

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Hans-Peter Hartung

**Neue tetracyclinregulierbare AAV-Einkassettenvektoren
für gentherapeutische Ansätze**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Ulrich Bender

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch

Dekan

Referent: PD Dr. med. C.-O. Hanemann

Korreferent: PD Dr. med. Th. Rosenbaum

Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. med. C.-O. Hanemann für seine beständige Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen. Des weiteren danke ich herzlichst dem Leiter des Neurochemischen Labors, Herrn Prof. Dr. H. W. Müller. Allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors danke ich für die praktische Anleitung und für die schöne Arbeitsatmosphäre. Frau R. Greiner-Petter und Frau Dr. C. Rosenbaum danke ich herzlich für ihre stets wertvolle methodische Anleitung, Hilfe und Geduld. Des weiteren danke ich Frau Dr. Liliane Tenenbaum, Brüssel, für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und wertvolle Diskussion.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Th. Rosenbaum für die Übernahme des Korreferates.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. W. Werner, Merzig, danken, der mich entscheidend zum Medizinstudium motiviert hat und zu meinen großen Vorbildern zählt.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mir diesen Weg überhaupt ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	8
<hr/>	
1 EINLEITUNG	10
<hr/>	
1.1 ALLGEMEINES	10
1.2 ANSÄTZE DER GENTHERAPIE	10
1.3 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT	13
1.4 DAS ADENO-ASSOZIIERTE VIRUS	14
1.4.1 LEBENSZYKLUS	14
1.4.2 GENETIK	15
1.4.3 INFEKTION UND INTEGRATION	16
1.5 DAS TET-SYSTEM	17
1.6 DIE SCHWANNZELLE ALS ZIELZELLE FÜR GENTHERAPIE	20
2 MATERIAL	22
<hr/>	
2.1 MOLEKULARBIOLOGIE	22
2.1.1 E. COLI-BAKTERIENSTÄMME	22
2.1.2 VEKTOREN	22
2.1.3 PLASMIDAUFREINIGUNG UND KLONIERUNG	23
2.1.4 SEQUENZIERUNG VON PLASMIDEN	23
2.1.5 MEDIEN ZUR KULTURELLEN VERMEHRUNG VON BAKTERIEN	23
2.1.6 GELELEKTROPHORESE	24
2.1.7 PUFFER	24
2.2 ZELLKULTUR	25
2.2.1 KULTURMEDIEN	25
2.2.2 SONSTIGE MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	25
2.2.3 TRANSFEKTIONSREAGENZNIEN	26
2.3 SONSTIGE CHEMIKALIEN, REAGENZNIEN UND GERÄTE	26

3	METHODEN	27
<hr/>		
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN (ALLGEMEINER TEIL)	27
3.1.1	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	27
3.1.2	SEQUENZIERUNG VON DNA	27
3.1.2.1	Oligodesoxynukleotide	27
3.1.2.2	Unidirektionale PCR-Amplifikation (Sequenzreaktion, modifiziert nach (Sanger <i>et al.</i> , 1977))	28
3.1.2.3	Automatische Sequenzierung (modifiziert nach (Sanger <i>et al.</i> , 1977))	28
3.1.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	29
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN (SPEZIELLER TEIL)	29
3.2.1	KLONIERUNG VON EINKASSETTENVEKTOREN	29
3.2.1.1	Die Bausteine	30
3.2.1.2	Vorläufervektoren	31
3.2.1.3	Das Kontrollplasmid	32
3.3	ZELLKULTURMETHODEN	33
3.3.1	VORBEREITUNG DER KULTURGEFÄßE	33
3.3.2	PASSAGIEREN VON ZELLEN	33
3.3.3	SCHWANNZELLKULTUREN (BROCKES <i>ET AL.</i> , 1979;BROCKES UND RAFF, 1979)	33
3.3.4	KOMPLEMENTLYSE (BROCKES <i>ET AL.</i> , 1979;BROCKES UND RAFF, 1979)	34
3.3.5	KRYOKONSERVIERUNG	35
3.3.6	AUFTAUEN VON ZELLEN	35
3.4	TRANSIENTE TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN	35
3.4.1	GRUNDSÄTZLICHES	35
3.4.2	VORBEREITUNG DER ZELLEN	36
3.4.3	TRANSFEKTIONSBEDINGUNGEN	36
3.5	FACS – ANALYSE	37
3.5.1	GRUNDSÄTZLICHES	37
3.5.2	ANALYSE DER ZELLEN	38
3.5.3	WEITERKULTIVIERUNG DER ZELLEN	38
3.6	SOFTWARE	39

4	<u>ERGEBNISSE</u>	40
4.1	DIE EINKASSETTENVEKTOREN	40
4.1.1	KLONIERUNG DER NICHT GEWEBESPEZIFISCHEN KONSTRUKTE	41
4.1.2	KLONIERUNG DER GEWEBESPEZIFISCHEN KONSTRUKTE	41
4.1.3	EINKASSETTENVEKTOREN OHNE SCHWANNZELLSPEZIFISCHEN PROMOTOR	42
4.1.4	EINKASSETTENVEKTOREN MIT SCHWANNZELLSPEZIFISCHEM PROMOTOR	44
4.2	TRANSFEKTION UND FACS	45
4.2.1	EFFEKTE VON DOSPER UND FUGENE	45
4.2.2	REGULIERBARKEIT UND GEWEBESPEZIFITÄT	49
	ARBEITSHYPOTHESEN	49
	RESULTATE UND BERECHNUNG	50
4.2.2.1	Übersicht über die Transfektionsergebnisse	58
4.2.3	LANGZEITERGEBNISSE	61
5	<u>DISKUSSION</u>	64
5.1	TET-ON-SYSTEM VERSUS TET-OFF-SYSTEM	64
5.2	ÜBERLEGUNGEN ZUM VEKTORDESIGN	65
5.3	BEURTEILUNG DER KONSTRUKTE	66
5.3.1	REGULIERBARKEIT	66
5.3.2	ZELLSPEZIFITÄT	68
5.3.3	HINTERGRUNDAKTIVITÄT	69
5.3.4	LANGZEITERGEBNISSE	71
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	73
7	<u>KARTEN UND SEQUENZEN</u>	74
7.1	PHUB-1	74
7.1.1	VEKTORKARTE	74
7.1.2	SEQUENZ	74
7.2	PTET-OFF-EGFP	83
7.2.1	VEKTORKARTE	83

7.2.2 SEQUENZ	83
7.3 PHUB-2	92
7.3.1 VEKTORKARTE	92
7.3.2 SEQUENZ	92
7.4 PHUB-3	102
7.4.1 VEKTORKARTE	102
7.4.2 SEQUENZ	102
7.5 PAC1	112
7.5.1 VEKTORKARTE	112
7.5.2 SEQUENZ	112
8 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	121

Verwendete Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalie-Virus
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphatmischung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOSPER	1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
rEGFP	regulated Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Scan
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HSV	Herpes-simplex-Virus
<i>ITR</i>	Inverted Terminal Repeat
kb	Kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kalium-di-hydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Di-Kalium-hydrogenphosphat
LB-Medium	Luria-Bertani -Medium
M	Molarität
MCS	Multiple Cloning site
min	Minuten
mol	Einheit: Mol
NaN ₃	Natriumazid
N ₂	Stickstoff
NF 2	Neurofibromatose Typ 2
OD _{XYZ}	Optische Dichte bei XYZ nm (gemessen im UV-Spektrometer)
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion

pXYZ	Plasmidbezeichnung: Plasmid XYZ
<i>P_{XYZ}</i>	Promotorbezeichnung: XYZ-Promotor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PNK	Polynukleotidkinase
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RSZ	Ratten-Schwann-Zelle(n)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase, alkalische Phosphatase aus Shrimps
SOC	SOC- Medium
<i>SV40pA</i>	poly-A Signal des Simianvirus
SZ	Schwann-Zelle(n)
rtTA	reverse Tetracycline-responsive transcriptional transactivator
tTA	Tetracycline-responsive transcriptional transactivator
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth Medium
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität Wenn nicht anders definiert, entspricht eine enzymatische Einheit der Enzymmenge, die bei 37° C einen Substratumsatz von einem Mikromol Substrat pro Minute aufweist.
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
wt	Wildtyp

DNA-Sequenzen und Gennamen werden in kursivem Schriftsatz dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Entwicklung und die Fortschritte der Molekularbiologie haben es in den vergangenen Jahren erlaubt, eine Vielzahl von Erkrankungen in ihrer Ätiopathogenese aufzuklären und auf genetische Determinanten zurückzuführen. Dies hat neben diversen genetischen und diagnostischen Fragestellungen auch eine Vielzahl genterapeutischer Ansätze eröffnet. Bevor jedoch auf die verschiedenen genterapeutischen Fragestellungen und Arbeitsansätze, insbesondere die Optimierung von Genterapievektoren, welche Gegenstand dieser Arbeit ist, eingegangen werden kann, muß an dieser Stelle kurz eine Definition von Genterapie versucht werden. Genterapie ist "die Behandlung oder Verhinderung von Krankheit durch Gentransfer", (Mountain, 2000;Robbins *et al.*, 1998), „jegliche Form von Therapie, die Gene beeinflusst“ (Snyder und Fisher, 1996), das „Einschleusen von korrigierendem genetischem Material, um Krankheitssymptome zu lindern“ (Verma und Somia, 1997). Diese verschiedenen Definitionen lassen erkennen, in welcher unterschiedlichen Richtungen die Ansätze gehen. Dementsprechend treten auch große ethische Vorbehalte und Unsicherheiten zutage. Es ist an Mutagenese oder Tumorgenese durch ungezielt in das Genom integrierende Fremd-DNA zu denken. Insbesondere muß auch die Möglichkeit einer Alteration der Keimbahn in Betracht gezogen werden. Eine unbeabsichtigte Manipulation von Keimzellen durch einen zufällig in das Keimzellgenom integrierenden Genterapievektor und eine eventuelle Verursachung von hereditären Schädigungen ist zwar nach dem heutigen Wissensstand sehr unwahrscheinlich aber dennoch nicht vollständig auszuschließen (Gordon, 1998). Die genterapeutischen Forschungen konzentrieren sich aufgrund dieser ethischen Vorbehalte durchweg auf somatische Genterapie, d. h. den Gentransfer in Körperzellen ohne Affektion der Keimbahn. In diesem Sinne ist auch der Gebrauch des Begriffes „Genterapie“ in dieser Arbeit aufzufassen.

1.2 Ansätze der Genterapie

Der erste klinische Versuch, eine genetisch bedingte Erkrankung zu korrigieren, fand 1990 bei zwei Kindern mit Adenosindesaminase-Mangel (ADA⁻-SCID) statt (Blaese *et al.*, 1995;Blaese, 1995a). Mit Hilfe eines Retrovirus wurden T-Zellen nach Entnahme genetisch verändert und reinfundiert (Blaese *et al.*, 1995). Nach nun mehr als zehnjährigem Verlauf ist dieser Versuch als erfolgreich zu beurteilen (Thompson, 2000). Seither hat sich die molekularmedizinische Forschung auf die verschiedensten Erkrankungen, Zelltypen und Gendefekte ausgedehnt (Blaese, 1995a;Blaese, 1995b). Ein beeindruckendes Beispiel für die

große Geschwindigkeit dieser Entwicklung ist der gentherapeutische Ansatz zur Behandlung der zystischen Fibrose. Hier lagen zwischen der Identifizierung des krankheitsverursachenden Gendefektes 1989 und der ersten klinischen Gentherapiestudie 1993 lediglich vier Jahre (Bartlett *et al.*, 1996).

Prinzipiell kann die Gentherapie von Erkrankungen auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden: *in vivo* und *ex vivo*. Bei einer indirekten oder *ex vivo* Therapie werden dem Patienten Zellen entnommen, genetisch modifiziert und dann wieder implantiert. Dies hat den Vorteil einer großen Effizienz der Genübertragung aber die Nachteile eines großen technischen Aufwandes, immunologischer bzw. infektiologischer Komplikationen und ist stark von dem jeweiligen Patienten und der Erkrankung bzw. dem erkrankten Organ abhängig. Eine direkte oder *in vivo* Therapie, bei der der Gentransfervektor dem Patienten direkt appliziert wird, hat demgegenüber den Nachteil einer geringeren Effizienz der Genübertragung, jedoch die Vorteile einer relativen Patientenunabhängigkeit, der Möglichkeit, zumindest theoretisch viele Zelltypen des Körpers erreichen zu können, und eines geringeren Aufwandes bei der Applikation. Alle diese genannten Faktoren hängen entscheidend von der Beschaffenheit des eingesetzten Vektors ab. Dieser Vektor muß im Idealfall folgende Kriterien erfüllen:

- Risikoarme Applikation
- Keine Auslösung einer Immunreaktion im Zielorganismus
- Effizienz in der Übertragung von DNA
- Spezifität in der Übertragung von DNA auf die anvisierte Zellart
- Spezifität bezüglich der Expression des Transgens in der angestrebten Zellart und
- Regulierbarkeit, ausreichende Stärke und Stabilität in der Expression des Transgens

Je nach betroffenem Organ bzw. Organsystem mit seinen anatomischen und physiologischen Besonderheiten, betroffenem Zelltyp, Art der Erkrankung und Therapieansatz stellen diese Punkte spezifische Schwierigkeiten dar, so daß es den allgemeinen perfekten Vektor nach dem heutigen Wissensstand nicht geben kann (Bartlett *et al.*, 1996).

Wie eingangs schon erwähnt, stellen die meisten Gentherapieverfahren eine Genaddition dar. Sie kann auf den funktionellen Ersatz eines defekten Gens durch seine Wildtypform zielen. Dies ist beispielsweise bei dem oben erwähnten Ansatz von Blaese und Mitarbeitern (Blaese *et al.*, 1995) erfolgt oder in der Arbeit von Acland und Mitarbeitern, die im Tierexperiment das Sehvermögen bei Leberscher kongenitaler Amaurose wiederherstellen konnten (Acland *et al.*, 2001). Vor allem bezüglich der Therapie maligner Erkrankungen wird die Übertragung von Suizid-Genen angestrebt. Als Beispiel sei hier die Transduktion von Glioblastomzellen

mit dem HSV-Thymidinkinasegen genannt, was nach Ganciclovirgabe zum Tumorzelltod führt (Culver *et al.*, 1992; Ram *et al.*, 1997). Weitere Ansätze verfolgen verschiedene Mechanismen der Immunmodulation, um z. B. durch Expression von transgenen Oberflächenmarkern oder Zytokinen in Tumorzellen Sensibilisierung und Angriff des Immunsystems zu erreichen (Prince, 1998; Vile *et al.*, 2000). Des Weiteren sei hier die Expression von transgenen wachstumshemmenden Proteinen oder die Übertragung von Antisense-Oligonukleotiden zur Expressionsunterdrückung des Zielgens genannt (Prince, 1998).

Innerhalb dieser genannten Versuchsmodelle stellt nun die effiziente Genübertragung auf die Zielzelle, das „Vehikel“ sozusagen, ein zentrales Problem dar. Hier sind im wesentlichen drei methodische Wege zu nennen, die beschrieben werden, um dieses Problem zu lösen:

- die Übertragung von freier („nackter“) DNA, die zu den ersten angewandten Verfahren gehört (Li und Huang, 2000; Prince, 1998)
- die Verwendung von Liposomen und anderen chemischen Präparationen (Li und Huang, 2000)
- die Verwendung von modifizierten Viren und Virosomen.

Die Vor- und Nachteile, die jeder dieser methodischen Wege birgt, werden in Kapitel 4 näher diskutiert und deshalb an dieser Stelle nicht weiter beleuchtet. Die am häufigsten angewendeten Methoden stellen derzeit die chemische Transfektion mittels Liposomen oder Lipidgemischen, die Transfektion mit Virosomen, d. h. Virusprotein-Liposomen-Komplexen und natürlich die Transduktion durch die verschiedensten Arten modifizierter Viren dar.

Einen vollständigen Überblick über die zur Gentherapie verwendeten Viren und deren Modifikationen zu geben, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, und deshalb werden hier lediglich die am häufigsten verwendeten viralen Ansätze kurz aufgezählt (die verwendete Literatur ist am Ende des Abschnittes aufgeführt):

Retroviren werden im wesentlichen in der onkologischen Gentherapie verwendet. Ein Vorteil ist hier die gute Infektion mitotischer Zellen, insbesondere der Zellen des hämatopoetischen Systems. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die bei Retroviren immer auftretende Integration des Virusgenoms in das Genom der Zielzelle und die demnach stabile Expression eines Transgens. Das Herpes-simplex-Virus (HSV) wird aufgrund seiner neurotrophen Eigenschaften in der neurologischen und neuroonkologischen Forschung eingesetzt. Hier sind vor allem die eingangs schon erwähnten Verfahren der Zellzerstörung mittels der HSV-Thymidinkinase zu nennen. Adenoviren werden sehr weit verbreitet eingesetzt. Sie bieten den Vorteil einer effizienten Infektion vieler verschiedener Gewebe- und Zelltypen und die Möglichkeit, relativ

große Konstrukte zu transportieren. Hauptnachteil ist die häufig auftretende starke Immunreaktion auf Virusantigene. Adeno-assoziierte Viren lösen im Unterschied zu den Adenoviren keine oder nur eine geringe Immunantwort im Wirtsorganismus aus. Ihr Infektionsspektrum ist jedoch schmäler, die Konstruktgröße limitiert und die Herstellung im Vergleich zu den vorgenannten rekombinanten Virusarten aufwendig (Ali *et al.*, 1994; Culver *et al.*, 1992; Prince, 1998; Robbins *et al.*, 1998; Samulski *et al.*, 1999; Schagen *et al.*, 2000; Verma und Somia, 1997; Wu und Ataii, 2000).

1.3 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden neu hergestellte Gentherapievektoren vorgestellt. Sie basieren durchweg auf dem Adeno-assoziierten Virus. Außerdem enthalten sie ein durch Tetracyclin regulierbares Expressionssystem, das als Detektionsmarker das grün fluoreszierende Chromophor EGFP auf ein und demselben Vektor exprimiert. Es wird zum einen durch liposomale Transfektion von HeLa-Zellen und von Schwanzzellen der Ratte untersucht, inwiefern dieses Einvektor-System durch Tetracyclin regulierbar ist. Zum zweiten werden diese beiden Zelltypen bezüglich dieser Konstrukte verglichen. Schließlich wird durch modifizierte schwanzzellspezifische Einkassettenvektoren die selektive Anwendung dieses Expressionssystems für Schwanzzellen untersucht. Zielsetzung dieser Arbeit ist die Generierung eines regulierbaren Einkomponentensystems zur *in vivo*-Gentherapie von Erkrankungen der Schwanzzelle. Ein sogenanntes Einkassettensystem ist bei einem *in vivo*-Ansatz vonnöten, da bei einem Mehrkomponentensystem die mehrmalige Manipulation exakt derselben Zellen im Organismus notwendig wäre. Solche Mehrkomponentensysteme sind daher eher bei den oben schon erwähnten *ex vivo*-Ansätzen sinnvoll, während für einen *in vivo*-Ansatz nur ein Einkomponentensystem in Betracht kommt. Die wesentlichen Charakteristika dieses Systems, das Adeno-assoziierte Virus, das tetracyclinregulierbare Expressionssystem und eine modellhafte Erkrankung werden in den nun folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.4 Das Adeno-assoziierte Virus

1.4.1 Lebenszyklus

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein nicht umhülltes, nur 19-26 nm großes eicosaedrisches DNA-Virus und gehört zur Familie der Parvoviren. Die Parvoviren werden in autonome und Dependoviren unterteilt (Muzyczka, 1992). Das Adeno-assoziierte Virus wird als Dependovirus klassifiziert, da für seine replikative lytische Infektion die Anwesenheit eines Helfervirus aus der Familie der Adenoviren oder Herpesviren erforderlich ist (Bartlett *et al.*, 1996; Berns und Hauswirth, 1979; Muzyczka, 1992). Autonome Parvoviren hingegen benötigen kein Helfervirus zum produktiven Wachstum. Das Adeno-assoziierte Virus allein ist nicht pathogen für den Menschen (Berns und Hauswirth, 1979). Bisher wurden 6 Serotypen (1-6) des humanen AAV identifiziert, von denen der Serotyp 2 (AAV-2) am besten untersucht ist (Muzyczka, 1992; Rabinowitz und Samulski, 2000). Mehrere Studien haben gezeigt, daß das AAV in gesunden Zellen eine latente Infektion etabliert und nur dann eine lytische Infektion hervorruft, wenn die Wirtszelle unter Stress steht (Berns und Giraud, 1996). Daher kann man den Lebenszyklus des AAV in eine latente und eine lytische Phase unterteilen (Berns und Giraud, 1996). In der latenten Phase wird das Virion in die Zelle aufgenommen, und das Genom wird entpackt. Sodann ist eine limitierte Expression von viralen Regulatorproteinen zu finden, die die Integration ins Wirtsgenom unterstützen und zudem eine weitergehende detektierbare Replikation und Expression viraler DNA unterdrücken. Das Genom des AAV bei dieser latenten Infektion stellt das erste Beispiel für Fremd-DNA dar, die bevorzugt an einer definierten Stelle des Genoms integriert, nämlich auf dem langen Arm von Chromosom 19 (Berns und Giraud, 1996). Der Mechanismus wird an anderer Stelle erläutert (siehe Kap. 1.4.3.). In der lytischen oder produktiven Phase ist meist eine Infektion mit einem Helfervirus aus der Familie der Adenoviren (Ad) oder Herpesviren (HSV) zu finden, die der AAV-Infektion vorausgehen

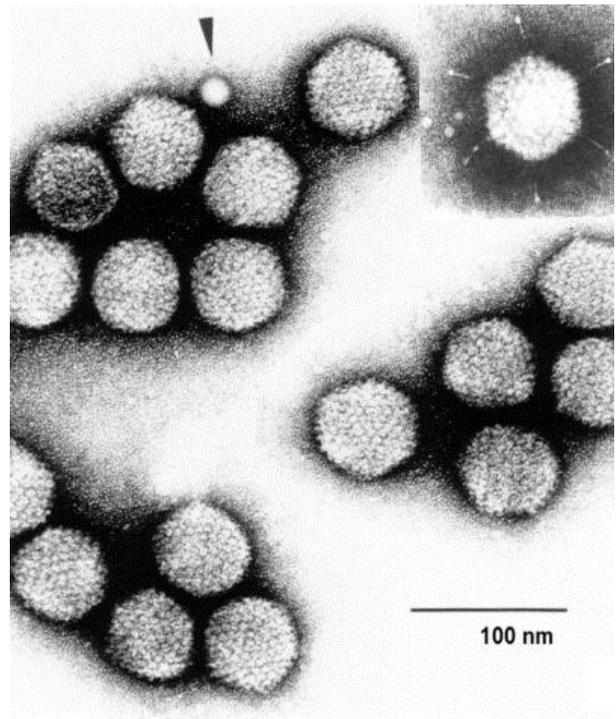


Abbildung 1: AAV, elektronenmikroskopisches Bild, aus: ICTVdB - A Universal Virus Database,
http://life.bio2.columbia.edu/WIntkev/Images/em_ade.no.gif

aber auch gleichzeitig oder nachträglich erfolgen kann. Diese Helfer stellen Gene zu Verfügung, die die Genexpression regulieren und für virale DNA-Polymerasen oder auch Helikasen kodieren. Dadurch wird nicht allein die virale sondern auch die Genexpression der Wirtszelle beeinflusst, und das intrazelluläre Milieu ändert sich. Nun können AAV-Gene exprimiert werden, das Genom wird exzidiert, und die Produktion von Virionen beginnt (Berns und Giraud, 1996).

1.4.2 Genetik

Das Virion enthält das Genom des AAV, ein einzelsträngiges DNA-Molekül von 4680 Nukleotiden Länge. Beide Enden des Genoms werden durch 145 bp lange Repeat-Sequenzen gebildet, den sogenannten inverted terminal repeats (ITR) (Berns und Hauswirth, 1979). Diese Sequenzen mit einem GC-Gehalt von über 80% bilden haarnadelartige Sekundärstrukturen aus (Haberman *et al.*, 2000; Lusby *et al.*, 1980; Muzyczka, 1992; Srivastava *et al.*, 1983). Es konnte gezeigt werden, daß diese ITRs sowohl für die ortsspezifische Integration in das Wirtsgenom als auch für die Exzision des AAV-Genoms in der lytischen Phase notwendig sind (Berns und Giraud, 1996; Young, Jr. *et al.*, 2000). Sie spielen bei der Unterdrückung der DNA-Replikation im Zustand der latenten Infektion eine wichtige Rolle, fungieren aber auch als Anfangssignal für die DNA-Replikation (*ori*) bei einer lytischen Infektion (Berns und Giraud, 1996).

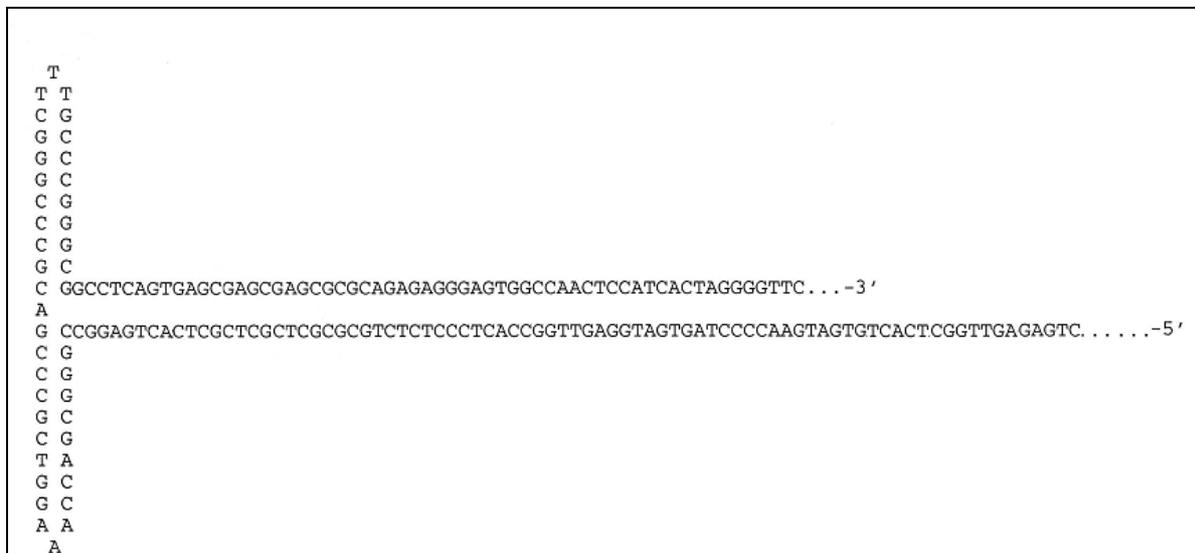


Abbildung 2: Sekundärstruktur der inverted terminal repeat-Sequenzen des AAV, modifiziert nach (Berns und Giraud, 1996)

Im internen Teil des Genoms befinden sich die Gene *rep* und *cap*, die von drei Promotoren kontrolliert werden (*p5*, *p19* und *p40*). Das *rep*-Gen kodiert für die vier nicht strukturellen Proteine Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40 (Berns und Giraud, 1996). Sie spielen vor allem

bei der Replikation des Virus eine wichtige Rolle, indem sie mit den ITR-Sequenzen interagieren, z. B. bindet Rep78/68 in dem durch Ko- oder Superinfektion veränderten Zellmilieu an Bindungsstellen der ITRs und exzidiert ein einzelsträngiges virales Genom aus dem Wirtsgenom der Zelle. Dann folgt die Faltung dieses Einzelstranges in den umgekehrt komplementären ITR-Regionen, und es entsteht ein doppelsträngiges DNA-Stück, das als Primer für die DNA-Neusynthese wirkt (Berns und Giraud, 1996; Snyder *et al.*, 1990; Young, Jr. *et al.*, 2000). Das *cap*-Gen kodiert für die viralen Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Das Kapsid ist für den intrazellulären Transport des Virions zum Nukleus verantwortlich, ein Mechanismus, der noch nicht in Gänze verstanden ist (Bartlett *et al.*, 2000; Rabinowitz und Samulski, 2000).

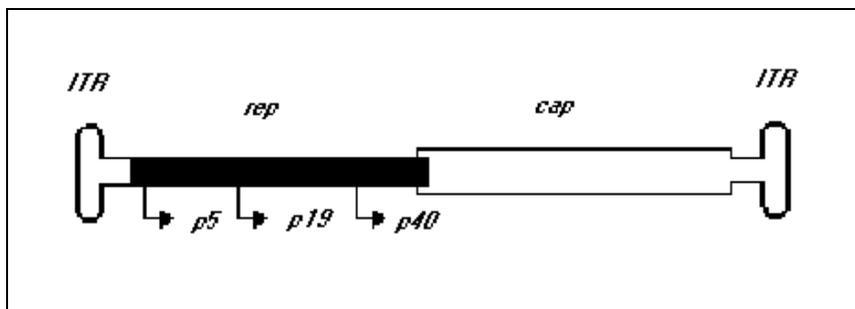


Abbildung 3: AAV-Genom schematisch dargestellt, modifiziert nach (Monahan und Samulski, 2000)

1.4.3 Infektion und Integration

Die Infektion der Wirtszelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose. Hierfür ist Heparansulfatproteoglykan (HSPG) an der Zelloberfläche als ein Hauptrezeptor identifiziert worden (Summerford und Samulski, 1998). Der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1) und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin wurden als Korezeptoren beschrieben (Bartlett *et al.*, 2000; Qing *et al.*, 1999; Summerford *et al.*, 1999). Die AAV-Partikel werden zum größten Teil in Clathrin-umhüllten Vesikeln aufgenommen und gelangen zum Nukleus (Bartlett *et al.*, 2000; Douar *et al.*, 2001; Monahan und Samulski, 2000). Dann findet eine Interaktion zwischen dem oben schon erwähnten Rep-Protein, den ITR-Sequenzen und der Zell-DNA statt (Linden *et al.*, 1996a; Linden *et al.*, 1996b; Samulski *et al.*, 1999; Young, Jr. und Samulski, 2001). Auf Chromosom 19q befindet sich eine Sequenz, an die Rep binden kann, fast identisch mit der oben genannten Rep-Bindungsstelle auf den inverted terminal repeats. Wir können also von zwei Rep-Bindungsstellen (rep binding element, RBE) sprechen, einer auf der viralen und einer auf der Wirts-DNA. Zusätzlich entspricht die Sequenz der Wirtszell-DNA an dieser Stelle dem viralen Anfangssignal für die DNA-Replikation (ori), das sich auf den ITRs befindet (Young, Jr. *et al.*, 2000; Young, Jr. und Samulski, 2001). Man kann also

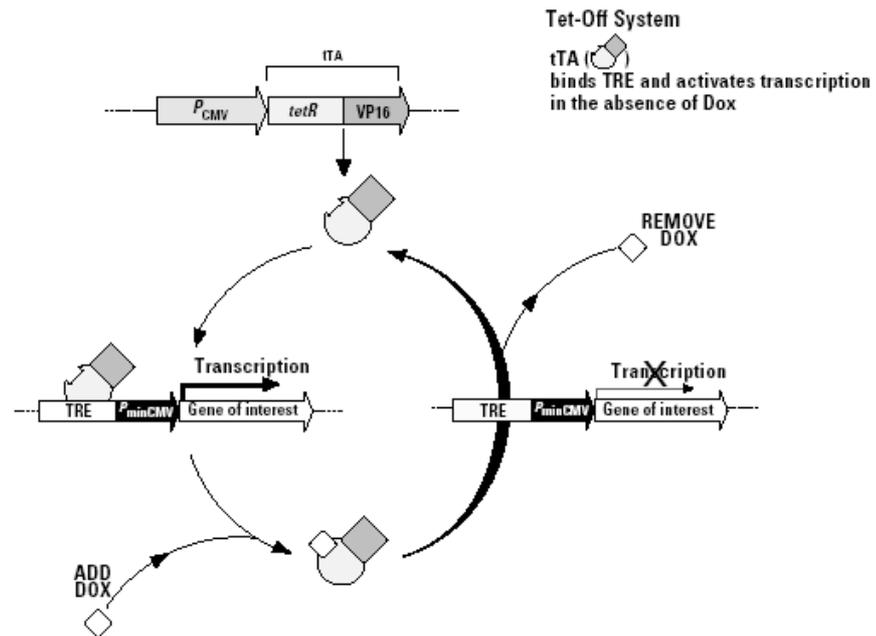
hier wiederum von zwei DNA-Replikationssignalen sprechen. Es konnte nun von Young und Samulski gezeigt werden, daß die Interaktion von Rep mit dem Replikationssignal der WirtsdNA entscheidend für die zielgerichtete Integration in das Wirtsgenom ist. Diese Integration findet im wesentlichen durch Rep-vermittelte zielgerichtete DNA-Rekombination statt (Young, Jr. *et al.*, 2000; Young, Jr. und Samulski, 2001). Der Integrationslokus wird als AAVS1 bezeichnet und befindet sich auf dem humanen Chromosom 19q13.3qter (Berns und Giraud, 1996; Monahan und Samulski, 2000; Young, Jr. *et al.*, 2000). Das AAV ist bisher das einzige bekannte Virus, das zu einer zielgerichteten Integration in ein Wirtsgenom in der Lage ist. Diese zielgerichtete Integration ist bei der Wildtypform mit einer Häufigkeit von > 70% zu finden und macht dieses Virus zu einem besonders attraktiven Kandidaten für gentherapeutische Versuchsansätze (Young, Jr. *et al.*, 2000; Young, Jr. und Samulski, 2001). Allerdings ist an dieser Stelle ebenfalls zu erwähnen, daß bei rekombinanten Adeno-assoziierten Viren eine zielgerichtete Integration nicht mehr möglich zu sein scheint. AAV-Gentherapievektoren benötigen als einzige virale Sequenzen die inverted terminal repeats, da ansonsten eine Vermehrung, d. h. Herstellung des rekombinanten Virus nicht möglich ist. Diese rekombinanten AAV-Vektoren tragen neben dem Zielgen lediglich die ITR-Sequenzen und keine *rep*-Sequenzen, die für eine zielgerichtete Integration notwendig sind, so daß eine zufällige Integration in das Wirtsgenom stattfindet (Samulski *et al.*, 1999).

1.5 Das Tet-System

Dieses von Gossen und Bujard 1992 beschriebene System stellt ein wirksames Instrument zur artifiziellen Regulation von Transgenen dar (Gossen *et al.*, 1993; Gossen *et al.*, 1995; Gossen und Bujard, 1992). Das System besteht aus einer regulierenden („Regulator“) und einer regulierten („Response“) Einheit, die sich auf zwei separaten Plasmiden befinden. Die regulierende Tet-Off-Einheit exprimiert den tet-responsiven transkriptionellen Aktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus bakteriellen und viralen Bestandteilen. Dieser besteht aus Kontrollelementen des Tet-Repressors (TetR) im Tetracyclinresistenz-Operon von *E. coli* und der C-terminalen Aktivierungsdomäne des VP 16-Proteins des Herpes-simplex-Virus (HSV). Die regulierte Einheit besteht aus dem Tet-responsiven Element (TRE), das sich aus sieben Kopien der Tet-operator DNA-Sequenz (*tetO*) des Tetracyclinresistenz-Operons von *E. coli* und einem minimalen, d. h. nicht aktiven CMV-Promotor zusammensetzt. Nur in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin kann tTA an TRE binden und die Transkription aktivieren (Gossen *et al.*, 1995; Gossen und Bujard, 1993; Mohammadi *et al.*, 1997). Die Tet-On-Einheit entsteht durch vier Punktmutationen im *TetR*-Gen, die zur

Expression eines reversen tet-responsiven transkriptionellen Aktivators (rtTA) führen, der bezüglich Bindung an TRE und Aktivierung der Expression genau die umgekehrte Funktionsweise besitzt, d. h. eine Aktivierung der Expression erfolgt nur in Anwesenheit von Tetracyclin. Dabei ist das Tet-On-System ausschließlich empfindlich für Doxycyclin, das Tet-Off-System für Tetracyclin, Doxycyclin und einige andere Derivate mit unterschiedlicher Pharmakodynamik (Gossen *et al.*, 1995; Gossen und Bujard, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Versuche Doxycyclin verwendet. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die dosisabhängige Expressionshemmung oder –aktivierung, die für beide Systeme beschrieben wurde. Von Gossen und Bujard wurde eine dosisabhängige Regulation der Expression im Bereich 0,001-1 µg Doxycyclin pro ml Kulturmedium nachgewiesen (Gossen und Bujard, 1992). Eine Aktivierung dieses Systems ist also mit einer Dosierung erreichbar, bei der keine Nebenwirkungen im Organismus zu erwarten sind. Eine graphische Darstellung beider Systeme zeigt Abbildung 4. Die oben geforderte Zell- bzw. Gewebespezifität von Gentherapievektoren sollte in dieser Arbeit durch die Verwendung eines schwanzzellspezifischen Promotors erreicht werden. Die Expression des tet-responsiven Transaktivators (rtTA) wurde unter die Kontrolle des schwanzzellspezifischen Promotors des Myelinproteins P₀ gestellt, so daß eine Expression nur in Schwanzzellen erfolgen sollte (Messing *et al.*, 1992). Außerdem wurde ein Konstrukt mit bidirektionalem tetracyclinabhängigem Promotor verwendet. Bei dieser Variante des Tet-Systems stehen sowohl Regulator- als auch Response-Einheit unter der Kontrolle eines tetracyclinabhängigen Promotors. Dieser setzt sich aus den schon beschriebenen tet-responsiven Elementen (TRE) und zwei Minimalpromotoren in entgegengesetzter Ausrichtung zusammen (Baron *et al.*, 1995).

Tet-Off



Tet-On

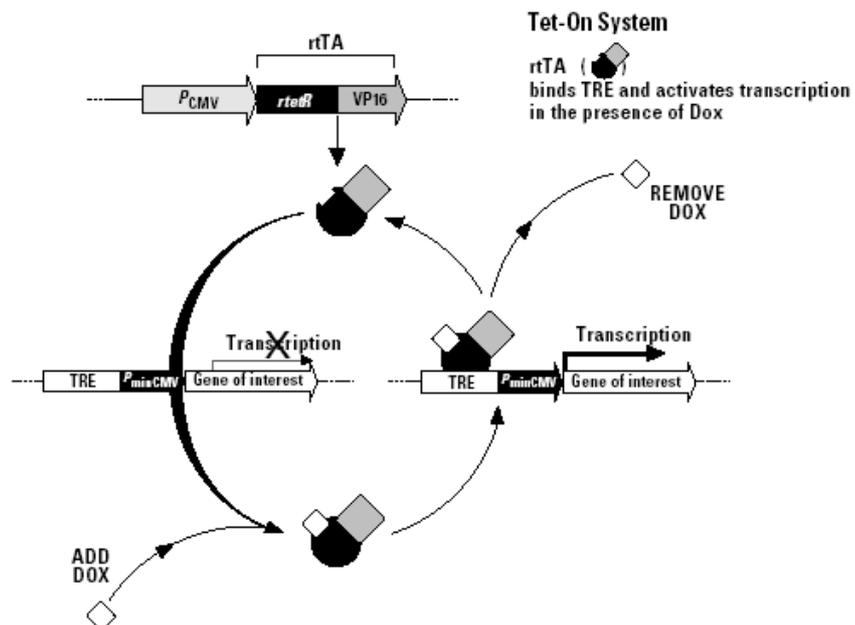


Abbildung 4: Das Tet-System. Dargestellt sind Tet-On/Off-Einheit und Tet-responsives Element (aus: CLONTECH Product Catalog – Tet-On and Tet-Off Gene Expression Systems, http://www.clontech.com/products/catalog01/Sec4/p126_128tetontetoff.shtml)

1.6 Die Schwannzelle als Zielzelle für Gentherapie

Als beispielhafte Erkrankung für diese Arbeit wurde die Neurofibromatose Typ 2 gewählt. Bei dieser Erkrankung wird vor allem die Entwicklung von relativ langsam wachsenden Schwannzelltumoren, den Vestibularisschwannomen beobachtet. Klinisch fallen die Patienten durch graduellen, progressiven, bisweilen auch plötzlichen Hörverlust auf. Dieser erfolgt oft asymmetrisch, kann aber auch beidseitig erfolgen. Das durchschnittliche Manifestationsalter dieser Erkrankung liegt bei 24 Jahren. Während beidseitige Vestibularisschwannome die Diagnose der Neurofibromatose Typ 2 beweisen, können zudem andere Schwannome, Meningeome und Gliome auftreten. Eine Übersicht über das klinische Bild und die Diagnosekriterien gibt Tabelle 1:

Die Diagnose Neurofibromatose Typ 2 gilt als gesichert bei:

(I) Bilateralen Vestibularisschwannomen

Oder

(II) positiver Familienanamnese für NF 2 im ersten Grad **plus**

1. Unilateralen Vestibularisschwannomen bei Patienten <30 Jahre **oder**

2. Zwei der folgenden Befunde: Meningeome, Gliome, andere Schwannome, juvenile kortikale Katarakte

Die Diagnose Neurofibromatose Typ 2 gilt als wahrscheinlich bei:

(I) Unilateralen Vestibularisschwannomen bei Patienten <30 Jahre und mindestens einem der folgenden Befunde:

Meningeome, Gliome, andere Schwannome, juvenile kortikale Katarakte

oder

(II) Zwei oder mehr Meningeomen plus unilateralem Vestibularisschwannom bei Patienten <30 Jahre **oder** einem der folgenden Befunde:

Meningeome, Gliome, andere Schwannome, juvenile kortikale Katarakte

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Neurofibromatose Typ 2 (nach (Hirsch *et al.*, 2001))

Die Inzidenz der Neurofibromatose Typ 2 liegt zwischen 1:33 000- 40 000. Durch genetische Studien in großen Stammbäumen wurde das *NF 2*-Gen identifiziert. Es kodiert für ein Protein, das Zytoskelett und Plasmamembran verbindet, Merlin oder auch Schwannomin genannt. Es handelt sich hierbei um ein Tumorsuppressorgen, dessen Funktionen für Wachstum, Proliferation und Zellmobilität noch nicht vollständig geklärt sind (Gutmann, 2001). Mutationen im *NF 2*-Gen führen in der Mehrzahl zur Trunkierung des resultierenden Proteins, wobei sowohl inaktivierende Mutationen in beiden Allelen vorkommen als auch der Verlust

des zweiten Allels ("loss of heterozygosity"). In solchen Fällen ist der additive Gentransfer eines "gesunden" Gens als Therapieansatz logisches Ziel. Da in aller Regel Schwanzzellen bei dieser Erkrankung betroffen sind, und für diesen Zelltyp in der Gentherapie noch relativ wenige Daten vorliegen, wurde dieser Zelltyp als Ziel für einen Gentherapieansatz gewählt. Hierbei ist jedoch zu bedenken, wie schwer zugänglich Schwanzzellen aufgrund ihrer anatomischen Lage für jegliche direkte Applikation wie z. B. Injektionen oder ähnliches sind. Es muß also als grundsätzliches Ziel hier eine systemische Applikationsmöglichkeit angestrebt werden. Die Probleme, die bei dieser Zielsetzung hinsichtlich Spezifität und "targeting" bedacht werden müssen, sind an anderer Stelle diskutiert.

2 Material

Die verwendeten Materialien sind hinsichtlich ihrer Verwendung in Molekularbiologie und Zellkultur gegliedert. Sehr methodenspezifische Materialien sind im Methodenteil aufgeführt.

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 E. coli-Bakterienstämme

DH5 α TM	endA1 hsdR17 supE44 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 β lac U196, (ϕ 80, lacZ Δ M15)
SURE 2 TM	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' proAB lacI ^q Z Δ (M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a (Fa. Stratagene, La Jolla, USA)
JC8111	supE344, tsx-33, sbcB15, his-4, argE3, proA2, thr-1, thi-1, str-31, recC22, leu-6, recF143, ara-14, xyl-5, galK2, mtl-1, recB21, lacY1 (S. Zolothukin, Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, USA)

Diese Bakterienstämme wurden zur Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet.

