter Nukleotide in unmittelbarer Sequenzumgebung verantwortlich (Kozak, 1986). Tab. 7 zeigt die von Kozak (1986) mit Hilfe von Punktmutationsanalysen ermittelte Konsensus-Sequenz, welche die für die Translationsinitiation in Eukaryoten optimale Sequenz darstellt. Während die Sequenzumgebung des im 3'-Ende von $P_{\text{NSE-XH}}$ enthaltenen ATGs einige Abweichungen von der Konsensus-Sequenz aufweist, entspricht der flankierende Bereich des ATGs der *luc*-cDNA exakt dieser Konsensus-Sequenz und stellt demzufolge den bevorzugten Startpunkt der Translation dar.

Die deutlich niedrigere EGFP-Expression nach pGFP3-NSE-XH-Transfektion läßt tatsächlich vermuten, daß der Translationsstart bevorzugt am ersten ATG erfolgt. Während das ATG der *egfp*-cDNA an Position -3 relativ zum Translationsstartpunkt (+1) ein Pyrimidin anstelle eines Purins besitzt, was nach Kozak (1986) einen dominanten Effekt hat und somit einen weniger effizienten Translationsstart bedeutet, ist beim 5'-wärts liegenden zusätzlichen ATG an dieser Stelle ein Purin vorhanden. Die hier auftretenden Abweichungen von der optimalen Konsensussequenz an Position -2 und +4 haben einen weniger dominanten Effekt. Dies

würde die stärkere Inhibition der EGFP-Expression durch das zusätzliche ATG im Vergleich zur Luc-Expression erklären.

Kozak-Sequenz	<u>ACC</u> ATG G
ATG im 3'-Bereich von P _{NSE-XH}	GGC ATG C
Startcodon der <i>egfp</i> -cDNA	TCC ATG G
Startcodon der <i>luc</i> -cDNA	ACC ATG G

Tab. 7: Vergleich der Konsensus-Sequenz eines optimalen Translationsstartpunkts eukaryotischer mRNAs nach Kozak (1986) mit den Sequenzumgebungen der in den Expressionsplasmiden pGL3-NSE-XH und pGFP3-NSE-XH vorhandenen ATGs. Besonders wichtig ist ein Purin (Adenin oder Guanin) an Position -3 (unterstrichen; relativ zum Translationsstartpunkt +1).

2. In vitro-Charakterisierung eines Fusionsproteins aus dem „Grün fluoreszierenden Protein“ und der HSV-Thymidinkinase

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung retroviraler Vektoren für den therapeutischen Gentransfer in Neuroblastome. Die Verwendung retroviraler Vektoren hat den Vorteil, daß die gute Verträglichkeit, biologische Sicherheit und geringe Nebenwirkungsrate dieser Vektoren experimentell gut belegt ist (Miller et al., 1993; Ram et al., 1993a). Zum Monitoring des Gentransfers sollte in der vorliegenden Arbeit ein einfaches in vitro-Untersuchungsmodell entwickelt werden, mit der die Ausbreitung des therapeutischen Gens nach retroviraler Transduktion visualisiert werden kann. Dies sollte durch Kombination der Fluoreszenzeigenschaften des Reportergens *egfp* (Chalfie et al., 1994; Zhang et al., 1996) mit der Enzymaktivität des Suizidgens *HSV-tk* innerhalb eines Fusionsproteins erreicht werden.

Es wurde ein Fusionsgen generiert, bei dem die *HSV-tk*-cDNA ohne Stop-Codon in den Leserahmen der *egfp*-cDNA kloniert wurde. Der Expressionsvektor mit dem Fusionsgen unter transkriptioneller Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors wurde in die Ratten-Gliosarkomzelle 9L transfiziert und sowohl die Fluoreszenzeigenschaft mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie als auch die Ganciclovir- (GCV-) Sensitivität untersucht. Die Expression des Fusionsgens wurde außerdem durch Westernblot-Analyse überprüft.

In der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß die Suizidgenkomponente die intrazelluläre Verteilung des Fusionsgenproduktes bestimmt. Es konnte eine starke Expression im Zellkern und nur eine schwache im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dies entspricht der natürlichen Verteilung der HSV-TK (Herzberg et al., 1981).

Neben dem Monitoring der therapeutischen Genexpression sollte die Verwendung des *egfp*-Fusionsgens auch die Selektion stabil HSV-TK-exprimierender Zelllinien vereinfachen und verkürzen. Dabei sollte die grüne Fluoreszenz zur Selektion mittels FACS verwendet werden. Die FACS-vermittelte Isolierung von *egfp*-exprimierenden Zelllinien ist in verschiedenen Arbeiten bereits gezeigt worden, wenn auch zumeist nur nach Kotransfektion oder Infektion mit bicistronischen Vektoren (Bierhuizen et al., 1997; Chen et al., 1999; Kandel et al., 1997) und nicht mittels Fusionsgenkonstrukten.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die FACS-vermittelte Selektion stabiler TK/EGFP-exprimierender 9L-Zellen mit der herkömmlichen Antibiotika-Selektion bezüglich Reinheit und Stärke der Transgenexpression untersucht werden. Die Antibiotika-Selektion ohne Einzelzellklonierung, basierend auf der neben dem Fusionsgen zusätzlich im Vektor enthaltenen *neo*-kodierenden Expressionskassette, resultierte in einer heterogenen Zellpopulation mit einem hohen Anteil nicht EGFP-exprimierender Zellen von etwa 35 %. Eine mögliche Erklärung für diesen hohen Verunreinigungsgrad könnte sein, daß während der Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Zelle die notwendige Linearisierung zum teilweisen Verlust der *egfp*-kodierenden Sequenzen geführt hat, das würde bedeuten, der Selektionsmarker blieb erhalten, das Transgen aber nicht. Deswegen ist es zur Gewinnung einer stabilen und in ausreichender Menge Transgen-exprimierenden Zelllinie in der Regel erforderlich, Einzelzellklone aus dem Gesamtpool der Antibiotika-selektionierten Zellen zu isolieren und anschließend auf ihre Transgenexpression hin zu untersuchen. Diese Methode ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Um dieses Verfahren zu beschleunigen und zu vereinfachen, wurden die EGFP-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation der Antibiotika-selektionierten Zellen durch Sortierung mittels FACS isoliert. Dies resultierte in einer homogenen stark *egfp*-exprimierenden Population. Durch die übliche Einzelzellklon-Isolierung der EGFP-positiven Population konnte dieses Resultat nicht signifikant verbessert werden. Neben der Antibiotika-vermittelten Einzelklonselektion wurde auch eine HAT-Selektion zum Vergleich durchgeführt. Hier führte die Anreicherung mittels HAT-Selektion, bei der lediglich die TK-aktiven Zellen überleben können, zu einer deutlich weniger reinen und inhomogeneren EGFP-positiven Population. Dies überraschte ein wenig, da erwartet werden konnte, daß die HAT-Selektion der TK-positiven Zellen zu einer nahezu 100 %

EGFP-exprimierenden Population führen würde, da die enzymatische Aktivität der HSV-TK im Fusionsprotein an das EGFP gekoppelt ist. Die tatsächliche Beobachtung, daß lediglich 93 % der Zellen grün fluoreszent waren, ist vermutlich auch auf Linearisierungen der Vektor-DNA mit Inaktivierung der EGFP-Komponente zurückzuführen.

