

**Aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Immunologie  
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel**

**Entwicklung einer tumorspezifischen Suizidgentherapie  
für Osteosarkome**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

**Klaus Bienemann**

**2005**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Christof Maria Kramm  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Jean Krutmann

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Verwendete Materialien	7
1.1. Chemikalien	7
1.2. Enzyme	7
1.3. DNA-Oligonukleotide	7
1.4. cDNA	8
1.5. Ausgangsplasmide	8
1.5.1. Prokaryotische Expressionsvektoren	8
1.5.2. Eukaryotische Expressionsvektoren	8
1.5.3. Gateway <sup>®</sup> -Technologie (Invitrogen)	9
1.5.4. Lentivirusvektoren und Plasmide zur Lentivirusproduktion	9
1.6. Zellkultur	9
1.6.1. Tumor-Zelllinien	9
1.6.2. Nicht-Tumor-Zelllinien	10
1.6.3. Zellkulturmedien	10
1.6.4. Transfektionsreagenzien	10
1.6.5. Antibiotika, Zytostatika und andere Zusätze	10
1.7. Sonstiges	10
2. Methoden	11
2.1. Molekularbiologische Techniken	11
2.1.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	11
2.1.2. Isolierung von Nukleinsäuren	11
2.1.2.1. Plasmid-, Midi- und Maxi- präparation	11
2.1.2.2. Isolierung von genomischer DNA	11
2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
2.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren	12
2.1.5. Sequenzierung von DNA	13
2.1.6. Gateway <sup>®</sup> -Technologie-Cloning	13
2.2. Molekularbiologische Klonierungsarbeiten und Konstrukte	14
2.2.1. Generierung der Osteocalcin (OC)- Promotor-Fragmente	14
2.2.2. Klonierung der Luziferasegen-Konstrukte pGL3-OC <sub>HeLa</sub> und pGL3-OC <sub>MG63</sub>	15
2.2.3. Klonierung der <i>hfpgs-ires2-egfp</i> -Konstrukte	16
2.2.3.1. Klonierung des pCMV-FPGS- IRES2-EGFP (pFPGS-control)	17
2.2.3.2. Klonierung des pOC-FPGS- IRES2-EGFP (pFPGS-OC)	18

2.2.4. Klonierung der lentiviralen Vektoren	19
2.2.4.1. Klonierung des lentiviralen „Destination“-Vektors pLNT/MCS/ccdB	19
2.2.4.2. Klonierung des lentiviralen Vektors pLNT-CMV-FPGS-EGFP	20
2.2.4.3. Klonierung des lentiviralen Vektors pLNT-OC-FPGS-EGFP	20
2.3. Zellkulturarbeiten und assoziierte Techniken	22
2.3.1. Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	22
2.3.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™6 zur transienten Genexpression	22
2.3.3. Promotorstudien mit Hilfe des Luziferase-Reporter- Assays	23
2.3.3.1. Dualer Luziferase-Assay	24
2.3.3.2. Singulärer Luziferase-Assay	25
2.3.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.3.4. Lentivirale Vektortechniken	27
2.3.4.1. Lentivirusherstellung	27
2.3.4.2. Lentivirale Infektion von Säugetierzellen	30
2.3.4.3. Bestimmung des lentiviralen Virustiters	32
2.3.4.3.1. EGFP-FACS-Methode	33
2.3.4.3.2. p24-Assay	33
2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie	33
2.3.6. Durchflußzytometrie	34
2.3.6.1. FACS-Analyse	35
2.3.7. Methotrexat (MTX)-Sensitivitätstest	35
2.3.7.1. Proliferations-Assays mittels Zellzählung	35
2.3.8. Behandlung der Zellen mit Calcitriol	36
III. Ergebnisse	37
1. Luciferase-Expressionsmessungen	37
1.1. Promotoraktivität in Abhängigkeit von Mutationen im Bereich der OC-Box	38
1.2. Steigerung der OC-Promotoraktivität durch Vitamin D	40
2. Untersuchung der <i>egfp</i> -Expression nach lentiviraler Infektion	41
2.1. Generierung und Titerbestimmung transienter lentiviraler Überstände	41
2.2. Lentivirale Infektion verschiedener Osteocalcin-positiver und negativer Zellen	42
3. Untersuchung der Methotrexat-Sensitivität der infizierten Zellen	45

IV. Diskussion und Ausblick	49
VI. Zusammenfassung	60
VII. Literaturverzeichnis	62

## **I. EINLEITUNG**

Das Osteosarkom stellt 2,3 % aller bösartigen Neubildungen bei Kindern unter 15 Jahren dar und ist damit der häufigste Knochentumor im Kindesalter (Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht, 2003). Nur durch operative Entfernung des Primärtumors in Kombination mit einer intensiven Chemotherapie lassen sich 60 – 70 % der betroffenen Patienten heilen (Bielack et al., 2000). Entscheidend bei der Prognose sind das Stadium der Erkrankung, das Vorhandensein von Fernmetastasen, das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie und die vollständige operative Kontrolle des Primarius.