2.1.2 Vektoren

pTet-Off-EGFP	S. Wosch, Neurochemisches Labor, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
pTetON-EGFP	L. Tenenbaum, Laboratory of Experimental Neurosurgery & Research Unit in Biotherapy and Oncology (I.R.I.B.H.N.), Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgien
pCR-1	C. Rosenbaum, Neurochemisches Labor, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
pPG-6	G. Lemke, Molecular Neurobiology Laboratory, The Salk Institute, 10010 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, USA

pTR-UF	S. Zolothukin, Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, USA
pBluescriptII KS+™	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
pBS+/-™	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
pTet-On™	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
pTet-Off™	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
pTRE™	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
pEGFP™	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
pHGF-S65T™	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
pHUB-1	Eigenkonstruktion
pHUB-2	Eigenkonstruktion
pHUB-3	Eigenkonstruktion
Linker	Fa. Stratagene, La Jolla, USA

2.1.3 Plasmidaufreinigung und Klonierung

Qiagen Plasmid Maxi Kit™	Fa. Qiagen, Hilden
EndoFree™ Plasmid Maxi Kit	Fa. Qiagen, Hilden
QIAEXII™ Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Fa. Roche, Mannheim
High Pure™ PCR-Product Purification Kit	Fa. Roche, Mannheim

2.1.4 Sequenzierung von Plasmiden

ABI 310 Genetic Analyzer Sequenzer	Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT
BigDye Terminator Sequenzierungsmix	Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT
DyeEx™ Spin Kit	Fa. Qiagen, Hilden
TSR-Puffer (Denaturierungspuffer)	Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT

2.1.5 Medien zur kulturellen Vermehrung von Bakterien

LB-Medium, LB-Agar, SOC-Medium und TB-Medium wurden nach Sambrook hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989).

Agar, Hefeextrakt, Trypton	Fa. Gibco BRL, Paisley, GB
----------------------------	----------------------------

2.1.6 Gelelektrophorese

DNA-Längenstandard	1 kb-DNA- Leiter, verdünnt in DNA-Ladepuffer (12216/ 11198/ 10180/ 9162/ 8144/ 7126/ 6108/ 5090/ 4072/ 3054/ 2036/ 1636/ 1018/ 516/ 507/ 396/ 344/ 298/ 220/ 201/ 154/ 134/ 75 bp) Fa. Gibco BRL, Paisley, GB
DNA-Farbmarker	0,1% Bromphenol-Blau, 0,1% Xylencyanol FF, 50% Glycerol in 1x TAE-Puffer
Agarose	Fa. Amresco, Solon, USA

Die Dokumentation der Gelelektrophorese erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Fa. Herolab) auf einen Thermodrucker (Fa. Mitsubishi).

2.1.7 Puffer

TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
Tris	Fa. MERCK, Darmstadt

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kulturmedien

Medium zur Kryokonservierung:

- 70% (v/v) DMEM
- 20% (v/v) FCS
- 10% (v/v) DMSO

Kulturmedium für HeLa-Zellen:

- DMEM
- 10% (v/v) FCS
- 50 U/ml Penicillin
- 50 U/ml Streptomycin
- 2 mM L-Glutamin

Kulturmedium für Rattenschwanzzellen:

- DMEM
- 10% (v/v) FCS
- 50 U/ml Penicillin
- 50 U/ml Streptomycin
- 2 mM L-Glutamin
- 2 μ M Forskolin

2.2.2 Sonstige Materialien für die Zellkultur

250 ml (75 cm ²) Zellkulturflaschen	Fa. Greiner, Solingen
6-well-Zellkulturplatten	Fa. Greiner, Solingen
DMEM	Fa. Gibco BRL, Paisley, GB
L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin	Fa. Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Fa. Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. PAA, Linz, Österreich
Tet-System-Approved FCS	Fa. Clontech, Palo Alto, USA
Poly-L-Lysin, Doxycyclin, Forskolin, HEPES	Fa. Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's PBS	Fa. PAA, Linz, Österreich
DMSO	Fa. MERCK, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Fa. Gibco BRL, Paisley, GB
Kaninchen-Komplement-Serum	Fa. Cedarlane, Hornby, CAN

2.2.3 Transfektionsreagenzien

FuGENE™ 6

Fa. Roche, Mannheim

DOSPER™

Fa. Roche, Mannheim

2.3 Sonstige Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Sorvall™ RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge
mit den Rotoren SS-34 und GSA

Fa. Du Pont, Del, USA

EBA 12R (gekühlte Tischzentrifuge)

Fa. Hettich, Tuttlingen

UV-Spektrometer: DU™ 650 Spectrophotometer

Fa. Beckmann, Fullerton,
USA

Mikroskop: Nikon Eclipse TE 200

Nikon,

Roti®-Phenol (zur Extraktion von DNA und RNA)

Fa. Carl Roth, Karlsruhe

PCR-Amplifikationen wurden im Thermocycler C480 durchgeführt (Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT). Die automatische Sequenzierung erfolgte in einem ABI 310 Genetic Analyzer Sequenzer der Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT. Alle Enzyme und Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Sigma/Deisenhofen, MERCK/Darmstadt und Roche/Mannheim bezogen.

Ultrareines Wasser wurde einem Milli-Q™ - Gerät (Fa. Millipore, Eschborn) entnommen.

Glaswaren für die Zellkultur wurden für 2 Stunden bei 180°C sterilisiert, Kunststoffgefäße und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden (allgemeiner Teil)

3.1.1 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden, die keine AAV-Sequenzen trugen, wurde der E. coli-Stamm DH5 α verwendet. Zur Vermehrung von Plasmiden mit AAV-ITR-Sequenzen wurde der E. coli-Stamm JC8111 verwendet, um die Integrität dieser palindromischen Repeat-Sequenzen bei den Vermehrungsprozessen zu gewährleisten (Boissy und Astell, 1985; McLaughlin *et al.*, 1988). Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 im Bakterienschüttler kultiviert, dann durch 3 minütige Zentrifugation bei 2500 x g pelletiert, in 100 μ l eiskaltem 150mM CaCl₂ resuspendiert und auf Eis 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde mit der jeweiligen DNA- Suspension (max. 200 ng DNA) versetzt und auf Eis 30 min inkubiert. Es folgte eine Kälteschockbehandlung für 1 min in flüssigem Stickstoff. Nach anschließendem Erwärmen auf 37°C wurde der Transformationsansatz mit 900 μ l SOC-Medium aufgefüllt, für 1 h bei 37°C auf dem Bakterienschüttler inkubiert und anschließend ausplattiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar-Platten bzw. in LB- oder TB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin.

3.1.2 Sequenzierung von DNA

3.1.2.1 Oligodesoxynukleotide

pTetOnOff F1	5'- CAT TGC ATA CGT TGT ATC CAT ATC -3'
pTetOnOff F2	5'- CAT ACG TTG TAT CCA TAT CAT AAT -3'
pTetOnOff R1	5'- ATA TGG ATA CAA CGT ATG CAA -3'
pTetOnOff R2	5'- GTC AAC ATG GTG GTA ATG TTG GAC -3'
pTetOnOff F3	5'- GTC ATC GCT ATT ACC ATG GTG A -3'
pTetOnOff R4	5'- AGG CCT ATA TAA GCA GAG CTC G -3'
pP0OnOff F1	5'- CTC TAT CAC TGA TAG GGA GTG GT -3'
pP0onOff R5	5'- TTA TCT AAT CTA GAC ATA TGA -3'

3.1.2.2 Unidirektionale PCR-Amplifikation (Sequenzreaktion, modifiziert nach (Sanger *et al.*, 1977))

Eingesetzt wurden in dieser Reaktion hochaufgereinigtes Plasmid und jeweils vektorspezifische Primer nach folgendem Schema (aus: Fa. Perkin-Elmer-Cetus, Handbuch ABI 310):

Plasmid (0.5-1 µg)	x µl
BigDye Terminator Sequenzierungsmix	8 µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die Sequenzreaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:

1.	94°C für 1 min (initiale Denaturierung)
2.	94°C für 30 sec, 55°C für 15 sec, 60°C für 4 min , 25 Zyklen (Reaktionsschritt)
3.	4°C für unbegrenzte Zeit

Nach Beendigung der Reaktion wurde das gesamte Volumen über DyeEx™ Spin-Säulen nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt, um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Nukleotide zu entfernen.

3.1.2.3 Automatische Sequenzierung (modifiziert nach (Sanger *et al.*, 1977))

Zur Auftrennung der durch die Didesoxymethode nach Sanger erhaltenen Polymerisationsprodukte wurden 8 µl Aliquots des DyeEx™ Spin -Eluates mit 12 µl TSR-Puffer (Denaturierungspuffer) versetzt und für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die so vorbereiteten Proben werden im ABI 310 Genetic Analyzer Sequenzer mittels Kapillarelektrophorese vollautomatisch aufgetrennt und das Resultat als Elektropherogramm ausgegeben. Die aus diesen Elektropherogrammen abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der Software Sequencher™ (Fa. Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) und VectorNTI®-Suite (Fa. InforMax Inc., Bethesda, MD, USA) ausgewertet.

3.1.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle weiteren, nicht aufgeführten Methoden wie z. B. Plasmidpräparationen, Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung, Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA sowie DNA-Polymerase-Reaktionen und Restriktionsanalysen wurden nach Sambrook durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA-Präparationen wurden photometrisch quantifiziert und deren Reinheit durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kontrolliert. Reine Nukleinsäurepräparationen ergeben einen Wert von 1,8 bis 2,0, während Proteine durch ihr Extinktionsmaximum bei 280 nm den Quotienten erniedrigen. Phenolverunreinigungen sind durch ein zweites Extinktionsmaximum bei 270 nm zu erkennen. Alle Plasmidpräparationen für Transfektionsexperimente wurden mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit™ bzw. EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (beides Fa. Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten und DNA-Linkern wurde der Rapid DNA Ligation Kit mit entsprechenden Reaktionspuffern (Fa. Roche, Mannheim) benutzt. Partiale Verdauungen mit Restriktionsendonukleasen wurden durchgeführt, indem der jeweilige Reaktionsansatz für verschiedene Zeiten bei 37° C inkubiert wurde und die Reaktion dann sofort in flüssigem Stickstoff gestoppt wurde. Die DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAEXII™ Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aus den Agarosegelen extrahiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden (spezieller Teil)

3.2.1 Klonierung von Einkassettenvektoren

Als Ausgangsvektoren dienten die Vektoren pTet-On™, pTet-Off™, pTRE™ und pEGFP™ sowie die Vektoren pPG-6 und pTR-UF (Zolotukhin *et al.*, 1996). Im folgenden werden die Klonierungsschritte lediglich mit den Teilen der Ausgangsvektoren dargestellt, die für den Klonierungsweg von Bedeutung sind. Die vollständigen Plasmidkarten mitsamt Sequenzen und Restriktionskarten sind in Kapitel 7 zusammengestellt.

3.2.1.1 Die Bausteine

Alle verwendeten Einkassettenvektoren bestehen im wesentlichen aus drei Hauptkomponenten, die hier kurz vorgestellt werden:

- 1.) Aus pTR-UF wurde durch Verdau mit BglIII ein Fragment gewonnen, das sowohl die für die Ampicillin-Resistenz und die bakterielle Replikation entscheidenden Sequenzen des Plasmides pBS⁺™ (hier als pBS-backbone bezeichnet) als auch die ITR-Sequenzen des AAV enthielt.



Abbildung 5: pBS-backbone mit AAV-inverted terminal repeats (3,2 kb)

- 2.) Aus pTet-On™ und pTet-Off™ wurde durch Partialverdau ein XhoI/HindIII-Fragment gewonnen, dessen HindIII-Ende mit einem BglIII-Linker in eine BglIII-Schnittstelle konvertiert wurde.



Abbildung 6: Transaktivatorkassette Tet-On/Off (2,3 kb)

- 3.) Der dritte wichtige Baustein ist die Reportereinheit, deren Expression unter der Kontrolle des tetracyclinabhängigen Minimalpromotors *P_{TRE}* steht. Als Reportergen wurde das Chromophor EGFP verwendet (Cormack *et al.*, 1996). Es handelt sich hierbei um eine für Säugerzellen optimierte Variante des Green Fluorescent Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* (Chalfie *et al.*, 1994).



Abbildung 7: Reporterkassette *P_{TRE}-EGFP* (2,05 kb)

3.2.1.2 Vorläufervektoren

1.) Aus pTR-UF wurde durch Partialverdau das GFP kodierende BglII/XhoI-Fragment exzidiert. Anschließend wurden die modifizierten (s.o.) Transaktivatorkassetten über XhoI und BglII einligiert. Diese Konstrukte erhielten die Bezeichnung pATet-On und pATet-Off (Wosch, 2001).

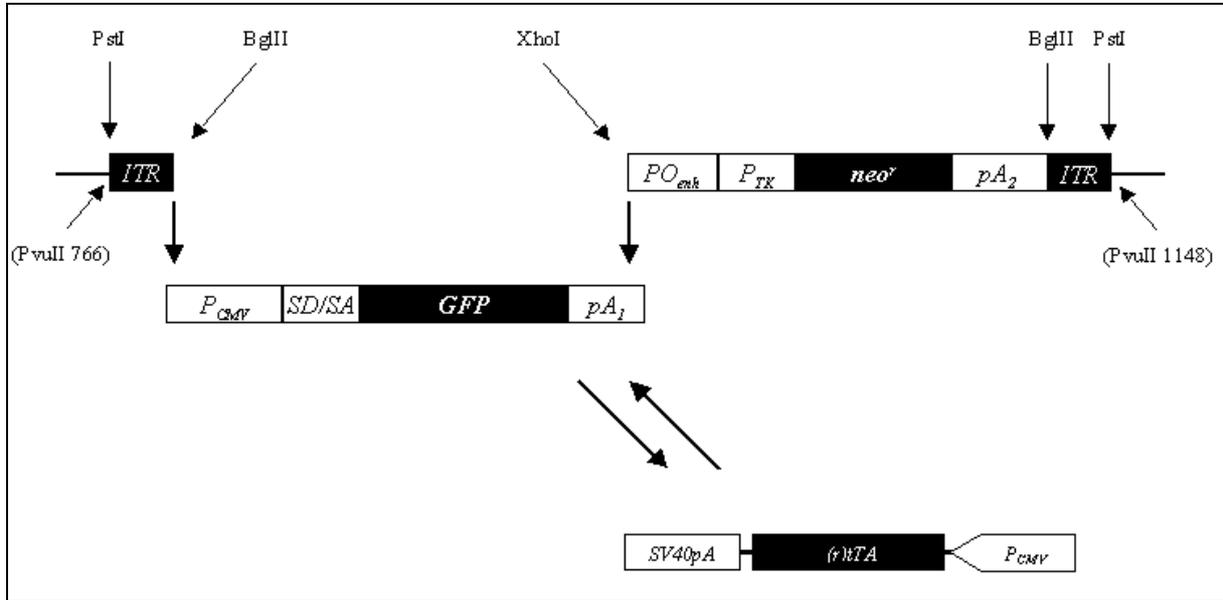


Abbildung 8: Klonierungsschema für pATet-On und pATet-Off (6,7 kb)

2.) Aus pTRETM und phGFP-S65TTM wurde über verschiedene Zwischenprodukte von Frau Dr. S. Wosch das Response-Plasmid pArEGFP kloniert, bei dem die Expression des EGFP unter der Kontrolle des tetracyclinresponsiblen Promotors steht (Wosch, 2001).

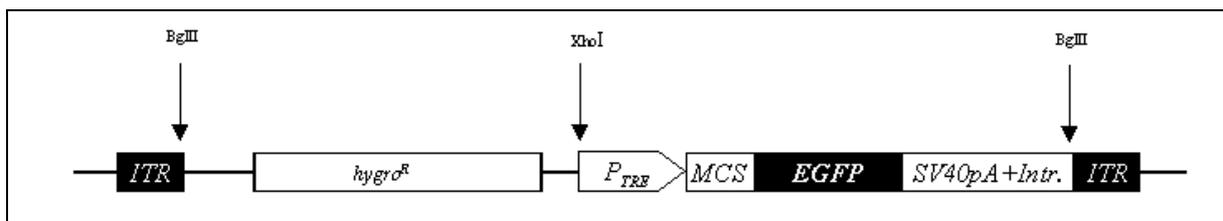


Abbildung 9: pArEGFP Regulationsplasmid, dargestellt ohne 3,0 kb pBS-backbone

3.) Sodann wurde in diese Kasette die Transaktivatoreinheit des Tet-Off-Vektors über Partialverdau mit BglII und XhoI einkloniert, so daß sich nun Transaktivator- und regulierte Einheit auf einem Plasmid befinden. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pTet-Off-EGFP und wurde ebenfalls von Frau Dr.S. Wosch hergestellt.

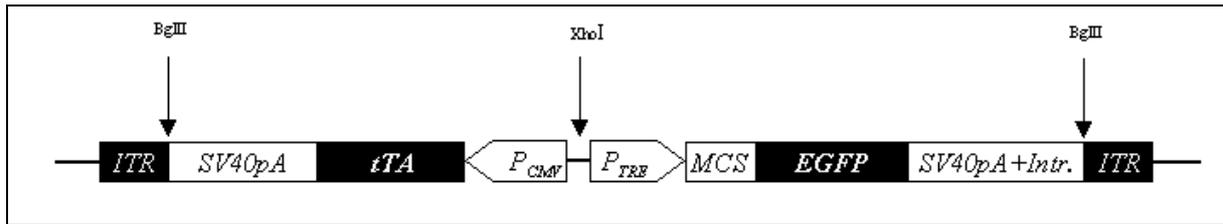


Abbildung 10: Einkassettenvektor pTet-Off-EGFP (4,3 kb), dargestellt ohne 3,0 kb pBS-backbone

3.2.1.3 Das Kontrollplasmid

Aus pTR-UF wurde zunächst durch Partialverdau ein BglIII/XhoI-Fragment exzidiert. Im nächsten Schritt wurde in pHGFP-S65T™ das HindIII-NotI-Fragment des *hGFP* durch *EGFP* aus pEGFP™ ersetzt, dem eine MCS vorgeschaltet ist. Anschließend erfolgte eine MluI/BamHI-Digestion, und dieses Fragment wurde nach entsprechender Linkersubstitution in pTR-UF über BglIII/XhoI einligiert. Dieser Vektor wurde pCR-1 genannt und von Frau Dr. C. Rosenbaum hergestellt. Er wurde verwendet, um die Transfektionsbedingungen zu optimieren (siehe Kapitel 3.4.3) und diente als Kontrolle bei den Transfektionsexperimenten mit Einkassettenvektoren.

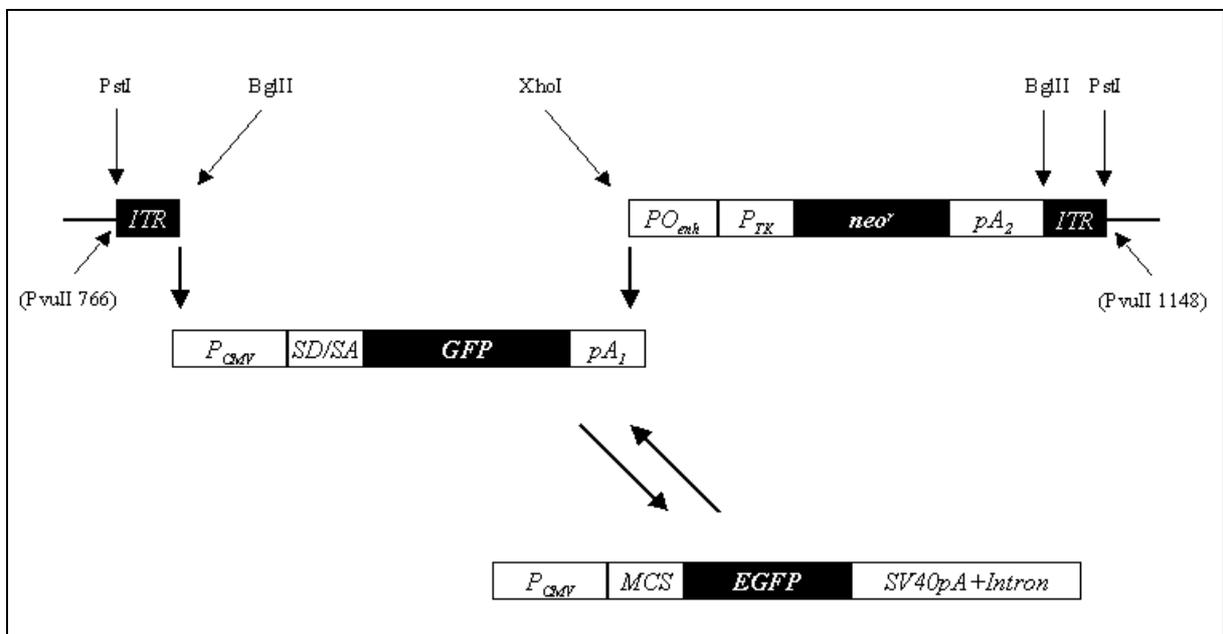


Abbildung 11: Klonierungsschema für pCR-1 (3,4 kb), siehe hierzu auch Kapitel 3.4.3

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Vorbereitung der Kulturgefäße

Alle Gefäße zur Kultivierung von Rattenschwanzzellen wurden vor Benutzung mit Poly-L-Lysin beschichtet, um den adhärent wachsenden Primärkulturen die Anhaftung an die Gefäßwände zu ermöglichen. Dazu verblieben 10 ml Poly-L-Lysin-Lösung (0,1mg/ml in PBS) für 15 min in den Kulturgefäßen, anschließend folgten drei Waschschrte mit PBS, bevor die Gefäße mit entsprechenden Volumina Kulturmedium gefüllt und 10 min vor Zugabe der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ vorgewärmt wurden. Dabei erhielten 6-well-Kulturgefäße pro well 2 ml und 75 cm²-Flaschen 7 ml Kulturmedium. Das Kulturmedium (siehe 1.1.7) wurde jeden dritten Tag erneuert.

HeLa-Zellen wurden auf nicht vorbeschichteten Kulturgefäßen in dem in Abschnitt 1.1.7 erwähnten Kulturmedium kultiviert, das ebenfalls jeden dritten Tag erneuert wurde.

3.3.2 Passagieren von Zellen

Sowohl bei HeLa-Zellen als auch bei Rattenschwanzzellen erfolgte die Zellpassage mit Trypsin/EDTA-Lösung. Zunächst wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, dann mit 5 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung pro 75 cm²-Flasche unter regelmäßigem Schütteln bei 37°C abgelöst. Zu dem Ansatz wurden 5 ml DMEM/10% FCS gegeben und die Zellen bei 1500 U/min für 5 min bei 280 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml DMEM/10% FCS resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde nun 1:2 (RSZ) bzw. 1:3 (HeLa) verdünnt auf Kulturgefäße mit angewärmten Medium gegeben, die für Rattenschwanzzellen vorbeschichtet waren.

3.3.3 Schwanzzellkulturen (Brookes *et al.*, 1979; Brookes und Raff, 1979)

Schwanzzellen wurden aus dem Ischiasnerv neugeborener (1-3 Tage alter) Ratten isoliert. Nach dem Töten der Tiere wurden die Ischiasnerven unter sterilen Bedingungen entnommen, in DMEM gesammelt und in 1-2 mm lange Stücke zerkleinert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 280 x g wurde das Medium abgenommen und die Nerven in 5 ml DMEM, 0,6 ml Trypsin (2,5%), 0,6 ml Kollagenase 1A (0,6%) bei 37°C für mindestens eine halbe Stunde inkubiert. Das abgenommene Medium wurde bei 37°C aufbewahrt und anschließend zusammen mit den Nerven mit 1 Volumen DMEM/10% FCS vermischt und bei 1500 U/min für 5 min bei 280 x g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 5 ml 10% FCS/DMEM Medium resuspendiert und die Nervenstücke durch langsames Aufziehen mit einer 5 ml-Multipipette und nachfolgend mit einer 10 ml-

Spritze durch 0,9 mm- und 0,6 mm-Stahlkanülen trituiert. Das so gewonnene Zellhomogenat wurde abschließend noch durch ein 60 µm Nylonnetz filtriert und in eine 25 cm²-Kulturflasche ausgesät.

Es folgte eine Inkubation der vereinzelter Zellen in 10% FCS/DMEM mit 10 µM Cytosinarabinosid (AraC) für 5 Tage bei 37°C. AraC wird als Cytosin-Analogon in die DNA sich replizierender Zellen eingebaut und führt so zum Absterben aller Zellen, die sich nicht in der Ruhephase des Zellzyklus (G₀-Phase) befinden. Nach 5 Tagen wurden die Zellen abgelöst, und es wurde eine Komplementlyse (s.u.) durchgeführt, um den Anteil an verbliebenen Fibroblasten zu minimieren. Nach der Komplementlyse wurden die Zellen auf eine mit Poly-L-Lysin vorbeschichtete Kulturflasche (75cm²) in SZ-Proliferationsmedium (10% FCS/DMEM, 2µM Forskolin, 100 µg/ml GGF) ausgesät und zur Konfluenz geführt. Nach einer abschließenden zweiten Komplementlyse wurden die Zellen in SZ-Proliferationsmedium auf eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Kulturflasche (75 cm²) ausgesät. Zur Vermehrung der Schwanzzellen wurde dem Kulturmedium 2µM Forskolin als Aktivator der Adenylatcyclase zugesetzt.

Zur Überprüfung der Qualität der SZ-Kulturen wurde nach 72 h eine Immunfärbung an den Schwanzzellen in einer kleinen Petrischale mit anti-Thy1.1 zur Markierung der Fibroblasten und anti-S100 zur Markierung der Schwanzzellen durchgeführt.

3.3.4 Komplementlyse (Brockes *et al.*, 1979; Brockes und Raff, 1979)

Beim Anlegen von Schwanzzellkulturen gelangen auch immer kontaminierende endoneurale Fibroblasten mit in Kultur. Reine Schwanzzellkulturen erhält man durch die Eliminierung der endoneuralen Fibroblasten mittels einer Komplementlyse.

Bei dieser Technik wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 75 cm²-Flasche bei 37°C schnell abgelöst. Zu dem Ansatz wurden 5 ml DMEM/10% FCS gegeben und die Zellen mit 280 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 0,8 ml DMEM/10% FCS resuspendiert, und die Zellen wurden mit einem spezifischen Fibroblasten-Antikörper (Thy1.1) (1:10 verdünnter Kulturüberstand) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Kaninchen-Komplement-Serum zur Zellsuspension hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Bindung des Komplements an den spezifischen Fibroblasten-Antikörper führt zur Lyse der Fibroblasten. Nach Zugabe von 8 ml DMEM/10% FCS wurde der Ansatz bei 280 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in SZ-Proliferationsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden 1:2 verdünnt in vorbeschichtete Kulturflaschen ausgesät.

3.3.5 Kryokonservierung

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Gefäßen und Medien. Hierbei wurde das Kulturmedium der Zellen bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und die Zellkulturflasche dann zum Ablösen der Zellen wiederholt fest auf einen Tisch geklopft. Die Kulturflaschen wurden mehrfach mit je 10 ml DMEM gespült, dann die so abgelösten Zellen in 50 ml-Röhrchen überführt, bei 1500 U/min für 5 min bei 280 x g pelletiert und schließlich in 1 ml DMEM mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig resuspendiert. Dann wurden die Zellen in o.g. Einfriermedium aufgenommen und zunächst für 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.3.6 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte durch vorsichtiges Erwärmen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen und sofortigem Überführen in 50 ml auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium, um Schäden durch das in der zum Einfrieren benutzten Lösung verwendeten zytotoxische DMSO zu vermeiden. Nach Zentrifugation und Vereinzelnung des Zellpellets wurden die Zellen in eine mit vorgewärmten Medium versetzte 75 cm²-Gewebekulturflasche gegeben.

3.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

3.4.1 Grundsätzliches

Schwanzzellen und HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des liposomalen Transfektionsreagenz DOSPER™ und des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 transient transfiziert.

Das Transfektionsreagenz DOSPER™ ist eine Liposomenpräparation des polykationischen Lipids[1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid].

Aufgrund der positiv-geladenen Spermin-Kopfgruppen bindet DOSPER™ negativ geladene DNA-Moleküle. Diese Bindung resultiert in der Bildung eines polykationischen Komplexes, der unspezifisch an die mit negativen Ladungen überzogene Oberfläche der zu transfizierenden Zellen adsorbiert wird. Diese Komplexe fusionieren mit der Zellmembran und transportieren auf diese Weise die DNA in das Zytoplasma.

Das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 ist eine Mischung von Lipiden und anderen Verbindungen in 80% Ethanol.

3.4.2 Vorbereitung der Zellen

20-24 h vor der Transfektion wurden 3×10^5 Schwann- bzw. HeLa- Zellen pro well auf 6-well-Platten ausgesät und bis zur Transfektion in Proliferationsmedium bei 37°C kultiviert. Damit wurde erreicht, daß die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50-80% besaßen.

3.4.3 Transfektionsbedingungen

Um zum einen das optimale Transfektionsreagenz und zum anderen die optimalen Transfektionsbedingungen für Schwann- und HeLa-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen zunächst mit dem oben schon erwähnten Konstrukt pCR-1 unter verschiedenen Bedingungen transfiziert:

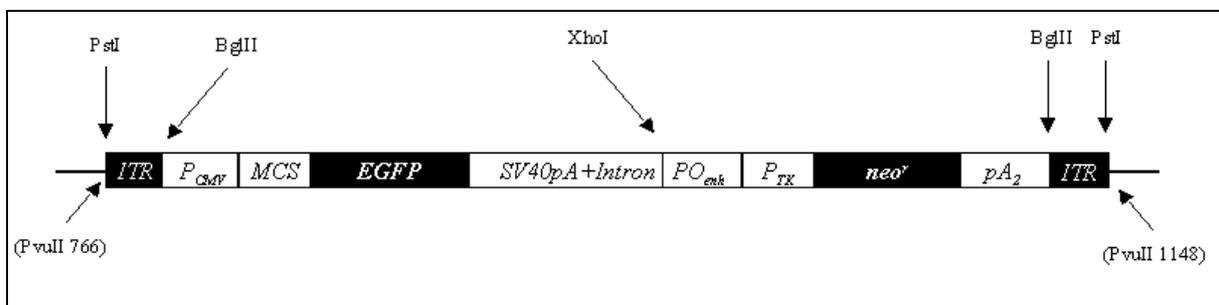


Abbildung 12: 3,4 kb pCR-1-Kassette, dargestellt ohne 3,0 kb pBS-backbone

Dieses Konstrukt wurde gewählt, da es

- 1.) fast die gleiche Größe wie die Zielkonstrukte aufweist
- 2.) die gleichen AAV-Sequenzen wie die Zielkonstrukte enthält und
- 3.) mit der gleichen Detektionsmethode (FACS) nachgewiesen werden kann.

Die Transfektionsparameter wurden wie folgt variiert:

Schwann- und HeLa- Zellen wurden jeweils

- a.) sowohl mit DOSPER als auch mit FuGENE transfiziert,
- b.) mittels FACS (s. u.) nach 48 h analysiert,
- c.) die Transfektionen wurden in Anwesenheit und in Abwesenheit von 10%FCS im Medium durchgeführt,
- d.) es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von DNA zu DOSPER bzw. FuGENE verwendet.

Bei der Transfektion mit Einkassettenvektoren wurden die so ermittelten optimalen Bedingungen gewählt und dann zum einen verschiedene Doxycyclinkonzentrationen im

Medium der transfizierten Zellen ausgetestet, zum anderen die Zellen verschieden lange in doxycyclinhaltigem Medium kultiviert bevor die Analyse mittels FACS erfolgte. Die Ergebnisse dieser Optimierung werden im Kapitel Ergebnisse vorgestellt. An dieser Stelle werden nun die optimalen Transfektionsbedingungen für einen Transfektionsansatz beschrieben. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE verwendet. Zur Transfektion von HeLa- und Schwanzzellen wurden 3 µl FuGENE in serumfreiem Kulturmedium zu einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 1 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde von den zur Transfektion vorgesehenen Kulturzellen abgenommen, sie wurden dreimal mit PBS gespült und mit 2 ml Kulturmedium überschichtet. Dann wurde die FuGENE/DNA-Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Transfektionsansatz für 24 h bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ inkubiert. Das FuGENE/DNA/Medium-Gemisch wurde nach 24 h abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt, das je nach Kulturbedingung 1 µg/ml Doxycyclin enthielt (siehe Ergebnisteil). Die Zellen wurden für weitere 48-96 h bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ inkubiert. Bei der Transfektion von Rattenschwanzzellen wurden stets Zellen der 8.-10. Passage verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.5 FACS – Analyse

3.5.1 Grundsätzliches

Transfizierte HeLa- und Schwann- Zellen wurden mit Hilfe eines FacScan™ und eines FacStar™ der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert. Beim Fluorescence Activated Cell Scan/Sort (FACS) werden Zellen in eine laminare Strömung versetzt, durch eine Düse mit 70 µm Durchmesser gespült, und dieser Strahl wird dann durch ein piezoelektrisches Element computergesteuert unterbrochen. Auf diese Weise werden die Zellen in exakt definierte und immer gleich große Tropfen aufgeteilt. Anschließend findet eine Einzelzellanalyse mit Hilfe eines Argon-Lasers statt. Es können Fluoreszenzen auf verschiedenen Wellenlängen, Vorwärtsstreulicht als Maß für die Zellgröße und Seitwärtsstreulicht als Maß für Zellgranularität bzw. -beschaffenheit gemessen werden. Das FACS stellt ein hochempfindliches Meßgerät dar, mit dem auch geringe Fluoreszenzunterschiede zuverlässig erfaßt werden können. In dieser Arbeit wurden neben der Anzahl grün fluoreszierender Zellen auch graduelle Unterschiede der EGFP-Expression, d. h.

unterschiedliche Leuchtstärken der grünen Fluoreszenz beurteilt. Bei der Analyse mit dem FacStar™ ist außer der Analyse auch das Sortieren der Zellen nach zwei Parametern möglich. Die laminar strömenden Tropfen werden durch einen nachgeschalteten Kondensator abgelenkt und so in die jeweiligen Gefäße sortiert. Dieser Vorgang muß in einem offenen System stattfinden und birgt deshalb eine erhebliche Kontaminationsgefahr für die sortierten Zellen.

3.5.2 Analyse der Zellen

Transfizierte HeLa- und Schwann- Zellen wurden nach Transfektion zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro well einer 6-well-Platte bei 37°C schnell abgelöst. Dann wurden 5 ml DMEM/10% FCS zugegeben und die Zellen mit 280 x g pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 5 ml 4°C kaltem PBS gewaschen, dann in 200 µl ebenfalls gekühltem PBS/NaN₃ (0,1mg/ml) resuspendiert und sofort analysiert. NaN₃ als reversibler Inhibitor der Atmungskette führt zu einer vorübergehenden Abrundung der zu analysierenden Zellen und somit zu besseren Flußeigenschaften im Durchflußzytometer. Bei der Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden die Zellen lediglich gescannt. In den weiteren Versuchen wurden die Zellen im FACStar sortiert, wobei EGFP-positive Zellen aussortiert und negative Zellen verworfen wurden.

3.5.3 Weiterkultivierung der Zellen

Die so sortierten Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem Proliferationsmedium aufgefangen und auf 12-well Platten ausgesät. Da bei der Sortierung mittels FACS eine erhebliche Kontaminationsgefahr besteht, erfolgte für eine Woche eine Kultivierung in Proliferationsmedium mit 100µg/ml Kanamycin als drittem Antibiotikum und danach erst die Weiterkultivierung in regulärem Proliferationsmedium. Diese sortierte Kultur wurde geteilt und eine Hälfte unter 1µg/ml Doxycyclin, die andere Hälfte ohne Doxycyclin gehalten. Durch nochmalige FACS-Analyse wurde so die Regulierbarkeit der Vektorkonstrukte unter Ausschluß der Transfektionseffizienz beurteilt.

3.6 Software

Zur Analyse, Auswertung und graphischen Darstellung der FACS-Daten wurden die Programme CellQuest™ der Fa. Becton Dickinson (CellQuest™, Version 3.3, 2001) und WinMDI™ des Scripps Research Institute, La Jolla, USA, verwendet (WinMDI™, Version 2.8, 1999).

Plasmidkarten wurden mit Redasoft Plasmid™ (Plasmid™, Version 1.1, 2000) der Fa. Redasoft und VectorNTI™-Suite der Fa. Informax (Vector NTI Suite, Version 5.0, 1999) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Einkassettenvektoren

Den hier neu konstruierten Einkassettenvektoren liegen die Grundkomponenten und Vorläuferplasmide zugrunde, die im Methodenteil vorgestellt wurden. Alle Eigenprodukte wurden durch automatische Sequenzierung mit den oben aufgeführten Oligonukleotidprimern überprüft (siehe Kapitel 3.1.2). Die Integrität der inverted terminal repeat-Sequenzen (ITR) wurde durch doppelten Restriktionsverdau mit den Enzymen BglII/PstI und anschließende Gelelektrophorese in einem 3%igen Agarosegel verifiziert. Hierbei ist bei intakten ITRs eine 160 bp-Bande als kürzestes Fragment zu finden, während bei Mutationen zusätzlich kürzere Fragmente auftreten.

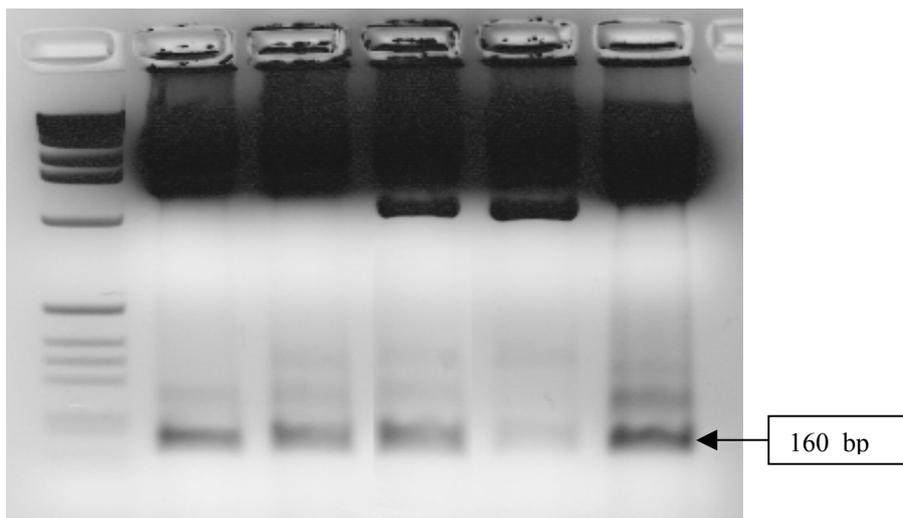


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese zur Verifizierung der AAV-ITRs.

4.1.1 Klonierung der nicht gewebespezifischen Konstrukte

Aus pTet-Off-EGFP wurde über XhoI/BglIII-Partialverdau die Tet-Off-Transaktivatoreinheit entfernt und die Tet-On-Transaktivatoreinheit aus pTet-On™ über XhoI/BglIII einligiert. Dieses Konstrukt erhielt die Bezeichnung pHUB-1.

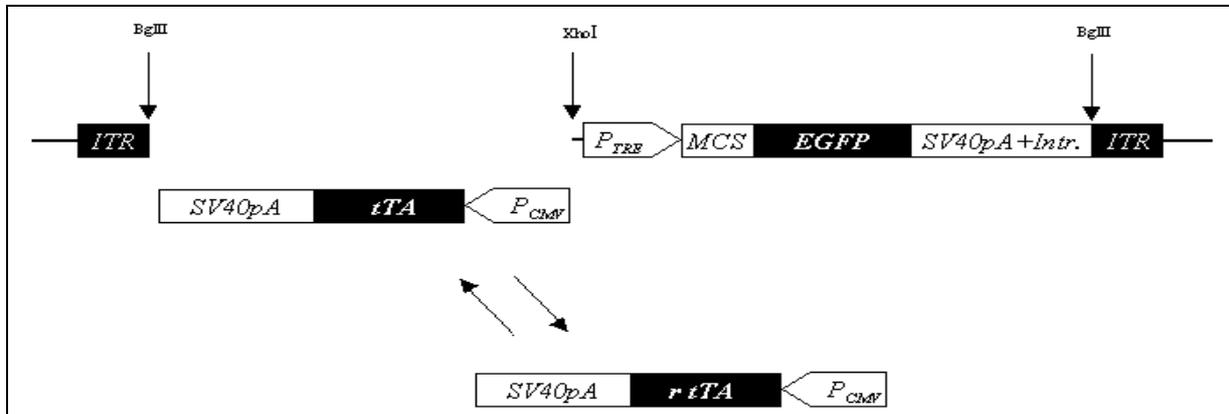


Abbildung 14: Klonierungsschema für pHUB-1, dargestellt ohne 3,0 kb pBS-backbone

4.1.2 Klonierung der gewebespezifischen Konstrukte

Zur Herstellung der Konstrukte mit konstitutivem gewebespezifischem P₀-Promotor wurde der CMV-Promotor in den beschriebenen Einkassettenvektoren durch den P₀-Promotor ersetzt. Aus pPG-6 wurde durch Digestion mit XhoI und EcoRI ein 1,1 kb-Fragment gewonnen, das den Promotor des Myelinproteins P₀ der Ratte codiert. Dann folgte mit pHUB-1 und pTet-Off-EGFP ein Partialverdau mit den gleichen Restriktionsenzymen, um den CMV-Promotor aus diesen Konstrukten zu entfernen. Das so entstandene 6,6 kb-Fragment wurde auf einem 0,5% Agarosegel bei 50V und 22 h Laufzeit isoliert und an dieser Stelle das 1,1 kb-Fragment einligiert. Diese Klonierungsstrategie wurde für das Tet-On- und Tet-Off-System gleichermaßen angewandt. Die neuen Konstrukte wurden pHUB-2 und pHUB-3 genannt.

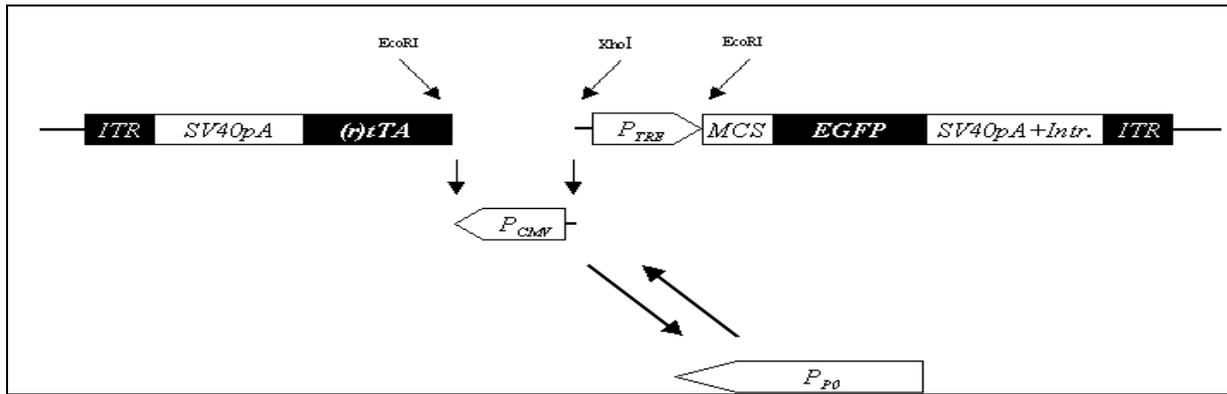


Abbildung 15: Klonierungsschema für Konstrukte mit P₀-Promotor, dargestellt ohne 3,0 kb pBS-backbone

Es wurden in dieser Arbeit insgesamt fünf verschiedene Einkassettenvektoren verwendet, von diesen wurden pHUB-1, pHUB-2 und pHUB-3 selbst hergestellt. Alle fünf Vektoren werden zur Übersicht in den folgenden Abschnitten nochmals kurz zusammengefasst.