Für unsere weiteren Untersuchungen war es auch von Bedeutung, ob eine Korrelation zwischen der Expression der TK- und der EGFP-Komponente innerhalb des Fusionsgens besteht und somit von der Fluoreszenzstärke auf die GCV-Sensitivität zurückgeschlossen werden kann. Dazu wurden einige 9L-TK/EGFP-Einzelklone mit unterschiedlicher „mean fluorescence intensity“ (MFI) als Maß für die Fluoreszenzstärke hinsichtlich ihrer GCV-Sensitivität analysiert. Dabei konnte zumindest semiquantitativ eine deutliche Korrelation nachgewiesen werden: Der Klon mit der stärksten MFI zeigte die stärkste Sensitivität gegenüber GCV, wohingegen die Klone mit niedrigerer MFI auch eine niedrigere Sensitivität aufwiesen.

Zusammengefaßt konnten bei der Charakterisierung des *tk/egfp*-Fusionsgens die folgenden Vorteile für die geplanten weiteren Untersuchungen gezeigt werden: Es lassen sich ähnlich reine stabile Zelllinien generieren wie unter Antibiotika-vermittelter Einzelklonselektion, jedoch deutlich schneller und einfacher. Mit Hilfe des FACS läßt sich die Transgenexpression und damit der Gentransfer einfach monitoren. Von der Fluoreszenzstärke kann auf die Suizidgenexpression zurückgeschlossen werden. Diese Ergebnisse wurden zum Teil auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Callus und Mathey-Prevot, 1999; Jacobs et al., 1999; Paquin et al., 2001).

3. Generierung und in vitro-Testung eines Retrovirusvektors mit spezifischer Expressionskassette

Die Verwendung retroviraler Vektoren für den Suizidgentransfer erfordert in der Regel Vorkehrungen, um den viralen Gentransfer auf spezifische Tumorzelltypen zu beschränken und somit die allgemeine Toxizität zu reduzieren. Auf dem *Moloney Murine Leukemia Virus* basierende Retrovirusvektoren besitzen zwar die Eigenschaft, daß das virale Genom nur während der Zellteilung ins zelluläre Genom eingeschleust werden kann (Miller et al., 1990), allerdings ist diese Limitierung der Infektion auf proliferierende Zellen nicht ausreichend, um eine auf Tumorzellen beschränkte Wirkung des Therapieansatzes zu garantieren. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Selektivität ist die Steuerung auf der Ebene des Viruseintritts in die Zelle, zum Beispiel über den Austausch von Glykoproteindomänen des viralen

„envelope“- (Env) Hüllproteins, über das die spezifische Anbindung an bestimmte zelluläre Oberflächenrezeptoren erfolgt (Cosset und Russell, 1996; Miller und Vile, 1995). Eine einfachere Möglichkeit ist jedoch die Verwendung Gewebe- oder Tumorzell-spezifischer Promotoren. So konnte mittels Plasmid- oder Retrovirusvektoren mit interner spezifischer Expressionskassette eine selektiv erhöhte Expression in den gewünschten Zielzellen erreicht werden (Jaggar et al., 1997; Kuriyama et al., 1999; Mawatari et al., 1998; Vile und Hart, 1993a; Vile und Hart, 1993b).

Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß der Einbau einer internen Transkriptionseinheit in einen Retrovirusvektor zu einer verringerten Transgenexpression führen kann. Bezüglich der Ursache der verringerten Transgenexpression bestehen unterschiedliche Hypothesen. Einige Arbeitsgruppen führen diese Beobachtung auf eine Wechselwirkung zwischen LTR- und internem Promotor zurück (Apperley et al., 1991; Bowtell et al., 1988; Emerman und Temin, 1984; Vile et al., 1994). Die Untersuchungen von Correl et al. (1994) dagegen zeigen, daß eine verringerte Expression vermutlich allein auf eine verminderte intrazelluläre Zahl an Provirus-Kopien zurückzuführen ist, die durch eine geringere Transduktionseffizienz bedingt ist. Der Vergleich verschiedener Retrovirusvektoren zur Langzeit-Genexpression in hämatopoetischen Zellen ergab, daß der Virustiter besonders stark durch das Vorhandensein eines internen PGK- (= humane Phosphoglycerat-Kinase) Promotors reduziert wurde, aber die Ausrichtung des PGK-Promotors in entgegengesetzter Orientierung interessanterweise einen Anstieg des Virustiters zur Folge hatte. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit dem *c-fos*-Promotor gezeigt, mit dem keine spezifische Transgenexpression in „sense“-Orientierung, sondern nur in „antisense“-Ausrichtung erreicht werden konnte (Belmont et al., 1988). In dieser Arbeit wurde postuliert, daß diese Beobachtung möglicherweise durch das Vorhandensein kryptischer Spleißdonor- oder Akzeptorsignale oder auch Polyadenylierungssignale erklärbar sein könnte, die eine Instabilität des Vektors mit „sense“-Orientierung verursachen. Die bereits angesprochene Studie von Correll et al. (1994) zeigte weiterhin, daß ein zusätzlicher SV40-Promotor einen geringeren Einfluß auf den Virustiter ausübt als zusätzliche eukaryotische Promotoren. Die allgemeine Schlußfolgerung aus dieser Beobachtung war, daß durch das Vorhandensein einer zweiten Transkriptionseinheit nicht zwangsläufig eine geringere Expression auftritt, sondern daß sowohl Virustiter als auch Expressionsstärke in Abhängigkeit von Promotor und Transgen unterschiedlich sein können (Belmont et al., 1988; Bowtell et al., 1988; Correll et al., 1994; McLachlin et al., 1993). Neben der Art des Promotors und des Transgens scheint auch noch die Position im Vektor eine entscheidende

Rolle hinsichtlich Titer und Transgenexpression zu spielen (Flasshove et al., 2000; McLachlin et al., 1993).

Zur Lösung des Problems der geringen Transgenexpression retroviraler Vektoren mit zusätzlicher Expressionskassette haben einige Arbeitsgruppen versucht, durch Deletion der viralen Promotor- und Enhancer-Elemente eine Wechselwirkung zwischen viralem LTR-Promotor und internem Promotor zu verringern (Yee et al., 1987; Yu et al., 1986). Normalerweise wird im integrierten Provirus die Transkription durch Promotor- und Enhancerelemente, die in der U3-Region der LTRs liegen, reguliert (Coffin et al., 1997; Graves et al., 1985). Für die Herstellung von Viruspartikeln wird nach Transfektion von Verpackungszellen auf jeden Fall ein intakter 5'-LTR-Promotor benötigt, damit die Gesamtlängen-RNA des viralen Genoms transkribiert und zu infektiösen Viruspartikeln verpackt werden kann. Auch zum Umschreiben der viralen RNA-Matrize durch reverse Transkription ist nach Infektion der Wirtszellen ein intakter 5'-LTR-Promotor erforderlich. Eine Deletion viraler Promotor- und Enhancer-Elemente kann also bei der Konstruktion retroviraler Vektoren nur in der 3'-LTR erfolgen. Während der reversen Transkription, bei der die reverse Transkriptase nach einem Transkriptionsstart am 5'-Ende der viralen RNA einen Matritzensprung ans 3'-Ende vollzieht, kommt es zu einer Duplikation von Promotor- und Enhancer-Elementen am 5'- und 3'-Ende. Dadurch werden die ursprünglich am 3'-Ende lokalisierten Deletionen nun auch auf das 5'-Ende übertragen, wodurch es nachträglich zu einer Inaktivierung des 5'-LTR-Promotors kommt. Vektoren, die sich diese retrovirale Eigenheit zunutze machen, um Interaktionen zwischen dem 5'-LTR-Promotor und internen Promotoren zu vermeiden, werden als „self-inactivating retroviruses“ bezeichnet (Yee et al., 1987; Yu et al., 1986).