4.1.3 Einkassettenvektoren ohne schwanzzellspezifischen Promotor

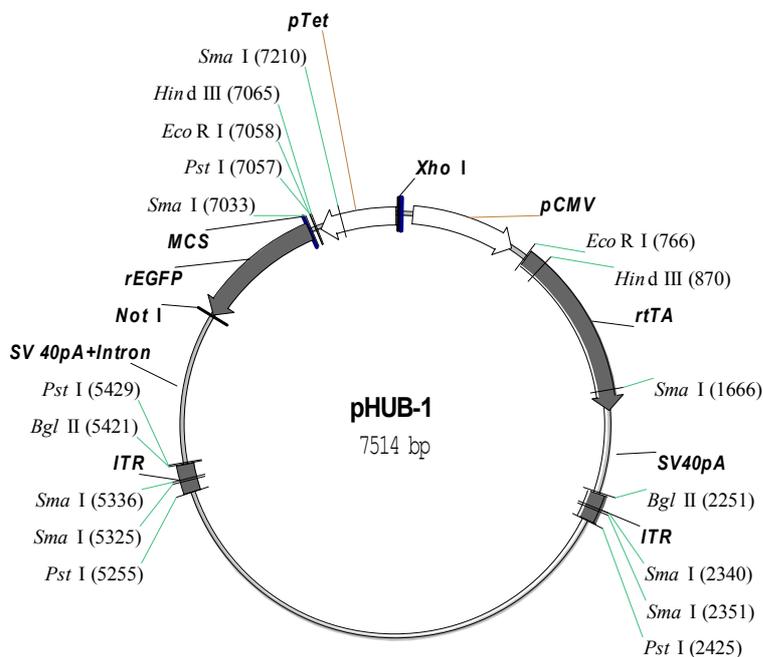


Abbildung 16: Einkassettenvektor pHUB-1. Die Expression von EGFP wird durch Doxycyclin aktiviert.

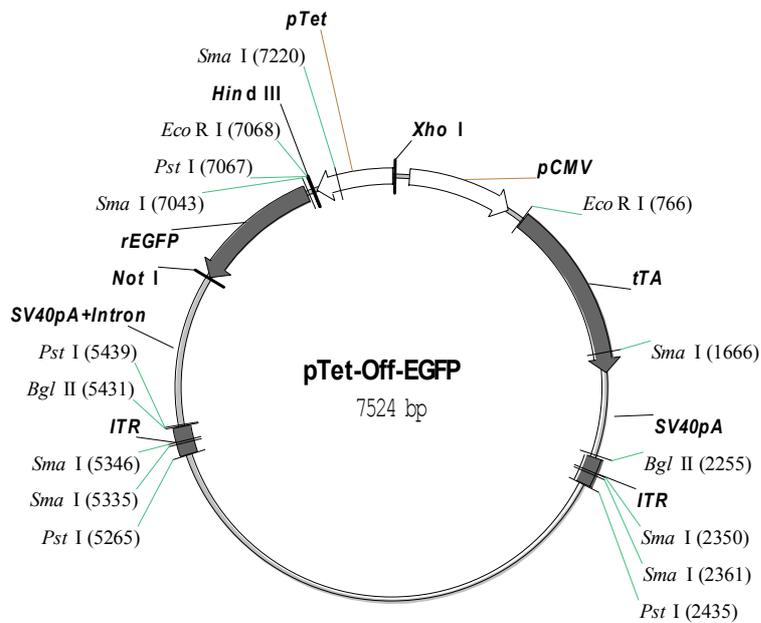


Abbildung 17: Einkassettenvektor pTet-Off-EGFP (S.Wosch). Die Expression von EGFP wird durch Doxycyclin **deaktiviert**.

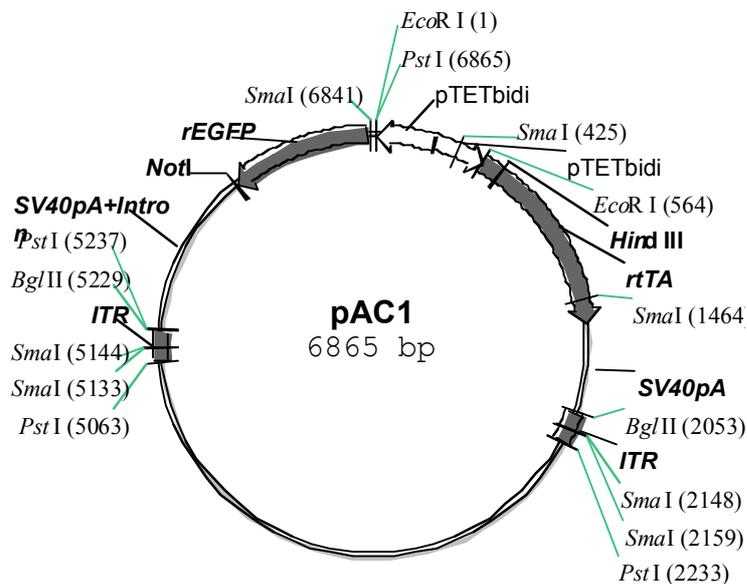


Abbildung 18: Einkassettenvektor pAC1 (L.Tenenbaum). Die Expression von tetracyclinabhängigem Transaktivator und die Expression von EGFP stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen tetracyclinabhängigen Promotors. Die Expression wird durch Doxycyclin **aktiviert**.

4.1.4 Einkassettenvektoren mit schwanzzellspezifischem Promotor

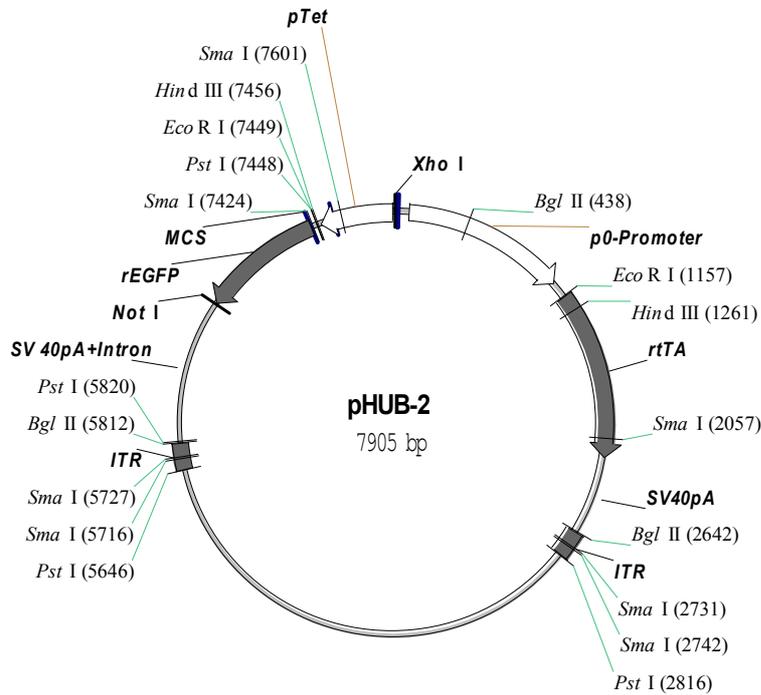


Abbildung 19: Einkassettenvektor pHUB-2. Der tetracyclinabhängige Transaktivator wird unter der Kontrolle des schwanzzellspezifischen P₀-Promotors exprimiert. Die Expression von EGFP wird durch Doxycyclin **aktiviert**.

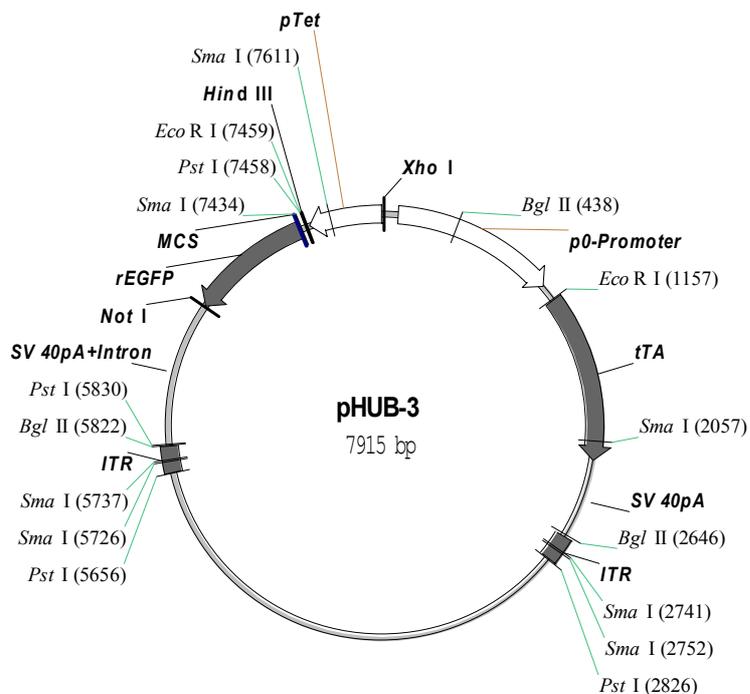


Abbildung 20: Einkassettenvektor pHUB-3. Der tetracyclinabhängige Transaktivator wird unter der Kontrolle des schwanzzellspezifischen P₀-Promotors exprimiert. Die Expression von EGFP wird durch Doxycyclin **deaktiviert**.

4.2 Transfektion und FACS

Bei der Analyse der transfizierten Zellen wurden zunächst Größe und Granularität der Zellen bewertet. Dies ist notwendig, um zwischen lebenden Zellen einerseits und Verunreinigungen, Zelltrümmern und toten Zellen andererseits zu differenzieren (Abb. 21). Des Weiteren kann so die Morphologie der Zellen indirekt beurteilt werden.

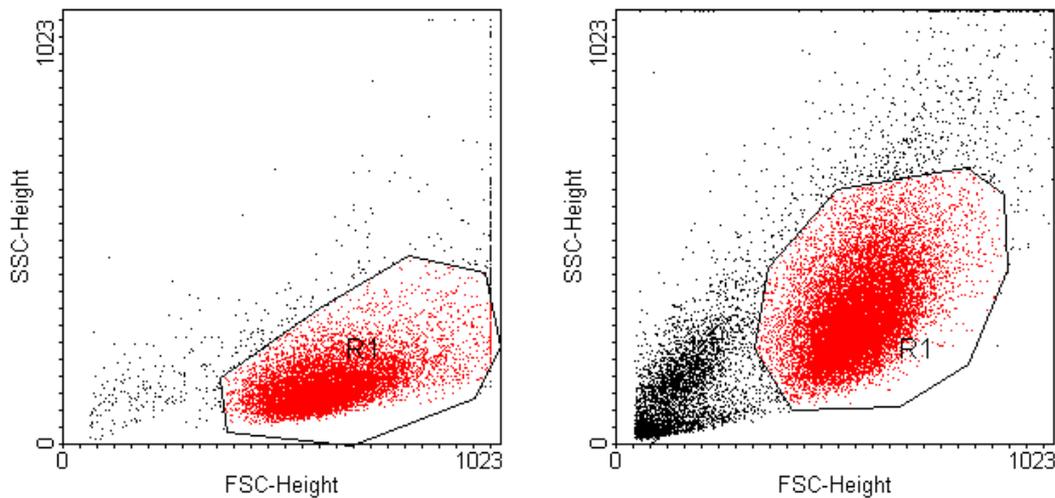


Abbildung 21: HeLa-Zellen (links) und Rattenschwanzzellen (rechts) mit ihrer Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung im Analyselaser. Alle in R1 befindlichen Zellen wurden bei der Analyse einbezogen.

4.2.1 Effekte von DOSPER und FuGENE

Um die Transfektionsbedingungen für Rattenschwanzzellen zu optimieren, wurden beide Transfektionsreagenzien an HeLa- und Rattenschwanzzellen getestet. Dazu wurde das in den Kapiteln „Material“ und „Methoden“ vorgestellte Konstrukt pCR-1 verwendet. Es konnten bei beiden Zelltypen keine signifikanten Unterschiede in der Transfektionseffizienz mit DOSPER und der mit FuGENE festgestellt werden (s. u.). Jedoch zeigten transfizierte HeLa-Zellen und Rattenschwanzzellen bei ähnlicher Transfektionseffizienz unterschiedliche Fluoreszenzmuster im Analyselaser. Mit FuGENE transfizierte Zellen zeigten eine breitere Verteilung im Fluoreszenzbereich und leuchteten im Mittel stärker als mit DOSPER transfizierte Zellen. Dies wurde nach mehrfacher Reproduzierbarkeit auf das jeweils verwendete Transfektionsreagenz zurückgeführt (Abb. 22).

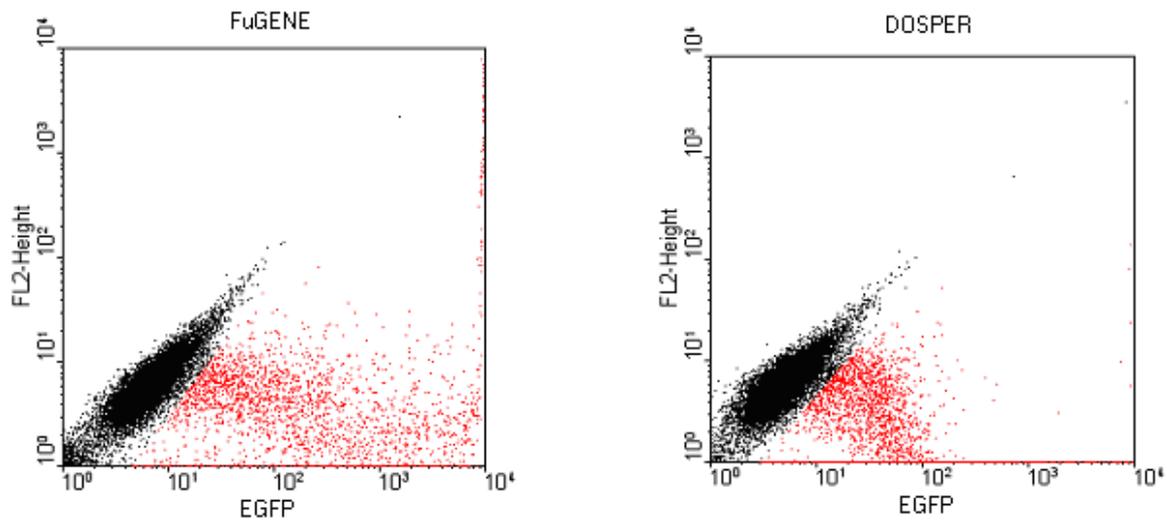


Abbildung 22: Rattenschwanzzellen nach Transfektion mit FuGENE (links) und DOSPER (rechts). Mit FuGENE transfizierte Zellen zeigen eine breitere Verteilung im Fluoreszenzbereich und leuchten stärker als mit DOSPER transfizierte Zellen.

Bei den Transfektionen von Rattenschwanzzellen konnte weder durch Mikroskopie noch im FACS hinsichtlich Granularität und Zellgröße eine morphologische Veränderung der transfizierten Zellen gegenüber nicht transfizierten Zellen gesehen werden. Auch rief eine längere EGFP-Expression bei den Zellen keine morphologischen Veränderungen hervor.

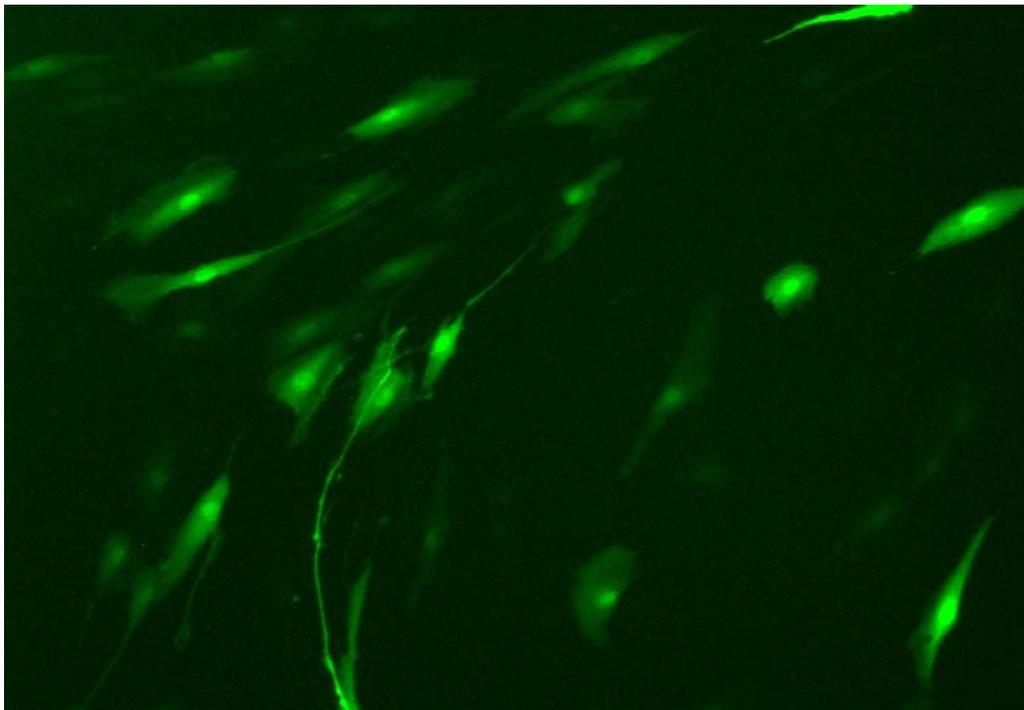


Abbildung 23: Transfizierte Rattenschwanzzellen, EGFP nativ

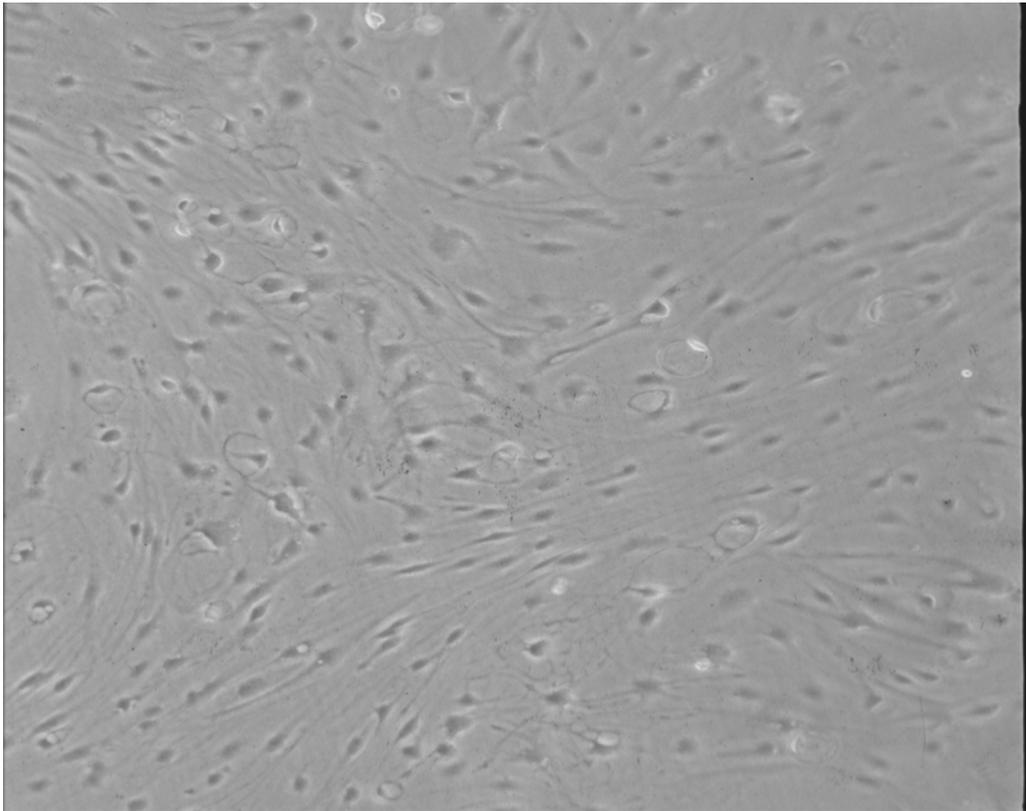


Abbildung 24: Transfizierte Rattenschwanzzellen in Durchlichtaufnahme

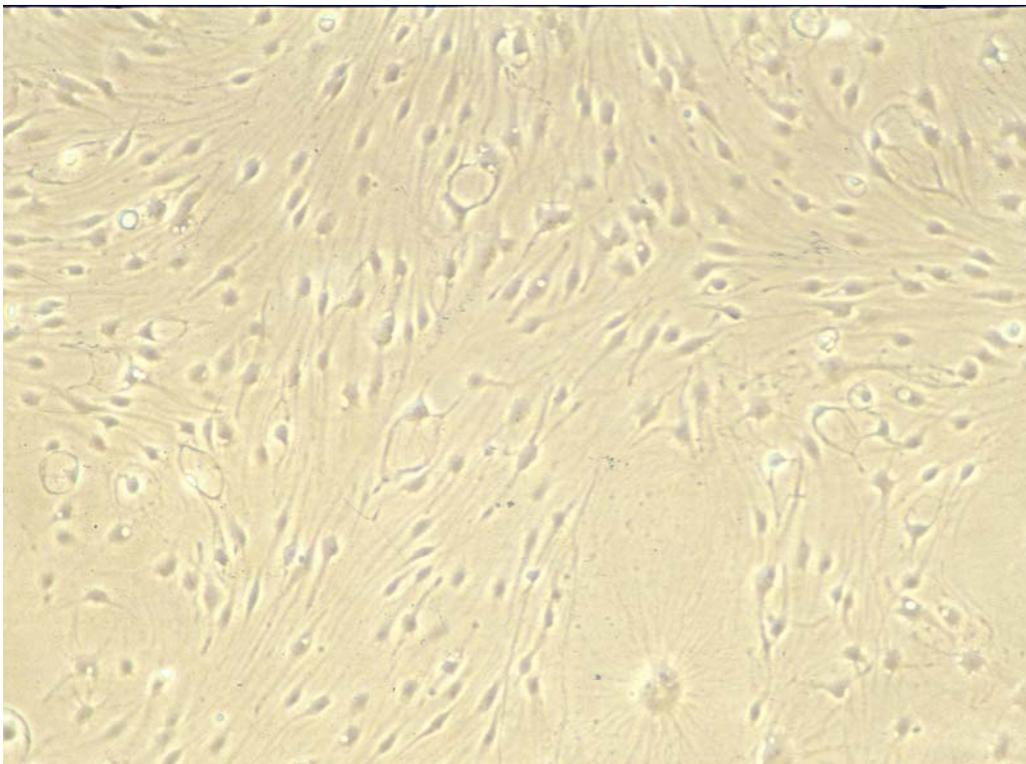


Abbildung 25: Untransfizierte Rattenschwanzzellen in Durchlichtaufnahme

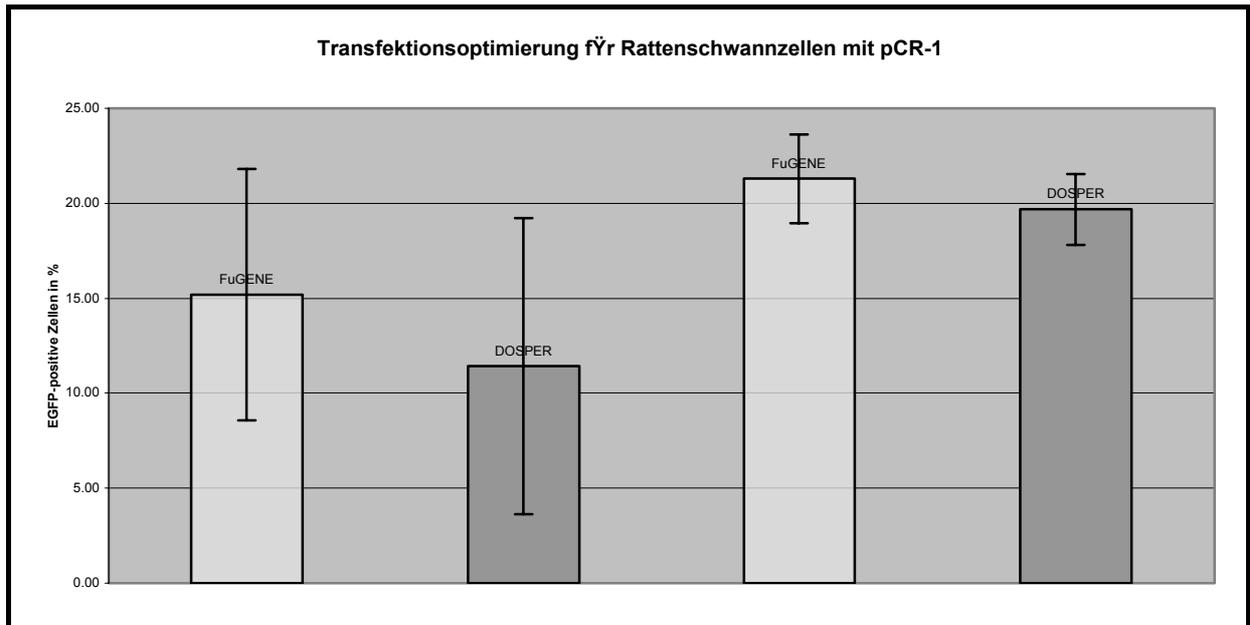


Abbildung 26: Transfektionen mit FuGENE und DOSPER im direkten Vergleich. Transfiziert wurde mit pCR-1, die Auswertung erfolgte durch FACS für EGFP-positive Zellen. Die Säulen stellen EGFP-positive Zellen in % dar. Linke Bildhälfte: DNA-Präparation mit Plasmid Maxi Kit; rechte Bildhälfte: DNA-Präparation mit EndoFree Plasmid Maxi Kit (beides Fa. Qiagen, Hilden, s.o.).

Abbildung 26 demonstriert zusätzlich den Effekt der DNA-Präparationsmethode für die Transfektion. In der linken Abbildungshälfte sind Transfektionen zusammengefaßt, bei denen Plasmid-DNA verwendet wurde, die mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit™ gewonnen wurde. In der rechten Abbildungshälfte wurden mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit hergestellte DNA-Präparationen transfiziert (beides Fa. Qiagen, Hilden, s. o.). Es wurde mit der endotoxinfreien Herstellungsmethode eine vergleichsweise erhöhte, jedoch mit $p = 0,11$ nicht signifikant veränderte Transfektionseffizienz bei Rattenschwanzzellen erreicht. Außerdem nahm die Streuung der Meßergebnisse erheblich ab. Aufgrund der oben beschriebenen deutlichen Unterschiede im Fluoreszenzverhalten und der nicht signifikant veränderten Transfektionseffizienz wurden alle Transfektionsexperimente mit FuGENE und mit DNA-Präparationen, die mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit hergestellt wurden, durchgeführt (siehe Kapitel Methoden).

4.2.2 Regulierbarkeit und Gewebespezifität

Arbeitshypothesen

Die hergestellten Konstrukte wurden auf ihre Regulierbarkeit und Zellspezifität hin untersucht. Dafür wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Für die nicht schwanzzellspezifischen Konstrukte pHUB-1 pTet-Off-EGFP und pAC1 - um der besseren Übersichtlichkeit willen hier kurz Tet-On und Tet-Off genannt - soll die EGFP-Expression nach Doxycyclingabe signifikant unterschiedlich sein.

Es soll also für alle Zellen bezüglich der EGFP-Expression gelten:

<u>Hypothese 1:</u>	Tet-On/ + Dox	>	Tet-On/ - Dox
		und	
	Tet-Off/ + Dox	<	Tet-Off/ - Dox

2. Für die schwanzzellspezifischen Konstrukte pHUB-2 und pHUB-3 soll ebenfalls eine Regulation gezeigt werden, d. h. die EGFP-Expression in Rattenschwanzzellen nach Doxycyclingabe soll signifikant unterschiedlich sein. Es soll demnach für Rattenschwanzzellen bezüglich der EGFP-Expression gelten:

<u>Hypothese 2:</u>	P ₀ -On/ + Dox	>	P ₀ -On/ - Dox
		und	
	P ₀ -Off/ + Dox	<	P ₀ -Off/ - Dox

3. Als dritte Hypothese schließlich soll die Zellspezifität der schwanzzellspezifischen Konstrukte überprüft werden, d. h. nach Aktivierung des Vektorsystems soll die EGFP-Expression in Rattenschwanzzellen signifikant höher sein als die EGFP-Expression in HeLa-Zellen. Es soll demnach gelten:

<u>Hypothese 3:</u>	RSZ/ P ₀ -On/ + Dox	>	HeLa/ P ₀ -On/ + Dox
		und	
	RSZ/ P ₀ -Off/ - Dox	>	HeLa/ P ₀ -Off/ - Dox

Resultate und Berechnung

Um die tatsächliche Menge des exprimierten EGFP in der Fluoreszenzzytometrie mit der größtmöglichen Näherung zu bestimmen, wurde die Anzahl EGFP-positiver Zellen mit der mittleren Fluoreszenz multipliziert. So wurden auch Unterschiede in der EGFP-Expression erfaßt, die sich nicht auf die Anzahl grün fluoreszierender Zellen, sondern nur auf die Leuchtstärke der Zellen auswirken. Um nun die Richtigkeit der oben aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, wurde jeweils ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Dabei konnten die folgenden qualitativen Aussagen über die EGFP-Expression gemacht werden:

1. Bei Einzelbetrachtung der Zelltypen zeigen sich signifikante Regulationsunterschiede für das Tet-On-System ($p = 0.006352889$) und das Tet-Off-System ($p = 0.008580877$) in HeLa-Zellen und in Rattenschwanzzellen (Tet-On-System: $p = 7.52685 \times 10^{-10}$ und Tet-Off-System: $p = 4.7216 \times 10^{-7}$).

Tet-On System + Dox		Tet-On System -Dox	
2674657	169360.1	596155.5	103676.8
2998840	176320	761052.6	87550
2006326	206085.4	1025592	72905
3120625.8	381607.2	421496	68847.3
4014170.4	362331	541125	41441.4
2858043.5	410870.6	429598.4	121896.4
205605.4	400586.4	122981.1	80073
173138.9	323568	126285.4	71764
209911.6	254425.5	149181.5	49672
Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen			
		Variable 1	Variable 2
Mittelwert		1163692.933	270627.4111
Varianz		1.81243E+12	84445142868
Beobachtungen		18	18
Hypothetische Differenz der Mittelwerte		0	
Freiheitsgrade (df)		19	
t-Statistik		2.751058251	
P(T<=t) einseitig		0.006352889	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test		1.729131327	

Tabelle 2: Regulierbarkeit des Tet-On-Systems durch Doxycyclin in HeLa-Zellen. Die in den folgenden Tabellen dargestellten Werte errechnen sich durch Multiplikation der Anzahl EGFP-positiver Zellen mit ihrer mittleren Fluoreszenzstärke.

Tet-Off-System- Dox	Tet-Off-System+Dox	Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
			Variable 1	Variable 2
1581593.70	261856		Variable 1	Variable 2
1914389.60	249608.7	Mittelwert	1220490.708	152584.4833
3214299.00	388662.3	Varianz	1.71819E+12	22795037989
2930715.00	241074	Beobachtungen	12	12
2637298.00	358423.2	Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
2174004.20	245069.6	Freiheitsgrade (df)	11	
21375.20	4722.6	t-Statistik	2.803669451	
30968.00	16705.5	P(T<=t) einseitig	0.008580877	
37263.60	21079.8	Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.795883691	
33521.60	25092			
31435.60	10897			
39025.00	7823.1			

Tabelle 3: Regulierbarkeit des Tet-Off-Systems durch Doxycyclin in HeLa-Zellen.

Tet-On-System + Dox		Tet-On-System - Dox	
1684366.9	848362.5	322088.5	239785.0
1461355.5	1052469.6	319704.0	276850.4
1852599.3	617274	268424.0	146688.0
1185321.6	921391.8	145228.4	214944.8
1606651.2	703510.6	361885.0	93933.0
1578149	512055	336393.0	82898.0
1758566.7	1162846.2	236898.9	568216.0
1701812.5	1629877.1	247205.0	547632.9
404383.5	927802	210731.4	134883.7
394520.8	951594.3	166953.6	170772.5
1193640.2	753480.9	646470.0	103057.5
1410719	736655.9	318787.8	128538.4
Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen			
		Variable 1	Variable 2
Mittelwert		1127058.588	262040.4083
Varianz		2.09485E+11	22571351240
Beobachtungen		24	24
Hypothetische Differenz der Mittelwerte		0	
Freiheitsgrade (df)		28	
t-Statistik		8.796983588	
P(T<=t) einseitig		7.52685E-10	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test		1.701130259	

Tabelle 4: Regulierbarkeit des Tet-On-Systems durch Doxycyclin in Rattenschwanzzellen

Tet-Off-System - Dox		Tet-Off-System + Dox	
969631.6	423722.0	333975	171386.2
1219458.0	500994.0	317116.3	138047.4
1792709.2	1457769.3	371896	678484.8
1511846.5	1260773.2	255955.7	195697.2
1050685.0	1262244.0	316862.4	256737.5
1233292.7	1303548.0	365096	249713
1609284.6	687352.7	443684.8	109098.6
2117902.5	575803.8	301194	111020.6
Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen			
		Variable 1	Variable 2
	Mittelwert	1186063.569	288497.8438
	Varianz	2.24049E+11	20337662909
	Beobachtungen	16	16
	Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
	Freiheitsgrade (df)	18	
	t-Statistik	7.262522379	
	P(T<=t) einseitig	4.7216E-07	
	Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.734063062	

Tabelle 5: Regulierbarkeit des Tet-Off-Systems durch Doxycyclin in Rattenschwanzzellen.

Diese Resultate bestätigen alle Aussagen, die in Arbeitshypothese 1 gefordert wurden.

Damit erweist sich Hypothese 1 als richtig !

Für das nicht zellspezifische bidirektional tet-abhängige Konstrukt pAC1 muß ebenfalls Hypothese 1 gelten. Bei Einzelbetrachtung der Zelltypen wurde auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen +/- Doxycyclingabe bei Rattenschwanzzellen ($p = 0.000245149$) und HeLa-Zellen ($p = 6.87054 \times 10^{-6}$) gefunden.

RSZ		Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
pAC1 + Dox	pAC1 - Dox		Variable 1	Variable 2
703510.6	93933.0	Mittelwert	922227.75	228741.5
512055.0	82898.0	Varianz	1.19793E+11	42055019999
1162846.2	568216.0	Beobachtungen	8	8
1629877.1	547632.9	Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
927802.0	134883.7	Freiheitsgrade (df)	11	
951594.3	170772.5	t-Statistik	4.875615196	
753480.9	103057.5	P(T<=t) einseitig	0.000245149	
736655.9	128538.4	Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.795883691	
HeLa		Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
pAC1 + Dox	pAC1 - Dox		Variable 1	Variable 2
381607.2	68847.3	Mittelwert	355564.7833	72282.35
362331	41441.4	Varianz	3412523451	799341712.8
410870.6	121896.4	Beobachtungen	6	6
400586.4	80073	Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
323568	71764	Freiheitsgrade (df)	7	
254425.5	49672	t-Statistik	10.69197759	
		P(T<=t) einseitig	6.87054E-06	
		Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.894577508	

Tabelle 6: pAC1 in RSZ und HeLa-Zellen, statistische Auswertung

Um sowohl Tet-On- als auch Tet-Off-System ohne Berücksichtigung des Zelltyps zu untersuchen, wurden beide Zelltypen zusammengenommen und sollten auch dann den Bedingungen der Arbeitshypothese 1 genügen.

Die Regulationsergebnisse zeigen auch in diesem Fall einen signifikanten Unterschied zwischen mit dem Tet-On-System + Doxycyclin transfizierten Zellen und mit dem Tet-On-System - Doxycyclin transfizierten Zellen: $p = 1.94694 \times 10^{-7}$:

Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
	Variable 1	Variable 2
Mittelwert	1142759.021	265720.5524
Varianz	8.6935E+11	47694315635
Beobachtungen	42	42
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	45	
t-Statistik	5.935375324	
P(T<=t) einseitig	1.94694E-07	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.679427442	

Tabelle 7: Regulierbarkeit des Tet-On-Systems durch Doxycyclin, statistische Auswertung.

Sie zeigen ebenfalls einen signifikanten Unterschied bei dem Tet-Off-System + Doxycyclin und Tet-Off-System - Doxycyclin: $p = 2.60337 \times 10^{-6}$:

Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
	Variable 1	Variable 2
Mittelwert	1200818.057	230249.2607
Varianz	8.24774E+11	25276982669
Beobachtungen	28	28
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	29	
t-Statistik	5.570354411	
P(T<=t) einseitig	2.60337E-06	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.699127097	

Tabelle 8: Regulierbarkeit des Tet-Off-Systems durch Doxycyclin, statistische Auswertung.

Auch für pAC1 konnte bei allen Zelltypen insgesamt ein signifikanter Regulationsunterschied mit $p = \underline{0.000119581}$ gezeigt werden:

pAC1 + Dox	pAC1 - Dox	Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen		
			Variable 1	Variable 2
381607.2	68847.3			
362331	41441.4	Mittelwert	679372.1929	161687.5786
410870.6	121896.4	Varianz	1.50504E+11	29408572690
400586.4	80073	Beobachtungen	14	14
323568	71764	Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
254425.5	49672	Freiheitsgrade (df)	18	
703510.6	93933	t-Statistik	4.566660062	
512055	82898	P(T<=t) einseitig	0.000119581	
1162846.2	568216	Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1.734063062	
1629877.1	547632.9	P(T<=t) zweiseitig	0.000239162	
927802	134883.7	Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2.100923666	
951594.3	170772.5			
753480.9	103057.5			
736655.9	128538.4			

Tabelle 9: Regulierbarkeit von pAC1 und statistische Auswertung

Auch hier erweist sich Hypothese 1 als richtig!

- Die Regulationsergebnisse zeigen weiterhin einen signifikanten Unterschied zwischen mit dem P₀-On-System + Doxycyclin transfizierten Rattenschwanzzellen und mit dem P₀-On-System - Doxycyclin transfizierten RSZ: $p = \underline{0.03409401}$. Auch für das P₀-Off-System konnte hier eine signifikante Regulation gezeigt werden: $p = \underline{0.00688340}$.

Damit erweist sich Hypothese 2 als richtig.

- Die Untersuchung auf Zellspezifität zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen mit dem P₀-On-System + Doxycyclin transfizierten Rattenschwanzzellen und mit dem P₀-On-System + Doxycyclin transfizierten HeLa-Zellen: $p = \underline{0.00081477}$. Weiterhin

zeigte sich ein signifikanter Unterschied für das P₀-Off-System – Doxycyclin in RSZ gegenüber gleich behandelten HeLa-Zellen: p = 0,00001594.

Damit erweist sich Hypothese 3 als richtig.