Mit dem „self-inactivating“-Vektor ist es jedoch nicht möglich, stabile Verpackungszelllinien zeitsparend durch Infektion mit transientem viralem Überstand aus nicht-stabilen Verpackungszellen zu gewinnen. Denn nach Infektion der Verpackungszellen mit dem transienten Überstand zur Herstellung stabiler Zelllinien ist der 5'-LTR-Promotor durch reverse Transkription wie beschrieben inaktiviert, so daß keine Gesamtlängen-RNA des viralen Genoms mehr synthetisiert und verpackt werden würde. Es würde also keine Virusproduktion mehr stattfinden können. Ein weiterer Nachteil des „self-inactivating“-Systems besteht darin, daß die Deletion in den viralen LTR-Elementen einen deutlich niedrigeren Virustiter zur Folge hat (Gilboa et al., 1986). Durch Einbau spezifischer Transkriptionselemente in die LTR anstelle der viralen Enhancer- und Promotorbereiche ist es jedoch verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen, die Virustiter zu verbessern und zum Teil sogar ähnliche Titer wie

bei nicht-modifizierten Retrovirusvektoren zu erreichen (Diaz et al., 1998; Mavria et al., 2000). Die Größe der eingebauten Promotor- und Enhancer-Elemente scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Der Einbau sehr langer spezifischer Promotorfragmente hat eine drastische Reduktion des Virustiters zur Folge (Vile et al., 1995). Auch die Sequenz des Übergangsbereiches zwischen spezifischem und viralem Promotor, das heißt zum Beispiel die Beibehaltung oder Eliminierung des viralen Transkriptionsstartpunktes oder der viralen TATA-Box, hat großen Einfluß sowohl auf den Virustiter als auch auf die Spezifität der Promotoraktivität (Diaz et al., 1998; Ferrari et al., 1995; Jager et al., 1999; Moore et al., 1991).

Für das in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ziel der Herstellung eines spezifischen und zugleich ausreichend leistungsstarken Vektors erschien das „self-inactivating“ Vektorsystem aufgrund der angeführten Nachteile weniger geeignet. Literaturdaten haben bestätigt, daß nicht in allen Fällen des versuchten Austausches viraler durch spezifische Promotorelemente in der LTR zufriedenstellende Transduktionseffizienzen erreicht werden konnten. Daher wurde eine andere Möglichkeit zum Einbau der spezifischen P_{TH}-tk/egfp-Expressionskassette in den Retrovirusvektor gewählt: Die Orientierung in entgegengesetzter Richtung zum viralen LTR-Promotor (Belmont et al., 1988; Chang und Roninson, 1996; Ragheb et al., 1999). Damit sollte verhindert werden, daß der starke retrovirale Promotor die Spezifität des spezifischen Promotors ausschaltet.

Für das Design eines solchen „antisense“ retroviralen Vektors mit spezifischer Therapiegenexpression mußte noch ein Transgen gefunden werden, das in „sense“-Orientierung als Markergen für die Transduktionseffizienz und zusätzlich auch als Selektionsgen fungieren konnte. Hier bot sich das trunkierte *cd4*-Gen an.

Der Vorteil des *cd4*-Gens besteht darin, daß die CD4-Expression durchflußzytometrisch ermittelt und somit als Maß für die Transduktionseffizienz verwendet werden kann. Weiterhin kann die Expression des Oberflächenmarkers CD4 zur einfachen MACS-vermittelten Anreicherung anstelle einer zeitaufwendigen Antibiotika-Selektion genutzt werden. Um die Eignung der trunkierten *cd4*-cDNA als Markergen in retroviralen Vektoren zu untersuchen, wurde die *puro*-cDNA in dem verwendeten Retrovirusvektor pBABE-*puro* (Morgenstern und Land, 1990) durch die *cd4*-kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht.

Die Infektion der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3 mit transienten infektiösen Überständen verschiedener retroviraler Vektorkonstrukte mit und ohne spezifische Transgenexpression in „antisense“-Orientierung ergab, daß mit dem pBABE-tk/egfp-*cd4*-Konstrukt ein dem

pBABEpuro-Konstrukt vergleichbarer über EGFP-Expression ermittelte Virustiter („GFP-Titer“) erreicht werden konnte, der CD4-Marker also scheinbar keinen signifikanten negativen Einfluß auf den Virustiter besitzt.

Zur Beurteilung des spezifischen Vektors mit „antisense“-Expressionskassette war der „GFP“-Titer ungeeignet, da die GFP-Expression hier über den spezifischen Promotor erfolgt. Daher wurde der Virustiter über die CD4-Expression („CD4-Titer“) bestimmt. Der Vergleich des Vektors mit spezifischer Expressionskassette mit dem nicht-spezifischen Kontrollvektor ergab, daß der „CD4-Titer“ und damit die Transduktionseffizienz des spezifischen Vektors in 3T3-Fibroblasten verringert ist.

Die Experimente zur Transduktion muriner Neuroblastomzellen ergaben sogar eine kaum nachweisbare GFP- und CD4-Expression nach Transduktion mit dem spezifischen Vektor. Die GFP- und CD4-Expression nach Infektion mit dem unspezifischen Kontrollvektor waren dagegen deutlich ausgeprägter. Die in den Luciferase- und EGFP-Reporter-Gen-Assays als nicht-neuronale Negativkontrolle verwendete murine Fibroblastenzelllinie L929 ließ sich ebenfalls mit den transienten retroviralen Überständen nicht signifikant infizieren. Bedingt durch die geringen Transduktionseffizienzen des spezifischen Vektors in den beiden murinen Zelllinien konnte deshalb keine verwertbare Aussage über die Spezifität der Expression in den Maus-Neuroblastomzellen gemacht werden. Eine mögliche Erklärung für die geringen Transduktionseffizienzen bei den verwendeten murinen Zelllinien könnte das Vorhandensein einer zu geringen Anzahl an Oberflächenrezeptoren sein, über die die Virusanbindung und somit die Virusaufnahme in die Zelle erfolgt.

Die Transduktion humaner Zelllinien mit amphotropen transienten Retrovirus-Überständen führte trotz Verwendung konzentrierter Ansätze, durch die die Anzahl Markergen-exprimierender Zellen zwar verdoppelt werden konnte, ebenfalls nur zu unzureichenden Transduktionsraten. Eine Erklärung hierfür wäre ebenfalls, daß der für die Virusanbindung erforderliche Oberflächenrezeptor in zu geringer Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Literaturdaten zufolge variiert die Expression dieses Rezeptors und ist unter anderem auch vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängig (Baum und Ostertag, 1996; Yu et al., 1998).

Das Problem der zu geringen Rezeptordichte als Ursache für eine unzureichende Infizierbarkeit von Zellen mit retroviralen Vektoren kann dadurch umgangen werden, daß man das Hüllprotein („envelope“ = Env) eines Vektors als Oberflächenbindungs-vermittelndes Element durch ein Hüllprotein einer anderen Retroviruspezies austauscht. Verschiedene

Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß dies tatsächlich möglich ist. Um einen auf MuLV-basierenden Retrovirusvektor zu infektiösen Viruspartikeln zu verpacken, wurden Hüllproteine des *Gibbon Ape Leukemia Virus* (Miller et al., 1991), des *Vesicular Stomatitis Virus* (Burns et al., 1993), des *Sendai Virus* (Spiegel et al., 1998) sowie von Lenti- (Indraccolo et al., 1998; Somia et al., 2000) oder auch Foamyviren (Lindemann et al., 1997) eingesetzt. Bei dieser als „Pseudotypisierung“ bezeichneten Methode erfolgt die Virusherstellung entweder durch Kotransfektion der Vektor-DNA mit Plasmiden, die die MuLV-*gag/pol*-cDNA sowie die *env*-cDNA einer anderen Virusspezies tragen (Soneoka et al., 1995), oder durch Transfektion stabiler Verpackungszelllinien, die die verschiedenen viralen Strukturgene unterschiedlicher Spezies stabil exprimieren. Die pseudotypisierten Viruspartikel übernehmen die Wirtsspezifität des Env-liefernden Virus, da, wie bereits erwähnt, dieses virale Protein die Anbindung an die Wirtszelle und anschließende Viruseinschleusung vermittelt.

Der humane Rezeptor für das GALV-Virus ist auf einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Spezies weit verbreitet, ausgeschlossen Maus-Zellen (O'Hara et al., 1990). Trotz dieser Einschränkung erschien das GALV-Verpackungssystem für die Pseudotypisierung der von MuLV abgeleiteten Retrovirusvektoren vielversprechend, um eine bessere Transduktionseffizienz der Vektoren zu erreichen.

Die Titration auf der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 ergab, daß mit den Überständen der stabil MuLV-Vektor-DNA-tragenden GALV-Verpackungszellen höhere Transduktionseffizienzen erreicht werden konnten als mit den transienten Überständen der MuLV-Verpackungszelllinie FNX-A. Trotzdem war die Transduktionseffizienz in humanen Neuroblastomzellen bei dem Retroviruskonstrukt mit spezifischer Expressionskassette immer noch gering. Daher konnte keine zuverlässige Aussage über die Neuroblastomspezifität des verwendeten retroviralen Vektors mit spezifischer Expressionskassette getroffen werden. Zwischen den Neuroblastomzellen und den nicht-neuronalen Zellen konnte kein Unterschied im Anteil EGFP-positiver Zellen nachgewiesen werden. Die mittlere EGFP-Expressionsstärke, die neben dem Anteil EGFP-exprimierender Zellen auch einen Parameter für die spezifische Aktivität des TH-Promotors darstellt, konnte wegen der niedrigen Transduktionseffizienzen in den humanen Neuroblastomzellen nach transienter retroviraler Infektion erst gar nicht zuverlässig bestimmt werden. Um trotzdem die P_{TH}-spezifische Transgenexpression in den transduzierten Zelllinien darstellen zu können, wurde ein in vitro Untersuchungsmodell entwickelt, das einer vollständig transduzierten Zellpopulation entspricht. Die Arbeitshypothese war, daß unterschiedliche, vor allem niedrige

Transduktionseffizienzen, eine Aussage über die Promotorspezifität nicht länger verfälschen können. Für das neue Untersuchungsmodell wurden die transduzierten Neuroblastom- und nicht-neuronalen Zellen mittels CD4-MACS-Aufreinigung angereichert. Das Ergebnis waren fast rein CD4-positive Zellpopulationen. Die FACS-Analyse der angereicherten Populationen ergab eine deutlich stärkere EGFP-Expressionsstärke in der pBREV-TH-tk/egfp-cd4-transduzierten Neuroblastomzelllinie als in der mit dem gleichen Konstrukt transduzierten nicht-neuronalen Zelllinie. Dies zeigte sich sowohl in einer höheren mittleren EGFP-Fluoreszenzstärke als auch in einem höheren Anteil GFP-positiver Zellen. Allerdings war die EGFP-Expressionsstärke auch in den mit dem nicht-spezifischen Retrovirusvektor transduzierten Neuroblastomzellen (Positivkontrolle) deutlich höher als in der entsprechenden HeLa-Population. Betrachtet man jedoch das Produkt der mittleren Fluoreszenzstärke EGFP-positiver Zellen und der Anzahl EGFP-positiver Zellen im Bezug zur Positivkontrolle (= 100 %), so ergibt sich eine mehr als doppelt so starke P_{TH} -vermittelte EGFP-Expression in Neuroblastomzellen (11,5 %) im Vergleich zu nicht-neuronalen HeLa-Zellen (5,6 %).

Es stellte sich dann natürlich die Frage, ob der mittels EGFP-Messung nachgewiesene Unterschied in der P_{TH} -vermittelten Expression zwischen den untersuchten Zelllinien ausreichend war, um auch eine verstärkte GCV-Sensitivität der Neuroblastomzellen im Vergleich zu nicht-neuronalen Zellen zu vermitteln. Um diese Frage zu klären, wurde die Überlebensrate der verschiedenen Zellpopulationen unter GCV-Behandlung bestimmt. Nach 4-tägiger Behandlung waren die mit dem Positivkontrollvektor pBABE-tk/egfp-cd4-transduzierten Neuroblastomzellen sowie die nicht-neuronalen HeLa-Zellen bis auf etwa 20 bzw. 30 % abgestorben, was bedeutet, daß das *HSV-tk/GCV*-System sowohl in der Neuroblastomzelllinie als auch in HeLa-Zellen effizient zytotoxisch wirkt. Bei den mit dem spezifischen Vektor pBREV-TH-tk/egfp-cd4 transduzierten Zelllinien MHH-NB11 (Neuroblastom) und HeLa (nicht-neuronal) waren dagegen, wie erhofft, signifikante Unterschiede in der Absterberate erkennbar: Nach P_{TH} -vermittelter *HSV-tk/GCV*-Suizidgentherapie waren etwa 20 % mehr tote Neuroblastomzellen als nicht-neuronale Zellen unter Behandlung mit der Standard-GCV-Dosis von 10 µg/ml nachweisbar. Ein deutlicherer Unterschied konnte in der Anzahl überlebender Neuroblastom- oder HeLa-Zellen nicht dargestellt werden. Da das *HSV-tk/GCV*-System ein sehr empfindliches Suizidgensystem darstellt, das transduzierte Zellen in der Regel um einen Faktor von 1000 bis 10000 sensibler macht gegenüber der zytotoxischen Wirkung einer GCV-Therapie, scheinen relativ geringe Expressionsunterschiede des *HSV-tk*-Gens, wie sie durch den spezifischen TH-Promotor in

Neuroblastomzellen erzielt werden, in dem hier gewählten Untersuchungsmodell keine deutlicheren Unterschiede im Zellüberleben zu bedingen.

Unterschiede bei der Zytotoxizitätsinduktion, die bei ca. 20 % liegen, schließen natürlich nicht aus, daß bei lokaler Applikation des spezifischen Retrovirusvektors in Neuroblastome auch normale Zellen geschädigt werden können. Eine Reduktion der zytotoxischen Nebenwirkung um 20 % bei gleichbleibender Tumorwirksamkeit stellt allerdings eine deutliche Verbesserung dar.