4. Um die Hintergrundaktivität der Konstrukte zu bestimmen, wurde die Anzahl EGFP-positiver Zellen multipliziert mit der mittleren Fluoreszenz für aktivierten und deaktivierten Zustand der Konstrukte zueinander in Bezug gesetzt. Dies ist erlaubt, da zuvor gezeigt wurde, daß die Mittelwerte signifikant verschieden sind. Als Hintergrundaktivität wird der detektierbare Wert im deaktivierten Zustand bezeichnet. Der aktivierte Zustand wird gleich 100 % gesetzt. Daraus ergeben sich folgende Werte:

HeLa-Zellen	EGFP-positive Zellen x mittlere Fluoreszenz		Hintergrundaktivität in %
	aktiviert	deaktiviert	
Vektor			
pHUB-1	2945443,78	629169,92	21,36
pTet-Off-EGFP	2408716,58	290782,3	12,07
pHUB-2	190070,23	110429,97	58,09
pHUB-3	32264,83	14386,67	44,58
pAC1	355564,78	72282,35	20,33

Tabelle 10: Hintergrundaktivität der AAV-Konstrukte bei HeLa-Zellen

RSZ	EGFP-positive Zellen x mittlere Fluoreszenz		Hintergrundaktivität in %
	aktiviert	deaktiviert	
Vektor			
pHUB-1	1603602,8	279728,4	17,44
pTet-Off-EGFP	1438101,3	338222,5	23,52
pHUB-2	855345,2	277651,4	32,46
pHUB-3	934025,9	238773,2	25,56
pAC1	922227,8	228741,5	24,80

Tabelle 11: Hintergrundaktivität der AAV-Konstrukte bei RSZ

4.2.2.1 Übersicht über die Transfektionsergebnisse

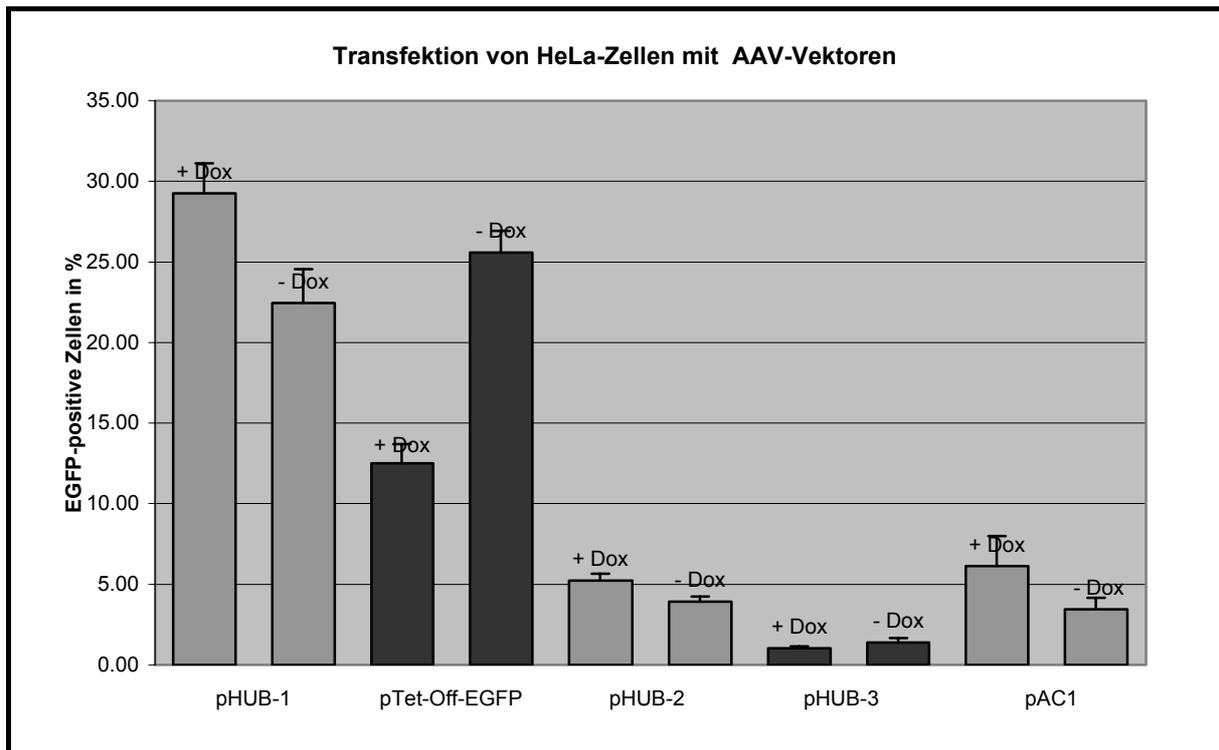


Abbildung 27: Transfektionsergebnisse für HeLa-Zellen mit sämtlichen Vektorkonstrukten, Übersicht

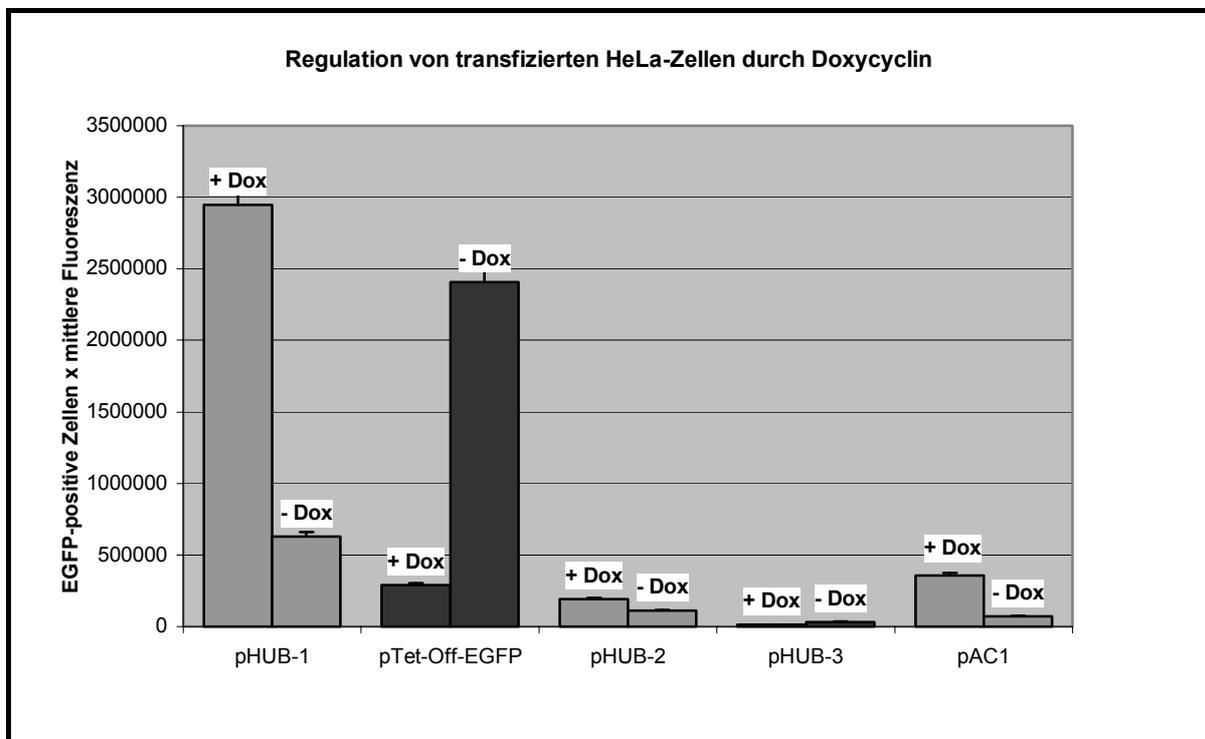


Abbildung 28: Regulationsergebnisse für transfizierte HeLa-Zellen, Übersicht

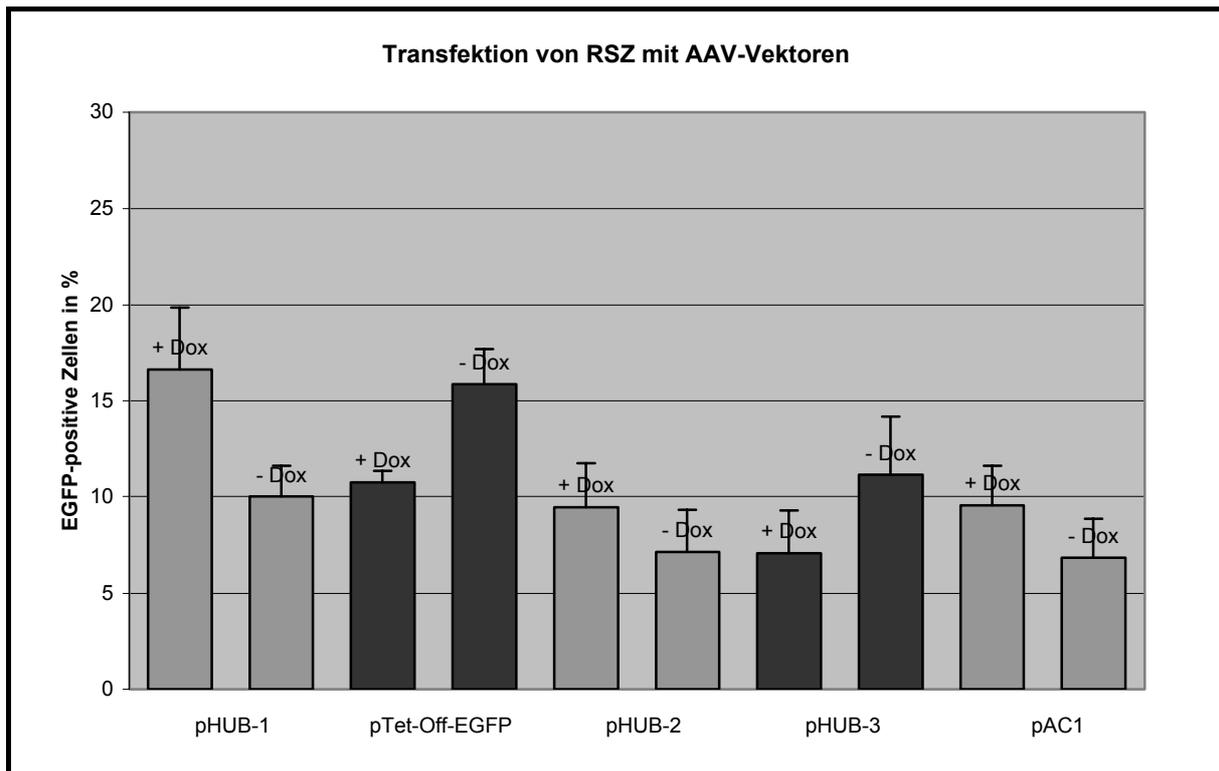


Abbildung 29: Transfektionsergebnisse für Rattenschwanzzellen mit sämtlichen Vektorkonstrukten, Übersicht

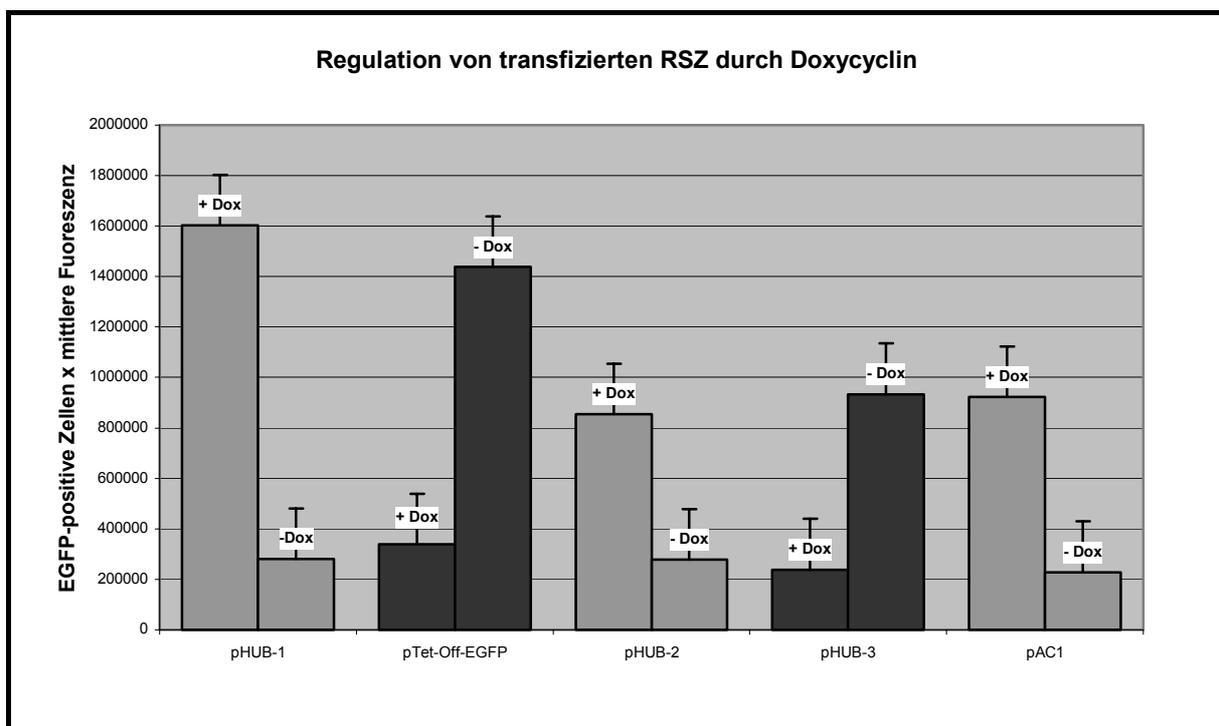


Abbildung 30: Regulationsergebnisse für transfizierte Rattenschwanzzellen, Übersicht.

Es konnten also bezüglich der Regulation der transfizierten Vektoren alle drei Hypothesen verifiziert werden. Diese Aussagen stellen qualitative Aussagen dar. Um nun zu relativen quantitativen Aussagen über die Regulierbarkeit der Konstrukte zu gelangen, wurden die

Mittelwerte aller Regulationsergebnisse zueinander Bezug gesetzt. Dies ist erlaubt, da zuvor gezeigt wurde, daß die Mittelwerte signifikant verschieden sind. Daraus ergeben sich die folgenden quantitativen Aussagen für Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen:

Vektorkonstrukt	Regulierbarkeit um Faktor
pHUB-1	5,7
pTet-Off-EGFP	4,3
pHUB-2	3,1
pHUB-3	3,9
pAC1	4,0

Tabelle 12: Regulierbarkeit der AAV-Vektoren in Rattenschwanzzellen

Vektorkonstrukt	Regulierbarkeit um Faktor
pHUB-1	4,7
pTet-On-EGFP	8,3
pAC1	4,9

Tabelle 13: Regulierbarkeit der AAV-Vektoren in HeLa-Zellen

Für die Konstrukte mit schwanzellspezifischem Promotor können diese Aussagen gemacht werden:

1. Bei pHUB-2 sind im aktivierten Zustand 1,78 mal mehr EGFP-positive RSZ als HeLa-Zellen zu finden.
2. Bei pHUB-2 ist in RSZ eine 4,5-fach höhere EGFP-Expression zu finden als in HeLa-Zellen.
3. Bei pHUB-3 sind im aktivierten Zustand 8 mal mehr EGFP-positive RSZ als HeLa-Zellen zu finden.
4. Bei pHUB-3 ist im aktivierten Zustand in RSZ eine 7,4-fach höhere EGFP-Expression zu finden als in HeLa-Zellen.

Vektorkonstrukt	RSZ (%)	EGFP RSZ > HeLa	HeLa (%)
pHUB-2/ + Dox	9,34	4,5 x	5,23
pHUB-3/ - Dox	11,13	7,4 x	1,39

Tabelle 14: Zellspezifität der Konstrukte pHUB-2 und pHUB-3, quantitativ. Dargestellt sind EGFP-positive Zellen in % und der Unterschied in der EGFP-Expression der Konstrukte im aktivierten Zustand.

4.2.3 Langzeitergebnisse

EGFP-positive HeLa- und Rattenschwanzzellen wurden durch FACSsort aussortiert, die so entstandenen Reinkulturen halbiert und weiterkultiviert. Dabei wurde eine Hälfte unter 1µg Doxycyclin/ml Medium, die andere Hälfte ohne Doxycyclin gehalten. Diese Zellen wurden nach 14 Tagen, nach 4 Wochen und nach 6 Wochen nochmals per FACS analysiert. Dabei ist zunächst zu verzeichnen, daß die Zahl EGFP-positiver Zellen stark abnimmt. Nach 14 Tagen wurden in diesen Reinkulturen noch zwischen 2-5 % positiver Zellen gefunden, nach 6 Wochen 1-3 %. Bei allen Konstrukten ist neben der Abnahme der EGFP-positiven Zellen auch eine Abnahme der Regulierbarkeit durch Doxycyclingabe zu finden. Nur bei dem bidirektional exprimierenden Vektorkonstrukt pAC1 ist eine Zunahme der Regulationsspanne zu verzeichnen (siehe Abb. 32). Dies gilt sowohl für HeLa-Zellen als auch für Rattenschwanzzellen. Quantitativ betrachtet steigt die Regulierbarkeit durch Doxycyclin in HeLa-Zellen von 4,9-fach auf 56,7-fach nach 6 Wochen an. In Rattenschwanzzellen ist sogar ein Anstieg der Regulation von 4-fach auf das 100-fache zu verzeichnen (s. Abb. 32).

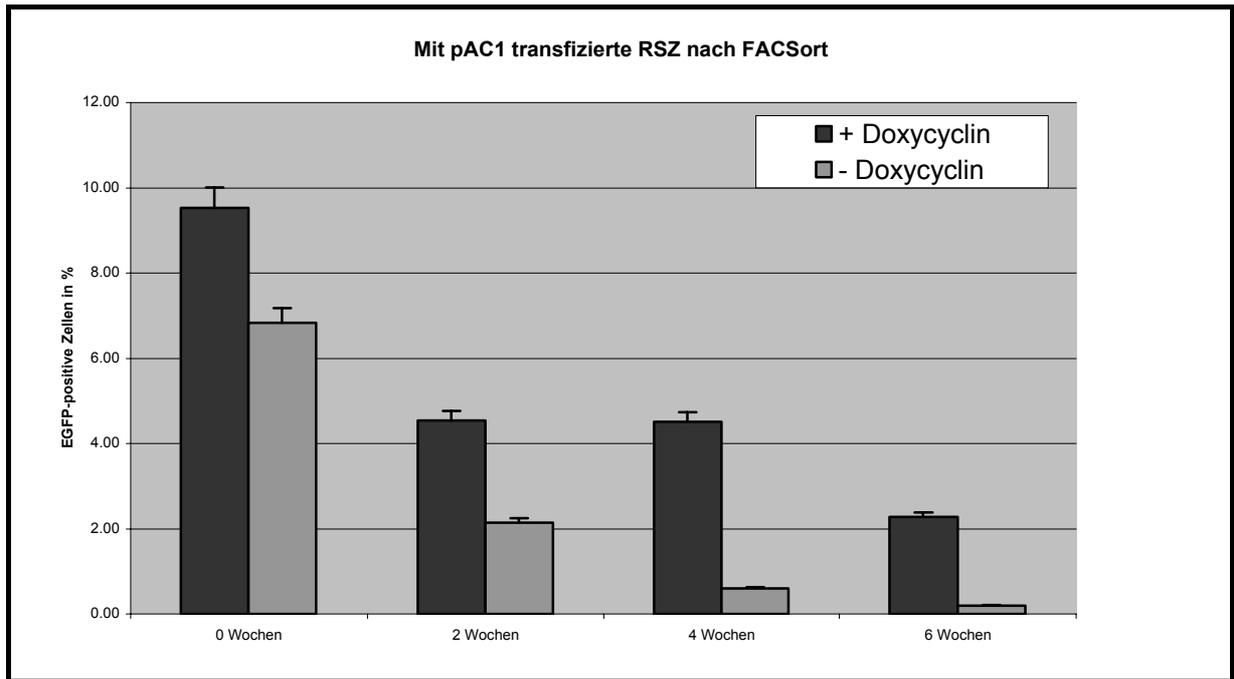


Abbildung 31: Mit pAC1 transfizierte und sortierte Rattenschwanzzellen, Langzeitbeobachtungen. Der Zeitpunkt 0 Wochen stellt die Analyse bei der FACSORTierung dar.

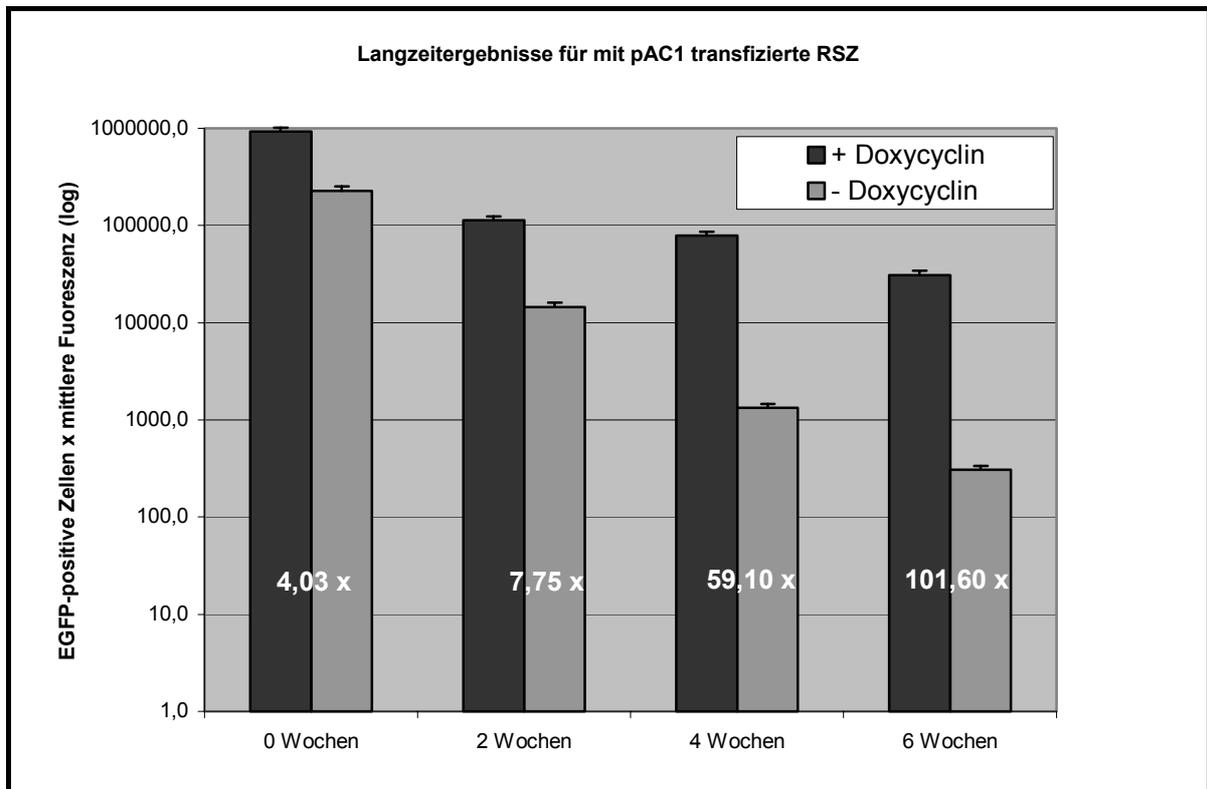


Abbildung 32: Regulationsergebnisse für pAC1 transfizierte RSZ in logarithmischer Skalierung. Die Regulationsfaktoren sind hell dargestellt.

Aus den Ergebnissen in Abbildung 32 ist ebenfalls ersichtlich, daß bei diesem Vektor auch die Hintergrundaktivität über die Zeit abnimmt, und zwar fast um mehr als Faktor 10, wie die folgende Tabelle zeigt:

RSZ	EGFP-positive Zellen x mittlere Fluoreszenz		Hintergrundaktivität in %
	pAC1	aktiviert	
0 Wochen	922227,8	228741,5	24,80
2 Wochen	112997,3	14588,6	12,91
4 Wochen	78531,8	1328,8	1,69
6 Wochen	31118,9	306,3	0,98

Tabelle 15: Hintergrundaktivität von pAC1 in RSZ über 6 Wochen

Dies ist bei den anderen Vektoren nicht zu verzeichnen. Aus den vorgestellten Ergebnissen ist also zu ersehen, daß pAC1 der einzige der transfizierten Vektoren ist, der sowohl eine Zunahme des möglichen Regulationsintervalls als auch eine mit längerer Dauer abnehmende Hintergrundaktivität zeigt.

5 Diskussion

Die regulierbare Expression von Fremdgenen gehört zu den wesentlichen Zielen der Genterapie. Die konstitutive Expression eines Transgens wäre in aller Regel unphysiologisch, und zudem soll eine toxische oder auch zu geringe Menge des jeweiligen Genproduktes vermieden werden. Es sind bisher verschiedene Modelle bekannt, die mit regulierbaren Promotorsystemen arbeiten. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Systeme, die auf Schwermetallionen, Hitzeschock oder Hormone reagieren (Brasemann *et al.*, 1993; Dhawan *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 2000; Mayo *et al.*, 1982; Nover, 1991). Bei diesen Regulationsmechanismen treten jedoch begleitend nicht unerhebliche Veränderungen des Organismus und des zellulären Milieus auf. Außerdem weisen diese Systeme eine relativ hohe Basalaktivität auf (Dhawan *et al.*, 1995). Aus diesen Gründen wurde nach Regulationssystemen gesucht, die zum einen geringe Sekundäreffekte mit sich bringen, zum anderen aber auch eine hocheffektive Regulierbarkeit ermöglichen. Diese Ziele wurden mit prokaryotischen Regulationselementen erreicht. Hier sind das *E. coli*-lac-System und das in dieser Arbeit verwendete tetracyclinregulierbare System zu erwähnen, das sich wie oben erwähnt ebenfalls aus Elementen von *E. coli* zusammensetzt (Gossen *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, ein tetracyclinregulierbares AAV-basiertes System für die Therapie von Erkrankungen der Schwanzzelle zu schaffen. Es sollte nur einen einzigen Transferschritt in die Zelle benötigen. Die Austestung dieses Tet-responsiven Systems erfolgte an primären Schwanzzellkulturen.

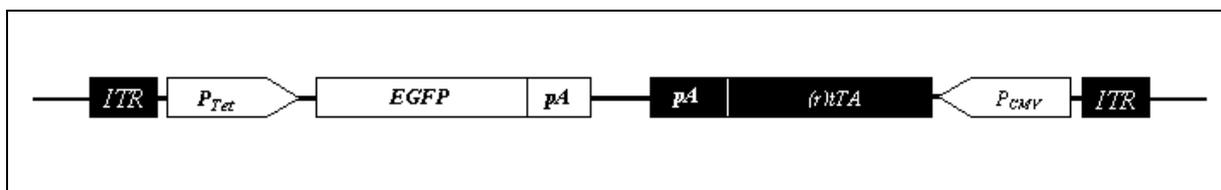
5.1 Tet-On-System versus Tet-Off-System

Um zu entscheiden, welches System sich für gentherapeutische Ansätze am besten eignet, müssen die folgenden theoretischen Überlegungen angestellt werden: In einem Organismus, der mit Hilfe des Tet-Off-Systems gentherapeutisch behandelt wird, muß zum einen im Off-Zustand ständig ein konstanter Tetracyclinspiegel aufrechterhalten werden und zum zweiten ist die Expression des therapeutischen Gens nicht dosisabhängig regulierbar, sondern lediglich die Suppression dieses Gens. Dagegen ist in einem Organismus, der mit dem Tet-On-System behandelt wird, die Expression des therapeutischen Gens dosisabhängig regulierbar und in der Ruhephase keine Tetracyclingabe notwendig. Aus dieser Sicht erscheint zunächst das Tet-On-System überlegen. Jedoch ist für bestimmte Erkrankungen beziehungsweise spezielle Therapieansätze unter Umständen nur die Verwendung des Tet-Off-Systems sinnvoll, so daß beide Systeme in der Genterapie ihren Platz finden können und keines der beiden Systeme als besser oder schlechter bezeichnet werden kann.

5.2 Überlegungen zum Vektordesign

Die Konstruktion von AAV-basierten Vektoren beinhaltet als Hauptschwierigkeit die limitierte Größe des Gesamtkonstruktes. Wie von Muzyczka und Mitarbeitern gezeigt wurde, ist die effiziente Verpackung eines AAV-Konstruktes in die Virionen nur bis zu einer Gesamtgröße von etwa 5 kb gewährleistet. Bei größeren Konstrukten nimmt die Verpackungseffizienz rapide ab (Muzyczka, 1992). Daher ist das Adeno-assoziierte Virus nur für die Einschleusung relativ kleiner Gensequenzen verwendbar. Obgleich in dieser Arbeit keine virale Infektion durchgeführt wurde, sollten die Vektoren doch den Ansprüchen genügen, die an ein vollständiges virales Gentherapieinstrument gestellt werden, d. h. der virale Teil des Vektors sollte nicht größer als 5 kb sein. Bei der Verwendung des Tet-Systems, das mit Poly-A-Signal schon eine Größe von 2,2 kb besitzt, können Zielgen und eventueller gewebespezifischer Promotor zusammen eine Maximalgröße von etwa 3 kb haben. Nun wurden in der überwiegenden Zahl von Studien zur Regulation des Tet-Systems entweder stabil transfizierte Zellen verwendet oder ein Selektionsdruck ausgeübt. Da ein solches Verfahren für einen Gentherapieansatz wie in dieser Arbeit nicht in Frage kommt, wurde hier lediglich ein Detektionsgen, das EGFP, gewählt. Des Weiteren wurde keine virale Infektion durchgeführt, so daß die Integration in das Wirtsgenom ein seltenes Ereignis darstellt. Ohne Selektionsvorteil und ohne Integration jedoch ist eine rapide Abnahme der Fremdgenexpression zu beobachten, und Langzeitbeobachtungen gestalten sich schwierig (s.o.). Dies wurde zugunsten der „Authentizität“ des Gentherapievektors und auch für den Rahmen dieser Arbeit in Kauf genommen. Die Anordnung der Vektorelemente wurde ebenfalls in die Überlegungen zum Konstruktdesign einbezogen: Konstitutiv exprimierter Transaktivator und tetracyclinabhängig exprimiertes EGFP sind entgegengesetzt angeordnet, um eine durchgehende Aktivierung des Regulationssystems zu vermeiden. Dabei existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten der Anordnung:

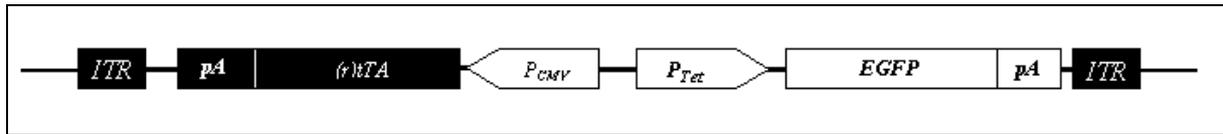
1. Die Leserichtungen laufen aufeinander zu:



Diese Möglichkeit wurde nicht gewählt, da auf den ITR-Sequenzen schon bei Beginn dieser Arbeit promotorähnliche Elemente vermutet wurden, die eine Regulation verhindern könnten.

Deshalb wurde Möglichkeit 2 gewählt:

2. Die Leserichtungen laufen voneinander weg:



In dieser Anordnung ist eine Aktivierung des Regulationssystems durch die ITR-Regionen unwahrscheinlicher als in Möglichkeit 1.

5.3 Beurteilung der Konstrukte

Für alle Ergebnisse konnten jeweils hochsignifikante Expressionsunterschiede für EGFP unter Doxycyclingabe mit $p < 0,05$ gefunden werden. Es muß jedoch gefragt werden, welcher Regulationsumfang für die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte postuliert werden muß. Dann muß erörtert werden, was für eine zellspezifische Expression zu fordern ist, und schließlich muß diskutiert werden, wieviel Hintergrundaktivität für ein Gentherapeutikum dieser Art zugelassen werden kann und ab wann eine Verwendung des Systems nicht mehr in Frage kommt.

5.3.1 Regulierbarkeit

Gossen und Bujard zeigten mit dem Tet-Off-System eine Regulation um den Faktor 10^5 , mit dem Tet-On-System eine Regulation um das 1000-fache (Gossen *et al.*, 1995; Gossen und Bujard, 1992). Allerdings handelt es sich dabei um Experimente an stabil (r)tTA exprimierenden Zellen und somit um ein Zweikassettensystem, so daß keine unmittelbare Vergleichbarkeit gegeben ist. In Arbeiten, die Einkassettensysteme verwenden, sind Regulationsgrößenordnungen von Faktor 10-20 beschrieben (bei viral transduzierten Zellen (Hofmann *et al.*, 1996) bis um den Faktor 90-800) (Fotaki *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1997; Schultze *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit den bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen kann so ein Minimalwert festgelegt werden, ab dem von einer effizienten Regulation gesprochen wird, das heißt: eine Regulierbarkeit um mindestens Faktor 10 wird von den Konstrukten gefordert. Wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist, konnten recht große Regulierbarkeiten von mehreren hundert Prozent gezeigt werden. In den Kurzzeitbeobachtungen konnte die selbst geforderte Regulierbarkeit durch Doxycyclingabe um den Faktor 10 von den nicht schwanzellspezifischen Konstrukten und auch von den schwanzellspezifischen Konstrukten jedoch nicht erreicht werden. Beim direkten Vergleich

der Ergebnisse für pHUB-1 bei HeLa- und RSZ fällt auf, daß die Regulierbarkeit dieses Konstruktes bei Rattenschwanzzellen in größerem Maß möglich ist als bei HeLa-Zellen. Bei pTet-Off-EGFP fällt die wesentlich größere Regulierbarkeit in HeLa-Zellen auf. Es läßt sich für diese beiden Konstrukte hier also festhalten, daß das nicht zellspezifische Tet-On-System in Rattenschwanzzellen in größerem Umfang reagiert, während das Tet-Off-System pTet-Off-EGFP in HeLa-Zellen in größerem Ausmaß regulierbar ist. pTet-Off-EGFP reicht mit einer Regulierbarkeit um den Faktor 8 recht nah an den geforderten Wert einer 10-fachen Regulierbarkeit heran und zeigt damit von allen Vektorkonstrukten die größte Regulation in den Kurzzeitbeobachtungen.

Der Vektor pAC1 zeigt in beiden Zelltypen unterschiedliche Regulierbarkeit. Hier wird in HeLa-Zellen eine größere Regulation als in RSZ gefunden. Diese Tatsache und der sehr geringe Prozentsatz EGFP-positiver Zellen im Vergleich zu den vorher erwähnten ebenfalls nicht zellspezifischen Konstrukten läßt sich durch das „langsame“ Promotorsystem erklären. pAC1 enthält einen bidirektional ausgerichteten tetracyclinabhängigen Zweifach-Promotor, der sich Hintergrundaktivität zunutze macht. Da hier der tetracyclinresponsive Transaktivator schon vorhanden sein muß, um seine eigene Expression tetracyclinabhängig steuern zu können, wäre dieses System ohne eine Hintergrundaktivität in diesem Kontext gar nicht nutzbar. Diese Autoregulation benutzt sozusagen den Effekt der Eigenverstärkung. Die Expression der beiden Proteine benötigt durch die inkompletten Promotoren mehr Zeit als bei Konstrukten mit konstitutivem Promotor. Für die schnellwachsenden und stoffwechselaktiveren HeLa-Zellen kann dieser Effekt früher eintreten. Daher sind für dieses autoregulierte System insbesondere die Langzeitbeobachtungen von Bedeutung (s. u.). Es ist für diesen Vektor also zunächst zu konstatieren, daß auch hier eine effiziente Regulation im geforderten Rahmen zunächst nicht möglich zu sein scheint und zudem durch die langsame zeitverzögerte Aktivierung des Systems eine Beurteilung innerhalb eines kurzen Zeitraumes erschwert wird. Insgesamt bleibt für die Regulierbarkeit der hier vorgestellten Konstrukte in den Kurzzeitbeobachtungen also folgendes festzuhalten:

Mit den Vektoren kann die EGFP-Expression um maximal das achtfache reguliert werden. Sie erreichen den in der Literatur beschriebenen kleinsten Wert für ähnliche Konstrukte somit nicht. Die Regulierbarkeit der Konstrukte ist je nach Zelltyp und verwendetem Konstrukt unterschiedlich groß. Daraus kann geschlossen werden, daß eine sorgfältige Testung der Kombination von Zielzelltyp und dem jeweiligen regulierten Vektor unbedingt notwendig ist, um ein effizientes Gentherapiewerkzeug zu entwickeln.

5.3.2 Zellspezifität

Für die schwanzzellspezifischen Konstrukte pHUB-2 und pHUB-3 zeigen die Ergebnisse durchweg eine geringere Anzahl EGFP-positiver Zellen als bei den Konstrukten mit unspezifischem Promotor. Auch die mittlere Fluoreszenz ist bei den mit diesen beiden Konstrukten transfizierten Zellen merklich erniedrigt. Diese beiden Tatsachen lassen sich gut mit einer geringeren Stärke des P₀-Promotors im Verhältnis zum CMV-Promotor erklären. Die Regulierbarkeit der Vektoren durch Doxycyclingabe ist im Vergleich mit den anderen Konstrukten erniedrigt. Jedoch fällt hier auf, daß bei pHUB-2, also dem Tet-On System, wie auch bei dem Tet-Off Pendant pHUB-3 eine Regulation in ähnlichem Umfang möglich ist. Rattenschwanzzellen verhalten sich also bezüglich dieser Konstrukte einheitlicher als für nicht zellspezifische Konstrukte. Dies kann mit einer besseren Einbindung des schwanzzellspezifischen Promotors in den Zellmetabolismus erklärt werden und so zum Vorteil der hier diskutierten Konstrukte ausgelegt werden. Des weiteren ist ein signifikanter Unterschied der EGFP-Expression zwischen Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen für diese beiden Konstrukte feststellbar. Die Zellspezifität ist demnach gegeben. Relativ zu HeLa-Zellen exprimieren RSZ hier bis zu 7,4 mal besser. Jedoch ist trotz allem eine geringe EGFP-Expression in HeLa-Zellen zu finden. Diese Inkonsistenz der Spezifität wurde für dieses Fragment des P₀-Promotors schon beschrieben (Feltri, 1999). Mit anderen Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des P₀-Gens wurde in verschiedenen Experimenten eine größere Zellspezifität beschrieben (Feltri, 1999). Diese Fragmente scheiden jedoch aufgrund ihrer Größe von 6 kb bzw. 9 kb und der oben erwähnten limitierten Verpackungskapazität des AAV von 5 kb für diesen Versuchsansatz aus. An dieser Stelle muß nun gefragt werden, welche Expressionsgrenze für eine Zellspezifität gezogen werden soll. Wie in der Einleitung angesprochen wurde, existieren bei der Gentherapie recht große Vorbehalte und Ängste. Daher müssen hier sehr strenge Maßstäbe gelten. Nach strengen Kriterien für ein Gentherapeutikum ist natürlich theoretisch eine absolute Zellspezifität zu fordern, bei der exklusiv in einer Zellart eine Expression zu finden ist und bei der in der „unerwünschten“ Zellart auch mit der empfindlichsten Nachweismethode keinerlei Expression detektierbar ist. Um solch eine hohe Zellspezifität zu erreichen, müssen exklusive Expressionselemente gefunden werden, die auch nicht mit anderen - beispielsweise Regulationssystemen - interagieren. Als weitere Möglichkeit muß die zielgerichtete Überbringung in einen definierten Zelltyp diskutiert werden. Hierbei können beispielsweise spezifische Rezeptoren auf Zielzellen und „Vehikeln“ dienlich sein. In dieser Arbeit war jedoch nicht die zielgerichtete Einschleusung der Vektoren Gegenstand der Betrachtung, sondern nur die

zellgerichtete Expression. Letzten Endes ist zum Erreichen einer absoluten Zellspezifität sicherlich die Kombination mehrerer Faktoren notwendig.

5.3.3 Hintergrundaktivität

Bei allen Konstrukten wurde durchweg Hintergrundaktivität gefunden. Für einen Gentherapievektor muß jedoch aus den eingangs angestellten Überlegungen heraus für die Hintergrundaktivität ein Grenzwert von Null gefordert werden. Da die oben schon erwähnten strengen Anforderungen gelten müssen, sind die hier gemessenen Hintergrundaktivitäten für einen Gentherapievektor nicht tolerabel. Es ist jedoch zu überlegen, ob für die Expression mancher Zielgene eine gewisse Hintergrundaktivität nicht vielleicht sogar physiologisch sein kann. Diese Überlegung setzt allerdings voraus, daß die physiologische Hintergrundaktivität des Zielgens in der Zielzelle und auch die Hintergrundaktivität des Vektors genauestens bekannt ist, so daß keine unbekannt Variable eine Rolle spielen kann. Dies jedoch ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt in dieser Form noch nicht möglich. pHUB-1 weist besonders in HeLa-Zellen eine sehr hohe Hintergrundaktivität auf. Ob im Falle von pTet-Off-EGFP gegenüber dem vergleichbaren Tet-On-System die Mutationen, die tTA in rtTA konvertieren (s. Kapitel 1.5), für die höhere Hintergrundaktivität verantwortlich sein können, muß in weiterführenden Experimenten noch untersucht werden. Diese Hintergrundaktivität kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden. Zum einen sind in der Sequenz des tetracyclinabhängigen Transaktivators (*(r)tTA*) promotorähnliche (Enhancer-) Elemente beschrieben, die eine effiziente Regulation auf einem Einkassettenvektor stören können (aus: User Manual, Tet-OffTM and Tet-OnTM Gene Expression Systems, Fa. Clontech, Palo Alto, USA, <http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT3001-1.pdf>). Andererseits wurde jedoch von gelungenen Experimenten mit tet-regulierbaren Einkassettenvektoren berichtet (Fotaki *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 1997; Schultze *et al.*, 1996). In dem hier vorliegenden Arbeitsansatz wurde versucht, durch das Vektordesign eine möglichst niedrige Hintergrundaktivität zu erreichen. Die Leserichtungen von konstitutiv exprimiertem Transaktivator und tetracyclinabhängig exprimiertem EGFP sind entgegengesetzt angeordnet. Dadurch sollte eine übergreifende Aktivierung des Systems vermieden werden. Ein weiterer Punkt, der an dieser Stelle angeführt werden muß, ist die nicht richtungsgebundene Aktivierung durch Promotorelemente. Der CMV-Promotor bewirkt nach herrschender Meinung im Verhältnis zu anderen Promotoren eine relativ starke Expressionsinduktion. Eine übergreifende Aktivierung des Tet-Systems könnte also auch dadurch bedingt sein. Außerdem ist auch eine gewisse Eigenaktivität des tet-abhängigen Minimalpromotors beschrieben (Hoffmann *et al.*, 1997). Des weiteren sind Wirksamkeit und Hintergrundaktivität des

tetracyclinregulierbaren Systems keineswegs in allen Zelltypen gleich, wie auch in dieser Arbeit deutlich wurde (Gossen *et al.*, 1993). So wurden beispielsweise von Howe starke Unterschiede bezüglich der Wirkung des Tet-Systems in verschiedenen Zelltypen gefunden (Gossen *et al.*, 1993;Gossen und Bujard, 1995;Howe *et al.*, 1995). Die meisten Experimente mit den Tet-Systemen wurden entweder an Kulturen immortalisierter Zellen, wie z. B. HeLa-, HEK 293- oder NIH 3T3-Zellen, an stabil transfizierten (r)tTA exprimierenden Zellen oder gar an transgenen (r)tTA-stabilen Tieren durchgeführt. Aus diesen beschriebenen Experimenten lassen sich für die transiente Transfektion primärer Schwanzzellen nur bedingt Rückschlüsse ziehen. Schließlich sind als weitere Störfaktoren des tetracyclinregulierbaren Systems die inverted terminal repeats (ITRs) des AAV zu diskutieren. Auf den ITRs konnten in letzter Zeit von Habermann und Mitarbeitern Promotorelemente nachgewiesen werden, die ein Regulationssystem stören können (Haberman *et al.*, 2000). Da diese Regionen jedoch unverzichtbare Bestandteile eines AAV-basierten Vektors darstellen, werden hier für die Entwicklung eines solchen regulierbaren Expressionssystems ganz erhebliche neue Schwierigkeiten offenbar. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukten wurde durch das Vektordesign versucht, diesen Effekt durch eine gewisse Antisense-Wirkung zu eliminieren. Die Hintergrundaktivität kann auch durch Kontrollelemente verringert werden, die im deaktivierten Zustand der Konstrukte eine aktiv supprimierende Funktion haben, hier wird von einem Silencer gesprochen. Nach Beginn dieser Arbeit wurde von S. Freundlieb und Mitarbeitern ein solches Regulationssystem beschrieben, das auch aus dem Tetracyclinresistenz-Operon von *E. coli* entwickelt wurde (Freundlieb *et al.*, 1999). Es ist genau wie das hier verwendete Transaktivatorsystem durch Tetracyclin(-derivate) regulierbar und wird als tetracyclinabhängiger transkriptioneller Silencer bezeichnet (tTS). Bei Kombination dieser beiden Systeme kann eine stärkere Unterdrückung der Hintergrundaktivität erreicht werden (Forster *et al.*, 1999;Freundlieb *et al.*, 1999). Diese Kombination wurde zum einen erst 1999 beschrieben und zum zweiten wäre bei dem vorliegenden Vektordesign eine Konstruktgröße des viralen Konstrukts von 5 kb überschritten worden. Dann wäre eine effiziente Verpackung in virale Partikel nicht mehr möglich gewesen. Aus den genannten Gründen wurde dieses Silencer-Element in die vorgestellten Vektoren nicht integriert.

5.3.4 Langzeitergebnisse

Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszumerzen, wurde wie schon beschrieben zunächst die Transfektion optimiert. Um jedoch zusätzliche Einflüsse auszuschalten, wurde folgende Überlegung angestellt: Wenn alle transfizierten Zellen aussortiert werden, entsteht eine Reinkultur EGFP-positiver Zellen. Wenn diese Reinkulturen jeweils aufgeteilt und weiterkultiviert werden, ist die Anzahl der Zellen, die den Vektor instabil exprimieren, statistisch gleich verteilt. So wurde eine Hälfte mit 1 µg Doxycyclin/ml Medium und die andere Hälfte ohne Doxycyclin weiterkultiviert. Da durch Aussortieren der Zellen eine Reinkultur entstanden war, ist die Transfektionseffizienz für die folgenden Ergebnisse nicht mehr von Bedeutung. Es zeigte sich jedoch wie oben schon beschrieben eine starke Abnahme der EGFP-positiven Zellen im untersuchten Zeitraum. Da dies jedoch in allen Proben gleich verteilt sein sollte, ist dieser Faktor ohne Bedeutung. Diese starke Abnahme positiver, das heißt das Konstrukt exprimierender Zellen ist zum einen auf den fehlenden Selektionsvorteil zurückzuführen, der nicht im Design der Vektoren vorgesehen war, zum anderen auch auf die plasmidale Form der transfizierten AAV-Konstrukte. Von Samulski wurde zwar auch die plasmidale Form der AAV-Partikel als infektiös beschrieben, jedoch in wesentlich geringerem Maße (Samulski *et al.*, 1983). Dieser Effekt war also durchaus zu erwarten.