Ein Problem stellt allerdings immer noch die unzureichende Transduktioeffizienz der Neuroblastomzellen dar. Der „CD4-Virustiter“ des stabilen PG13-Überstands des spezifischen „antisense“-Vektors war deutlich schlechter als der Titer der Positivkontrolle, des unspezifischen Vektors. Bei den transienten FNX-Überständen ist dieser Unterschied weniger deutlich, was aber durch schwankende Transfektionseffizienzen bedingt sein könnte.

Die Frage, ob der TH-Promotor und/oder die Anordnung der spezifischen Expressionskassette in „antisense“-Orientierung eine Reduktion des Virustiters bedingt, konnte durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden. Als möglicher Nachteil der Vektoren mit „antisense“-Orientierung wurde diskutiert, daß das Transkript des viralen LTR-Promotors einen inhibitorischen Effekt in Form einer „antisense“-Wechselwirkung auf die Expression des entgegengesetzt orientierten Gens haben könnte (Karlsson et al., 1987). Die Inhibition durch „antisense“-Wechselwirkung könnte eine mögliche Erklärung für den geringen Unterschied der spezifischen Expression sein. Andere Untersuchungen weisen darauf hin, daß das Fehlen einer Polyadenylierungssequenz am 3'-Ende einer entgegengesetzt zur LTR orientierten Expressionskassette einen negativen Effekt auf die Expressionsstärke zu haben scheint (Maxwell et al., 1991; Narita et al., 2000). Eine Untersuchung, die eine 3-fach höhere mRNA-Expression nach Transduktion eines Vektors mit „sense“-orientierter Expressionskassette im Vergleich zum Vektor mit „antisense“-orientierter Transkriptionseinheit zeigte, bestätigt diese Annahme (Xu et al., 1993). Dieses Problem könnte durch Einbau einer Polyadenylierungssequenz ans 3'-Ende des *tk/egfp*-Fusionsgens umgangen werden.

Ausblick

Die verschiedenen Experimente haben gezeigt, daß das *HSV-tk/GCV*-System in Kombination mit einer P_{TH} -vermittelten Expression einen vielversprechenden Ansatz zur Weiterentwicklung für eine Neuroblastom-spezifische Suizidgentherapie darstellt. Verschiedene Möglichkeiten wurden diskutiert, um dieses System hinsichtlich Spezifität und Transduktionseffizienz zu optimieren.

Die vorliegenden Arbeiten konzentrierten sich auf die Generierung von retroviralen Vektoren, die für eine mögliche klinische Anwendung die bestmögliche Sicherheit bieten. Alternativ kämen am ehesten Adenovirusvektoren in Frage. Die Expressionskassette, bestehend aus TH-Promotor und *HSV-tk*-Gen, ließe sich problemlos in ein adenovirales Grundgerüst zur spezifischen Transgenexpression in Neuroblastomen integrieren. Adenovirale Vektoren zeigten in den bisherigen klinischen Anwendungen zum Teil eine ausgeprägte Toxizität, ein Patient verstarb sogar an einem durch Adenovirusvektoren ausgelösten Leberversagen (SoRelle, 2000). Adenovirusvektoren neuerer Generation könnten hier Abhilfe schaffen, der klinische Nachweis der besseren Verträglichkeit steht allerdings noch aus. Retrovirale Vektoren besitzen ein großes Weiterentwicklungspotential. Auch ist die Kombination mit anderen Vektoren, z.B. HSV-Amplikonvektoren möglich, um letztendlich eine bessere Transduktionseffizienz und damit eine höhere therapeutische Erfolgsquote zu erreichen.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für eine Neuroblastom-spezifische Suizidgenexpression zu entwickeln. Die Suizidgenexpression basiert auf dem Transfer eines Enzymgens, welches in den transduzierten Tumorzellen eine inaktive Substanzvorstufe („prodrug“) in einen toxischen Metaboliten umwandelt. Als Vektormodell wurden retrovirale Vektoren gewählt, da retrovirale Vektoren eine experimentell und klinisch gut belegte biologische Sicherheit und Verträglichkeit aufweisen und bezüglich der Transduktionsbedingung gut standardisierbar sind. Die Suizidgenexpression sollte durch Verwendung eines Neuroblastom-spezifischen Promotors auf die Tumorzellen beschränkt werden. Als Kandidaten-Promotorsysteme wurden Promotorfragmente der Tumormarker Neuron-spezifische Enolase (NSE), Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) mittels Luciferase- (Luc) und „enhanced green fluorescent protein“- (*egfp*) Reporter-Gen-Assays hinsichtlich Expressionsstärke und neuronaler Expressionspezifität geprüft. Das TH-Promotorfragment (P_{TH}) erschien nach diesen Assays am besten für eine Neuroblastom-spezifische Suizidgenexpression geeignet. Dabei zeigten die Ergebnisse der beiden Reporter-Gen-Assays, daß das Reporter-Gen *egfp* gleichermaßen für transiente Promotorstudien geeignet ist wie das für diese Untersuchungen etablierte Reporter-Gen *luc*. Für die eigentlichen Suizidgenexpressionsstudien wurde das Reporter-Gen *egfp* mit dem Suizidgen *HSV-tk* fusioniert, um die Suizidgenexpression und die Promotorspezifität auch in den zytotoxischen Versuchsansätzen kontinuierlich monitoren zu können. Dabei zeigten die Untersuchungen eine deutliche Korrelation zwischen „prodrug“-Sensitivität und EGFP-Fluoreszenzintensität. Bei Einbau der Expressionskassette aus P_{TH} und *tk/egfp*-Fusionsgen war es problematisch zu gewährleisten, daß der starke retrovirale Promotor die Spezifität des spezifischen TH-Promotors nicht ausschaltet. Zur Lösung dieses Problems wurde die P_{TH} -*tk/egfp*-Expressionskassette in „antisense“-Orientierung in den retroviralen Vektor eingebaut. Als Selektionsmarker enthielt der Vektor eine zweite Expressionskassette, bestehend aus SV40-Promotor und der trunckierten cDNA des humanen CD4-Oberflächenmarkers. Da die Transduktionseffizienz des Retrovirusvektors mit spezifischer Expressionskassette zu gering war, um eine Spezifität der P_{TH} -vermittelten Expression in den transduzierten Neuroblastomzellen nachzuweisen, wurden die CD4-positiven Zellen mittels „magnetic activated cell sorting“ (MACS) separiert. Sowohl in der Stärke der P_{TH} -vermittelten GFP-Expression als auch in der „prodrug“-Sensitivität konnte auf diese Weise ein deutlicher Unterschied zwischen humanen Neuroblastomzellen und nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden.

VI. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	„Cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“
Env	„envelope“ (retrovirales Hüllprotein)
et al.	et alteres (und andere)
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GALV	<i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i>
GCV	Ganciclovir
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HSV-TK	<i>Herpes-simplex-Virus</i> -Thymidinkinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
lacZ	β -Galactosidase-Gen
LB	Luria Bertani
LTR	„long terminal repeat“ (retrovirales Element)
Luc	Luciferase
m	milli- (1×10^{-3})
MACS	„magnetic-activated cell sorting“
Min.	Minute

MuLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, inneres Salz
u	„units“
μ	mikro- (1×10^{-6})
n	nano- (1×10^{-9})
neo	Neomycin-Resistenzgen
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NTP	Nukleotid-5'-Phosphat
P	Promotor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMS	Phenazinmethosulfat
puro	Puromycin-Resistenzgen
RLU	„relative light unit“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Std.	Stunde
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

VII. Literaturverzeichnis

Alouani, S., Ketchum, S., Rambosson, C., and Eistetter, H. R. (1993). Transcriptional activity of the neuron-specific enolase (NSE) promoter in murine embryonic stem (ES) cells and preimplantation embryos. *Eur J Cell Biol* 62, 324-32.

Andersen, J. K., Frim, D. M., Isacson, O., and Breakefield, X. O. (1993). Herpesvirus-mediated gene delivery into the rat brain: specificity and efficiency of the neuron-specific enolase promoter. *Cell Mol Neurobiol* 13, 503-15.

Andersen, J. K., Garber, D. A., Meaney, C. A., and Breakefield, X. O. (1992). Gene transfer into mammalian central nervous system using herpes virus vectors: extended expression of bacterial lacZ in neurons using the neuron-specific enolase promoter. *Hum Gene Ther* 3, 487-99.

Anderson, W. F. (1992). Human gene therapy. *Science* 256, 808-13.

Andra, K., Abramowski, D., Duke, M., Probst, A., Wiederhold, K. H., Burki, K., Goedert, M., Sommer, B., and Staufenbiel, M. (1996). Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol Aging* 17, 183-90.

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

Ausubel, F. M. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, ed. (New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.).

Baum, C., and Ostertag, W. (1996). Somatischer Gentransfer in der Onkologie. In *Onkologie*, Zeller and z. Hausen, eds., pp. 1-23.

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B., and Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19, 327-36.

Belmont, J. W., MacGregor, G. R., Wager-Smith, K., Fletcher, F. A., Moore, K. A., Hawkins, D., Villalon, D., Chang, S. M., and Caskey, C. T. (1988). Expression of human adenosine deaminase in murine hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 8, 5116-25.

Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Meyer, E., Uckert, W., and Debatin, K. M. (1999). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8699-704.

Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Uckert, W., and Debatin, K. M. (2000). Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res* 60, 3212-7.

- Bierhuizen, M. F., Westerman, Y., Visser, T. P., Dimjati, W., Wognum, A. W., and Wagemaker, G. (1997). Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 90, 3304-15.
- Bowtell, D. D., Cory, S., Johnson, G. R., and Gonda, T. J. (1988). Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J Virol* 62, 2464-73.
- Brand, K., Arnold, W., Bartels, T., Lieber, A., Kay, M. A., Strauss, M., and Dorken, B. (1997). Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 4, 9-16.
- Brand, K., Loser, P., Arnold, W., Bartels, T., and Strauss, M. (1998). Tumor cell-specific transgene expression prevents liver toxicity of the adeno-HSVtk/GCV approach. *Gene Ther* 5, 1363-71.
- Buchsacher, G. L., Jr., and Wong-Staal, F. (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95, 2499-504.
- Bueler, H. (1999). Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem* 380, 613-22.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-7.
- Callus, B. A., and Mathey-Prevo, B. (1999). Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 874-8.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-5.
- Chamberlain, J. (1994). Screening for neuroblastoma: a review of the evidence. *J Med Screen* 1, 169-75.
- Chang, B. D., and Roninson, I. B. (1996). Inducible retroviral vectors regulated by lac repressor in mammalian cells. *Gene* 183, 137-42.
- Chen, R., Greene, E. L., Collinsworth, G., Grewal, J. S., Houghton, O., Zeng, H., Garnovskaya, M., Paul, R. V., and Raymond, J. R. (1999). Enrichment of transiently transfected mesangial cells by cell sorting after cotransfection with GFP. *Am J Physiol* 276, F777-85.
- Coelen, R. J., Jose, D. G., and May, J. T. (1983). The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV. *Arch Virol* 75, 307-11.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*, J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus, eds. (Plainview, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Coker, G. T., Vinnedge, L., and O'Malley, K. L. (1988). Characterization of rat and human tyrosine hydroxylase genes: functional expression of both promoters in neuronal and non-neuronal cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 1341-7.
- Correll, P. H., Colilla, S., and Karlsson, S. (1994). Retroviral vector design for long-term expression in murine hematopoietic cells in vivo. *Blood* 84, 1812-22.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., and Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3, 207-12.
- Cosset, F. L., and Russell, S. J. (1996). Targeting retrovirus entry. *Gene Ther* 3, 946-56.
- Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H., and Blaese, R. M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256, 1550-2.
- Danos, O., and Mulligan, R. C. (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6460-4.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., and DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7870-3.
- Diaz, R. M., Eisen, T., Hart, I. R., and Vile, R. G. (1998). Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma. *J Virol* 72, 789-95.
- Emerman, M., and Temin, H. M. (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* 39, 449-67.
- Ezzeddine, Z. D., Martuza, R. L., Platika, D., Short, M. P., Malick, A., Choi, B., and Breakefield, X. O. (1991). Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* 3, 608-14.
- Ferrari, G., Salvatori, G., Rossi, C., Cossu, G., and Mavilio, F. (1995). A retroviral vector containing a muscle-specific enhancer drives gene expression only in differentiated muscle fibers. *Hum Gene Ther* 6, 733-42.
- Flasshove, M., Bardenheuer, W., Schneider, A., Hirsch, G., Bach, P., Bury, C., Moritz, T., Seeber, S., and Opalka, B. (2000). Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 391-9.
- Forss-Petter, S., Danielson, P., and Sutcliffe, J. G. (1986). Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control. *J Neurosci Res* 16, 141-56.

- Forss-Petter, S., Danielson, P. E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M., and Sutcliffe, J. G. (1990). Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5, 187-97.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P., and Geller, A. I. (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol* 70, 7190-7.
- Gardaneh, M., Gilbert, J., Haber, M., Norris, M. D., Cohn, S. L., Schmidt, M. L., and Marshall, G. M. (2000). Synergy between 5' and 3' flanking regions of the human tyrosine hydroxylase gene ensures specific, high-level expression in neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 292, 147-50.
- Gilboa, E., Eglitis, M. A., Kantoff, P. W., and Anderson, W. F. (1986). Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *Biotechnology* 4, 504-12.
- Graves, B. J., Eisenman, R. N., and McKnight, S. L. (1985). Delineation of transcriptional control signals within the Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 5, 1948-58.
- Hawley, T. S., Telford, W. G., Ramezani, A., and Hawley, R. G. (2001). Four-color flow cytometric detection of retrovirally expressed red, yellow, green, and cyan fluorescent proteins. *Biotechniques* 30, 1028-34.
- Henson, J. W. (1998). Promoters for expression of gene products within neurons and glia. In *Gene therapy for neurological disorders and brain tumors*, E. A. Chiocca and X. O. Breakefield, eds. (Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.), pp. 121-146.
- Herzberg, M., Bibor-Hardy, V., and Simard, R. (1981). Herpes specific and alpha DNA polymerase in nuclear envelope of BHK infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 100, 644-50.
- Hsu, T. C., and Somers, C. E. (1962). Properties of L-cells resistant to 5-bromo-deoxyuridine. *Exp Cell Res* 26, 404-8.
- Indraccolo, S., Minuzzo, S., Feroli, F., Mammano, F., Calderazzo, F., Chieco-Bianchi, L., and Amadori, A. (1998). Pseudotyping of Moloney leukemia virus-based retroviral vectors with simian immunodeficiency virus envelope leads to targeted infection of human CD4+ lymphoid cells. *Gene Ther* 5, 209-17.
- Jacobs, A., Dubrovin, M., Hewett, J., Sena-Esteves, M., Tan, C. W., Slack, M., Sadelain, M., Breakefield, X. O., and Tjuvajev, J. G. (1999). Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: implications for noninvasive imaging of transgene expression. *Neoplasia* 1, 154-61.
- Jager, U., Zhao, Y., and Porter, C. D. (1999). Endothelial cell-specific transcriptional targeting from a hybrid long terminal repeat retrovirus vector containing human prepro-endothelin-1 promoter sequences. *J Virol* 73, 9702-9.