Wie im Ergebnisteil schon beschrieben wurde, zeigt von allen transfizierten Konstrukten nur pAC1 ein zunehmende Regulierbarkeit in der Langzeitbeobachtung über sechs Wochen. Es wurde in der Literatur schon beschrieben, daß eine effiziente Regulierbarkeit erst nach einer längeren Zeitspanne oder bei stabil transfizierten Zellen zu beobachten war (Yin *et al.*, 1996). Dies läßt sich damit begründen, daß bei stabilen Zellen die beiden Komponenten des Tet-Systems Transaktivator und Reporter in geringerer Menge und in genau dem gleichen und fixierten Verhältnis in den Zellen vorliegen. Unter anderem deshalb wurden Regulationsversuche fast ausschließlich an stabil transfizierten oder viral infizierten Zellen durchgeführt. Allerdings kann von der Dauer der Expression in den hier vorgestellten Versuchen noch nicht auf eine stabile Transfektion der Zellen geschlossen werden. Es bleibt für dieses Konstrukt festzuhalten, daß nach 6 Wochen eine Regulierbarkeit der EGFP-Expression um den Faktor 100 in Rattenschwanzzellen und um Faktor 56 in HeLa-Zellen erzielt wurde. Damit liegt die Regulierbarkeit dieses Konstruktes weit über dem geforderten minimalen Wert von 10-facher Regulierbarkeit. Dieser Vektor kann also als ein effizient regulierbarer Gentherapievektor bezeichnet werden. Als zweiter wichtiger Punkt ist noch die Hintergrundaktivität dieses Vektors zu betrachten. Es konnte für pAC1 eine Abnahme der Hintergrundaktivität um das 10-fache gezeigt werden. Damit ist auch hier ein wichtiges

Charakteristikum eines Gentherapievektors erfüllt. Insgesamt kann damit gesagt werden, daß nur der Vektor pAC1 in den Langzeitversuchen das Verhalten zeigt, das unter strengen Maßstäben für einen effizient regulierbaren Gentherapievektor zu fordern ist. Abschließend kann noch angemerkt werden, daß die vorliegenden Ergebnisse mit viraler Infektion sowohl in vitro als auch durch stereotaktische Injektion in den Globus pallidus der Ratte in vivo bestätigt werden konnten (Chtarto, **Bender** et al., in Druck).

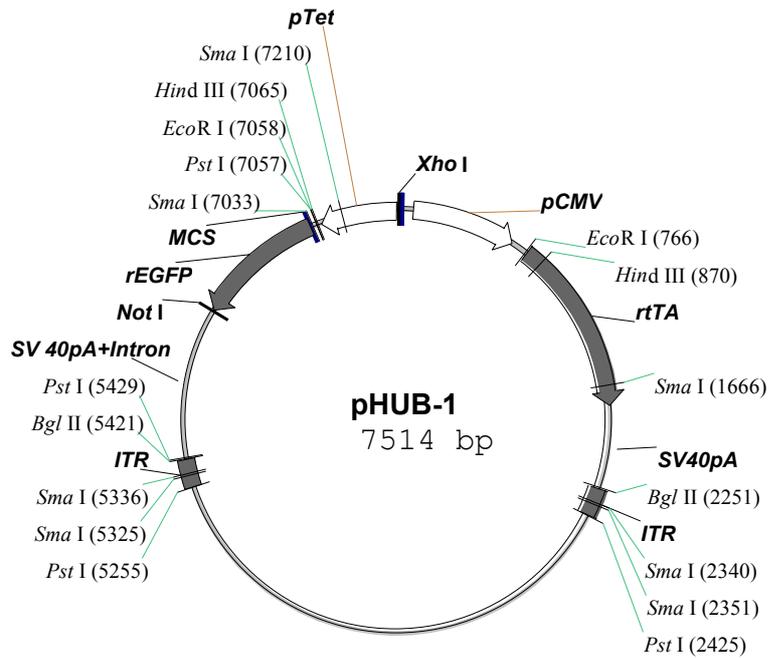
6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Gentherapievektorkonstrukte an Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen *in vitro* getestet. Die Konstrukte stellen Einkassettenvektoren dar, die *EGFP* als Detektionsgen unter der Kontrolle des tetracyclinregulierbaren Tet-On- bzw. Tet-Off-Systems exprimieren. Es wurde jeweils ein Tet-On- und ein Tet-Off-Konstrukt mit nicht gewebespezifischem Promotor verwendet, ein Konstrukt enthielt ein bidirektionales tetracyclinresponsives Expressionssystem. Mit diesen Vektoren wurde die Regulierbarkeit des Systems geprüft. Außerdem wurde jeweils ein Tet-On- und ein Tet-Off-Konstrukt mit schwanzellspezifischem Myelinprotein P₀-Promotor hergestellt, um eine Zellspezifität der Konstrukte zu erreichen. Alle Konstrukte basieren auf dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) als Vektor. Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen wurden mit diesen Vektorkonstrukten transfiziert und mittels FACS bezüglich ihrer EGFP-Expression sortiert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Einkassetten-Vektorkonstrukte sowohl im Tet-On System als auch im Tet-Off System signifikant durch Tetracyclingabe reguliert werden können. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die konstruierten schwanzellspezifischen Konstrukte in Schwanzzellen signifikant stärker exprimiert werden als in HeLa-Zellen. Dennoch konnten alle Konstrukte die selbst gesetzte Anforderung von mindestens zehnfacher Regulierbarkeit in einem kurzen Beobachtungszeitraum nicht erfüllen und zeigten durchweg eine Hintergrundaktivität des Systems in allen Konstrukten. In Langzeitexperimenten über einen Zeitraum von sechs Wochen wies nur das Konstrukt pAC1 (mit bidirektionalem Promotor) eine bis zu 100-fache Regulierbarkeit in Schwanzzellen und eine Hintergrundaktivität von weniger als 1% auf. Die Ergebnisse zeigen, daß AAV-Einkassettenvektoren in Schwanzzellen prinzipiell verwendbar sind, daß diese Einkassettenvektoren durch Tetracyclin signifikant regulierbar sind und daß Zellspezifität eines Gentherapievektors durch Einfügen zelltypenspezifischer Promotoren möglich ist.

7 Karten und Sequenzen

7.1 pHUB-1

7.1.1 Vektorkarte



7.1.2 Sequenz

XhoI
~~~~~

|     |            |             |            |             |            |
|-----|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 1   | TCGAGGAGCT | TGGCCCATTTG | CATACGTTGT | ATCCATATCA  | TAATATGTAC |
|     | AGCTCCTCGA | ACCGGGTAAC  | GTATGCAACA | TAGGTATAGT  | ATTATACATG |
| 51  | ATTTATATTG | GTCATGTCC   | AACATTACCG | CCATGTTGAC  | ATTGATTATT |
|     | TAAATATAAC | CGAGTACAGG  | TTGTAATGGC | GGTACAACCTG | TAACTAATAA |
| 101 | GACTAGTTAT | TAATAGTAAT  | CAATTACGGG | GTCATTAGTT  | CATAGCCCAT |
|     | CTGATCAATA | ATTATCATT   | GTTAATGCC  | CAGTAATCAA  | GTATCGGGTA |
| 151 | ATATGGAGTT | CCGCGTTACA  | TAACTTACGG | TAAATGGCCC  | GCCTGGCTGA |
|     | TATACCTCAA | GGCGCAATGT  | ATTGAATGCC | ATTTACCGGG  | CGGACCGACT |
| 201 | CCGCCCAACG | ACCCCCGCCC  | ATTGACGTCA | ATAATGACGT  | ATGTTCCCAT |
|     | GGCGGGTTGC | TGGGGGCGGG  | TAACTGCAGT | TATTACTGCA  | TACAAGGGTA |
| 251 | AGTAACGCCA | ATAGGGACTT  | TCCATTGACG | TCAATGGGTG  | GAGTATTTAC |

|      |                          |                           |                          |                          |                           |
|------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|      | TCATTGCGGT               | TATCCCTGAA                | AGGTAAGTGC               | AGTTACCCAC               | CTCATAAATG                |
| 301  | GCTAAACTGC<br>CGATTTGACG | CCACTTGGCA<br>GGTGAACCGT  | GTACATCAAG<br>CATGTAGTTC | TGTATCATAT<br>ACATAGTATA | GCCAAGTACG<br>CGGTTTCATGC |
| 351  | CCCCCTATTG<br>GGGGGATAAC | ACGTCAATGA<br>TGCAGTTACT  | CGGTAAATGG<br>GCCATTTACC | CCCGCCTGGC<br>GGGCGGACCG | ATTATGCCCA<br>TAATACGGGT  |
| 401  | GTACATGACC<br>CATGTACTGG | TTATGGGACT<br>AATACCCTGA  | TTCCTACTTG<br>AAGGATGAAC | GCAGTACATC<br>CGTCATGTAG | TACGTATTAG<br>ATGCATAATC  |
| 451  | TCATCGCTAT<br>AGTAGCGATA | TACCATGGTG<br>ATGGTACCAC  | ATGCGGTTTT<br>TACGCCAAAA | GGCAGTACAT<br>CCGTCATGTA | CAATGGGCGT<br>GTTACCCGCA  |
| 501  | GGATAGCGGT<br>CCTATCGCCA | TTGACTCACG<br>AACTGAGTGC  | GGGATTTCCA<br>CCCTAAAGGT | AGTCTCCACC<br>TCAGAGGTGG | CCATTGACGT<br>GGTAACTGCA  |
| 551  | CAATGGGAGT<br>GTTACCCTCA | TTGTTTTGGC<br>AACAAAACCG  | ACCAAAATCA<br>TGTTTTTAGT | ACGGGACTTT<br>TGCCCTGAAA | CCAAAATGTC<br>GGTTTTACAG  |
| 601  | GTAACAATC<br>CATTGTTGAG  | CGCCCCATTG<br>GCGGGGTAAC  | ACGCAAATGG<br>TGCGTTTACC | GCGGTAGGCG<br>CGCCATCCGC | TGTACGGTGG<br>ACATGCCACC  |
| 651  | GAGGTCTATA<br>CTCCAGATAT | TAAGCAGAGC<br>ATTCGTCTCG  | TCGTTTTAGT<br>AGCAAATCAC | AACCGTCAGA<br>TTGGCAGTCT | TCGCCTGGAG<br>AGCGGACCTC  |
| 701  | ACGCCATCCA<br>TGCGGTAGGT | CGCTGTTTTG<br>GCGACAAAAC  | ACCTCCATAG<br>TGGAGGTATC | AAGACACCGG<br>TTCTGTGGCC | GACCGATCCA<br>CTGGCTAGGT  |
|      |                          | EcoRI<br>~~~~~            |                          |                          |                           |
| 751  | GCCTCCGCGG<br>CGGAGGCGCC | CCCCGAATTC<br>GGGGCTTAAG  | ATATGTCTAG<br>TATACAGATC | ATTAGATAAA<br>TAATCTATTT | AGTAAAGTGA<br>TCATTTCACT  |
| 801  | TTAACAGCGC<br>AATTGTCGCG | ATTAGAGCTG<br>TAATCTCGAC  | CTTAATGAGG<br>GAATTACTCC | TCGGAATCGA<br>AGCCTTAGCT | AGGTTTAAACA<br>TCCAAATTGT |
|      |                          | HindIII<br>~~~~~          |                          |                          |                           |
| 851  | ACCCGTAAAC<br>TGGGCATTTG | TCGCCCAGAA<br>AGCGGGTCTT  | GCTTGGTGTA<br>CGAACACAT  | GAGCAGCCTA<br>CTCGTCGGAT | CACTGTATTG<br>GTGACATAAC  |
| 901  | GCATGTAAAA<br>CGTACATTTT | AATAAGCGGG<br>TTATTCGCCC  | CTTTGCTCGA<br>GAAACGAGCT | CGCCTTAGCC<br>GCGGAATCGG | ATTGAGATGT<br>TAACTCTACA  |
| 951  | TAGATAGGCA<br>ATCTATCCGT | CCATACTCAC<br>GGTATGAGTG  | TTTTGCCCCT<br>AAAACGGGAA | TAAAAGGGGA<br>ATTTTCCCCT | AAGCTGGCAA<br>TTCGACCGTT  |
| 1001 | GATTTTTTAC<br>CTAAAAAATG | GCAATAACGC<br>CGTTATTGCG  | TAAAAGTTTT<br>ATTTTCAAAA | AGATGTGCTT<br>TCTACACGAA | TACTAAGTCA<br>ATGATTCAGT  |
| 1051 | TCGCAATGGA<br>AGCGTTACCT | GCAAAAGTAC<br>CGTTTTTCATG | ATTCAGATAC<br>TAAGTCTATG | ACGGCCTACA<br>TGCCGGATGT | GAAAAACAGT<br>CTTTTTTGTC  |
| 1101 | ATGAAACTCT<br>TACTTTGAGA | CGAAAATCAA<br>GCTTTTAGTT  | TTAGCCTTTT<br>AATCGGAAAA | TATGCCAACA<br>ATACGGTTGT | AGGTTTTTCA<br>TCCAAAAAGT  |
| 1151 | CTAGAGAACG<br>GATCTCTTGC | CGTTATATGC<br>GCAATATACG  | ACTCAGCGCT<br>TGAGTCGCGA | GTGGGGCATT<br>CACCCCGTAA | TTACTTTAGG<br>AATGAAATCC  |

|      |                           |                           |                          |                           |                           |
|------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1201 | TTGCGTATTG<br>AACGCATAAC  | GAAGATCAAG<br>CTTCTAGTTC  | AGCATCAAGT<br>TCGTAGTTCA | CGCTAAAGAA<br>GCGATTTCTT  | GAAAGGGAAA<br>CTTTCCCTTT  |
| 1251 | CACCTACTAC<br>GTGGATGATG  | TGATAGTATG<br>ACTATCATAAC | CCGCCATTAT<br>GGCGGTAATA | TACGACAAGC<br>ATGCTGTTTCG | TATCGAATTA<br>ATAGCTTAAT  |
| 1301 | TTTGATCACC<br>AAACTAGTGG  | AAGGTGCAGA<br>TTCCACGTCT  | GCCAGCCTTC<br>CGGTCGGAAG | TTATTCGGCC<br>AATAAGCCGG  | TTGAATTGAT<br>AACTTAACTA  |
| 1351 | CATATGCGGA<br>GTATACGCCT  | TTAGAAAAAC<br>AATCTTTTTG  | AACTTAAATG<br>TTGAATTTAC | TGAAAGTGGG<br>ACTTTCACCC  | TCCGCGTACA<br>AGGCGCATGT  |
| 1401 | GCCGCGCGCG<br>CGGCGCGCGC  | TACGAAAAAC<br>ATGCTTTTTG  | AATTACGGGT<br>TTAATGCCCA | CTACCATCGA<br>GATGGTAGCT  | GGGCTGCTC<br>CCCGGACGAG   |
| 1451 | GATCTCCCGG<br>CTAGAGGGCC  | ACGACGACGC<br>TGCTGCTGCG  | CCCCGAAGAG<br>GGGGCTTCTC | GCGGGGCTGG<br>CGCCCCGACC  | CGGCTCCGCG<br>GCCGAGGCGC  |
| 1501 | CCTGTCCTTT<br>GGACAGGAAA  | CTCCCCGCGG<br>GAGGGGCGCC  | GACACACGCG<br>CTGTGTGCGC | CAGACTGTCTG<br>GTCTGACAGC | ACGGCCCCCC<br>TGCCGGGGGG  |
| 1551 | CGACCGATGT<br>GCTGGCTACA  | CAGCCTGGGG<br>GTCGGACCCC  | GACGAGCTCC<br>CTGCTCGAGG | ACTTAGACGG<br>TGAATCTGCC  | CGAGGACGTG<br>GCTCCTGCAC  |
| 1601 | GCGATGGCGC<br>CGCTACCGCG  | ATGCCGACGC<br>TACGGCTGCG  | GCTAGACGAT<br>CGATCTGCTA | TTCGATCTGG<br>AAGCTAGACC  | ACATGTTGGG<br>TGTACAACCC  |
|      |                           | SmaI<br>~~~~~             |                          |                           |                           |
| 1651 | GGACGGGGAT<br>CCTGCCCTTA  | TCCCCGGGTC<br>AGGGGCCAG   | CGGGATTTAC<br>GCCCTAAATG | CCCCCACGAC<br>GGGGGTGCTG  | TCCGCCCCCT<br>AGGCGGGGGA  |
| 1701 | ACGGCGCTCT<br>TGCCCGGAGA  | GGATATGGCC<br>CCTATACCGG  | GACTTCGAGT<br>CTGAAGCTCA | TTGAGCAGAT<br>AACTCGTCTA  | GTTTACCGAT<br>CAAATGGCTA  |
| 1751 | GCCCTTGGA<br>CGGGAACCTT   | TTGACGAGTA<br>AACTGCTCAT  | CGGTGGGTAG<br>GCCACCCATC | GGGGCGCGAG<br>CCCCGCGCTC  | GATCCAGACA<br>CTAGGTCTGT  |
| 1801 | TGATAAGATA<br>ACTATTCTAT  | CATTGATGAG<br>GTAACACTC   | TTTGGACAAA<br>AAACCTGTTT | CCACAAC TAG<br>GGTGTGATC  | AATGCAGTGA<br>TTACGCTACT  |
| 1851 | AAAAAATGCT<br>TTTTTTACGA  | TTATTTGTGA<br>AATAAACACT  | AATTTGTGAT<br>TTAAACACTA | GCTATTGCTT<br>CGATAACGAA  | TATTTGTAAC<br>ATAAACATTG  |
| 1901 | CATTATAAGC<br>GTAATATTTCG | TGCAATAAAC<br>ACGTTATTTG  | AAGTTAACAA<br>TTCAATTGTT | CAACAATTGC<br>GTTGTTAACG  | ATTCATTTTA<br>TAAGTAAAAT  |
| 1951 | TGTTTCAGGT<br>ACAAAGTCCA  | TCAGGGGGAG<br>AGTCCCCCTC  | GTGTGGGAGG<br>CACACCCTCC | TTTTTTAAAG<br>AAAAAATTTT  | CAAGTAAAAC<br>GTTTCAATTTG |
| 2001 | CTCTACAAAT<br>GAGATGTTTA  | GTGGTATGGC<br>CACCATAACCG | TGATTATGAT<br>ACTAATACTA | CCTGCAAGCC<br>GGACGTTTCGG | TCGTCGTCTG<br>AGCAGCAGAC  |
| 2051 | GCCGGACCAC<br>CGGCCTGGTG  | GCTATCTGTG<br>CGATAGACAC  | CAAGGTCCCC<br>GTTCCAGGGG | GGACGCGCGC<br>CCTGCGCGCG  | TCCATGAGCA<br>AGGTACTCGT  |
| 2101 | GAGCGCCCCG<br>CTCGCGGGCG  | CGCCGAGGCA<br>GCGGCTCCGT  | AGACTCGGGC<br>TCTGAGCCCG | GGCGCCCTGC<br>CCGCGGGACG  | CCGTCCCACC<br>GGCAGGGTGG  |

2151 AGGTCAACAG GCGGTAACCG GCCTCTTCAT CGGGAATGCG CGCGACCTTC  
TCCAGTTGTC CGCCATTGGC CGGAGAAGTA GCCCTTACGC GCGCTGGAAG

BglII  
~

2201 AGCATCGCCG GCATGTCCCC TGGCGGACGG GAAGTATCAG CTCGACCACA  
TCGTAGCGGC CGTACAGGGG ACCGCCTGCC CTTCATAGTC GAGCTGGTGT

BglII  
~~~~~

2251 GATCTGGCCG CGCGCGCGCG CGCAGGAACC CCTAGTGATG GAGTTGGCCA
CTAGACCGGC GCGCGCGCGC GCGTCCTTGG GGATCACTAC CTCAACCGGT

SmaI SmaI
~~~~~            ~~~

2301 CTCCCTCTCT GCGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCCC GGC AAAGCCC  
GAGGGAGAGA CGCGCGAGCG AGCGAGTGAC TCCGGCGGGC CCGTTTCGGG

SmaI  
~~~~

2351 GGGCGTCGGG CGACCTTTGG TCGCCCGGCC TCAGTGAGCG AGCGAGCGCG
CCCGCAGCCC GCTGGAAACC AGCGGGCCGG AGTCACTCGC TCGCTCGCGC

PstI
~~~~~

2401 CAGAGAGGGA GTGGCCAAGC TGCAGCCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC  
GTCTCTCCCT CACCGGTTTCG ACGTCGGACG TAATTACTTA GCCGGTTGCG

2451 GCGGGGAGAG GCGGTTTTCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC  
CGCCCTCTC CGCCAAACGC ATAACCCGCG AGAAGGCGAA GGAGCGAGTG

2501 TGA CTGCTG CGCTCGGTTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT  
ACTGAGCGAC GCGAGCCAGC AAGCCGACGC CGCTCGCCAT AGTCGAGTGA

2551 CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG  
GTTTCCGCCA TTATGCCAAT AGGTGTCTTA GTCCCCTATT GCGTCCTTTC

2601 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC  
TTGTACTACT GTTTTCCGGT CGTTTTCCGG TCCTTGGCAT TTTTCCGGCG

2651 GTTGCTGGCG TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA  
CAACGACCGC AAAAAGGTAT CCGAGGCGGG GGGACTGCTC GTAGTGTTTT

2701 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC  
TAGCTGCGAG TTCAGTCTCC ACCGCTTTGG GCTGTCCTGA TATTTCTATG

2751 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT  
GTCCGCAAAG GGGGACCTTC GAGGGAGCAC GCGAGAGGAC AAGGCTGGGA

2801 GCCGTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC  
CGGCGAATGG CCTATGGACA GCGGAAAGA GGAAGCCCT TCGCACC GCG

2851 TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCGC  
AAAGAGTTAC GAGTGCGACA TCCATAGAGT CAAGCCACAT CCAGCAAGCG

2901 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCC ACCGCTGCGC  
AGGTTTCGACC CGACACACGT GCTTGGGGGG CAAGTCGGGC TGGCGACGCG

2951 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT  
GAATAGGCCA TTGATAGCAG AACTCAGGTT GGGCCATTCT GTGCTGAATA  
3001 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA  
GCGGTGACCG TCGTCGGTGA CCATTGTCCT AATCGTCTCG CTCCATACAT  
3051 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG  
CCGCCACGAT GTCTCAAGAA CTTACCACC GGATTGATGC CGATGTGATC  
3101 AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA  
TTCCTGTCAT AAACCATAGA CGCGAGACGA CTTCCGGTCAA TGGAAGCCTT  
3151 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT  
TTTCTCAACC ATCGAGAACT AGGCCGTTT TTTGGTGGCG ACCATCGCCA  
3201 GGTTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA  
CCAAAAAAC AAACGTTTCGT CGTCTAATGC GCGTCTTTTT TTCTTAGAGT  
3251 AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGAACGAAA  
TCTTCTAGGA AACTAGAAAA GATGCCCCAG ACTGCGAGTC ACCTTGCTTT  
3301 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC  
TGAGTGCAAT TCCCTAAAAC CAGTACTCTA ATAGTTTTTC CTAGAAGTGG  
3351 TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA  
ATCTAGAAA ATTTAATTTT TACTTCAAAA TTTAGTTAGA TTTCATATAT  
3401 TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA  
ACTCATTGTA ACCAGACTGT CAATGGTTAC GAATTAGTCA CTCCGTGGAT  
3451 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC  
AGAGTCGCTA GACAGATAAA GCAAGTAGGT ATCAACGGAC TGAGGGGCG  
3501 GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC  
CACATCTATT GATGCTATGC CCTCCCGAAT GGTAGACCGG GGTACGACG  
3551 AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA  
TTACTATGGC GCTCTGGGTG CGAGTGGCCG AGGTCTAAAT AGTCGTTATT  
3601 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTCTG AACTTTATCC  
TGGTCGGTTCG GCCTTCCCGG CTCGCGTCTT CACCAGGACG TTGAAATAGG  
3651 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC  
CGGAGGTAGG TCAGATAATT AACAAACGGC CTTTCGATCTC ATTCATCAAG  
3701 GCCAGTTAAT AGTTTGCACA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG  
CGGTCAATTA TCAAACGCGT TGCAACAACG GTAACGATGT CCGTAGCACC  
3751 TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA  
ACAGTGCAGAG CAGCAAACCA TACCGAAGTA AGTCGAGGCC AAGGGTTGCT  
3801 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC  
AGTTCGCTC AATGTACTAG GGGGTACAAC ACGTTTTTTT GCCAATCGAG  
3851 CTTCCGGTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC  
GAAGCCAGGA GGCTAGCAAC AGTCTTCATT CAACCGGCGT CACAATAGTG  
3901 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAAGTGCAT GCCATCCGTA  
AGTACCAATA CCGTCGTGAC GTATTAAGAG AATGACAGTA CCGTAGGCAT

3951 AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA  
TCTACGAAAA GACACTGACC ACTCATGAGT TGGTTCAGTA AGACTCTTAT  
4001 GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA  
CACATACGCC GCTGGCTCAA CGAGAACGGG CCGCAGTTAT GCCCTATTAT  
4051 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT  
GGCGCGGTGT ATCGTCTTGA AATTTTCACG AGTAGTAACC TTTTGCAAGA  
4101 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT  
AGCCCCGCTT TTGAGAGTTC CTAGAATGGC GACAACCTTA GGTCAAGCTA  
4151 GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA  
CATTGGGTGA GCACGTGGGT TGACTAGAAG TCGTAGAAAA TGAAAGTGGT  
4201 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA  
CGCAAAGACC CACTCGTTTT TGTCTTCCG TTTTACGGCG TTTTTTCCCT  
4251 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCAATA  
TATTCGCT GTGCCTTTAC AACTTATGAG TATGAGAAGG AAAAAGTTAT  
4301 TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG  
AATAACTTCG TAAATAGTCC CAATAACAGA GTACTCGCCT ATGTATAAAC  
4351 AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA  
TTACATAAAT CTTTTTATTT GTTTATCCCC AAGGCGCGTG TAAAGGGGCT  
4401 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA  
TTTCACGGTG GACTGCAGAT TCTTTGGTAA TAATAGTACT GTAATTGGAT  
4451 TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTCGCGCGT TTCGGTGATG  
ATTTTTATCC GCATAGTGCT CCGGGAAAGC AGAGCGCGCA AAGCCACTAC  
4501 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT  
TGCCACTTTT GGAGACTGTG TACGTCGAGG GCCTCTGCCA GTGTCGAACA  
4551 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG  
GACATTCGCC TACGGCCCTC GTCTGTTTCGG GCAGTCCCGC GCAGTCGCCC  
4601 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCT GGCTTAACTA TGCGGCATCA GAGCAGATTG  
ACAACCGCCC ACAGCCCCGA CCGAATTGAT ACGCCGTAGT CTCGTCTAAC  
4651 TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG  
ATGACTCTCA CGTGGTATAC GCCACACTTT ATGGCGTGTC TACGCATTCC  
4701 AGAAAATACC GCATCAGGCG ACGCGCCCTG TAGCGGCGCA TTAAGCGCGG  
TCTTTTATGG CGTAGTCCGC TGCAGGGGAC ATCGCCGCGT AATTCGCGCC  
4751 CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG CTACACTTGC CAGCGCCCTA  
GCCACACCA CCAATGCGCG TCGCACTGGC GATGTGAACG GTCGCGGGAT  
4801 GCGCCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTTCC TTTCTCGCCA CGTTCGCCGG  
CGCGGGCGAG GAAAGCGAAA GAAGGGAAGG AAAGAGCGGT GCAAGCGGCC  
4851 CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA  
GAAAGGGGCA GTTCGAGATT TAGCCCCCGA GGGAAATCCC AAGGCTAAAT  
4901 GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG TGATGGTTCA

CACGAAATGC CGTGGAGCTG GGGTTTTTTTG AACTAATCCC ACTACCAAGT  
4951 CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCGCCCTT TGACGTTGGA  
GCATCACCCG GTAGCGGGAC TATCTGCCAA AAAGCGGGAA ACTGCAACCT  
5001 GTCCACGTTT TTTAATAGTG GACTCTTGTT CCAAACCTGGA ACAACACTCA  
CAGGTGCAAG AAATTATCAC CTGAGAACAA GGTTCGACCT TGTTGTGAGT  
5051 ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT AAGGGATTTT GCCGATTTTCG  
TGGGATAGAG CCAGATAAGA AAATAAATA TTCCCTAAAA CGGCTAAAGC  
5101 GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAAAATTTA ACGCGAATTT  
CGGATAACCA ATTTTTTACT CGACTAAATT GTTTTTTAAAT TGCCTTAAA  
5151 TAACAAAATA TTAACGTTTA CAATTTTCGCC ATTCGCCATT CAGGCTACGC  
ATTGTTTTAT AATTGCAAT GTTAAAGCGG TAAGCGGTAA GTCCGATGCG  
  
PstI  
~  
5201 AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT TACGCCAGGC  
TTGACAACCC TTCCCCTAG CCACGCCCGG AGAAGCGATA ATGCGGTCCG  
  
PstI  
~~~~~  
5251 TGCAGCTTGG CCACTCCCTC TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGG
ACGTCGAACC GGTGAGGGAG AGACGCGCGA GCGAGCGAGT GACTCCGGCC

SmaI SmaI
~~~~~ ~~~~~  
5301 GCGACCAAAG GTCGCCCGAC GCCCGGGCTT TGCCCGGGCG GCCTCAGTGA  
CGCTGGTTTC CAGCGGGCTG CGGGCCCGAA ACGGGCCCGC CGGAGTCACT  
5351 GCGAGCGAGC GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC  
CGCTCGCTCG CGCGTCTCTC CCTCACCGGT TGAGGTAGTG ATCCCCAAGG  
  
PstI  
~~~~~  
BglII
~~~~~  
5401 TGC GCGCGCGC CGCGCGGCCA GATCTGCAGA CATGATAAGA TACATTGATG  
ACGCGCGCGC GCGCGCCGGT CTAGACGTCT GTACTATTCT ATGTAACTAC  
5451 AGTTTGGACA AACCACAAC TGAATGCAGT GAAAAAATG CTTTATTTGT  
TCAAACCTGT TTGGTGTGA TCTTACGTCA CTTTTTTTAC GAAATAACA  
5501 GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA  
CTTTAAACAC TACGATAACG AAATAAACAT TGGTAATATT CGACGTTATT  
5551 ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG  
TGTTCAATTG TTGTTGTTAA CGTAAGTAAA ATACAAAGTC CAAGTCCCCC  
5601 AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA ACCTCTACAA ATGTGGTATG  
TCCACACCCT CAAAAAATT TCGTTTCAATTT TGGAGATGTT TACACCATAC  
5651 GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT ACATCAAATA TTCCTTATTA  
CGACTAATAC TAGAGATCAG TTCCGTGATA TGTAGTTTAT AAGGAATAAT  
5701 ACCCCTTTAC AAATTAATAA GCTAAAGGTA CACAATTTTT GAGCATAGTT  
TGGGGAAATG TTTAATTTTT CGATTTCCAT GTGTTAAAAA CTCGTATCAA

|               |                           |                          |                          |                            |                          |
|---------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 5751          | ATTAATAGCA<br>TAATTATCGT  | GACACTCTAT<br>CTGTGAGATA | GCCTGTGTGG<br>CGGACACACC | AGTAAGAAAA<br>TCATTCTTTT   | AACAGTATGT<br>TTGTCATACA |
| 5801          | TATGATTATA<br>ATACTAATAT  | ACTGTTATGC<br>TGACAATACG | CTACTTATAA<br>GATGAATATT | AGGTTACAGA<br>TCCAATGTCT   | ATATTTTTCC<br>TATAAAAAGG |
| 5851          | ATAATTTTCT<br>TATTAAGAAG  | TGTATAGCAG<br>ACATATCGTC | TGCAGCTTTT<br>ACGTCGAAAA | TCCTTTGTGG<br>AGGAAACACC   | TGTAAATAGC<br>ACATTTATCG |
| 5901          | AAAGCAAGCA<br>TTTCGTTTCGT | AGAGTTCTAT<br>TCTCAAGATA | TACTAAACAC<br>ATGATTTGTG | AGCATGACTC<br>TCGTACTGAG   | AAAAAACTTA<br>TTTTTTGAAT |
| 5951          | GCAATTCTGA<br>CGTTAAGACT  | AGGAAAGTCC<br>TCCTTTCAGG | TTGGGGTCTT<br>AACCCCAGAA | CTACCTTTCT<br>GATGGAAAGA   | CTTCTTTTTT<br>GAAGAAAAAA |
| 6001          | GGAGGAGTAG<br>CCTCCTCATC  | AATGTTGAGA<br>TTACAACCTC | GTCAGCAGTA<br>CAGTCGTCAT | GCCTCATCAT<br>CGGAGTAGTA   | CACTAGATGG<br>GTGATCTACC |
| 6051          | CATTTCTTCT<br>GTAAAGAAGA  | GAGCAAAACA<br>CTCGTTTTGT | GGTTTTCTTC<br>CCAAAAGGAG | ATTAAAGGCA<br>TAATTTCCGT   | TTCCACCACT<br>AAGGTGGTGA |
| 6101          | GCTCCCATTC<br>CGAGGGTAAAG | ATCAGTTCCA<br>TAGTCAAGGT | TAGGTTGGAA<br>ATCCAACCTT | TCTAAAATAC<br>AGATTTTATG   | ACAAACAATT<br>TGTTTGTTAA |
| 6151          | AGAATCAGTA<br>TCTTAGTCAT  | GTTTAACACA<br>CAAATTGTGT | TTATACACTT<br>AATATGTGAA | AAAAATTTTA<br>TTTTTAAAT    | TATTTACCTT<br>ATAAATGGAA |
| 6201          | AGAGCTTTAA<br>TCTCGAAATT  | ATCTCTGTAG<br>TAGAGACATC | GTAGTTTGTC<br>CATCAAACAG | CAATTATGTC<br>GTTAATACAG   | ACACCACAGA<br>TGTGGTGTCT |
| NotI<br>~~~~~ |                           |                          |                          |                            |                          |
| 6251          | AGTAAGGTTT<br>TCATTCCAAG  | CTTCACAAAG<br>GAAGTGTTTC | ATCCTCTAGA<br>TAGGAGATCT | GTCGCGGCCG<br>CAGCGCCGGC   | CTTTACTTGT<br>GAAATGAACA |
| 6301          | ACAGCTCGTC<br>TGTCGAGCAG  | CATGCCGAGA<br>GTACGGCTCT | GTGATCCCGG<br>CACTAGGGCC | CGGCGGTCAC<br>GCCGCCAGTG   | GAACTCCAGC<br>CTTGAGGTCG |
| 6351          | AGGACCATGT<br>TCCTGGTACA  | GATCGCGCTT<br>CTAGCGCGAA | CTCGTTGGGG<br>GAGCAACCCC | TCTTTGCTCA<br>AGAAACGAGT   | GGGCGGACTG<br>CCCCTGAC   |
| 6401          | GGTGCTCAGG<br>CCACGAGTCC  | TAGTGGTTGT<br>ATCACCAACA | CGGGCAGCAG<br>GCCCGTCGTC | CACGGGGCCG<br>GTGCCCCGGC   | TCGCCGATGG<br>AGCGGCTACC |
| 6451          | GGGTGTTCTG<br>CCCACAAGAC  | CTGGTAGTGG<br>GACCATCACC | TCGGCGAGCT<br>AGCCGCTCGA | GCACGCTGCC<br>CGTGCGACGG   | GTCCTCGATG<br>CAGGAGCTAC |
| 6501          | TTGTGGCGGA<br>AACACCGCCT  | TCTTGAAGTT<br>AGAACTTCAA | CACCTTGATG<br>GTGGAACTAC | CCGTTCTTCT<br>GGCAAGAAGA   | GCTTGTCGGC<br>CGAACAGCCG |
| 6551          | CATGATATAG<br>GTACTATATC  | ACGTTGTGGC<br>TGCAACACCG | TGTTGTAGTT<br>ACAACATCAA | GTACTIONCAGC<br>CATGAGGTCG | TTGTGCCCA<br>AACACGGGGT  |
| 6601          | GGATGTTGCC<br>CCTACAACGG  | GTCCTCCTTG<br>CAGGAGGAAC | AAGTCGATGC<br>TTCAGCTACG | CCTTCAGCTC<br>GGAAGTCGAG   | GATGCGGTTT<br>CTACGCCAAG |
| 6651          | ACCAGGGTGT<br>TGGTCCCACA  | CGCCCTCGAA<br>GCGGGAGCTT | CTTACCTCG<br>GAAGTGGAGC  | GCGCGGGTCT<br>CGCGCCCAGA   | TGTAGTTGCC<br>ACATCAACGG |

6701 GTCGTCCTTG AAGAAGATGG TGCCTCCTG GACGTAGCCT TCGGGCATGG  
CAGCAGGAAC TTCTTCTACC ACGCGAGGAC CTGCATCGGA AGCCCGTACC

6751 CGGACTTGAA GAAGTCGTGC TGCTTCATGT GGTCGGGGTA GCGGCTGAAG  
GCCTGAACTT CTTTCAGCAC ACGAAGTACA CCAGCCCCAT CGCCGACTTC

6801 CACTGCACGC CGTAGGTCAG GGTGGTCACG AGGGTGGGCC AGGGCACGGG  
GTGACGTGCG GCATCCAGTC CCACCAGTGC TCCCACCCGG TCCCGTGCCC

6851 CAGCTTGCCG GTGGTGCAGA TGAAC TTCAG GGTCAGCTTG CCGTAGGTGG  
GTCGAACGGC CACCACGTCT ACTTGAAGTC CCAGTCGAAC GGCATCCACC

6901 CATCGCCCTC GCCCTCGCCG GACACGCTGA ACTTGTGGCC GTTTACGTCG  
GTAGCGGGAG CGGGAGCGGC CTGTGCGACT TGAACACCCG CAAATGCAGC

6951 CCGTCCAGCT CGACCAGGAT GGGCACCACC CCGGTGAACA GCTCCTCGCC  
GGCAGGTGCG GCTGGTCCTA CCCGTGGTGG GGCCACTTGT CGAGGAGCGG

SmaI

~~~~~

7001 CTTGCTCACC ATGGTGGCGA CCGGTGGATC CCGGGCCCGC GGTACCGTCG
GAACGAGTGG TACCACCGCT GGCCACCTAG GGCCCGGGCG CCATGGCAGC

PstI

~~~~~

EcoRI HindIII

~~~~~

7051 ACTGCAGAAT TCGAAGCTTG CGGGGCCGCG GAGGCTGGAT CCGTCCCGGT
TGACGTCTTA AGCTTCGAAC GCCCCGGCGC CTCCGACCTA GCCAGGGCCA

7101 GTCTTCTATG GAGGTCAAAA CAGCGTGGAT GGCGTCTCCA GGCGATCTGA
CAGAAGATAC CTCCAGTTTT GTCGCACCTA CCGCAGAGGT CCGCTAGACT

7151 CGGTTCACTA AACGAGCTCT GCTTATATAG GCCTCCCACC GTACACGCCT
GCCAAGTGAT TTGCTCGAGA CGAATATATC CGGAGGGTGG CATGTGCGGA

SmaI

~~~~~

7201 ACTCGACCCG GGTACCGAGC TCGACTTTCA CTTTTCTCTA TCACTGATAG  
TGAGCTGGGC CCATGGCTCG AGCTGAAAGT GAAAAGAGAT AGTGACTATC

7251 GGAGTGGTAA ACTCGACTTT CACTTTTCTC TATCACTGAT AGGGAGTGGT  
CCTCACCATT TGAGCTGAAA GTGAAAAGAG ATAGTGACTA TCCCTCACCA

7301 AAACCTCGACT TTCACTTTTC TCTATCACTG ATAGGGAGTG GTAAACTCGA  
TTTGAGCTGA AAGTGAAAAG AGATAGTGAC TATCCCTCAC CATTTGAGCT

7351 CTTTCACTTT TCTCTATCAC TGATAGGGAG TGGTAAACTC GACTTTCACT  
GAAAGTGAAA AGAGATAGTG ACTATCCCTC ACCATTTGAG CTGAAAAGTGA

7401 TTTCTCTATC ACTGATAGGG AGTGGTAAAC TCGACTTTCA CTTTTCTCTA  
AAAGAGATAG TGACTATCCC TCACCATTTG AGCTGAAAGT GAAAAGAGAT

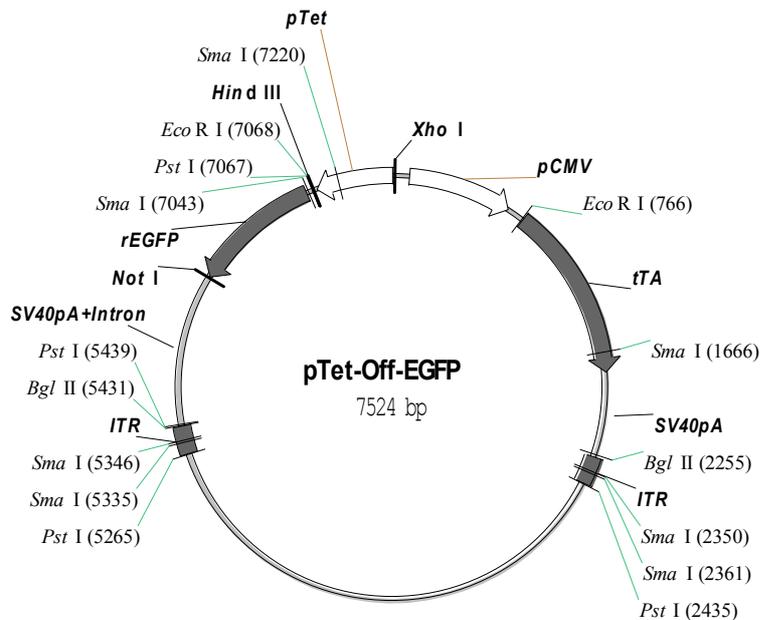
7451 TCACTGATAG GGAGTGGTAA ACTCGACTTT CACTTTTCTC TATCACTGAT  
AGTGACTATC CCTCACCATT TGAGCTGAAA GTGAAAAGAG ATAGTGACTA

XhoI

7501 AGGGAGTGGT AAAC  
TCCCTCACCA TTTG

## 7.2 pTet-Off-EGFP

### 7.2.1 Vektorkarte



### 7.2.2 Sequenz

XhoI  
~~~~~

1	TCGAGGAGCT	TGGCCCAT TG	CATACGTTGT	ATCCATATCA	TAATATGTAC
	AGCTCCTCGA	ACCGGGTAAC	GTATGCAACA	TAGGTATAGT	ATTATACATG
51	ATTTATATTG	GCTCATGTCC	AACATTACCG	CCATGTTGAC	ATTGATTATT
	TAAATATAAC	CGAGTACAGG	TTGTAATGGC	GGTACAAC TG	TAACTAATAA
101	GACTAGTTAT	TAATAGTAAT	CAATTACGGG	GTCATTAGTT	CATAGCCCAT
	CTGATCAATA	ATTATCATT A	GTTAATGCCC	CAGTAATCAA	GTATCGGGTA
151	ATATGGAGTT	CCGCGTTACA	TAACTTACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCTGA
	TATACCTCAA	GGCGCAATGT	ATTGAATGCC	ATTTACCGGG	CGGACCGACT
201	CCGCCCAACG	ACCCCCGCC	ATTGACGTCA	ATAATGACGT	ATGTTCCCAT
	GGCGGGTTGC	TGGGGGCGGG	TAACTGCAGT	TATTACTGCA	TACAAGGGTA
251	AGTAACGCCA	ATAGGGACTT	TCCATTGACG	TCAATGGGTG	GAGTATTTAC
	TCATTGCGGT	TATCCCTGAA	AGGTAACTGC	AGTTACCCAC	CTCATAAATG
301	GCTAAACTGC	CCACTTGGCA	GTACATCAAG	TGTATCATAT	GCCAAGTACG

CGATTTGACG GGTGAACCGT CATGTAGTTC ACATAGTATA CGGTTTCATGC

351 CCCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA
GGGGGATAAC TGCAGTTACT GCCATTTACC GGGCGGACCG TAATACGGGT

401 GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG
CATGTACTGG AATACCCTGA AAGGATGAAC CGTCATGTAG ATGCATAATC

451 TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT
AGTAGCGATA ATGGTACCAC TACGCCAAAA CCGTCATGTA GTTACCCGCA

501 GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT
CCTATCGCCA AACTGAGTGC CCCTAAAGGT TCAGAGGTGG GGTAAC TGCA

551 CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAAATGTC
GTTACCCTCA AACAAAACCG TGGTTTTAGT TGCCCTGAAA GGTTTTTACAG

601 GTAACAATC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG
CATTGTTGAG GCGGGGTAAC TGCGTTTACC CGCCATCCGC ACATGCCACC

651 GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCGTTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG
CTCCAGATAT ATTCGTCTCG AGCAAATCAC TTGGCAGTCT AGCGGACCTC

701 ACGCCATCCA CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA
TGCGGTAGGT GCGACAAAAC TGGAGGTATC TTCTGTGGCC CTGGCTAGGT

EcoRI
~~~~~

751 GCCTCCGCGG CCCC GAATTC ATATGTCTAG ATTAGATAAA AGTAAAGTGA  
CGGAGGCGCC GGGGCTTAAG TATACAGATC TAATCTATTT TCATTTCACT

801 TTAACAGCGC ATTAGAGCTG CTTAATGAGG TCGGAATCGA AGGTTTAAACA  
AATTGTCGCG TAATCTCGAC GAATTACTCC AGCCTTAGCT TCCAAATTGT

851 ACCCGTAAAC TCGCCAGAA GCTAGGTGTA GAGCAGCCTA CATTGTATTG  
TGGGCATTTG AGCGGGTCTT CGATCCACAT CTCGTCGGAT GTAACATAAC

901 GCATGTAAAA AATAAGCGGG CTTTGCTCGA CGCCTTAGCC ATTGAGATGT  
CGTACATTTT TTATTCGCCC GAAACGAGCT GCGGAATCGG TAACTCTACA

951 TAGATAGGCA CCATACTCAC TTTTGCCCTT TAGAAGGGGA AAGCTGGCAA  
ATCTATCCGT GGTATGAGTG AAAACGGGAA ATCTTCCCCT TTCGACCGTT

1001 GATTTTTTAC GTAATAACGC TAAAAGTTTT AGATGTGCTT TACTAAGTCA  
CTAAAAAATG CATTATTGCG ATTTTCAAAA TCTACACGAA ATGATTCAGT

1051 TCGCGATGGA GCAAAAGTAC ATTTAGGTAC ACGGCCTACA GAAAAACAGT  
AGCGCTACCT CGTTTTTCATG TAAATCCATG TGCCGGATGT CTTTTTGTCA

1101 ATGAAACTCT CGAAAATCAA TTAGCCTTTT TATGCCAACA AGGTTTTTCA  
TACTTTGAGA GCTTTTAGTT AATCGGAAAA ATACGGTTGT TCCAAAAAGT

1151 CTAGAGAATG CATTATATGC ACTCAGCGCT GTGGGGCATT TFACTTTAGG  
GATCTCTTAC GTAATATACG TGAGTCGCGA CACCCCGTAA AATGAAATCC

1201 TTGCGTATTG GAAGATCAAG AGCATCAAGT CGCTAAAGAA GAAAGGGAAA  
AACGCATAAC CTTCTAGTTC TCGTAGTTCA GCGATTTCTT CTTTCCCTTT

1251 CACCTACTAC TGATAGTATG CCGCCATTAT TACGACAAGC TATCGAATTA

GTGGATGATG ACTATCATACT GCGGTAATA ATGCTGTTTCG ATAGCTTAAT  
 1301 TTTGATCACC AAGGTGCAGA GCCAGCCTTC TTATTCGGCC TTGAATTGAT  
 AAAC TAGTGG TTCCACGTCT CGGTCGGAAG AATAAGCCGG AACTTAACTA  
 1351 CATATGCGGA TTAGAAAAAC AACTTAAATG TGAAAGTGGG TCCGCGTACA  
 GTATACGCCT AATCTTTTTG TTGAATTTAC ACTTTCACCC AGGCGCATGT  
 1401 GCCGCGCGCG TACGAAAAAC AATTACGGGT CTACCATCGA GGCCTGCTC  
 CCGCGCGCGC ATGCTTTTTG TTAATGCCCA GATGGTAGCT CCCGACGAG  
 1451 GATCTCCCGG ACGACGACGC CCCC GAAGAG GCGGGGCTGG CGGCTCCGCG  
 CTAGAGGGCC TGCTGCTGCG GGGGCTTCTC CGCCCCGACC GCCGAGGCGC  
 1501 CCTGTCCTTT CTCCCCGCGG GACACACGCG CAGACTGTTCG ACGCCCCCCC  
 GGACAGGAAA GAGGGGCGCC CTGTGTGCGC GTCTGACAGC TGCCGGGGGG  
 1551 CGACCGATGT CAGCCTGGGG GACGAGCTCC ACTTAGACGG CGAGGACGTG  
 GCTGGCTACA GTCGGACCCC CTGCTCGAGG TGAATCTGCC GCTCCTGCAC  
 1601 GCGATGGCGC ATGCCGACGC GCTAGACGAT TTCGATCTGG ACATGTTGGG  
 CGTACCGCG TACGGCTGCG CGATCTGCTA AAGCTAGACC TGTACAACCC  
  
 SmaI  
 ~~~~~  
 1651 GGACGGGGAT TCCCCGGGTC CGGGATTTAC CCCCCACGAC TCCGCCCCCT
 CCTGCCCTA AGGGGCCAG GCCCTAAATG GGGGGTGCTG AGGCGGGGGA
 1701 ACGGCGCTCT GGATATGGCC GACTTCGAGT TTGAGCAGAT GTTTACCGAT
 TGCCGCGAGA CCTATACCGG CTGAAGCTCA AACTCGTCTA CAAATGGCTA
 1751 GCCCTTGAA TTGACGAGTA CGGTGGGTAG GGGGCGCGAG GATCCAGACA
 CGGGAACCTT AACTGCTCAT GCCACCCATC CCCC GCGCTC CTAGGTCTGT
 1801 TGATAAGATA CATTGATGAG TTTGGACAAA CCACAAC TAG AATGCAGTGA
 ACTATTCTAT GTAAC TACTC AAACCTGTTT GGTGTTGATC TTACGTCACT
 1851 AAAAAATGCT TTATTTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC
 TTTTTTACGA AATAAACACT TTAAACACTA CGATAACGAA ATAAACATTG
 1901 CATTATAAGC TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA
 GTAATATTTCG ACGTTATTTG TTCAATTGTT GTTGTTAACG TAAGTAAAAT
 1951 TGTTTCAGGT TCAGGGGGAG GTGTGGGAGG TTTTTTAAAG CAAGTAAAAC
 ACAAAGTCCA AGTCCCCCTC CACACCCTCC AAAAAATTTT GTTCATTTTG
 2001 CTCTACAAAT GTGGTATGGC TGATTATGAT CCTGCAAGCC TCGTCGTCTG
 GAGATGTTTA CACCATAACG ACTAATACTA GGACGTTTCGG AGCAGCAGAC
 2051 GCCGGACCAC GCTATCTGTG CAAGGTCCCC GGACGCGCGC TCCATGAGCA
 CGGCCTGGTG CGATAGACAC GTTCCAGGGG CCTGCGCGCG AGGTACTCGT
 2101 GAGCGCCCGC CGCCGAGGCA AGACTCGGGC GGCGCCCTGC CCGTCCCACC
 CTCGCGGGCG GCGGCTCCGT TCTGAGCCCG CCGCGGGACG GGCAGGGTGG
 2151 AGGTCAACAG GCGGTAACCG GCCTCTTCAT CGGGAATGCG CGCGACCTTC
 TCCAGTTGTC CGCCATTGGC CGGAGAAGTA GCCCTTACGC GCGCTGGAAG
 2201 AGCATCGCCG GCATGTCCCC TGGCGGACGG GAAGTATCAG CTCGACCAAG

TCGTAGCGGC CGTACAGGGG ACCGCCTGCC CTTCATAGTC GAGCTGGTTC

BglII

~~~~~

2251 CTCAGATCTG GATCTGGCCG CGCGCGCGCG CGCAGGAACC CCTAGTGATG  
GAGTCTAGAC CTAGACCGGC GCGCGCGCGC GCGTCCTTGG GGATCACTAC

SmaI

~~~~

2301 GAGTTGGCCA CTCCCTCTCT GCGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCCG
CTCAACCGGT GAGGGAGAGA CGCGCGAGCG AGCGAGTGAC TCCGGCGGGC

SmaI

SmaI

~~

~~~~~

2351 GGCAAAGCCC GGGCGTCGGG CGACCTTTGG TCGCCCGGCC TCAGTGAGCG  
CCGTTTTCGGG CCCGCAGCCC GCTGGAAACC AGCGGGCCGG AGTCACTCGC

PstI

~~~~~

2401 AGCGAGCGCG CAGAGAGGGA GTGGCCAAGC TGCAGCCTGC ATTAATGAAT
TCGCTCGCGC GTCTCTCCCT CACCGGTTTCG ACGTCGGACG TAATTACTTA

2451 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT
GCCGGTTGCG CGCCCCTCTC CGCCAAACGC ATAACCCGCG AGAAGGCGAA

2501 CCTCGCTCAC TGA CTGCTG TCGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA
GGAGCGAGTG ACTGAGCGAC GCGAGCCAGC AAGCCGACGC CGCTCGCCAT

2551 TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA
AGTCGAGTGA GTTTCCGCCA TTATGCCAAT AGGTGTCTTA GTCCCTATT

2601 CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA
GCGTCCTTTC TTGTACACTC GTTTTCCGGT CGTTTTCCGG TCCTTGCCAT

2651 AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG
TTTTCCGGCG CAACGACCGC AAAAAGGTAT CCGAGGCGGG GGGACTGCTC

2701 CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT
GTAGTGTTTT TAGCTGCGAG TTCAGTCTCC ACCGCTTTGG GCTGTCTTGA

2751 ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG
TATTTCTATG GTCCGCAAAG GGGGACCTTC GAGGGAGCAC GCGAGAGGAC

2801 TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA
AAGGCTGGGA CGGCGAATGG CCTATGGACA GGCGGAAAGA GGGAAAGCCCT

2851 AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA
TCGCACCGCG AAAGAGTTAC GAGTGCGACA TCCATAGAGT CAAGCCACAT

2901 GGTGTTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG
CCAGCAAGCG AGGTTTCGACC CGACACACGT GCTTGGGGGG CAAGTCGGGC

2951 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA
TGGCGACGCG GAATAGGCCA TTGATAGCAG AACTCAGGTT GGGCCATTCT

3001 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC
GTGCTGAATA GCGGTGACCG TCGTCGGTGA CCATTGTCTT AATCGTCTCG

3051 GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG

CTCCATACAT CCGCCACGAT GTCTCAAGAA C TTCACCACC GGATTGATGC
 3101 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT
 CGATGTGATC TTCCTGTCAAT AAACCATAGA CCGGAGACGA CTTCCGGTCAA
 3151 ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC
 TGGAAGCCTT TTTCTCAACC ATCGAGAACT AGGCCGTTTG TTTGGTGGCG
 3201 TGGTAGCGGT GGTTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA
 ACCATCGCCA CCAAAAAAAC AAACGTTTCGT CGTCTAATGC GCGTCTTTTT
 3251 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG
 TTCCTAGAGT TCTTCTAGGA AACTAGAAAA GATGCCCCAG ACTGCGAGTC
 3301 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG
 ACCTTGCTTT TGAGTGCAAT TCCCTAAAAC CAGTACTCTA ATAGTTTTTC
 3351 GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT
 CTAGAAGTGG ATCTAGGAAA ATTTAATTTT TACTTCAAAA TTTAGTTAGA
 3401 AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT
 TTTTCATATAT ACTCATTTGA ACCAGACTGT CAATGGTTAC GAATTAGTCA
 3451 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG
 CTCCGTGGAT AGAGTCGCTA GACAGATAAA GCAAGTAGGT ATCAACGGAC
 3501 ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
 TGAGGGGCAG CACATCTATT GATGCTATGC CCTCCCGAAT GGTAGACCGG
 3551 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA
 GGTACAGACG TTACTATGGC GCTCTGGGTG CGAGTGGCCG AGGTCTAAAT
 3601 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC
 AGTCGTTATT TGGTCGGTGC GCCTTCCCGG CTCGCGTCTT CACCAGGACG
 3651 AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG
 TTGAAATAGG CGGAGGTAGG TCAGATAAAT AACAACGGCC CTTTCGATCTC
 3701 TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA
 ATTCATCAAG CGGTCAATTA TCAAACGCGT TGCAACAACG GTAACGATGT
 3751 GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG
 CCGTAGCACC ACAGTGCAG CAGCAAACCA TACCGAAGTA AGTCGAGGCC
 3801 TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
 AAGGGTTGCT AGTTCCGCTC AATGTACTAG GGGGTACAAC ACGTTTTTTC
 3851 CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGCCCGCA
 GCCAATCGAG GAAGCCAGGA GGCTAGCAAC AGTCTTCATT CAACCGGCGT
 3901 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TFACTGTGAT
 CACAATAGTG AGTACCAATA CCGTCGTGAC GTATTAAGAG AATGACAGTA
 3951 GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT
 CGGTAGGCAT TCTACGAAAA GACACTGACC ACTCATGAGT TGGTTCAGTA
 4001 TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA
 AGACTCTTAT CACATACGCC GCTGGCTCAA CGAGAACGGG CCGCAGTTAT

4051 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG
GCCCTATTAT GGCGCGGTGT ATCGTCTTGA AATTTTCACG AGTAGTAACC
4101 AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT
TTTTGCAAGA AGCCCCGCTT TTGAGAGTTC CTAGAATGGC GACAACCTCTA
4151 CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT
GGTCAAGCTA CATTGGGTGA GCACGTGGGT TGACTIONAAG TCGTAGAAAA
4201 ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC
TGAAAGTGGT CGCAAAGACC CACTCGTTTT TGTCCTTCCG TTTTACGGCG
4251 AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC
TTTTTCCCT TATTCCCGCT GTGCCTTTAC AACTTATGAG TATGAGAAGG
4301 TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
AAAAAGTTAT AATAACTTCG TAAATAGTCC CAATAACAGA GTACTCGCCT
4351 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC
ATGTATAAAC TTACATAAAT CTTTTTATTT GTTTATCCCC AAGGCGCGTG
4401 ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA
TAAAGGGGCT TTTCACGGTG GACTGCAGAT TCTTTGGTAA TAATAGTACT
4451 CATTAACTTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTCGCGCGT
GTAATTGGAT ATTTTTATCC GCATAGTGCT CCGGGAAAGC AGAGCGCGCA
4501 TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT
AAGCCACTAC TGCCACTTTT GGAGACTGTG TACGTCGAGG GCCTCTGCCA
4551 CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG
GTGTCGAACA GACATTCGCC TACGGCCCTC GTCTGTTCGG GCAGTCCCCG
4601 CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCT GGCTTAACTA TGCGGCATCA
GCAGTCGCCC ACAACCGCCC ACAGCCCCGA CCGAATTGAT ACGCCGTAGT
4651 GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG
CTCGTCTAAC ATGACTCTCA CGTGGTATAC GCCACACTTT ATGGCGTGTC
4701 ATGCGTAAGG AGAAAATACC GCATCAGGCG ACGCGCCCTG TAGCGGCGCA
TACGCATTCC TCTTTTATGG CGTAGTCCGC TGCGCGGGAC ATCGCCGCGT
4751 TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG CTACACTTGC
AATTCGCGCC GCCCACACCA CCAATGCGCG TCGCACTGGC GATGTGAACG
4801 CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTTCC TTTCTCGCCA
GTCGCGGGAT CGCGGGCGAG GAAAGCGAAA GAAGGGAAGG AAAGAGCGGT
4851 CGTTCGCCCG CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG
GCAAGCGGCC GAAAGGGGCA GTTCGAGATT TAGCCCCGA GGGAAATCCC
4901 TTCCGATTTA GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG
AAGGCTAAAT CACGAAATGC CGTGGAGCTG GGGTTTTTTG AACTAATCCC
4951 TGATGGTTCA CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCCGCCCTT
ACTACCAAGT GCATCACCCG GTAGCGGGAC TATCTGCCAA AAAGCGGGAA
5001 TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTTAATAGTG GACTCTTGTT CCAAACCTGGA
ACTGCAACCT CAGGTGCAAG AAATTATCAC CTGAGAACAA GGTTTGACCT

5051 ACAACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT AAGGGATTTT
TGTGTGAGT TGGGATAGAG CCAGATAAGA AAATAAATA TTCCCTAAAA

5101 GCCGATTTTC GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAAAATTTA
CGGCTAAAGC CGGATAACCA ATTTTTTACT CGACTAAATT GTTTTTAAAT

5151 ACGCGAATTT TAACAAAATA TTAACGTTTA CAATTTCCGC ATTCGCCATT
TGCCTTAAA ATTGTTTTAT AATTGCAAAT GTTAAAGCGG TAAGCGGTAA

5201 CAGGCTACGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
GTCCGATGCG TTGACAACCC TTCCCGCTAG CCACGCCCGG AGAAGCGATA

PstI
~~~~~

5251 TACGCCAGGC TGCAGCTTGG CCACTCCCTC TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA  
ATGCGGTCCG ACGTCGAACC GGTGAGGGAG AGACGCGCGA GCGAGCGAGT

SmaI                    SmaI  
~~~~~                    ~~~~~

5301 CTGAGGCCGG GCGACCAAAG GTCGCCCGAC GCCCGGGCTT TGCCCGGGCG
GACTCCGGCC CGCTGGTTTC CAGCGGGCTG CGGGCCCGAA ACGGGCCCGC

5351 GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC
CGGAGTCACT CGCTCGCTCG CGCGTCTCTC CCTCACCGGT TGAGGTAGTG

PstI
~~~~~

BglII  
~~~~~

5401 TAGGGGTTCC TGC GCGCGCGC GCGCGCGCCA GATCTGCAGA CATGATAAGA
ATCCCAAGG ACGCGCGCGC GCGCGCGCGT CTAGACGTCT GTACTATTCT

5451 TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAC TGAATGCAGT GAAAAAATG
ATGTAAC TCAACCTGT TTGGTGTGTA TCTTACGTCA CTTTTTTTAC

5501 CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA
GAAATAACA CTTTAAACAC TACGATAACG AAATAAACAT TGGTAATATT

5551 GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCATTT TATGTTTCAG
CGACGTTATT TGTTCAATTG TTGTTGTTAA CGTAAGTAAA ATACAAAGTC

5601 GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA ACCTCTACAA
CAAGTCCCC TCCACACCT CCAAAAAATT TCGTTCATTT TGGAGATGTT

5651 ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT ACATCAAATA
TACACCATA CGACTAATAC TAGAGATCAG TTCCGTGATA TGTAGTTTAT

5701 TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAATAA GCTAAAGGTA CACAATTTTT
AAGGAATAAT TGGGGAAATG TTTAATTTTT CGATTTCCAT GTGTTAAAAA

5751 GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG AGTAAGAAAA
CTCGTATCAA TAATTATCGT CTGTGAGATA CGGACACACC TCATTCTTTT

5801 AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA AGGTTACAGA
TTGTCATACA ATACTAATAT TGACAATACG GATGAATATT TCCAATGTCT

5851 ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT TCCTTTGTGG
TATAAAAAGG TATTAAGA ACATATCGTC ACGTCGAAAA AGGAAACACC

6801 GCGGCTGAAG CACTGCACGC CGTAGGTCAG GGTGGTCACG AGGGTGGGCC
CGCCGACTTC GTGACGTGCG GCATCCAGTC CCACCAGTGC TCCCACCCGG

6851 AGGGCACGGG CAGCTTGCCG GTGGTGCAGA TGAAC TTCAG GGTGAGCTTG
TCCCGTGCCC GTCGAACGGC CACCACGTCT ACTTGAAGTC CCAGTCGAAC

6901 CCGTAGGTGG CATCGCCCTC GCCCTCGCCG GACACGCTGA ACTTGTGGCC
GGCATCCACC GTAGCGGGAG CGGGAGCGGC CTGTGCGACT TGAACACCCG

6951 GTTTACGTCG CCGTCCAGCT CGACCAGGAT GGCACCACC CCGGTGAACA
CAAATGCAGC GGCAGGTCGA GCTGGTCCTA CCCGTGGTGG GGCCACTTGT

SmaI

~~~~~

7001 GTCCTCGCC CTTGCTCACC ATGGTGGCGA CCGGTGGATC CCGGGCCCCG  
CGAGGAGCGG GAACGAGTGG TACCACCGCT GGCCACCTAG GGCCCGGGCG

PstI

~~~~~

EcoRI HindIII

~~~~~ ~~~~~

7051 GGTACCGTCG ACTGCAGAAT TCGAAGCTTG CGGGGCCGCG GAGGCTGGAT  
CCATGGCAGC TGACGTCTTA AGCTTCGAAC GCCCGGGCGC CTCCGACCTA

7101 CGGTCCCGGT GTCTTCTATG GAGGTCAAAA CAGCGTGGAT GCGTCTCCA  
GCCAGGGCCA CAGAAGATAC CTCCAGTTTT GTCGCACCTA CCGCAGAGGT

7151 GGCGATCTGA CGGTTCACTA AACGAGCTCT GCTTATATAG GCCTCCCACC  
CCGCTAGACT GCCAAGTGAT TTGCTCGAGA CGAATATATC CGGAGGGTGG

SmaI

~~~~~

7201 GTACACGCCT ACTCGACCCG GGTACCGAGC TCGACTTTCA CTTTTCTCTA
CATGTGCGGA TGAGCTGGGC CCATGGCTCG AGCTGAAAGT GAAAAGAGAT

7251 TCACTGATAG GGAGTGGTAA ACTCGACTTT CACTTTTCTC TATCACTGAT
AGTGA CTATC CCTCACCATT TGAGCTGAAA GTGAAAAGAG ATAGTGA CTACTA

7301 AGGGAGTGGT AA ACTCGACT TTCACTTTTC TCTATCACTG ATAGGGAGTG
TCCCTACCA TTTGAGCTGA AAGTGAAAAG AGATAGTGAC TATCCCTCAC

7351 GTAAACTCGA CTTTCACTTT TCTCTATCAC TGATAGGGAG TGGTAAACTC
CATTTGAGCT GAAAGTGAAA AGAGATAGTG ACTATCCCTC ACCATTTGAG

7401 GACTTTCACT TTTCTCTATC ACTGATAGGG AGTGGTAAAC TCGACTTTCA
CTGAAAGTGA AAAGAGATAG TGACTATCCC TCACCATTTG AGCTGAAAGT

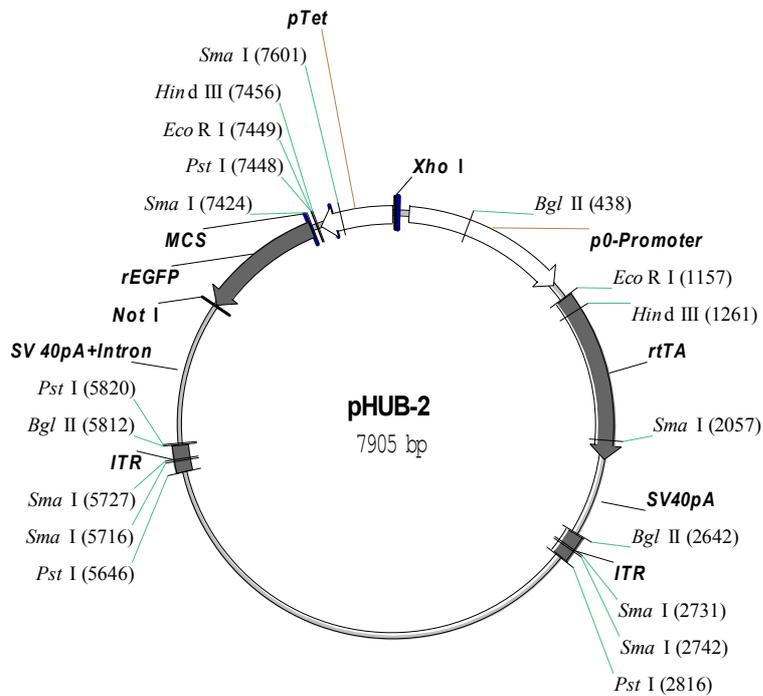
7451 CTTTTCTCTA TCACTGATAG GGAGTGGTAA ACTCGACTTT CACTTTTCTC
GAAAAGAGAT AGTGA CTATC CCTCACCATT TGAGCTGAAA GTGAAAAGAG

XhoI

7501 TATCACTGAT AGGGAGTGGT AAAC
ATAGTGA CTACTA TCCCTACCA TTTG

7.3 pHUB-2

7.3.1 Vektorkarte



7.3.2 Sequenz

XhoI
 ~~~~~

|     |            |             |            |             |            |
|-----|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 1   | TCGAGGAGCT | TGGCCCATTTG | CATACGTTGT | ATCCATATCA  | TAATATGTAC |
|     | AGCTCCTCGA | ACCGGGTAAC  | GTATGCAACA | TAGGTATAGT  | ATTATACATG |
| 51  | ATTTATATTG | GCTCATGTCC  | AACATTACCG | CCATTCTAGA  | CATTATCCCT |
|     | TAAATATAAC | CGAGTACAGG  | TTGTAATGGC | GGTAAGATCT  | GTAATAGGGA |
| 101 | CCCCTTATTT | CCCTTATCAA  | AATGGCTGCT | GTCCTTCAA   | GGTTCCAAAT |
|     | GGGGAATAAA | GGGAATAGTT  | TTACCGACGA | CGAGGAAGTT  | CCAAGGTTTA |
| 151 | AACACTGCTT | CCTGGACCTG  | ACTCCTCTTT | CCTCTGAACT  | TCCTGTGTTA |
|     | TTGTGACGAA | GGACCTGGAC  | TGAGGAGAAA | GGAGACTTGA  | AGGACACAAT |
| 201 | AGTGTATTCC | TAGTGCACCTG | TGCCTTGGTA | GTTGTTGAGA  | TTCCCCTCTG |
|     | TCACATAAGG | ATCACGTGAC  | ACGGAACCAT | CAACAACCTCT | AAGGGGAGAC |
| 251 | CTTCTCCCTT | CTGCCTCCTC  | ATCTAGTGAT | CTTGAGCTTG  | TAGAAAGAAC |
|     | GAAGAGGGAA | GACGGAGGAG  | TAGATCACTA | GAACTCGAAC  | ATCTTTCTTG |

301 TGAATTACCA TTCTAATACG AGCATTCTCG AACTCTCCAA ATAGCCACCA  
ACTTAATGGT AAGATTATGC TCGTAAGAGC TTGAGAGGTT TATCGGTGGT

351 AGCAGGACAA TACGCAGTCT TGATCATTTA AACTGCTGCA TGGCAAAAGG  
TCGTCCTGTT ATGCGTCAGA ACTAGTAAAT TTGACGACGT ACCGTTTTCC

BglII  
~~~~~

401 AATCGAAGGA TTTCTTAACA GAAGTGGGGG GGGGGGAGAT CTGGGCTTCT
TTAGCTTCCT AAAGAATTGT CTTACACCCC CCCCCCTCTA GACCCGAAGA

451 TCCTGCAAGT TTCCTGATAG AGAAAATCTT CTGCCTGGGT AGAATCTCCC
AGGACGTTCA AAGGACTATC TCTTTTAGAA GACGGACCCA TCTTAGAGGG

501 AGGATGCAGG GAGATGGAAA AAGTTGTTCC CCAGAGGACT TTGTAGTCTA
TCCTACGTCC CTCTACCTTT TTCAACAAGG GGTCTCCTGA AACATCAGAT

551 CAGTGTTGTC GTAGCCATCG GAACAACGAG ACACCCTAAT TTGGGAGTGC
GTCACAACAG CATCGGTAGC CTTGTTGCTC TGTGGGATTA AACCCTCACG

601 TCTGAAAGAA ACTTGCCTCT AGGCCCTAGG GCTCTCAGGC AAGGACCCTA
AGACTTTCTT TGAACGGAGA TCCGGGATCC CGAGAGTCCG TTCTGGGAT

651 AGAAGGAATC CTTTGCTGTA GCCTTTTGGG TTTAGGTTTC TCAGCTTATC
TCTTCCTTAG GAAACGACAT CGGAAAACCT AAATCCAAAG AGTCGAATAG

701 TATCCCTCAG AGAAGTGTGT CTATGTCCCT TTTCTGTCCC TCTGCCTCAC
ATAGGGAGTC TCTTCACACA GATACAGGGA AAAGACAGGG AGACGGAGTG

751 CCCACCCCAA CATTCCAACG TAGGGTAGGG GGAGGTCAGT ATACACAAAG
GGGTGGGGTT GTAAGGTTGC ATCCCATCCC CCTCCAGTCA TATGTGTTTC

801 CCCTCTGTGT AAGGGGTGGT ATGTGTCCCC CCACCCCCCT ACCCAGAGTA
GGGAGACACA TTCCCCACCA TACACAGGGG GGTGGGGGGA TGGGTCTCAT

851 TACAATGCCC CTTCTGCTCC ATGCCCTGC CACCCTCCCC ACCACGTCTC
ATGTTACGGG GAAGACGAGG TACGGGGACG GTGGGAGGGG TGGTGCAGAG

901 AATTGCACAT GCCAGGCTGC AATTGGTCAC GGCTCAGGAC AGCCCCCTCA
TTAACGTGTA CGGTCCGACG TTAACCAGTG CCGAGTCCTG TCGGGGGAGT

951 TGCTGGGGAT CCAGGGGATT TTAAGCAGGT TCCAGAAAAC ACCACTCAGT
ACGACCCCTA GGTCCCCTAA AATTCGTCCA AGGTCTTTTG TGGTGAGTCA

1001 TCCTTGTTCC CCGCTCTCTC CACCCACAG ACGCTCTGGG CCCTTGCCCC
AGGAACAGGG GGCGAGAGAG GTGGGGTGTC TGCGAGACCC GGGAACGGGG

1051 TACCCAGCT ATGGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA GACGCCATCC
ATGGGGTCGA TACCAAATCA CTTGGCAGTC TAGCGGACCT CTGCGGTAGG

1101 ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGCG
TGCGACAAAA CTGGAGGTAT CTTCTGTGGC CCTGGCTAGG TCGGAGGCCG

EcoRI
~~~~~

1151 GCCCCGAATT CATATGTCTA GATTAGATAA AAGTAAAGTG ATTAACAGCG  
CGGGGCTTAA GTATACAGAT CTAATCTATT TTCATTTAC TAATTGTCGC

1201 CATTAGAGCT GCTTAATGAG GTCGGAATCG AAGGTTTAAAC AACCCGTAAA  
 GTAATCTCGA CGAATTACTC CAGCCTTAGC TTCCAAATTG TTGGGCATTT

HindIII

~~~~~

1251 CTCGCCCAGA AGCTTGGTGT AGAGCAGCCT ACACTGTATT GGCATGTAAA
 GAGCGGGTCT TCGAACCAACA TCTCGTCGGA TGTGACATAA CCGTACATTT

1301 AAATAAGCGG GCTTTGCTCG ACGCCTTAGC CATTGAGATG TTAGATAGGC
 TTTATTTCGCC CGAAACGAGC TGCGGAATCG GTAACCTCTAC AATCTATCCG

1351 ACCATACTCA CTTTTGCCCT TTAAAAGGGG AAAGCTGGCA AGATTTTTTTA
 TGGTATGAGT GAAAACGGGA AATTTTCCCC TTTCGACCGT TCTAAAAAAT

1401 CGCAATAACG CTAAAAGTTT TAGATGTGCT TTAATAAGTC ATCGCAATGG
 GCGTTATTGC GATTTTCAAA ATCTACACGA AATGATTAGC TAGCGTTACC

1451 AGCAAAAGTA CATTTCAGATA CACGGCCTAC AGAAAAACAG TATGAAACTC
 TCGTTTTTCAT GTAAGTCTAT GTGCCGGATG TCTTTTTGTC ATACTTTGAG

1501 TCGAAAATCA ATTAGCCTTT TTATGCCAAC AAGGTTTTTTC ACTAGAGAAC
 AGCTTTTAGT TAATCGGAAA AATACGGTTG TTCCAAAAAG TGATCTCTTG

1551 GCGTTATATG CACTCAGCGC TGTGGGGCAT TTTACTTTAG GTTGCGTATT
 CGCAATATAC GTGAGTCGCG ACACCCCGTA AAATGAAATC CAACGCATAA

1601 GGAAGATCAA GAGCATCAAG TCGCTAAAGA AGAAAGGGAA ACACCTACTA
 CCTTCTAGTT CTCGTAGTTC AGCGATTTCT TCTTTCCCTT TGTGGATGAT

1651 CTGATAGTAT GCCGCCATTA TTACGACAAG CTATCGAATT ATTTGATCAC
 GACTATCATA CGGCGGTAAT AATGCTGTTC GATAGCTTAA TAACTAGTG

1701 CAAGGTGCAG AGCCAGCCTT CTTATTTCGGC CTTGAATTGA TCATATGCGG
 GTTCCACGTC TCGGTCGGAA GAATAAGCCG GAACCTAACT AGTATACGCC

1751 ATTAGAAAAA CAACTTAAAT GTGAAAGTGG GTCCGCGTAC AGCCGCGCGC
 TAATCTTTTT GTTGAATTTA CACTTTCACC CAGGCGCATG TCGGCGCGCG

1801 GTACGAAAAA CAATTACGGG TCTACCATCG AGGGCCTGCT CGATCTCCCG
 CATGCTTTTT GTTAATGCCC AGATGGTAGC TCCCGGACGA GCTAGAGGGC

1851 GACGACGACG CCCCCGAAGA GGCGGGGCTG GCGGCTCCGC GCCTGTCCCTT
 CTGCTGCTGC GGGGGCTTCT CCGCCCCGAC CGCCGAGGCG CGGACAGGAA

1901 TCTCCCCGCG GGACACACGC GCAGACTGTC GACGGCCCCC CCGACCGATG
 AGAGGGGCGC CCTGTGTGCG CGTCTGACAG CTGCCGGGGG GGCTGGCTAC

1951 TCAGCCTGGG GGACGAGCTC CACTTAGACG GCGAGGACGT GGCGATGGCG
 AGTCGGACCC CCTGCTCGAG GTGAATCTGC CGCTCCTGCA CCGCTACCGC

2001 CATGCCGACG CGCTAGACGA TTTGATCTG GACATGTTGG GGGACGGGGA
 GTACGGCTGC GCGATCTGCT AAAGCTAGAC CTGTACAACC CCCTGCCCTT

SmaI

~~~~~

2051 TTCCCCGGGT CCGGGATTTA CCCCCACGA CTCCGCCCCC TACGGCGCTC  
 AAGGGGCCCA GGCCCTAAAT GGGGGGTGCT GAGGCGGGGG ATGCCGCGAG

2101 TGGATATGGC CGACTTCGAG TTTGAGCAGA TGTTTACCGA TGCCCTTGGA

ACCTATACCG GCTGAAGCTC AAACCTCGTCT ACAAATGGCT ACGGGAACCT  
 2151 ATTGACGAGT ACGGTGGGTA GGGGGCGCGA GGATCCAGAC ATGATAAGAT  
 TAACTGCTCA TGCCACCCAT CCCCCGCGCT CCTAGGTCTG TACTATTCTA  
 2201 ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAACATA GAATGCAGTG AAAAAAATGC  
 TGTAACACT CAAACCTGTT TGGTGTGAT CTTACGTCAC TTTTTTTACG  
 2251 TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG  
 AAATAAACAC TTAAACACT ACGATAACGA AATAAACATT GGTAATATTC  
 2301 CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCAATTTT ATGTTTCAGG  
 GACGTTATTT GTTCAATTGT TGTTGTTAAC GTAAGTAAAA TACAAAGTCC  
 2351 TTCAGGGGGA GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA GCAAGTAAAA CCTCTACAAA  
 AAGTCCCCCT CCACACCCTC CAAAAAATTT CGTTCATTTT GGAGATGTTT  
 2401 TGTGGTATGG CTGATTATGA TCCTGCAAGC CTCGTCGTCT GGCCGGACCA  
 ACACCATAAC GACTAATACT AGGACGTTTC GAGCAGCAGA CCGGCTTGGT  
 2451 CGCTATCTGT GCAAGGTCCC CGGACGCGCG CTCCATGAGC AGAGCGCCCG  
 GCGATAGACA CGTTCCAGGG GCCTGCGCGC GAGGTACTCG TCTCGCGGGC  
 2501 CCGCCGAGGC AAGACTCGGG CGGCGCCCTG CCCGTCCCAC CAGGTCAACA  
 GCGGCTCCG TTCTGAGCCC GCCGCGGGAC GGGCAGGGTG GTCCAGTTGT  
 2551 GCGGTAACC GGCCTCTTCA TCGGGAATGC GCGCGACCTT CAGCATCGCC  
 CCGCCATTGG CCGGAGAAGT AGCCCTTACG CGCGCTGGAA GTCGTAGCGG  
  

BglII  
~~~~~

 2601 GGCATGTCCC CTGGCGGACG GGAAGTATCA GCTCGACCAC AGATCTGGCC
 CCGTACAGGG GACCGCCTGC CCTTCATAGT CGAGCTGGTG TCTAGACCGG
 2651 GCGCGCGCGC GCGCAGGAAC CCCTAGTGAT GGAGTTGGCC ACTCCCTCTC
 CGCGCGCGCG CGCGTCCTTG GGGATCACTA CCTCAACCGG TGAGGGAGAG

SmaI SmaI
~~~~~                      ~~~~~

 2701 TGCGCGCTCG CTCGCTCACT GAGGCCGCC GGGCAAAGCC CGGGCGTCCG  
 ACGCGCGAGC GAGCGAGTGA CTCCGGCGGG CCCGTTTCGG GCCCGCAGCC  
 2751 GCGACCTTTG GTCGCCCGGC CTCAGTGAGC GAGCGAGCGC GCAGAGAGGG  
 CGCTGGAAAC CAGCGGGCCG GAGTCACTCG CTCGCTCGCG CGTCTCTCCC  
  

PstI  
~~~~~

 2801 AGTGGCCAAG CTGCAGCCTG CATTAAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA
 TCACCGGTTT GACGTCGGAC GTAATTACTT AGCCGGTTGC GCGCCCTCT
 2851 GCGGTTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT
 CCGCCAAACG CATAACCCGC GAGAAGGCGA AGGAGCGAGT GACTGAGCGA
 2901 GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG
 CGCGAGCCAG CAAGCCGACG CCGCTCGCCA TAGTCGAGTG AGTTTCCGCC
 2951 TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA
 ATTATGCCAA TAGGTGTCTT AGTCCCCTAT TGCGTCCTTT CTTGTACTACT

3001 GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC
CGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCCTTGGA TTTTTCCGGC GCAACGACCG
3051 GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT
CAAAAAGGTA TCCGAGGCGG GGGGACTGCT CGTAGTGTTT TTAGCTGCGA
3101 CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT
GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGTCTCTG ATATTTCTAT GGTCCGCAAA
3151 CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC
GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CGCGAGAGGA CAAGGCTGGG ACGGCGAATG
3201 CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC TTCGCACCGC GAAAGAGTTA
3251 GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTCG CTCCAAGCTG
CGAGTGCAGC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC GAGGTTTCGAC
3301 GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG
CCGACACACG TGCTTGGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACGC GGAATAGGCC
3351 TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG
ATTGATAGCA GAACTCAGGT TGGGCCATTC TGTGCTGAAT AGCGGTGACC
3401 CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT
GTCGTGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA TCCGCCACGA
3451 ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT
TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGATG CCGATGTGAT CTTCTGTCA
3501 ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCT TTTTCTCAAC
3551 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTTT
CATCGAAGC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAAAA
3601 GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC
CAAACGTTTC TCGTCTAATG CGCGTCTTTT TTTCTAGAG TTCTCTAGG
3651 TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT
AAACTAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA
3701 AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT
TTCCCTAAAA CCAGTACTCT AATAGTTTTT CCTAGAAGTG GATCTAGGAA
3751 TTAAATTTAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC
AATTTAATTT TTACTTCAAA ATTTAGTTAG ATTTTCATATA TACTCATTTG
3801 TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA
AACCAGACTG TCAATGGTTA CGAATTAGTC ACTCCGTGGA TAGAGTCGCT
3851 TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA
AGACAGATAA AGCAAGTAGG TATCAACGGA CTGAGGGGCA GCACATCTAT
3901 ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC
TGATGCTATG CCCTCCCGAA TGGTAGACCG GGGTCACGAC GTTACTATGG
3951 GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG
CGCTCTGGGT GCGAGTGGCC GAGGTCTAAA TAGTCGTTAT TTGGTCGGTC

4001 CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC
GGCCTTCCCG GCTCGCGTCT TCACCAGGAC GTTGAAATAG GCGGAGGTAG
4051 CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA
GTCAGATAAT TAACAACGGC CCTTCGATCT CATTTCATCAA GCGGTCAATT
4101 TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT
ATCAAACGCG TTGCAACAAC GGTAACGATG TCCGTAGCAC CACAGTGCGA
4151 CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA
GCAGCAAACC ATACCGAAGT AAGTCGAGGC CAAGGGTTGC TAGTTCCGCT
4201 GTTACATGAT CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC
CAATGTACTA GGGGGTACAA CACGTTTTTT CGCCAATCGA GGAAGCCAGG
4251 TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA
AGGCTAGCAA CAGTCTTCAT TCAACCGGCG TCACAATAGT GAGTACCAAT
4301 TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT
ACCGTCGTGA CGTATTAAGA GAATGACAGT ACGGTAGGCA TTCTACGAAA
4351 TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG
AGACACTGAC CACTCATGAG TTGGTTCAGT AAGACTCTTA TCACATACGC
4401 GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC
CGCTGGCTCA ACGAGAACGG GCCGCAGTTA TGCCCTATTA TGGCGCGGTG
4451 ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA
TATCGTCTTG AAATTTTCAC GAGTAGTAAC CTTTTGCAAG AAGCCCCGCT
4501 AAACCTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC
TTTGAGAGTT CCTAGAATGG CGACAACCTCT AAGTCAAGCT ACATTGGGTG
4551 TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG
AGCACGTGGG TTGACTAGAA GTCGTAGAAA ATGAAAGTGG TCGCAAAGAC
4601 GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG
CCACTCGTTT TTGTCCTTCC GTTTTACGGC GTTTTTTCCC TTATTCCCGC
4651 ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG
TGTGCCTTTA CAACTTATGA GTATGAGAAG GAAAAAGTTA TAATAACTTC
4701 CATTATATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT
GTAAATAGTC CCAATAACAG AGTACTCGCC TATGTATAAA CTTACATAAA
4751 AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCTCCG AAAAGTGCCA
TCTTTTTTATT TGTTTTATCC CAAGGCGCGT GTAAAGGGGC TTTTCACGGT
4801 CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG
GGACTGCAGA TTCTTTGGTA ATAATAGTAC TGTAATTGGA TATTTTTATC
4851 GCGTATCACG AGGCCCTTTC GTCTCGCGCG TTTCGGTGAT GACGGTGAAA
CGCATAGTGC TCCGGGAAAG CAGAGCGCGC AAAGCCACTA CTGCCACTTT
4901 ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG TCTGTAAGCG
TGGAGACTGT GTACGTCGAG GGCCTCTGCC AGTGTCGAAC AGACATTTCG
4951 GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG

CTACGGCCCT CGTCTGTTCG GGCAGTCCCG CGCAGTCGCC CACAACCGCC
 5001 GTGTCGGGGC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
 CACAGCCCCG ACCGAATTGA TACGCCGTAG TCTCGTCTAA CATGACTCTC
 5051 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 ACGTGGTATA CGCCACACTT TATGGCGTGT CTACGCATTC CTCTTTTATG
 5101 CGCATCAGGC GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG
 GCGTAGTCCG CTGCGCGGGA CATCGCCGCG TAATTCGCGC CGCCACACC
 5151 TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTCGCGGGA TCGCGGGCGA
 5201 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG
 GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CGAAAGGGGC
 5251 TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
 AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG AGGGAAATCC CAAGGCTAAA TCACGAAATG
 5301 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG
 CCGTGGAGCT GGGGTTTTTTT GAACTAATCC CACTACCAAG TGCATCACCC
 5351 CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
 GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA
 5401 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATATCT
 GAAATTATCA CCTGAGAACA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG TTGGGATAGA
 5451 CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG
 GCCAGATAAG AAAACTAAAT ATTCCCTAAA ACGGCTAAAG CCGGATAACC
 5501 TTAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACCGAATT TTAACAAAAT
 AATTTTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA TTGCGCTTAA AATTGTTTTA
 5551 ATTAACGTTT ACAATTTTCG CATTGCGCAT TCAGGCTACG CAACTGTTGG
 TAATTGCAA TGTTAAAGCG GTAAGCGGTA AGTCCGATGC GTTGACAACC