- Jaggar, R. T., Chan, H. Y., Harris, A. L., and Bicknell, R. (1997). Endothelial cell-specific expression of tumor necrosis factor-alpha from the KDR or E-selectin promoters following retroviral delivery. *Hum Gene Ther* 8, 2239-47.
- Kandel, E. S., Chang, B. D., Schott, B., Shtil, A. A., Gudkov, A. V., and Roninson, I. B. (1997). Applications of green fluorescent protein as a marker of retroviral vectors. *Somat Cell Mol Genet* 23, 325-40.
- Karlsson, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., and Nienhuis, A. W. (1987). Regulated expression of human globin genes following transfer with retroviral vectors. *Prog Clin Biol Res* 251, 595-603.
- Käser, H., Wagner, H. P., and Oesch, I. (1990). Neuroblastom, Ganglioneurom, Phäochromozytom und verwandte Tumoren. In *Pädiatrie in Praxis und Klinik*, K.-D. Bachmann, ed. (Stuttgart: Gustav Fischer Verlag), pp. 716-721.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7, 33-40.
- Kennett, R. H. (1979). *Cell culture*, Volume 58, W. B. Jakoby and I. H. Pastan, eds. (New York, USA: Academic Press).
- Kirino, T., Brightman, M. W., Oertel, W. H., Schmechel, D. E., and Marangos, P. J. (1983). Neuron-specific enolase as an index of neuronal regeneration and reinnervation. *J Neurosci* 3, 915-23.
- Klein, R. L., Meyer, E. M., Peel, A. L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N., and King, M. A. (1998). Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol* 150, 183-94.
- Kobayashi, K., Kurosawa, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1989). Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 17, 1089-102.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-92.
- Kramm, C. M., Sena-Esteves, M., Barnett, F. H., Rainov, N. G., Schuback, D. E., Yu, J. S., Pechan, P. A., Paulus, W., Chiocca, E. A., and Breakefield, X. O. (1995). Gene therapy for brain tumors. *Brain Pathol* 5, 345-81.
- Kuriyama, S., Masui, K., Kikukawa, M., Sakamoto, T., Nakatani, T., Nagao, S., Yamazaki, M., Yoshiji, H., Tsujinoue, H., Fukui, H., Yoshimatsu, T., and Ikenaka, K. (1999). Complete cure of established murine hepatocellular carcinoma is achievable by repeated injections of retroviruses carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 6, 525-33.
- LaBrosse, E. H., Comoy, E., Bohuon, C., Zucker, J. M., and Schweisguth, O. (1976). Catecholamine metabolism in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 57, 633-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M., and Rethwilm, A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol* 71, 4815-20.
- Lissemore, J. L., Jankowski, J. T., Thomas, C. B., Mascotti, D. P., and deHaseth, P. L. (2000). Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*. *Biotechniques* 28, 82-9.
- Marangos, P. J., and Schmechel, D. E. (1987). Neuron-specific enolase, a clinically useful marker for neuroscience and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci* 10, 269-295.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988b). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-6.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988a). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62, 1120-4.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17, 969-73.
- Mavria, G., Jager, U., and Porter, C. D. (2000). Generation of a high titre retroviral vector for endothelial cell-specific gene expression in vivo. *Gene Ther* 7, 368-76.
- Mawatari, F., Tsuruta, S., Ido, A., Ueki, T., Nakao, K., Kato, Y., Tamaoki, T., Ishii, N., and Nakata, K. (1998). Retrovirus-mediated gene therapy for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by human alpha-fetoprotein enhancer directly linked to its promoter. *Cancer Gene Ther* 5, 301-6.
- Maxwell, I. H., Brown, J. L., and Maxwell, F. (1991). Inefficiency of expression of luciferase reporter from transfected murine leukaemia proviral DNA may be partially overcome by providing a strong polyadenylation signal. *J Gen Virol* 72, 1721-4.
- McLachlin, J. R., Mittereder, N., Daucher, M. B., Kadan, M., and Eglitis, M. A. (1993). Factors affecting retroviral vector function and structural integrity. *Virology* 195, 1-5.
- Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65, 2220-4.
- Miller, A. D., Miller, D. G., Garcia, J. V., and Lynch, C. M. (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217, 581-99.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10, 4239-42.
- Miller, N., and Vile, R. (1995). Targeted vectors for gene therapy. *Faseb J* 9, 190-9.

- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* *11*, 231-8.
- Miyao, Y., Shimizu, K., Tamura, M., Yamada, M., Tamura, K., Nakahira, K., Kuriyama, S., Hayakawa, T., and Ikenaka, K. (1995). A simplified general method for determination of recombinant retrovirus titers. *Cell Struct Funct* *20*, 177-83.
- Mizuno, H., Sawano, A., Eli, P., Hama, H., and Miyawaki, A. (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* *40*, 2502-10.
- Moolten, F. L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* *46*, 5276-81.
- Moolten, F. L., and Wells, J. M. (1990). Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* *82*, 297-300.
- Moore, K. A., Scarpa, M., Kooyer, S., Utter, A., Caskey, C. T., and Belmont, J. W. (1991). Evaluation of lymphoid-specific enhancer addition or substitution in a basic retrovirus vector. *Hum Gene Ther* *2*, 307-15.
- Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Research* *18*, 3587-3696.
- Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* *260*, 926-32.
- Narita, M., Takanaga, K., Yoshida, Y., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Hamada, H., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S., and Tagawa, M. (2000). Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res* *20*, 279-82.
- Nolan, G. P. (1997). PhoenixTM helper-free retrovirus producer lines.: World Wide Web <http://www.stanford.edu/group/nolan>).
- O'Hara, B., Johann, S. V., Klinger, H. P., Blair, D. G., Rubinson, H., Dunn, K. J., Sass, P., Vitek, S. M., and Robins, T. (1990). Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ* *1*, 119-27.
- Oldfield, E. H., Ram, Z., Culver, K. W., Blaese, R. M., DeVroom, H. L., and Anderson, W. F. (1993). Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther* *4*, 39-69.
- Paquin, A., Jaalouk, D. E., and Galipeau, J. (2001). Retrovector encoding a green fluorescent protein-herpes simplex virus thymidine kinase fusion protein serves as a versatile suicide/reporter for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther* *12*, 13-23.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8392-6.