PstI
~~~~~

 5601 GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGG CTGCAGCTTG  
 CTTCCCCTA GCCACGCCCC GAGAAGCGAT AATGCGGTCC GACGTGGAAC  
 5651 GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG GGCGACCAAA  
 CGGTGAGGGA GAGACGCGCG AGCGAGCGAG TGACTCCGGC CCGCTGGTTT  
  

SmaI                      SmaI  
~~~~~                      ~~~~~

 5701 GGTCGCCCCG CGCCCCGGCT TTGCCCGGGC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG
 CCAGCGGGCT GCGGGCCCCG AACGGGCCCC CCGGAGTCAC TCGCTCGCTC
 5751 CGCGCAGAGA GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTC CTGCGCGCGC
 GCGCGTCTCT CCCTCACCGG TTGAGGTAGT GATCCCCAAG GACGCGCGCG

PstI
~~~~~  
BglII  
~~~~~

 5801 GCGCGCGGCC AGATCTGCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC

| | | | | | |
|------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | CGCGCGCCGG | TCTAGACGTC | TGTACTATTC | TATGTAACTA | CTCAAACCTG |
| 5851 | AAACCACAAC
TTTGGTGTGG | TAGAATGCAG
ATCTTACGTC | TGAAAAAAT
ACTTTTTTTA | GCTTTATTTG
CGAAATAAAC | TGAAATTTGT
ACTTTAAACA |
| 5901 | GATGCTATTG
CTACGATAAC | CTTTATTTGT
GAAATAAACA | AACCATTATA
TTGGTAATAT | AGCTGCAATA
TCGACGTTAT | AACAAGTTAA
TTGTTCAATT |
| 5951 | CAACAACAAT
GTTGTTGTGA | TGCATTCATT
ACGTAAGTAA | TTATGTTTCA
AATACAAAGT | GGTTCAGGGG
CCAAGTCCCC | GAGGTGTGGG
CTCCACACCC |
| 6001 | AGGTTTTTTA
TCCAAAAAAT | AAGCAAGTAA
TTCGTTTCATT | AACCTCTACA
TTGGAGATGT | AATGTGGTAT
TTACACCATA | GGCTGATTAT
CCGACTAATA |
| 6051 | GATCTCTAGT
CTAGAGATCA | CAAGGCACTA
GTTCCGTGAT | TACATCAAAT
ATGTAGTTTA | ATTCCTTATT
TAAGGAATAA | AACCCCTTTA
TTGGGGAAAT |
| 6101 | CAAATTAATA
GTTTAATTTT | AGCTAAAGGT
TCGATTTCCA | ACACAATTTT
TGTGTTAAAA | TGAGCATAGT
ACTCGTATCA | TATTAATAGC
ATAATTATCG |
| 6151 | AGACACTCTA
TCTGTGAGAT | TGCCTGTGTG
ACGGACACAC | GAGTAAGAAA
CTCATTCTTT | AAACAGTATG
TTTGTACATC | TTATGATTAT
AATACTAATA |
| 6201 | AACTGTTATG
TTGACAATAC | CCTACTTATA
GGATGAATAT | AAGGTTACAG
TTCCAATGTC | AATATTTTTT
TTATAAAAAG | CATAATTTTC
GTATTAAAAG |
| 6251 | TTGTATAGCA
AACATATCGT | GTGCAGCTTT
CACGTCGAAA | TTCCCTTGTG
AAGGAAACAC | GTGTAAATAG
CACATTTATC | CAAAGCAAGC
GTTTCGTTTC |
| 6301 | AAGAGTTCTA
TTCTCAAGAT | TTACTAAACA
AATGATTTGT | CAGCATGACT
GTCGTAAGTA | CAAAAACTT
GTTTTTTGAA | AGCAATTCTG
TCGTTAAGAC |
| 6351 | AAGGAAAGTC
TTCCTTTCAG | CTTGGGGTCT
GAACCCGAGA | TCTACCTTTC
AGATGGAAAG | TCTTCTTTTT
AGAAGAAAAA | TGGAGGAGTA
ACCTCCTCAT |
| 6401 | GAATGTTGAG
CTTACAACCT | AGTCAGCAGT
TCAGTCGTCA | AGCCTCATCA
TCGGAGTAGT | TCACTAGATG
AGTGATCTAC | GCATTTCTTC
CGTAAAGAAG |
| 6451 | TGAGCAAAAC
ACTCGTTTTG | AGGTTTTCTT
TCCAAAAGGA | CATTAAAGGC
GTAATTTCCG | ATTCCACCAC
TAAGGTGGTG | TGCTCCCATF
ACGAGGGTAA |
| 6501 | CATCAGTTCC
GTAGTCAAGG | ATAGGTTGGA
TATCCAACCT | ATCTAAAATA
TAGATTTTAT | CACAAAACAAT
GTGTTTGTGA | TAGAATCAGT
ATCTTAGTCA |
| 6551 | AGTTTAACAC
TCAAATTGTG | ATTATACACT
TAATATGTGA | TAAAAATTTT
ATTTTTAAAA | ATATTTACCT
TATAAATGGA | TAGAGCTTTA
ATCTCGAAAT |
| 6601 | AATCTCTGTA
TTAGAGACAT | GGTAGTTTGT
CCATCAAACA | CCAATTATGT
GGTTAATACA | CACACCACAG
GTGTGGTGTC | AAGTAAGGTT
TTCATTCCAA |
| | | | NotI
~~~~~ | | |
| 6651 | CCTTCACAAA
GGAAGTGTTT | GATCCTCTAG
CTAGGAGATC | AGTCGCGGCC
TCAGCGCCGG | GCTTTACTTG
CGAAATGAAC | TACAGCTCGT
ATGTCGAGCA |
| 6701 | CCATGCCGAG
GGTACGGCTC | AGTGATCCCG
TCACTAGGGC | GCGGCGGTCA
CGCCGCCAGT | CGAACTCCAG
GCTTGAGGTC | CAGGACCATG
GTCCTGGTAC |
| 6751 | TGATCGCGCT | TCTCGTTGGG | GTCTTTGCTC | AGGGCGGACT | GGGTGCTCAG |

| | | | | | |
|------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| | ACTAGCGCGA | AGAGCAACCC | CAGAAACGAG | TCCCGCCTGA | CCCACGAGTC |
| 6801 | GTAGTGGTTG | TCGGGCAGCA | GCACGGGGCC | GTCGCCGATG | GGGGTGTTCCT |
| | CATCACCAAC | AGCCCCGTCGT | CGTGCCCCCG | CAGCGGCTAC | CCCCACAAGA |
| 6851 | GCTGGTAGTG | GTCGGCGAGC | TGCACGCTGC | CGTCCTCGAT | GTTGTGGCGG |
| | CGACCATCAC | CAGCCGCTCG | ACGTGCGACG | GCAGGAGCTA | CAACACCGCC |
| 6901 | ATCTTGAAGT | TCACCTTGAT | GCCGTTCTTC | TGCTTGTCGG | CCATGATATA |
| | TAGAACTTCA | AGTGGAACTA | CGGCAAGAAG | ACGAACAGCC | GGTACTATAT |
| 6951 | GACGTTGTGG | CTGTTGTAGT | TGTACTCCAG | CTTGTGCCCC | AGGATGTTGC |
| | CTGCAACACC | GACAACATCA | ACATGAGGTC | GAACACGGGG | TCCTACAACG |
| 7001 | CGTCCTCCTT | GAAGTCGATG | CCCTTCAGCT | CGATGCGGTT | CACCAGGGTG |
| | GCAGGAGGAA | CTTCAGCTAC | GGGAAGTCGA | GCTACGCCAA | GTGGTCCCAC |
| 7051 | TCGCCCTCGA | ACTTCACCTC | GGCGCGGGTC | TTGTAGTTGC | CGTCGTCCCTT |
| | AGCGGGAGCT | TGAAGTGGAG | CCGCGCCCAG | AACATCAACG | GCAGCAGGAA |
| 7101 | GAAGAAGATG | GTGCGCTCCT | GGACGTAGCC | TTCGGGCATG | GCGGACTTGA |
| | CTTCTTCTAC | CACGCGAGGA | CCTGCATCGG | AAGCCCGTAC | CGCCTGAACT |
| 7151 | AGAAGTCGTG | CTGCTTCATG | TGGTCGGGGT | AGCGGCTGAA | GCACTGCACG |
| | TCTTCAGCAC | GACGAAGTAC | ACCAGCCCCA | TCGCCGACTT | CGTGACGTGC |
| 7201 | CCGTAGGTCA | GGGTGGTCAC | GAGGGTGGGC | CAGGGCACGG | GCAGCTTGCC |
| | GGCATCCAGT | CCCACCAGTG | CTCCCACCCG | GTCCCCTGCC | CGTCGAACGG |
| 7251 | GGTGGTGCAG | ATGAACTTCA | GGGTGAGCTT | GCCGTAGGTG | GCATCGCCCT |
| | CCACCACGTC | TACTTGAAGT | CCCAGTCGAA | CGGCATCCAC | CGTAGCGGGA |
| 7301 | CGCCCTCGCC | GGACACGCTG | AACTTGTGGC | CGTTTACGTC | GCCGTCCAGC |
| | GCGGGAGCGG | CCTGTGCGAC | TTGAACACCG | GCAAATGCAG | CGGCAGGTCG |
| 7351 | TCGACCAGGA | TGGGCACCAC | CCCGGTGAAC | AGCTCCTCGC | CCTTGCTCAC |
| | AGCTGGTCCT | ACCCGTGGTG | GGGCCACTTG | TCGAGGAGCG | GGAACGAGTG |
| | | | | PstI | |
| | | | | ~~~~~ | |
| | | | SmaI | | EcoRI |
| | | | ~~~~~ | | ~~~ |
| 7401 | CATGGTGGCG | ACCGGTGGAT | CCCGGGCCCG | CGGTACCGTC | GACTGCAGAA |
| | GTACCACCGC | TGGCCACCTA | GGGCCCGGGC | GCCATGGCAG | CTGACGTCTT |
| | HindIII | | | | |
| | ~~~~~ | | | | |
| | EcoRI | | | | |
| | ~~~ | | | | |
| 7451 | TTCGAAGCTT | GCGGGGCCGC | GGAGGCTGGA | TCGGTCCCAG | TGTCTTCTAT |
| | AAGCTTCGAA | CGCCCCGGCG | CCTCCGACCT | AGCCAGGGCC | ACAGAAGATA |
| 7501 | GGAGGTCAAA | ACAGCGTGGA | TGGCGTCTCC | AGGCGATCTG | ACGGTTCACT |
| | CCTCCAGTTT | TGTCGCACCT | ACCGCAGAGG | TCCGCTAGAC | TGCCAAGTGA |
| | | | | SmaI | |
| | | | | ~~~~ | |
| 7551 | AAACGAGCTC | TGCTTATATA | GGCCTCCCAC | CGTACACGCC | TACTCGACCC |
| | TTTGCTCGAG | ACGAATATAT | CCGGAGGGTG | GCATGTGCGG | ATGAGCTGGG |

SmaI

~~~

7601 GGGTACCGAG CTCGACTTTC ACTTTTCTCT ATCACTGATA GGGAGTGGTA  
CCCATGGCTC GAGCTGAAAG TGAAAAGAGA TAGTGACTAT CCCTCACCAT

7651 AACTCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGGGAGTGG TAAACTCGAC  
TTGAGCTGAA AGTGAAAAGA GATAGTGACT ATCCCTCACC ATTTGAGCTG

7701 TTTCACITTT CTCTATCACT GATAGGGAGT GGTAAACTCG ACTTTCACIT  
AAAGTGAAAA GAGATAGTGA CTATCCCTCA CCATTTGAGC TGAAAGTGAA

7751 TTCTCTATCA CTGATAGGGA GTGGTAAACT CGACTTTCAC TTTTCTCTAT  
AAGAGATAGT GACTATCCCT CACCATTTGA GCTGAAAGTG AAAAGAGATA

7801 CACTGATAGG GAGTGGTAAA CTCGACTTTC ACTTTTCTCT ATCACTGATA  
GTGACTATCC CTCACCATTT GAGCTGAAAG TGAAAAGAGA TAGTGACTAT

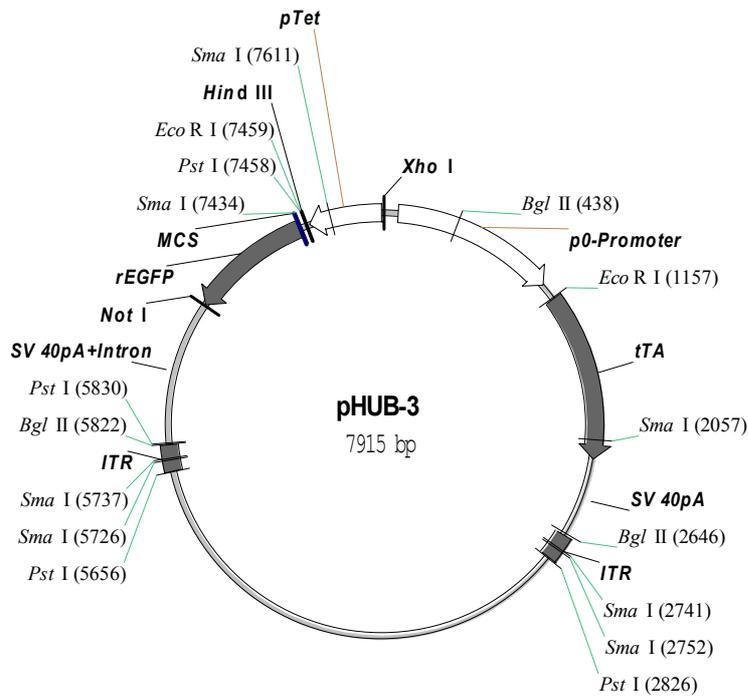
7851 GGGAGTGGTA AACTCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGGGAGTGG  
CCCTCACCAT TTGAGCTGAA AGTGAAAAGA GATAGTGACT ATCCCTCACC

XhoI

7901 TAAAC  
ATTTG

## 7.4 pHUB-3

### 7.4.1 Vektorkarte



### 7.4.2 Sequenz

XhoI  
~~~~~

1	TCGAGTTTCA	CTTTACTCTA	TCACTGATAG	GGAGCTGGTA	CAACATCTAC
	AGCTCAAAGT	GAAATGAGAT	AGTGACTATC	CCTCGACCAT	GTTGTAGATG
51	ATTTATATTG	GCTCATGTCC	AACATTACCG	CCATTCTAGA	CATTATCCCT
	TAAATATAAC	CGAGTACAGG	TTGTAATGGC	GGTAAGATCT	GTAATAGGGA
101	CCCCTTATTT	CCCTTATCAA	AATGGCTGCT	GCTCCTTCAA	GGTTCCAAAT
	GGGGAATAAA	GGGAATAGTT	TTACCGACGA	CGAGGAAGTT	CCAAGGTTTA
151	AACACTGCTT	CCTGGACCTG	ACTCCTCTTT	CCTCTGAACT	TCCTGTGTTA
	TTGTGACGAA	GGACCTGGAC	TGAGGAGAAA	GGAGACTTGA	AGGACACAAT
201	AGTGTATTCC	TAGTGCACCTG	TGCCTTGGTA	GTTGTTGAGA	TTCCCCTCTG
	TCACATAAGG	ATCACGTGAC	ACGGAACCAT	CAACAACCTCT	AAGGGGAGAC
251	CTTCTCCCTT	CTGCCTCCTC	ATCTAGTGAT	CTTGAGCTTG	TAGAAAGAAC
	GAAGAGGGAA	GACGGAGGAG	TAGATCACTA	GAACTCGAAC	ATCTTTCTTG

301 TGAATTACCA TTCTAATACG AGCATTCTCG AACTCTCCAA ATAGCCACCA
ACTTAATGGT AAGATTATGC TCGTAAGAGC TTGAGAGGTT TATCGGTGGT

351 AGCAGGACAA TACGCAGTCT TGATCATTTA AACTGCTGCA TGGCAAAAGG
TCGTCCTGTT ATGCGTCAGA ACTAGTAAAT TTGACGACGT ACCGTTTTCC

BglII
~~~~~

401 AATCGAAGGA TTTCTTAACA GAAGTGGGGG GGGGGGAGAT CTGGGCTTCT  
TTAGCTTCCT AAAGAATTGT CTTACCCCC CCCCCCTCTA GACCCGAAGA

451 TCCTGCAAGT TTCCTGATAG AGAAAATCTT CTGCCTGGGT AGAATCTCCC  
AGGACGTTCA AAGGACTATC TCTTTTAGAA GACGGACCCA TCTTAGAGGG

501 AGGATGCAGG GAGATGGAAA AAGTTGTTCC CCAGAGGACT TTGTAGTCTA  
TCCTACGTCC CTCTACCTTT TTCAACAAGG GGTCTCCTGA AACATCAGAT

551 CAGTGTTGTC GTAGCCATCG GAACAACGAG ACACCCTAAT TTGGGAGTGC  
GTCACAACAG CATCGGTAGC CTTGTTGCTC TGTGGGATTA AACCCTCACG

601 TCTGAAAGAA ACTTGCCTCT AGGCCCTAGG GCTCTCAGGC AAGGACCCTA  
AGACTTTCTT TGAACGGAGA TCCGGGATCC CGAGAGTCCG TTCTGGGAT

651 AGAAGGAATC CTTTGCTGTA GCCTTTTGGG TTTAGGTTTC TCAGCTTATC  
TCTTCCTTAG GAAACGACAT CGGAAAACCT AAATCCAAAG AGTCGAATAG

701 TATCCCTCAG AGAAGTGTGT CTATGTCCCT TTTCTGTCCC TCTGCCTCAC  
ATAGGGAGTC TCTTCACACA GATACAGGGA AAAGACAGGG AGACGGAGTG

751 CCCACCCCAA CATTCCAACG TAGGGTAGGG GGAGGTCAGT ATACACAAAG  
GGGTGGGGTT GTAAGGTTGC ATCCCATCCC CCTCCAGTCA TATGTGTTTC

801 CCCTCTGTGT AAGGGGTGGT ATGTGTCCCC CCACCCCCCT ACCCAGAGTA  
GGGAGACACA TTCCCCACCA TACACAGGGG GGTGGGGGGA TGGGTCTCAT

851 TACAATGCCC CTTCTGCTCC ATGCCCTGC CACCCTCCCC ACCACGTCTC  
ATGTTACGGG GAAGACGAGG TACGGGGACG GTGGGAGGGG TGGTGCAGAG

901 AATTGCACAT GCCAGGCTGC AATTGGTCAC GGCTCAGGAC AGCCCCCTCA  
TTAACGTGTA CGGTCCGACG TTAACCAGTG CCGAGTCCTG TCGGGGGAGT

951 TGCTGGGGAT CCAGGGGATT TTAAGCAGGT TCCAGAAAAC ACCACTCAGT  
ACGACCCCTA GGTCCCCTAA AATTCGTCCA AGGTCTTTTG TGGTGAGTCA

1001 TCCTTGTCCT CCGCTCTCTC CACCCACAG ACGCTCTGGG CCCTTGCCCC  
AGGAACAGGG GGCGAGAGAG GTGGGGTGTC TGCGAGACCC GGAACGGGG

1051 TACCCAGCT ATGGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA GACGCCATCC  
ATGGGGTCTA TACCAAATCA CTTGGCAGTC TAGCGGACCT CTGCGGTAGG

1101 ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGCG  
TGCGACAAA CTGGAGGTAT CTTCTGTGGC CCTGGCTAGG TCGGAGGCGC

EcoRI  
~~~~~

1151 GCCCCGAATT CATATGTCTA GATTAGATAA AAGTAAAGTG ATTAACAGCG
CGGGGCTTAA GTATACAGAT CTAATCTATT TTCATTTTAC TAATTGTGCG

1201 CATTAGAGCT GCTTAATGAG GTCGGAATCG AAGGTTTAAAC AACCCGTAAA

GTAATCTCGA CGAATTACTC CAGCCTTAGC TTCCAAATTG TTGGGCATTT
 1251 CTCGCCCAGA AGCTAGGTGT AGAGCAGCCT ACATTGTATT GGCATGTAAA
 GAGCGGGTCT TCGATCCACA TCTCGTCGGA TGTAACATAA CCGTACATTT
 1301 AAATAAGCGG GCTTTGCTCG ACGCCTTAGC CATTGAGATG TTAGATAGGC
 TTTATTTCGCC CGAAACGAGC TGCGGAATCG GTAACCTCTAC AATCTATCCG
 1351 ACCATACTCA CTTTTGCCCT TTAGAAGGGG AAAGCTGGCA AGATTTTTTA
 TGGTATGAGT GAAAACGGGA AATCTTCCCC TTTTCGACCGT TCTAAAAAAT
 1401 CGTAATAACG CTAAAAGTTT TAGATGTGCT TTAATAAGTC ATCGCGATGG
 GCATTATTGC GATTTTCAA AATCTACACGA AATGATTAG TAGCGCTACC
 1451 AGCAAAAGTA CATTTAGGTA CACGGCCTAC AGAAAAACAG TATGAAACTC
 TCGTTTTTCAT GTAAATCCAT GTGCCGGATG TCTTTTTGTC ATACTTTGAG
 1501 TCGAAAATCA ATTAGCCTTT TTATGCCAAC AAGGTTTTTC ACTAGAGAAT
 AGCTTTTAGT TAATCGGAAA AATACGGTTG TTCCAAAAAG TGATCTCTTA
 1551 GCATTATATG CACTCAGCGC TGTGGGGCAT TTTACTTTAG GTTGCATATT
 CGTAATATAC GTGAGTCGCG ACACCCCGTA AAATGAAATC CAACGCATAA
 1601 GGAAGATCAA GAGCATCAAG TCGCTAAAGA AGAAAGGGAA ACACCTACTA
 CCTTCTAGTT CTCGTAGTTC AGCGATTTCT TCTTTCCCTT TGTGGATGAT
 1651 CTGATAGTAT GCCGCCATTA TTACGACAAG CTATCGAATT ATTTGATCAC
 GACTATCATA CGGCGGTAAT AATGCTGTTC GATAGCTTAA TAACTAGTG
 1701 CAAGGTGCAG AGCCAGCCTT CTTATTCGGC CTTGAATTGA TCATATGCGG
 GTTCCACGTC TCGGTCGGAA GAATAAGCCG GAACCTAACT AGTATACGCC
 1751 ATTAGAAAAA CAACTTAAAT GTGAAAGTGG GTCCGCGTAC AGCCGCGCGC
 TAATCTTTTT GTTGAATTTA CACTTTCACC CAGGCGCATG TCGGCGCGCG
 1801 GTACGAAAAA CAATTACGGG TCTACCATCG AGGGCCTGCT CGATCTCCCG
 CATGCTTTTT GTTAATGCCC AGATGGTAGC TCCCGGACGA GCTAGAGGGC
 1851 GACGACGACG CCCCCGAAGA GGCAGGGCTG GCGGCTCCGC GCCTGTCCCTT
 CTGCTGCTGC GGGGGCTTCT CCGCCCCGAC CGCCGAGGCG CGGACAGGAA
 1901 TCTCCCCGCG GGACACACGC GCAGACTGTC GACGGCCCCC CCGACCGATG
 AGAGGGGCGC CCTGTGTGCG CGTCTGACAG CTGCCGGGGG GGCTGGCTAC
 1951 TCAGCCTGGG GGACGAGCTC CACTTAGACG GCGAGGACGT GGCGATGGCG
 AGTCGGACCC CCTGCTCGAG GTGAATCTGC CGCTCCTGCA CCGCTACCGC
 2001 CATGCCGACG CGCTAGACGA TTTTCGATCTG GACATGTTGG GGGACGGGGA
 GTACGGCTGC GCGATCTGCT AAAGCTAGAC CTGTACAACC CCCTGCCCTT

 SmaI
 ~~~~~~  
 2051 TTCCCCGGGT CCGGGATTTA CCCCCACGA CTCCGCCCCC TACGGCGCTC  
 AAGGGGCCCA GGCCCTAAAT GGGGGGTGCT GAGGCGGGGG ATGCCGCGAG  
 2101 TGGATATGGC CGACTTCGAG TTTGAGCAGA TGTTTACCGA TGCCCTTGGA  
 ACCTATACCG GCTGAAGCTC AAACCTCGTCT ACAAATGGCT ACGGGAACCT  
 2151 ATTGACGAGT ACGGTGGGTA GGGGGCGCGA GGATCCAGAC ATGATAAGAT

TAACTGCTCA TGCCACCCAT CCCCCGCGCT CCTAGGTCTG TACTATTCTA  
 2201 ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAACATA GAATGCAGTG AAAAAAATGC  
 TGTAACACT CAAACCTGTT TGGTGTGAT CTTACGTCAC TTTTTTTACG  
 2251 TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG  
 AAATAAACAC TTAAACACT ACGATAACGA AATAAACATT GGTAATATTC  
 2301 CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCAATTTT ATGTTTCAGG  
 GACGTTATTT GTTCAATTGT TGTTGTTAAC GTAAGTAAAA TACAAAGTCC  
 2351 TTCAGGGGGA GGTGTGGGAG GTTTTTTTAAA GCAAGTAAAA CCTCTACAAA  
 AAGTCCCCCT CCACACCCTC CAAAAAATTT CGTTCATTTT GGAGATGTTT  
 2401 TGTGGTATGG CTGATTATGA TCCTGCAAGC CTCGTCGTCT GGCCGGACCA  
 ACACCATAAC GACTAATACT AGGACGTTTC GAGCAGCAGA CCGGCTGGT  
 2451 CGCTATCTGT GCAAGGTCCC CGGACGCGCG CTCCATGAGC AGAGCGCCCG  
 GCGATAGACA CGTTCCAGGG GCCTGCGCGC GAGGTACTCG TCTCGCGGGC  
 2501 CCGCCGAGGC AAGACTCGGG CGGCGCCCTG CCCGTCCCAC CAGGTCAACA  
 GCGGCTCCG TTCTGAGCCC GCCGCGGGAC GGGCAGGGTG GTCCAGTTGT  
 2551 GCGGTAACC GGCCTCTTCA TCGGGAATGC GCGCGACCTT CAGCATCGCC  
 CCGCATTGG CCGGAGAAGT AGCCCTTACG CCGCTGGAA GTCGTAGCGG  
  

BglII  
~~~~~

 2601 GGCATGTCCC CTGGCGGACG GGAAGTATCA GCTCGACCAA GCTCAGATCT
 CCGTACAGGG GACCGCCTGC CCTTCATAGT CGAGCTGGTT CGAGTCTAGA
 2651 GGATCTGGCC GCGCGCGCGC GCGCAGGAAC CCCTAGTGAT GGAGTTGGCC
 CCTAGACCGG CGCGCGCGCG CGCGTCCTTG GGGATCACTA CCTCAACCGG

SmaI SmaI
~~~~~            ~~~

 2701 ACTCCCTCTC TGCGCGCTCG CTCGCTCACT GAGGCCGCC GGGCAAAGCC  
 TGAGGGAGAG ACGCGCGAGC GAGCGAGTGA CTCCGGCGGG CCCGTTTCGG  
  

SmaI  
~~~~~

 2751 CGGGCGTCGG GCGACCTTTG GTCGCCCGGC CTCAGTGAGC GAGCGAGCGC
 GCCCGCAGCC CGCTGGAAC CAGCGGGCCG GAGTCACTCG CTCGCTCGCG

PstI
~~~~~

 2801 GCAGAGAGGG AGTGGCCAAG CTGCAGCCTG CATTAAATGAA TCGGCCAACG  
 CGTCTCTCCC TCACCGGTTT GACGTCGGAC GTAATTAATT AGCCGGTTGC  
 2851 CGCGGGGAGA GCGGTTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA  
 GCGCCCCTCT CCGCAAACG CATAACCCGC GAGAAGGCGA AGGAGCGAGT  
 2901 CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC  
 GACTGAGCGA CGCGAGCCAG CAAGCCGACG CCGCTCGCCA TAGTCGAGTG  
 2951 TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA  
 AGTTTCCGCC ATTATGCCAA TAGGTGTCTT AGTCCCCTAT TGCGTCCTTT  
 3001 GAACATGTGA GCAAAGGCC AGCAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAAGCCG

CTTGTACACT CGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCCTTGGCA TTTTTCCGGC  
 3051 CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA  
 GCAACGACCG CAAAAAGGTA TCCGAGGCGG GGGGACTGCT CGTAGTGTTT  
 3101 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA  
 TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGTCCTG ATATTTCTAT  
 3151 CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC  
 GGTCCGCAAA GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CGCGAGAGGA CAAGGCTGGG  
 3201 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG  
 ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC TTCGCACCGC  
 3251 CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTCG  
 GAAAGAGTTA CGAGTGCAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC  
 3301 CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG  
 GAGGTTTCGAC CCGACACACG TGCTTGGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACGC  
 3351 CTTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA  
 GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT TGGGCCATTC TGTGCTGAAT  
 3401 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT  
 AGCGGTGACC GTCGTCGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA  
 3451 AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA  
 TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGATG CCGATGTGAT  
 3501 GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA  
 CTTCTGTCA TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCT  
 3551 AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG  
 TTTTCTCAAC CATCGAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC  
 3601 TGGTTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC  
 ACCAAAAAAA CAAACGTTTCG TCGTCTAATG CGCGTCTTTT TTTCTTAGAG  
 3651 AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA  
 TTCTTCTAGG AAAC TAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT CACCTTGCTT  
 3701 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC  
 TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTACTCT AATAGTTTTT CCTAGAAGTG  
 3751 CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT  
 GATCTAGGAA AATTTAATTT TTAATCAAAA ATTTAGTTAG ATTTTCATATA  
 3801 ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT  
 TACTCATTTG AACCAGACTG TCAATGGTTA CGAATTAGTC ACTCCGTGGA  
 3851 ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT  
 TAGAGTCGCT AGACAGATAA AGCAAGTAGG TATCAACGGA CTGAGGGGCA  
 3901 CGTG TAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG  
 GCACATCTAT TGATGCTATG CCCTCCCGAA TGGTAGACCG GGGTCACGAC  
 3951 CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA  
 GTTACTATGG CGCTCTGGGT GCGAGTGGCC GAGGTCTAAA TAGTCGTTAT

4001 AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC  
TTGGTTCGGT GGCCTTCCCC GCTCGCGTCT TCACCAGGAC GTTGAAATAG  
4051 CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT  
GCGGAGGTAG GTCAGATAAT TAACAACGGC CCTTCGATCT CATTCATCAA  
4101 CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG  
GCGGTCAATT ATCAAACGCG TTGCAACAAC GGTAACGATG TCCGTAGCAC  
4151 GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG  
CACAGTGC GA CAGCAAACC ATACCGAAGT AAGTCGAGGC CAAGGGTTGC  
4201 ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT  
TAGTTCCGCT CAATGTACTA GGGGGTACAA CACGTTTTTTT CGCCAATCGA  
4251 CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTATCA  
GGAAGCCAGG AGGCTAGCAA CAGTCTTCAT TCAACCGGC TCACAATAGT  
4301 CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT  
GAGTACCAAT ACCGTCGTGA CGTATTAAGA GAATGACAGT ACGGTAGGCA  
4351 AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT  
TTCTACGAAA AGACACTGAC CACTCATGAG TTGGTTCAGT AAGACTCTTA  
4401 AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT  
TCACATACGC CGCTGGCTCA ACGAGAACGG GCCGCAGTTA TGCCCTATTA  
4451 ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT  
TGGCGCGGTG TATCGTCTTG AAATTTTAC GAGTAGTAAC CTTTTGCAAG  
4501 TTCGGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCTGA  
AAGCCCCGCT TTTGAGAGTT CCTAGAATGG CGACAACCTT AAGTCAAGCT  
4551 TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTTACC  
ACATTGGGTG AGCACGTGGG TTGACTAGAA GTCGTAGAAA ATGAAAGTGG  
4601 AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAAGGG  
TCGCAAAGAC CCACTCGTTT TTGTCCTTCC GTTTTACGGC GTTTTTTCCC  
4651 AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT  
TTATTCCC GC TGTGCCTTTA CAACTTATGA GTATGAGAAG GAAAAAGTTA  
4701 ATTATTGAAG CATTATATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT  
TAATAACTTC GTAAATAGTC CCAATAACAG AGTACTCGCC TATGTATAAA  
4751 GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG  
CTTACATAAA TCTTTTTTATT TGTTTATCCC CAAGGCGCGT GTAAAGGGGC  
4801 AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT  
TTTTACGGT G GACTGCAGA TTCTTTGGTA ATAATAGTAC TGTAAATTGGA  
4851 ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTTC GTCTCGCGCG TTTCCGGTGAT  
TATTTTTTATC CGCATAGTGC TCCGGGAAAG CAGAGCGCGC AAAGCCACTA  
4901 GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG  
CTGCCACTTT TGGAGACTGT GTACGTCGAG GGCCTCTGCC AGTGTCGAAC  
4951 TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG  
AGACATTGCG CTACGGCCCT CGTCTGTTTC GGCAGTCCCC CGCAGTCGCC

5001 GTGTTGGCGG GTGTCGGGGC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT  
CACAAACCGC CACAGCCCCG ACCGAATTGA TACGCCGTAG TCTCGTCTAA  
  
5051 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG  
CATGACTCTC ACGTGGTATA CGCCACACTT TATGGCGTGT CTACGCATTC  
  
5101 GAGAAAATAC CGCATCAGGC GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG  
CTCTTTTATG GCGTAGTCCG CTGCGCGGGA CATCGCCGCG TAATTGCGCG  
  
5151 GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT  
CGCCACACC ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGGA  
  
5201 AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG  
TCGCGGGCGA GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC  
  
5251 GCTTTCCTCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT  
CGAAAGGGGC AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG AGGGAAATCC CAAGCTAAA  
  
5301 AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC  
TCACGAAATG CCGTGGAGCT GGGGTTTTTTT GAACATAATCC CACTACCAAG  
  
5351 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG  
TGCATCACCC GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC  
  
5401 AGTCCACGTT CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC  
TCAGGTGCAA GAAATTATCA CCTGAGAACA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG  
  
5451 AACCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTT  
TTGGGATAGA GCCAGATAAG AAAACTAAAT ATTCCTTAAA ACGGCTAAAG  
  
5501 GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACCGAATT  
CCGGATAACC AATTTTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA TTGCGCTTAA  
  
5551 TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCG CATTTCGCCAT TCAGGCTACG  
AATTGTTTTA TAATTGCAA TGTAAAGCG GTAAGCGGTA AGTCCGATGC  
  
5601 CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGG  
GTTGACAACC CTTCCCGCTA GCCACGCCCG GAGAAGCGAT AATGCGGTCC  
  
PstI  
~~~~~  
5651 CTGCAGCTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG
GACGTGCAAC CGGTGAGGGA GAGACGCGCG AGCGAGCGAG TGACTIONCGC

SmaI SmaI
~~~~~ ~~~~~  
5701 GGCGACAAA GGTCGCCCCG CGCCCGGGCT TTGCCCCGGC GCCTCAGTG  
CCGCTGGTTT CCAGCGGGCT GCGGGCCCCG AACGGGCCCC CCGGAGTCAC  
  
5751 AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTC  
TCGCTCGCTC GCGCGTCTCT CCCTCACCGG TTGAGGTAGT GATCCCCAAG  
  
PstI  
~~~~~  
BglII
~~~~~  
5801 CTGCGCGCGC GCGCGCGGCC AGATCTGCAG ACATGATAAG ATACATTGAT  
GACGCGCGCG CGCGCGCCGG TCTAGACGTC TGTACTATTC TATGTAACATA

|      |                          |                           |                           |                          |                            |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 5851 | GAGTTTGGAC<br>CTCAAACCTG | AAACCACAAC<br>TTTGGTGTGG  | TAGAATGCAG<br>ATCTTACGTC  | TGAAAAAAT<br>ACTTTTTTTA  | GCTTTATTTG<br>CGAAATAAAC   |
| 5901 | TGAAATTTGT<br>ACTTTAAACA | GATGCTATTG<br>CTACGATAAC  | CTTTATTTGT<br>GAAATAAACA  | AACCATTATA<br>TTGGTAATAT | AGCTGCAATA<br>TCGACGTTAT   |
| 5951 | AACAAGTTAA<br>TTGTTCAATT | CAACAACAAT<br>GTTGTTGTTA  | TGCATTTCATT<br>ACGTAAGTAA | TTATGTTTCA<br>AATACAAAGT | GGTTCAGGGG<br>CCAAGTCCCC   |
| 6001 | GAGGTGTGGG<br>CTCCACACCC | AGGTTTTTTA<br>TCCAAAAAAT  | AAGCAAGTAA<br>TTCGTTTCATT | AACCTCTACA<br>TTGGAGATGT | AATGTGGTAT<br>TTACACCATA   |
| 6051 | GGCTGATTAT<br>CCGACTAATA | GATCTCTAGT<br>CTAGAGATCA  | CAAGGCACTA<br>GTTCCGTGAT  | TACATCAAAT<br>ATGTAGTTTA | ATTCCCTTATT<br>TAAGGAATAA  |
| 6101 | AACCCCTTTA<br>TTGGGGAAAT | CAAATTAATA<br>GTTTAATTTT  | AGCTAAAGGT<br>TCGATTTCCA  | ACACAATTTT<br>TGTGTTAAAA | TGAGCATAGT<br>ACTCGTATCA   |
| 6151 | TATTAATAGC<br>ATAATTATCG | AGACACTCTA<br>TCTGTGAGAT  | TGCCTGTGTG<br>ACGGACACAC  | GAGTAAGAAA<br>CTCATTCTTT | AAACAGTATG<br>TTTGTGCATC   |
| 6201 | TTATGATTAT<br>AATACTAATA | AACTGTTATG<br>TTGACAATAC  | CCTACTTATA<br>GGATGAATAT  | AAGGTTACAG<br>TTCCAATGTC | AATATTTTTTC<br>TTATAAAAAAG |
| 6251 | CATAATTTTC<br>GTATTAAAAG | TTGTATAGCA<br>AACATATCGT  | GTGCAGCTTT<br>CACGTCGAAA  | TTCCTTTGTG<br>AAGGAAACAC | GTGTAAATAG<br>CACATTTATC   |
| 6301 | CAAAGCAAGC<br>GTTTCGTTTC | AAGAGTTCTA<br>TTCTCAAGAT  | TTACTAAACA<br>AATGATTTGT  | CAGCATGACT<br>GTCGTAAGTA | CAAAAACTT<br>GTTTTTTGAA    |
| 6351 | AGCAATTCTG<br>TCGTTAAGAC | AAGGAAAGTC<br>TTCCTTTCAG  | CTTGGGGTCT<br>GAACCCAGAG  | TCTACCTTTC<br>AGATGGAAAG | TCTTCTTTTT<br>AGAAGAAAAA   |
| 6401 | TGGAGGAGTA<br>ACCTCCTCAT | GAATGTTGAG<br>CTTACAACCT  | AGTCAGCAGT<br>TCAGTCGTCA  | AGCCTCATCA<br>TCGGAGTAGT | TCACTAGATG<br>AGTGATCTAC   |
| 6451 | GCATTTCTTC<br>CGTAAAGAAG | TGAGCAAAAC<br>ACTCGTTTTG  | AGGTTTTTCT<br>TCCAAAAGGA  | CATTAAAGGC<br>GTAATTTCCG | ATTCCACCAC<br>TAAGGTGGTG   |
| 6501 | TGCTCCCAT<br>ACGAGGGTAA  | CATCAGTTCC<br>GTAGTCAAGG  | ATAGGTTGGA<br>TATCCAACCT  | ATCTAAAATA<br>TAGATTTTAT | CACAAACAAT<br>GTGTTTGTTA   |
| 6551 | TAGAATCAGT<br>ATCTTAGTCA | AGTTTAAACAC<br>TCAAATTGTG | ATTATACACT<br>TAATATGTGA  | TAAAAATTTT<br>ATTTTTAAAA | ATATTTACCT<br>TATAAATGGA   |
| 6601 | TAGAGCTTTA<br>ATCTCGAAAT | AATCTCTGTA<br>TTAGAGACAT  | GGTAGTTTGT<br>CCATCAAACA  | CCAATTATGT<br>GGTTAATACA | CACACCACAG<br>GTGTGGTGTC   |
|      |                          |                           |                           | Not I<br>~~~~~           |                            |
| 6651 | AAGTAAGGTT<br>TTCATTCCAA | CCTTCACAAA<br>GGAAGTGTTT  | GATCCTCTAG<br>CTAGGAGATC  | AGTCGCGGCC<br>TCAGCGCCGG | GCTTTACTTG<br>CGAAATGAAC   |
| 6701 | TACAGCTCGT<br>ATGTCGAGCA | CCATGCCGAG<br>GGTACGGCTC  | AGTGATCCCG<br>TCACTAGGGC  | GCGGCGGTCA<br>CGCCGCCAGT | CGAACTCCAG<br>GCTTGAGGTC   |
| 6751 | CAGGACCATG<br>GTCCTGGTAC | TGATCGCGCT<br>ACTAGCGCGA  | TCTCGTTGGG<br>AGAGCAACCC  | GTCTTTGCTC<br>CAGAAACGAG | AGGGCGGACT<br>TCCCCCCTGA   |

6801 GGGTGCTCAG GTAGTGGTTG TCGGGCAGCA GCACGGGGCC GTCGCCGATG  
CCCACGAGTC CATCACCAAC AGCCCGTCGT CGTGCCCCGG CAGCGGCTAC

6851 GGGGTGTTCT GCTGGTAGTG GTCGGCGAGC TGCACGCTGC CGTCCTCGAT  
CCCCACAAGA CGACCATCAC CAGCCGCTCG ACGTGCGACG GCAGGAGCTA

6901 GTTGTGGCGG ATCTTGAAGT TCACCTTGAT GCCGTTCTTC TGCTTGTCGG  
CAACACCGCC TAGAACTTCA AGTGGAACTA CGGCAAGAAG ACGAACAGCC

6951 CCATGATATA GACGTTGTGG CTGTTGTAGT TGTACTCCAG CTTGTGCCCC  
GGTACTATAT CTGCAACACC GACAACATCA ACATGAGGTC GAACACGGGG

7001 AGGATGTTGC CGTCCTCCTT GAAGTCGATG CCCTTCAGCT CGATGCGGTT  
TCCTACAACG GCAGGAGGAA CTTTCAGCTAC GGAAGTCGA GCTACGCCAA

7051 CACCAGGGTG TCGCCCTCGA ACTTCACCTC GCGCGGGTC TTGTAGTTGC  
GTGGTCCCAC AGCGGGAGCT TGAAGTGGAG CCGCGCCCAG AACATCAACG

7101 CGTCGTCTTT GAAGAAGATG GTGCGCTCCT GGACGTAGCC TTCGGGCATG  
GCAGCAGGAA CTTCTTCTAC CACGCGAGGA CCTGCATCGG AAGCCCGTAC

7151 GCGGACTTGA AGAAGTCGTG CTGCTTCATG TGGTCGGGGT AGCGGCTGAA  
CGCCTGAACT TCTTCAGCAC GACGAAGTAC ACCAGCCCCA TCGCCGACTT

7201 GCACTGCACG CCGTAGGTCA GGGTGGTCAC GAGGGTGGGC CAGGGCACGG  
CGTGACGTGC GGCATCCAGT CCCACCAGTG CTCCCACCCG GTCCCGTGCC

7251 GCAGCTTGCC GGTGGTGCAG ATGAACTTCA GGGTCAGCTT GCCGTAGGTG  
CGTCGAACGG CCACCACGTC TACTTGAAGT CCCAGTCGAA CGGCATCCAC

7301 GCATCGCCCT CGCCCTCGCC GGACACGCTG AACTTGTGGC CGTTTACGTC  
CGTAGCGGGA GCGGGAGCGG CCTGTGCGAC TTGAACACCG GCAAATGCAG

7351 GCCGTCCAGC TCGACCAGGA TGGGCACCAC CCCGGTGAAC AGCTCCTCGC  
CGGCAGGTCG AGCTGGTCCT ACCCGTGGTG GGGCCACTTG TCGAGGAGCG

SmaI  
~~~~~

7401 CCTTGCTCAC CATGGTGGCG ACCGGTGGAT CCCGGGCCCCG CGGTACCGTC
GGAACGAGTG GTACCACCGC TGGCCACCTA GGGCCCAGGC GCCATGGCAG

PstI
~~~~~

EcoRI HindIII  
~~~~~ ~~~~~

7451 GACTGCAGAA TTCGAAGCTT GCGGGGCCGC GGAGGCTGGA TCGGTCCCCG
CTGACGTCTT AAGCTTCGAA CGCCCCGGCG CCTCCGACCT AGCCAGGGCC

7501 TGTCTTCTAT GGAGGTCAA ACAGCGTGGA TGGCGTCTCC AGGCGATCTG
ACAGAAGATA CCTCCAGTTT TGTCGCACCT ACCGCAGAGG TCCGCTAGAC

7551 ACGGTTCACT AAACGAGCTC TGCTTATATA GGCCTCCCAC CGTACACGCC
TGCCAAGTGA TTTGCTCGAG ACGAATATAT CCGGAGGGTG GCATGTGCGG

SmaI
~~~~~

7601 TACTCGACCC GGGTACCGAG CTCGACTTTC ACTTTTCTCT ATCACTGATA  
ATGAGCTGGG CCCATGGCTC GAGCTGAAAG TGAAAAGAGA TAGTACTAT

7651 GGGAGTGGTA AACTCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGGGAGTGG  
CCCTCACCAT TTGAGCTGAA AGTGAAAAGA GATAGTGACT ATCCCTCACC

7701 TAAACTCGAC TTTCACTTTT CTCTATCACT GATAGGGAGT GGTAAGTTCG  
ATTTGAGCTG AAAGTGAAAA GAGATAGTGA CTATCCCTCA CCATTTGAGC

7751 ACTTTCACTT TTCTCTATCA CTGATAGGGA GTGGTAAACT CGACTTTCAC  
TGAAAGTGAA AAGAGATAGT GACTATCCCT CACCATTTGA GCTGAAAGTG

7801 TTTTCTCTAT CACTGATAGG GAGTGGTAAA CTCGACTTTC ACTTTTCTCT  
AAAAGAGATA GTGACTATCC CTCACCATTT GAGCTGAAAG TGAAAAGAGA

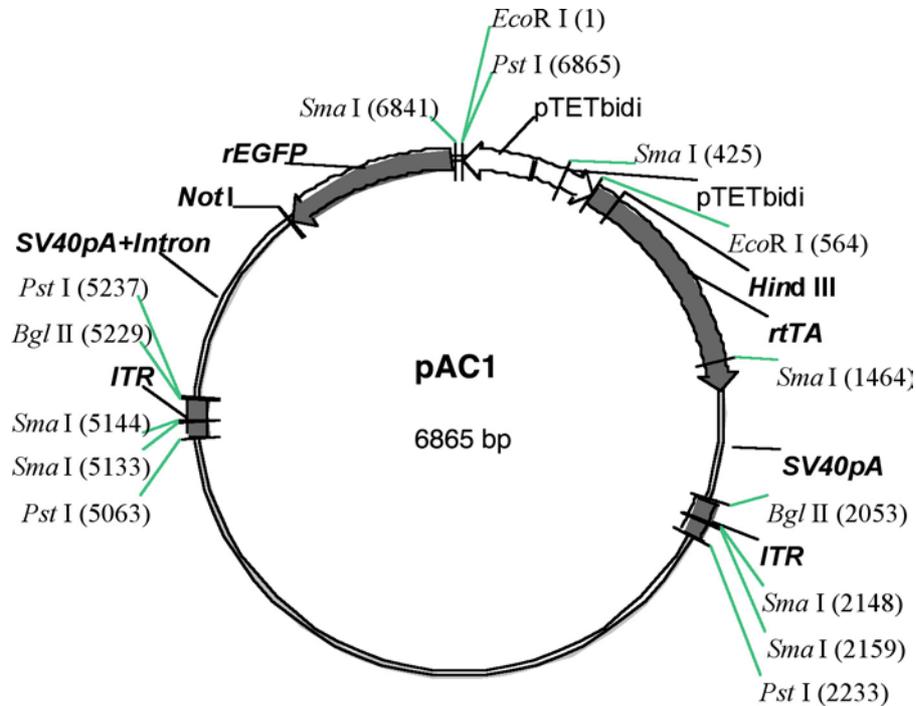
7851 ATCACTGATA GGGAGTGGTA AACTCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA  
TAGTGACTAT CCCTCACCAT TTGAGCTGAA AGTGAAAAGA GATAGTGACT

XhoI

7901 TAGGGAGTGG TAAAC  
ATCCCTCACC ATTTG

## 7.5 pAC1

### 7.5.1 Vektorkarte



### 7.5.2 Sequenz

```

EcoRI
~~~~~
1 AATTCGGGGC CGCGGAGGCT GGATCGGTCC CGGTGTCTTC TATGGAGGTC
 TTAAGCCCCG GCGCCTCCGA CCTAGCCAGG GCCACAGAAG ATACCTCCAG

51 AAAACAGCGT GGATGGCGTC TCCAGGCGAT CTGACGGTTC ACTAAACGAG
 TTTTGTGCGA CCTACCGCAG AGGTCCGCTA GACTGCCAAG TGATTTGCTC

101 CTCTGCTTAT ATAGGTCGAG TTTACCACTC CCTATCAGTG ATAGAGAAAA
 GAGACGAATA TATCCAGCTC AAATGGTGAG GGATAGTCAC TATCTCTTTT

151 GTGAAAGTCG AGTTTACCAC TCCCTATCAG TGATAGAGAA AAGTGAAAAGT
 CACTTTCAGC TCAAATGGTG AGGGATAGTC ACTATCTCTT TTCACTTTCA

201 CGAGTTTACC ACTCCCTATC AGTGATAGAG AAAAGTGAAA GTCGAGTTTA
 GCTCAAATGG TGAGGGATAG TCACTATCTC TTTTCACTTT CAGCTCAAAT

251 CCACTCCCTA TCAGTGATAG AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC
 GGTGAGGGAT AGTCACTATC TCTTTTCACT TTCAGCTCAA ATGGTGAGGG

301 TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCGAG TTTACCACTC CCTATCAGTG

```



1201 CGCGCGCGTA CGAAAAACAA TTACGGGTCT ACCATCGAGG GCCTGCTCGA  
GCGCGCGCAT GCTTTTTGTT AATGCCCAGA TGGTAGCTCC CGGACGAGCT

1251 TCTCCCGGAC GACGACGCC CCGAAGAGGC GGGGCTGGCG GCTCCGCGCC  
AGAGGGCCTG CTGCTGCGGG GGCTTCTCCG CCCCAGCCGC CGAGGCGCGG

1301 TGTCTTTTCT CCCCAGCGGA CACACGCGCA GACTGTCGAC GGCCCCCCCG  
ACAGGAAAGA GGGGCGCCCT GTGTGCGCGT CTGACAGCTG CCGGGGGGGC

1351 ACCGATGTCA GCCTGGGGGA CGAGCTCCAC TTAGACGGCG AGGACGTGGC  
TGGCTACAGT CGGACCCCTT GCTCGAGGTG AATCTGCCGC TCCTGCACCG

1401 GATGGCGCAT GCCGACGCGC TAGACGATTT CGATCTGGAC ATGTTGGGGG  
CTACCGCGTA CGGCTGCGCG ATCTGCTAAA GCTAGACCTG TACAACCCCC

SmaI

~~~~~

1451 ACGGGGATTC CCCGGGTCCG GGATTTACCC CCCACGACTC CGCCCCCTAC  
TGCCCTAAG GGGCCAGGC CCTAAATGGG GGGTGCTGAG GCGGGGGATG

1501 GCGGCTCTGG ATATGGCCGA CTTCGAGTTT GAGCAGATGT TTACCGATGC  
CCGCGAGACC TATACCGGCT GAAGCTCAAA CTCGTCTACA AATGGCTACG

1551 CTTTGAATT GACGAGTACG GTGGGTAGGG GCGCGAGGA TCCAGACATG  
GGAACCTTAA CTGCTCATGC CACCCATCCC CCGCGCTCCT AGGTCTGTAC

1601 ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA  
TATTCTATGT AACTACTCAA ACCTGTTTGG TGTTGATCTT ACGTCACTTT

1651 AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA  
TTTTACGAAA TAAACTTTT AAACACTACG ATAACGAAAT AAACATTGGT

1701 TTATAAGCTG CAATAAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG  
AATATTCGAC GTTATTTGTT CAATTGTTGT TGTTAACGTA AGTAAAATAC

1751 TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAACCT  
AAAGTCCAAG TCCCCCTCCA CACCCTCCAA AAAATTTTCGT TCATTTTGGA

1801 CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCC TGCAAGCCTC GTCGTCTGGC  
GATGTTTACA CCATACCGAC TAATACTAGG ACGTTCGGAG CAGCAGACCG

1851 CGGACCACGC TATCTGTGCA AGGTCCCCGG ACGCGCGCTC CATGAGCAGA  
GCCTGGTGCG ATAGACACGT TCCAGGGGCC TGCGCGCGAG GTRACTCGTCT

1901 GCGCCCAGCG CCGAGGCAAG ACTCGGGCGG CGCCCTGCCC GTCCCACCAG  
CGCGGGCGGC GGCTCCGTTT TGAGCCCGCC GCGGGACGGG CAGGGTGGTC

1951 GTCAACAGGC GGTAACCGGC CTCTTCATCG GGAATGCGCG CGACCTTCAG  
CAGTTGTCCG CCATTGGCCG GAGAAGTAGC CCTTACGCGC GCTGGAAGTC

2001 CATCGCCGGC ATGTCCCCTG GCGGACGGGA AGTATCAGCT CGACCAAGCT  
GTAGCGGCCG TACAGGGGAC CGCCTGCCCT TCATAGTCGA GCTGGTTTCGA

BglII

~~~~~

2051 CAGATCTGGA TCTGGCCGCG CGCGCGCGCG CAGGAACCCC TAGTGATGGA  
GTCTAGACCT AGACCGGCGC GCGCGCGCGC GTCCTTGGGG ATCACTACCT

SmaI

```

                ~~~~~~
2101  GTTGGCCACT CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGCCCCGG
      CAACCGGTGA GGGAGAGACG CGCGAGCGAG CGAGTGACTC CGGCGGGCCC

          SmaI
      ~~~~~~
2151 CAAAGCCCCG GCGTCGGGCG ACCTTTGGTC GCCCGGCCTC AGTGAGCGAG
 GTTTCGGGCC CGCAGCCCCG TGGAAACCAG CGGGCCGGAG TCACTCGCTC

 PstI
            ~~~~~~
2201  CGAGCGCGCA GAGAGGGAGT GGCCAAGCTG CAGCCTGCAT TAATGAATCG
      GCTCGCGCGT CTCTCCCTCA CCGGTTTCGAC GTCGGACGTA ATTACTTAGC

2251  GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC
      CGGTTGCGCG CCCCTCTCCG CCAAACGCAT AACCCGCGAG AAGGCGAAGG

2301  TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC
      AGCGAGTGAC TGAGCGACGC GAGCCAGCAA GCCGACGCCG CTCGCCATAG

2351  AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG
      TCGAGTGAGT TTCCGCCATT ATGCCAATAG GTGTCTTAGT CCCCTATTGC

2401  CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
      GTCCTTTCTT GTACACTCGT TTTCCGGTCG TTTTCCGGTC CTTGGCATTT

2451  AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA
      TTCCGGCGCA ACGACCGCAA AAAGGTATCC GAGGCGGGGG GACTGCTCGT

2501  TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT
      AGTGTTTTTA GCTGCGAGTT CAGTCTCCAC CGCTTTGGGC TGTCTTGATA

2551  AAAGATACCA GGCCTTTCCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT
      TTTCTATGGT CCGCAAAGGG GGACCTTCGA GGGAGCACGC GAGAGGACAA

2601  CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGGAAG
      GGCTGGGACG GCGAATGGCC TATGGACAGG CGGAAAGAGG GAAGCCCTTC

2651  CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG
      GCACCGCGAA AGAGTTACGA GTGCGACATC CATAGAGTCA AGCCACATCC

2701  TCGTTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCAGC
      AGCAAGCGAG GTTCGACCCG ACACACGTGC TTGGGGGGCA AGTCGGGCTG

2751  CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA
      GCGACGCGGA ATAGGCCATT GATAGCAGAA CTCAGGTTGG GCCATTCTGT

2801  CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA
      GCTGAATAGC GGTGACCGTC GTCGGTGACC ATTGTCTTAA TCGTCTCGCT

2851  GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC
      CCATACATCC GCCACGATGT CTCAAGAACT TCACCACCGG ATTGATGCCG

2901  TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC
      ATGTGATCTT CCTGTCATAA ACCATAGACG CGAGACGACT TCGGTCAATG

2951  CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG
      GAAGCCTTTT TCTCAACCAT CGAGAACTAG GCCGTTTGTG TGGTGGCGAC

```

3001 GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA  
CATCGCCACC AAAAAACAA ACGTTCGTCG TCTAATGCGC GTCTTTTTTT  
3051 GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG  
CCTAGAGTTC TTCTAGGAAA CTAGAAAAGA TGCCCCAGAC TGCGAGTCAC  
3101 GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA  
CTTGCTTTTG AGTGCAATTC CCTAAAACCA GTACTCTAAT AGTTTTTCCT  
3151 TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA  
AGAAGTGGAT CTAGGAAAAT TTAATTTTTTA CTTCAAAATT TAGTTAGATT  
3201 AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA  
TCATATATAC TCATTTGAAC CAGACTGTCA ATGGTTACGA ATTAGTCACT  
3251 GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC  
CCGTGGATAG AGTCGCTAGA CAGATAAAGC AAGTAGGTAT CAACGGACTG  
3301 TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC  
AGGGGCAGCA CATCTATTGA TGCTATGCCC TCCCGAATGG TAGACCGGGG  
3351 AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC  
TCACGACGTT ACTATGGCGC TCTGGGTGCG AGTGGCCGAG GTCTAAATAG  
3401 AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA  
TCGTTATTTG GTCGGTCGGC CTTCCCGGCT CCGCTCTTCA CCAGGACGTT  
3451 CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA  
GAAATAGGCG GAGGTAGGTC AGATAATTAA CAACGGCCCT TCGATCTCAT  
3501 AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG  
TCATCAAGCG GTCAATTATC AAACGCGTTG CAACAACGGT AACGATGTCC  
3551 CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT  
GTAGACCAC AGTGCGAGCA GCAAACCATA CCGAAGTAAG TCGAGGCCAA  
3601 CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG  
GGGTTGCTAG TTCCGCTCAA TGTACTAGGG GGTACAACAC GTTTTTTCGC  
3651 GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGAGT  
CAATCGAGGA AGCCAGGAGG CTAGCAACAG TCTTCATTCA ACCGGCGTCA  
3701 GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC  
CAATAGTGAG TACCAATACC GTCGTGACGT ATTAAGAGAA TGACAGTACG  
3751 CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC  
GTAGGCATTC TACGAAAAGA CACTGACCAC TCATGAGTTG GTTCAGTAAG  
3801 TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG  
ACTCTTATCA CATACGCCGC TGGCTCAACG AGAACGGGCC GCAGTTATGC  
3851 GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA  
CCTATTATGG CGCGGTGTAT CGTCTTGAAA TTTTCACGAG TAGTAACCTT  
3901 AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC  
TTGCAAGAAG CCCCCTTTTT GAGAGTTTCT AGAATGGCGA CAACTCTAGG  
3951 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC  
TCAAGCTACA TTGGGTGAGC ACGTGGGTTG ACTAGAAGTC GTAGAAAATG

4001 T TTCACCAGC G TTTTCTGGGT G AGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA  
AAAGTGGTCG C AAAGACCCA CTCGTTTTTG TCCTTCCGTT TTACGGCGTT  
4051 A AAAAGGGAAT A AAGGGCGACA C CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT  
TTTTCCCTTA T TTCCCCTGT GCCTTTACAA CTTATGAGTA TGAGAAGGAA  
4101 T TTC AATATT A ATTGAAGCAT T TTATCAGGGT T ATTGTCTCA TGAGCGGATA  
AAAGTTATAA T AACTTTCGTA A ATAGTCCCA ATAACAGAGT ACTCGCCTAT  
4151 C ATATTTGAA T GTATTTAGA A AAAATAAACA A ATAGGGGTT C CGCGCACAT  
GTATAAACTT A CATAAATCT T TTTTATTTGT T TATCCCCAA GCGCGTGTA  
4201 T TCCCCGAAA A GTGCCACCT G ACGTCTAAG A AAACCATTAT T ATCATGACA  
AAGGGGCTTT T CACGGTGGA C TG CAGATTC T TTTGGTAATA ATAGTACTGT  
4251 T TAACCTATA A AAAATAGGCG T ATCACGAGG C CCCTTTCGTC T CGCGCGTTT  
AATTGGATAT T TTTTATCCGC A TAGTGCTCC G GGGAAAGCAG AGCGCGCAA  
4301 C GGTGATGAC G GTGAAAACC T CTGACACAT G CAGCTCCCG A GAGACGGTCA  
GCCACTACTG C CACTTTTGG A GACTGTGTA C GTCGAGGGC C TCTGCCAGT  
4351 C AGCTTGTCT G TAAGCGGAT G GCCGGGAGCA G ACAAGCCCG T CAGGGCGCG  
GTCGAACAGA C ATTCGCCTA C GGGCCCTCGT C TGTTCCGGC AGTCCCAGC  
4401 T CAGCGGGTG T TGCGGGTG T TCGGGGCTGG C TTA ACTATG C GGCATCAGA  
AGTCGCCAC A ACCGCCAC A GCCCCGACC G AATTGATAC GCCGTAGTCT  
4451 G CAGATTGTA C TGAGAGTGC A ACCATATGCG G GTGTGAAATA C CGCACAGAT  
CGTCTAACAT A GACTCTCAC G TGGTATACG C CACTTTTAT G GCGTGTCTA  
4501 G CGTAAGGAG A AAAATACCG C ATCAGGCGAC G GCGCCCTGTA C GCGGCGATT  
CGCATTCTC T TTTTATGGC G TAGTCCGCTG C GCGGGACAT C GCGCGTAA  
4551 A AGCGCGGCG G GTGTGGTGG T TACGCGCAG C GTGACCGCT A CACTTGCCA  
TTCGCGCCG C CCACACCAC A ATGCGCGTC G CACTGGCGA TGTGAACGGT  
4601 G CGCCCTAGC G CCCGCTCCT T TCGCTTTCT T CCCTTCCTT T TCTCGCCACG  
CGCGGGATC G CGGGCGAGGA A AGCGAAAGA G AGGAAGGAA A AGAGCGGTG  
4651 T TCGCCGGCT T TCCCCGTCA A AGCTCTAAAT C GGGGGCTCC C TTTAGGGTT  
AAGCGGCCG A AAGGGCAGT T CGAGATTTA G CCCCCGAGG G AAATCCCCA  
4701 C CGATTTAGT G CTTTACGGC A CCTCGACCC C AAAAAACTT G ATTAGGGTG  
GGCTAAATCA C GAAATGCCG T GGAGCTGGG G TTTTTTGAA C TAATCCCAC  
4751 A TG GTTCACG T TAGTGGGCCA T CGCCCTGAT A GACGGTTTT TCGCCCTTTG  
TACCAAGTGC A TCACCCGGT G AGCGGGACTA TCTGCCAAA A AGCGGAAAC  
4801 A CGTTGGAGT C CACGTTCTT T AATAGTGG A CTCTTGTTC C AA ACTGGAAC  
TGCAACCTCA G GTGCAAGAA A ATTATCACCT G AGAACAAGG TTTGACCTG  
4851 A AACTCAAC C CTATCTCGG T CTATTCTTT T GATTTATAA GGGATTTTGC  
TTGTGAGTTG G GATAGAGCC A GATAAGAAA A CTAAATATT C CTTAAAACG  
4901 C GATTTCCGC T ATTGGTTA A AAAATGAGC T GATTTAACA AAAATTTAAC  
GCTAAAGCCG A GATAACCAAT T TTTTACTCG A CTAAATTGT TTTTAAATTG  
4951 G CGAATTTTA A CAAAATATT A ACGTTTACA A TTTCCGCAT TCGCCATTCA

CGCTTAAAAT TGTTTTATAA TTGCAAATGT TAAAGCGGTA AGCGGTAAGT

5001 GGCTACGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG TCGGGCCTC TTCGCTATTA  
CCGATGCGTT GACAACCCTT CCCGCTAGCC ACGCCCGGAG AAGCGATAAT

PstI  
~~~~~

5051 CGCCAGGCTG CAGCTTGGCC ACTCCCTCTC TGCGCGCTCG CTCGCTCACT
GCGGTCCGAC GTCGAACCGG TGAGGGAGAG ACGCGCGAGC GAGCGAGTGA

SmaI SmaI
~~~~~                    ~~~~~

5101 GAGGCCGGGC GACCAAAGGT CGCCCGACGC CCGGGCTTTG CCCGGGCGGC  
CTCCGGCCCG CTGGTTTCCA GCGGGCTGCG GGCCCGAAAC GGGCCCGCCG

5151 CTCAGTGAGC GAGCGAGCGC GCAGAGAGGG AGTGGCCAAC TCCATCACTA  
GAGTCACTCG CTCGCTCGCG CGTCTCTCCC TCACCGGTTG AGGTAGTGAT

BglII  
~~~~~

PstI
~~~~~

5201 GGGGTTCTTG CGCGCGCGCG CGCGGCCAGA TCTGCAGACA TGATAAGATA  
CCCCAAGGAC GCGCGCGCGC GCGCCGGTCT AGACGTCTGT ACTATTCTAT

5251 CATTGATGAG TTTGGACAAA CCACAACACTAG AATGCAGTGA AAAAAATGCT  
GTAATACTC AAACCTGTTT GGTGTTGATC TTACGTCACT TTTTTTACGA

5301 TTATTTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC CATTATAAGC  
AATAAACACT TTAAACACTA CGATAACGAA ATAAACATTG GTAATATTCG

5351 TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA TGTTTCAGGT  
ACGTTATTTG TTCAATTGTT GTTGTTAACG TAAGTAAAAT ACAAAGTCCA

5401 TCAGGGGGAG GTGTGGGAGG TTTTTTAAAG CAAGTAAAAC CTCTACAAAT  
AGTCCCCCTC CACACCCTCC AAAAAATTTT GTTCATTTTG GAGATGTTTA

5451 GTGGTATGGC TGATTATGAT CTCTAGTCAA GGCCTATAC ATCAAATATT  
CACCATAACG ACTAATACTA GAGATCAGTT CCGTGATATG TAGTTTATAA

5501 CCTTATTAAC CCCTTTACAA ATTA AAAAGC TAAAGGTACA CAATTTTGA  
GGAATAATTG GGGAAATGTT TAATTTTTCG ATTTCCATGT GTTAAAAACT

5551 GCATAGTTAT TAATAGCAGA CACTCTATGC CTGTGTGGAG TAAGAAAAA  
CGTATCAATA ATTATCGTCT GTGAGATACG GACACACCTC ATTCTTTTTT

5601 CAGTATGTTA TGATTATAAC TGTTATGCCT ACTTATAAAG GTTACAGAAT  
GTCATACAAT ACTAATATTG ACAATACGGA TGAATATTTT CAATGTCTTA

5651 ATTTTTCCAT AATTTTCTTG TATAGCAGTG CAGCTTTTTT CTTTGTGGTG  
TAAAAGGTA TAAAAGAAC ATATCGTCAC GTCGAAAAAG GAAACACCAC

5701 TAAATAGCAA AGCAAGCAAG AGTTCTATTA CTAAACACAG CATGACTCAA  
ATTTATCGTT TCGTTCGTTT TCAAGATAAT GATTTGTGTC GFACTGAGTT

5751 AAAACTTAGC AATTCTGAAG GAAAGTCCTT GGGGTCTTCT ACCTTTCTCT  
TTTTGAATCG TTAAGACTTC CTTTCAGGAA CCCCAGAAGA TGGAAAGAGA

5801 TCTTTTTTGG AGGAGTAGAA TGTTGAGAGT CAGCAGTAGC CTCATCATCA

AGAAAAAACC TCCTCATCTT ACAACTCTCA GTCGTCATCG GAGTAGTAGT  
 5851 CTAGATGGCA TTTCTTCTGA GCAAAACAGG TTTTCCTCAT TAAAGGCATT  
 GATCTACCGT AAAGAAGACT CGTTTTGTCC AAAAGGAGTA ATTTCCGTAA  
 5901 CCACCACTGC TCCCATTCAT CAGTTCCATA GGTGGAATC TAAAATACAC  
 GGTGGTGACG AGGGTAAGTA GTCAAGGTAT CCAACCTTAG ATTTTATGTG  
 5951 AAACAATTAG AATCAGTAGT TTAACACATT ATACACTTAA AAATTTTATA  
 TTTGTTAATC TTAGTCATCA AATTGTGTAA TATGTGAATT TTTAAAATAT  
 6001 TTTACCTTAG AGCTTTAAAT CTCTGTAGGT AGTTTGTCCA ATTATGTCAC  
 AAATGGAATC TCGAAATTTA GAGACATCCA TCAAACAGGT TAATACAGTG  
  
 NotI  
 ~~~~~~  
 6051 ACCACAGAAG TAAGGTTCCCT TCACAAAGAT CCTCTAGAGT CGCGGCCGCT
 TGGTGTCTTC ATTCCAAGGA AGTGTCTTA GGAGATCTCA GCGCCGGCGA
 6101 TTA CTTGTAC AGCTCGTCCA TGCCGAGAGT GATCCCGGCG GCGGTCACGA
 AATGAACATG TCGAGCAGGT ACGGCTCTCA CTAGGGCCGC CGCCAGTGCT
 6151 ACTCCAGCAG GACCATGTGA TCGCGCTTCT CGTTGGGGTC TTTGCTCAGG
 TGAGGTCGTC CTGGTACACT AGCGCGAAGA GCAACCCAG AAACGAGTCC
 6201 GCGGACTGGG TGCTCAGGTA GTGGTTGTCT GGCAGCAGCA CGGGGCCGTC
 CGCCTGACCC ACGAGTCCAT CACCAACAGC CCGTCGTCGT GCCCCGGCAG
 6251 GCCGATGGGG GTGTTCTGCT GGTAGTGGTC GGCAGCTGC ACGCTGCCGT
 CGGCTACCCC CACAAGACGA CCATCACCAG CCGCTCGACG TGCACGGCA
 6301 CCTCGATGTT GTGGCGGATC TTGAAGTTCA CCTTGATGCC GTTCTTCTGC
 GGAGCTACAA CACCGCCTAG AACTTCAAGT GGAACCTACGG CAAGAAGACG
 6351 TTGTCGGCCA TGATATAGAC GTTGTGGCTG TTGTAGTTGT ACTCCAGCTT
 AACAGCCGGT ACTATATCTG CAACACCGAC AACATCAACA TGAGGTCGAA
 6401 GTGCCCCAGG ATGTTGCCGT CCTCCTTGAA GTCGATGCCC TTCAGCTCGA
 CACGGGGTCC TACAACGGCA GGAGGAACTT CAGCTACGGG AAGTCGAGCT
 6451 TGCGGTTTAC CAGGGTGTCT CCCTCGAACT TCACCTCGGC GCGGGTCTTG
 ACGCCAAGTG GTCCCACAGC GGGAGCTTGA AGTGGAGCCG CGCCCAGAAC
 6501 TAGTTGCCGT CGTCCTTGAA GAAGATGGTG CGTCCTGGA CGTAGCCTTC
 ATCAACGGCA GCAGGAACTT CTTCTACCAC GCGAGGACCT GCATCGGAAG
 6551 GGGCATGGCG GACTTGAAGA AGTCGTGCTG CTTTATGTGG TCGGGGTAGC
 CCCGTACCGC CTGAACTTCT TCAGCACGAC GAAGTACACC AGCCCCATCG
 6601 GGCTGAAGCA CTGCACGCCG TAGGTCAGGG TGGTCACGAG GGTGGGCCAG
 CCGACTTCTG GACGTGCGGC ATCCAGTCCC ACCAGTGCTC CCACCCGGTC
 6651 GGCACGGGCA GCTTGCCGGT GGTGCAGATG AACTTCAGGG TCAGCTTGCC
 CCGTGCCCGT CGAACGGCCA CCACGTCTAC TTGAAGTCCC AGTCGAACGG
 6701 GTAGGTGGCA TCGCCCTCGC CCTCGCCGGA CACGCTGAAC TTGTGGCCGT
 CATCCACCGT AGCGGGAGCG GGAGCGGCCT GTGCGACTTG AACACCCGCA
 6751 TTACGTGCGC GTCCAGCTCG ACCAGGATGG GCACCACCCC GGTGAACAGC

AATGCAGCGG CAGGTCGAGC TGGTCCTACC CGTGGTGGGG CCACTTGTCG

SmaI

~~~~~

6801 TCCTCGCCCT TGCTCACCAT GGTGGCGACC GGTGGATCCC GGGCCCGCGG  
AGGAGCGGGA ACGAGTGGTA CCACCGCTGG CCACCTAGGG CCCGGGCGCC

PstI

~~~~~

EcoRI

6851 TACCGTCGAC TGCAG
ATGGCAGCTG ACGTC

8 Literaturverzeichnis

1. ACLAND GM, AGUIRRE GD, RAY J, ZHANG Q, ALEMAN TS, CIDECIYAN AV, PEARCE-KELLING SE, ANAND V, ZENG Y, MAGUIRE AM, JACOBSON SG, HAUSWIRTH WW, BENNETT J, 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28:92-95.
2. ALI M, LEMOINE NR, RING CJ, 1994. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 1:367-384.
3. BARON U, FREUNDLIEB S, GOSSEN M, BUJARD H, 1995. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res.* 23:3605-3606.
4. BARTLETT JS, WILCHER R, SAMULSKI RJ, 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74:2777-2785.
5. BARTLETT JS, XIAO X, SAMULSKI RJ, 1996. Adeno-associated Virus Vectors for Gene Transfer. In: Lowenstein PR, Enquist LW, eds. *Protocols for Gene Transfer in Neuroscience: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders*. John Wiley & Sons Ltd., 115-127.
6. Becton Dickinson. CellQuest™. [3.3]. 2001. Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Computer: Macintosh; OS: OS Macintosh
<http://www.bdfacs.com>
7. BERNS KI, GIRAUD C, 1996. Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 218:1-23.
8. BERNS KI, HAUSWIRTH WW, 1979. Adeno-associated viruses. *Adv. Virus Res.* 25:407-449.
9. BLAESE RM, 1995a. Steps toward gene therapy: 1. The initial trials. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 30:33-40.
10. BLAESE RM, 1995b. Steps toward gene therapy: 2. Cancer and AIDS. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 30:37-45.
11. BLAESE RM, CULVER KW, MILLER AD, CARTER CS, FLEISHER T, CLERICI M, SHEARER G, CHANG L, CHIANG Y, TOLSTOSHEV P, ., 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.

12. BOISSY R, ASTELL CR, 1985. An *Escherichia coli* recBCsbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene* 35:179-185.
13. BRASELMANN S, GRANINGER P, BUSSLINGER M, 1993. A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:1657-1661.
14. BROCKES JP, FIELDS KL, RAFF MC, 1979. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165:105-118.
15. BROCKES JP, RAFF MC, 1979. Studies on cultured rat Schwann cells. II. Comparison with a rat Schwann cell line. *In Vitro* 15:772-778.
16. CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
17. CORMACK BP, VALDIVIA RH, FALKOW S, 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
18. CULVER KW, RAM Z, WALLBRIDGE S, ISHII H, OLDFIELD EH, BLAESE RM, 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256:1550-1552.
19. DHAWAN J, RANDO TA, ELSON SL, BUJARD H, BLAU HM, 1995. Tetracycline-regulated gene expression following direct gene transfer into mouse skeletal muscle. *Somat. Cell Mol. Genet.* 21:233-240.
20. DOUAR AM, POULARD K, STOCKHOLM D, DANOS O, 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J. Virol.* 75:1824-1833.
21. FORSTER K, HELBL V, LEDERER T, URLINGER S, WITTENBURG N, HILLEN W, 1999. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 27:708-710.

22. FOTAKI ME, PINK JR, MOUS J, 1997. Tetracycline-responsive gene expression in mouse brain after amplicon-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 4:901-908.
23. FREUNDLIEB S, SCHIRRA-MULLER C, BUJARD H, 1999. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1:4-12.
24. GORDON JW, 1998. Germline alteration by gene therapy: assessing and reducing the risks. *Mol. Med. Today* 4:468-470.
25. GOSSEN M, BONIN AL, BUJARD H, 1993. Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.* 18:471-475.
26. GOSSEN M, BUJARD H, 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:5547-5551.
27. GOSSEN M, BUJARD H, 1993. Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 21:4411-4412.
28. GOSSEN M, BUJARD H, 1995. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* 19:213-216.
29. GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, MULLER G, HILLEN W, BUJARD H, 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
30. GUTMANN DH, 2001. The neurofibromatoses: when less is more. *Hum. Mol. Genet.* 10:747-755.
31. HABERMAN RP, MCCOWN TJ, SAMULSKI RJ, 2000. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J. Virol.* 74:8732-8739.
32. HIRSCH NP, MURPHY A, RADCLIFFE JJ, 2001. Neurofibromatosis: clinical presentations and anaesthetic implications. *Br. J. Anaesth.* 86:555-564.
33. HOFFMANN A, VILLALBA M, JOURNOT L, SPENGLER D, 1997. A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res.* 25:1078-1079.

34. HOFMANN A, NOLAN GP, BLAU HM, 1996. Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:5185-5190.
35. HOWE JR, SKRYABIN BV, BELCHER SM, ZERILLO CA, SCHMAUSS C, 1995. The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J. Biol. Chem.* 270:14168-14174.
36. InforMax. Vector NTI Suite. [5.0]. 1999. InforMax Inc.
Computer: IBM/PC; OS: Windows
http://www.informaxinc.com/products/vectornti/vector_suite.html
37. LEE F, MULLIGAN R, BERG P, RINGOLD G, 1981. Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids. *Nature* 294:228-232.
38. LEE HC, KIM SJ, KIM KS, SHIN HC, YOON JW, 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single- chain insulin analogue. *Nature* 408:483-488.
39. LI S, HUANG L, 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7:31-34.
40. LINDEN RM, WARD P, GIRAUD C, WINOCOUR E, BERNS KI, 1996a. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:11288-11294.
41. LINDEN RM, WINOCOUR E, BERNS KI, 1996b. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:7966-7972.
42. LUSBY E, FIFE KH, BERNS KI, 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 34:402-409.
43. MAYO KE, WARREN R, PALMITER RD, 1982. The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell* 29:99-108.
44. MCLAUGHLIN SK, COLLIS P, HERMONAT PL, MUZYCZKA N, 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* 62:1963-1973.

45. MESSING A, BEHRINGER RR, HAMMANG JP, PALMITER RD, BRINSTER RL, LEMKE G, 1992. P0 promoter directs expression of reporter and toxin genes to Schwann cells of transgenic mice. *Neuron* 8:507-520.
46. MOHAMMADI S, ALVAREZ-VALLINA L, ASHWORTH LJ, HAWKINS RE, 1997. Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues. *Gene Ther.* 4:993-997.
47. MONAHAN PE, SAMULSKI RJ, 2000. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol. Med. Today* 6:433-440.
48. MOUNTAIN A, 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.* 18:119-128.
49. MUZYCZKA N, 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.
50. NOVER L, 1991. *Heat shock response*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 167-220.
51. O'BRIEN K, OTTO K, RAO RN, 1997. Construction and characterization of a one-plasmid system for the controlled expression of genes in mammalian cells by tetracycline. *Gene* 184:115-120.
52. PRINCE HM, 1998. Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 30:335-347.
53. QING K, MAH C, HANSEN J, ZHOU S, DWARKI V, SRIVASTAVA A, 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* 5:71-77.
54. RABINOWITZ JE, SAMULSKI RJ, 2000. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 278:301-308.
55. RAM Z, CULVER KW, OSHIRO EM, VIOLA JJ, DEVROOM HL, OTTO E, LONG Z, CHIANG Y, MCGARRITY GJ, MUUL LM, KATZ D, BLAESE RM, OLDFIELD EH, 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* 3:1354-1361.
56. Redasoft. Plasmid™. [1.1]. 10-29-2000. Redasoft. 1997.
Computer: IBM/PC; OS: Windows
<http://www.redasoft.com>

57. ROBBINS PD, TAHARA H, GHIVIZZANI SC, 1998. Viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology* 16:35-40.
58. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
59. SAMULSKI RJ, SALLY M, MUZYCZKA N, 1999. Adeno-associated viral vectors. In: Friedmann T, ed. *The development of human gene therapy*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 131-172.
60. SAMULSKI RJ, SRIVASTAVA A, BERNS KI, MUZYCZKA N, 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* 33:135-143.
61. SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:5463-5467.
62. SCHAGEN FH, RADEMAKER HJ, FALLAUX FJ, HOEBEN RC, 2000. Insertion vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 7:271-272.
63. SCHULTZE N, BURKI Y, LANG Y, CERTA U, BLUETHMANN H, 1996. Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 14:499-503.
64. SNYDER EY, FISHER LJ, 1996. Gene therapy in neurology. *Curr. Opin. Pediatr.* 8:558-568.
65. SNYDER RO, IM DS, MUZYCZKA N, 1990. Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J. Virol.* 64:6204-6213.
66. SRIVASTAVA A, LUSBY EW, BERNS KI, 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45:555-564.
67. SUMMERFORD C, BARTLETT JS, SAMULSKI RJ, 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* 5:78-82.
68. SUMMERFORD C, SAMULSKI RJ, 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72:1438-1445.

69. Thompson, L. Human Gene Therapy - Harsh Lessons, High Hopes. Thompson, L. FDA Consumer Magazine . 8-15-2000. U.S. Food and Drug Administration.
Ref. Typ: Electronic Citation.
http://www.fda.gov/fdac/features/2000/500_gene.html
70. Trotter, J. WinMDIT™. [2.8]. 12-30-1999. Scripps Research Institute, La Jolla, USA. 1993.
Computer: IBM/PC; OS: Windows
<http://www.facs.scripps.edu>
71. VERMA IM, SOMIA N, 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
72. VILE RG, RUSSELL SJ, LEMOINE NR, 2000. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* 7:2-8.
73. Wosch, S. S. Konstruktion und Etablierung von AAV-Tet-Vektorsystemen für den Gentransfer in humane Schwanzzellen. 2001. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
Ref Type: Thesis/Dissertation.
74. WU N, ATAAI MM, 2000. Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:205-208.
75. YIN DX, ZHU L, SCHIMKE RT, 1996. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal. Biochem.* 235:195-201.
76. YOUNG SM, JR., MCCARTY DM, DEGTYAREVA N, SAMULSKI RJ, 2000. Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J. Virol.* 74:3953-3966.
77. YOUNG SM, JR., SAMULSKI RJ, 2001. Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:13525-13530.
78. ZOLOTUKHIN S, POTTER M, HAUSWIRTH WW, GUY J, MUZYCZKA N, 1996. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol.* 70:4646-4654.

CURRICULUM VITAE

Daten

Geburtsdatum: 7. März 1969
Geburtsort: Mannheim
Eltern: Brita Bender, Bilanzbuchhalterin
Dr. Klaus Bender, Rechtsanwalt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1975 – 1979: Grundschule, Mannheim
1979 – 1988: Karl-Friedrich-Gymnasium Mannheim
Mai 1988: Abitur

Zivildienst

1988 – 1990: Rettungssanitäter, Rotes Kreuz, Mannheim

Studium und beruflicher Werdegang

1991 – 1997: Musikstudium an der Robert-Schumann-Hochschule, Düsseldorf sowie am Twents Conservatorium, Enschede, Niederlande, Hauptfach: Saxophon
Juli 1997: Abschluß der Konzertausbildung, Diplom, Note: sehr gut

Seit 1994: Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

März 1996: Physikum

August 1997: Erstes Staatsexamen

März 2000: Zweites Staatsexamen

08.06. 2001 : Drittes Staatsexamen
Gesamtnote: befriedigend (2,83)

Zur Zeit: Postdoctoral Fellow an der Johns-Hopkins-Universität, Baltimore,
USA, Howard Hughes Medical Institute und McKusick-Nathans-
Institute for Genetic Medicine, im Labor von Prof. Dr. David Valle



Baltimore, den 13. Januar 2003

Neue tetracyclinregulierbare AAV-Einkassettenvektoren für gentherapeutische Ansätze

Dissertation, vorgelegt von Hans-Ulrich Bender

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Gentherapievektorkonstrukte an Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen *in vitro* getestet. Die Konstrukte stellen Einkassettenvektoren dar, die das *Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)* als Detektionsgen unter der Kontrolle des tetracyclinregulierbaren Tet-On- bzw. Tet-Off-Systems exprimieren. Es wurde jeweils ein Tet-On- und ein Tet-Off-Konstrukt mit nicht gewebespezifischem Promotor verwendet, ein Konstrukt enthielt ein bidirektionales tetracyclinresponsives Expressionssystem. Mit diesen Vektoren wurde die Regulierbarkeit des Systems geprüft. Außerdem wurde jeweils ein Tet-On- und ein Tet-Off-Konstrukt mit schwanzellspezifischem Myelinprotein P₀-Promotor hergestellt, um eine Zellspezifität der Konstrukte zu erreichen. Alle Konstrukte basieren auf dem adeno-assoziierten Virus (AAV) als Vektor. Rattenschwanzzellen und HeLa-Zellen wurden mit diesen Vektorkonstrukten transfiziert und mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) bezüglich ihrer EGFP-Expression sortiert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Einkassetten-Vektorkonstrukte sowohl im Tet-On System als auch im Tet-Off System signifikant durch Tetracyclingabe reguliert werden können. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die konstruierten schwanzellspezifischen Konstrukte in Schwanzzellen signifikant stärker exprimiert werden als in HeLa-Zellen. Dennoch konnten alle Konstrukte die selbst gesetzte Anforderung von mindestens zehnfacher Regulierbarkeit in einem kurzen Beobachtungszeitraum nicht erfüllen und zeigten durchweg eine Hintergrundaktivität des Systems in allen Konstrukten. In Langzeitexperimenten über einen Zeitraum von sechs Wochen wies nur das Konstrukt pAC1 (mit bidirektionalem Promotor) eine bis zu 100-fache Regulierbarkeit in Schwanzzellen und eine Hintergrundaktivität von weniger als 1% auf. Die Ergebnisse zeigen, daß AAV-Einkassettenvektoren in Schwanzzellen prinzipiell verwendbar sind, daß diese Einkassettenvektoren durch Tetracyclin signifikant regulierbar sind und daß Zellspezifität eines Gentherapievektors durch Einfügen zelltypenspezifischer Promotoren möglich ist.

Düsseldorf, den 02.01.2003

PD Dr. med. Clemens Oliver Hanemann
(Referent)