- Peel, A. L., Zolotukhin, S., Schrimsher, G. W., Muzyczka, N., and 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.
- Raffel, C., Culver, K., Kohn, D., Nelson, M., Siegel, S., Gillis, F., Link, C. J., Villablanca, J. G., and Anderson, W. F. (1994). Gene therapy for the treatment of recurrent pediatric malignant astrocytomas with in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system. *Hum Gene Ther* 5, 863-90.
- Ragheb, J. A., Couture, L., Mullen, C., Ridgway, A., and Morgan, R. A. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev. *Hum Gene Ther* 10, 103-12.
- Rainov, N. G. (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 11, 2389-401.
- Rainov, N. G., Kramm, C. M., Aboody-Guterman, K., Chase, M., Ueki, K., Louis, D. N., Harsh, G. R. t., Chiocca, A., and Breakefield, X. O. (1996). Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm. *Cancer Gene Ther* 3, 99-106.
- Ram, Z., Culver, K., Oshiro, E., Viola, J., DeVroom, H., Otto, E., Long, Z., McGarrity, G., Muul, L., Katz, D., and Blaese, R. M. (1995). Summary of results and conclusions of the gene therapy of malignant brain tumors: Clinical study. *J Neurosurg* 82, 343 A.
- Ram, Z., Culver, K. W., Oshiro, E. M., Viola, J. J., DeVroom, H. L., Otto, E., Long, Z., Chiang, Y., McGarrity, G. J., Muul, L. M., Katz, D., Blaese, R. M., and Oldfield, E. H. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3, 1354-61.
- Ram, Z., Culver, K. W., Walbridge, S., Blaese, R. M., and Oldfield, E. H. (1993b). In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 53, 83-8.
- Ram, Z., Culver, K. W., Walbridge, S., Frank, J. A., Blaese, R. M., and Oldfield, E. H. (1993a). Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. *J Neurosurg* 79, 400-7.
- Reeves, S. A. (1998). Retrovirus vectors and regulatable promoters. In *Gene therapy for neurological disorders and brain tumors*, E. A. Chiocca and X. O. Breakefield, eds. (Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.), pp. 7-38.
- Sakimura, K., Kushiya, E., Takahashi, Y., and Suzuki, Y. (1987). The structure and expression of neuron-specific enolase gene. *Gene* 60, 103-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Edition, J. Sambrook, ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R. J., Wu, Y., Koopmans, S. C., Langston, C., Graham, F. L., Beaudet, A. L., and Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18, 180-3.
- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Fraefel, C., and Breakefield, X. O. (2000). HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol Ther* 2, 9-15.
- Shaskus, J., Greco, D., Asnani, L. P., and Lewis, E. J. (1992). A bifunctional genetic regulatory element of the rat dopamine beta-hydroxylase gene influences cell type specificity and second messenger-mediated transcription. *J Biol Chem* 267, 18821-30.
- Short, M. P., Choi, B. C., Lee, J. K., Malick, A., Breakefield, X. O., and Martuza, R. L. (1990). Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res* 27, 427-39.
- Somia, N. V., Miyoshi, H., Schmitt, M. J., and Verma, I. M. (2000). Retroviral vector targeting to human immunodeficiency virus type 1-infected cells by receptor pseudotyping. *J Virol* 74, 4420-4.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-33.
- SoRelle, R. (2000). Human gene therapy: science under fire. *Circulation* 101, E9023-4.
- Southern, P. J., and Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1, 327-41.
- Spiegel, M., Bitzer, M., Schenk, A., Rossmann, H., Neubert, W. J., Seidler, U., Gregor, M., and Lauer, U. (1998). Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F. *J Virol* 72, 5296-302.
- Triantaphyllopoulos, K., Croxford, J., Baker, D., and Chernajovsky, Y. (1998). Cloning and expression of murine IFN beta and a TNF antagonist for gene therapy of experimental allergic encephalomyelitis. *Gene Ther* 5, 253-63.
- Twyman, R. M., and Jones, E. A. (1997). Sequences in the proximal 5' flanking region of the rat neuron-specific enolase (NSE) gene are sufficient for cell type-specific reporter gene expression. *J Mol Neurosci* 8, 63-73.
- van der Eb, M. M., Cramer, S. J., Vergouwe, Y., Schagen, F. H., van Krieken, J. H., van der Eb, A. J., Rinkes, I. H., van de Velde, C. J., and Hoeben, R. C. (1998). Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther* 5, 451-8.

Vile, R., Miller, N., Chernajovsky, Y., and Hart, I. (1994). A comparison of the properties of different retroviral vectors containing the murine tyrosinase promoter to achieve transcriptionally targeted expression of the HSVtk or IL-2 genes. *Gene Ther* 1, 307-16.

Vile, R. G., Diaz, R. M., Miller, N., Mitchell, S., Tuszyanski, A., and Russell, S. J. (1995). Tissue-specific gene expression from Mo-MLV retroviral vectors with hybrid LTRs containing the murine tyrosinase enhancer/promoter. *Virology* 214, 307-13.

Vile, R. G., and Hart, I. R. (1993a). In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res* 53, 962-7.

Vile, R. G., and Hart, I. R. (1993b). Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res* 53, 3860-4.

Weizsaecker, M., Deen, D. F., Rosenblum, M. L., Hoshino, T., Gutin, P. H., and Barker, M. (1981). The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J Neurol* 224, 183-92.

Wicke, I., and Gansbacher, B. (1996). [Using the thymidine kinase gene in therapy of solid tumors]. *Internist (Berl)* 37, 369-73.

Xu, X. M., Ohashi, K., Sanduja, S. K., Ruan, K. H., Wang, L. H., and Wu, K. K. (1993). Enhanced prostacyclin synthesis in endothelial cells by retrovirus-mediated transfer of prostaglandin H synthase cDNA. *J Clin Invest* 91, 1843-9.

Yang, T. T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P. A., Chen, Y. T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G. H., Piston, D. W., and Kain, S. R. (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* 273, 8212-6.

Yee, J. K., Moores, J. C., Jolly, D. J., Wolff, J. A., Respass, J. G., and Friedmann, T. (1987). Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5197-201.

Yu, H., Empig, C., Xia, J., and Anderson, W. F. (1998). Quantitation of MoMuLV envelope protein on the cell surface. *Virology* 243, 415-22.

Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-8.

Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S. R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 707-11.

Zhang, Q., Tiersch, T. R., and Cooper, R. K. (1998). Inducible expression of green fluorescent protein within channel catfish cells by a cecropin gene promoter. *Gene* 216, 207-13.

Zhang, W. W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 6, 113-38.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Göbel danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie des Zentrums für Kinderheilkunde der Universitätsklinik Düsseldorf. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Göbel für seine intensiven Bemühungen um finanzielle Förderungen danken. An dieser Stelle möchte ich auch der Elterninitiative Kinderkrebsklinik Düsseldorf für die großzügigige finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten danken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Kramm für die Bereitstellung dieses Themas, seine Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, durch die zahlreiche kreative Ideen entstanden und umgesetzt worden sind.

Den Mitarbeitern des Labors für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie gilt der Dank für die hervorragende Unterstützung und die vielen konstruktiven Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich hier die Unterstützung von Frau Dr. Susanne Frank und Herrn PD Dr. Hanenberg, deren Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Mehlhorn danke ich für seine Bereitschaft, die Erstellung des Zweitgutachtens zu übernehmen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sabine Steffens
geboren am 25.7.1973 in Bingen/Rhein
ledig

Ausbildungsdaten

1979-1983	Grundschule, Koblenz
1983-1992	Hilda-Gymnasium, Koblenz
Oktober 1992-November 1997	Studium (Diplom-Biologie) an der Justus-Liebig-Universität, Giessen
November 1996-November 1997	Diplom-Arbeit am Institut für Virologie, Universität Giessen Thema: Identifikation einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase bei Pestiviren
seit Dezember 1997	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Stammzelltransplantation und experimentelle Hämatologie, Kinderklinik, Heinrich-Heine-Universität Promotionsthema: Entwicklung einer tumorspezifischen Suizidgentherapie für Neuroblastome