Die operativen Lokalmaßnahmen zur Tumorkontrolle schließen oft die Amputation der betroffenen Extremität ein, so daß die aufgeführten Überlebenszahlen nicht in gleicher Weise die Wiederherstellung bzw. den Erhalt der Lebensqualität bei den überlebenden Patienten widerspiegeln. Nicht nur die weitere Verbesserung der Operationstechniken und der systemisch wirksamen Chemotherapie, sondern auch die Einführung von neuen lokal wirksamen Behandlungsverfahren könnte die Notwendigkeit von Amputationen zukünftig deutlich senken, ohne daß dies zu Lasten des therapeutischen Gesamtergebnisses führen würde.

Ein innovatives Therapieverfahren zur Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle könnte die Suizidgentherapie darstellen (Wicke et al., 1996). Das Prinzip der Suizidgentherapie beruht auf dem Transfer eines Enzymgenes, durch das Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit einem an sich nicht oder nur wenig toxischen Pharmakon sensibilisiert werden. Die Sensibilisierung führt unter Behandlung mit dem Pharmakon zum selektiven Absterben aller Zellen, die das Enzymgen enthalten. Zellen, in die jedoch das Enzymgen nicht transferiert wurde, bleiben von der Zytotoxizität weitestgehend verschont. Der wichtigste Vertreter einer solchen Suizidgentherapie stellt das Herpes simplex Virus Typ I Thymidinkinase / Ganciclovir System dar (Moolten, 1986).

Umfassende Studien im Zellkultur- und Tiermodell (Culver et al., 1992; Ezzeddine et al., 1991; Ram et al., 1993) bildeten die Grundlage für die Durchführung erster klinischer Suizidgentherapiestudien an Patienten mit therapieresistenten

Tumoren, insbesondere Hirntumoren. Diese klinischen Studien zeigten allerdings keinen signifikanten Therapieerfolg (Rainov, 2000). Ausschlaggebend hierfür schienen vor allem die beobachteten niedrigen Gentransferraten zu sein, die bedingten, daß nur ein sehr kleiner Teil ( $< 0,2\%$ ) der Tumorzellen wirklich das Enzymgen enthielten (Ram et al. 1997).

Die vorliegende Arbeit baute in ihrer Zielsetzungen und ihrem Design unter anderem bewußt auf den Erfahrungen dieser wenig befriedigenden bisherigen Sui-zidtherapiestrategien auf, indem

- 1.** an Stelle der bisher klinisch verwendeten Retrovirusvektoren die potenteren Lentivirusvektoren verwendet wurden und
- 2.** das Folypolyglutamatsynthetase / MTX System als therapeutisches Prinzip gewählt wurde, das das für die Osteosarkombehandlung zentrale Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX) in seiner Wirkung signifikant verstärken kann.
- 3.** Weiterhin wurde unter den Gesichtspunkten der biologischen Sicherheit und der Verminderung von toxischen Nebenwirkungen die therapeutische Selektivität des unter **1.** und **2.** genannten gentherapeutischen Ansatzes in Kombination mit dem Osteosarkom-spezifischen Osteocalcin-Promotor untersucht.

### **Zu 1: Lentivirale Vektoren als Gentransfersysteme**

Lentiviren gehören zu den komplexen Retroviren (Coffin et al., 1997). Neben den für die viralen Strukturproteine und Enzyme kodierenden Genen gag, pol und env, die auch die Onkoretroviren und andere Retroviren besitzen, tragen Lentiviren zusätzliche, für regulatorische und akzessorische Proteine kodierende Sequenzen. Für den Replikationszyklus sind die regulatorischen Gene essentiell, während die akzessorischen Gene *in vitro* zumeist entbehrlich sind (Tang et al., 1999; Seelamgari et al., 2004).

Anders als Onkoretroviren sind Lentiviren in der Lage, ihr Genom auch in nicht teilungsaktive Zellen zu integrieren. Zwar gelangt auch bei Lentiviren der Präin-

tegrationskomplex am effizientesten während der Mitose in den Kern, doch wird er auch ausserhalb der Mitose von der zellulären Kernimportmaschinerie erkannt und aktiv mit Hilfe einer Integrase durch die Poren einer intakten Kernmembran transportiert (Bukrinsky et al., 1993; Gallay et al., 1997).

Vor diesem Hintergrund wurden rekombinante Gentransfer-Vektoren etabliert, die auf Lentiviren verschiedener Primaten und anderer Spezies basieren. Die größten Bemühungen galten dabei der Entwicklung von Vektoren, die vom Human Immundeficiency Virus (HIV-1) abgeleitet sind. Dies bot sich an, da zum einen humane Zellen die natürlichen Wirte dieses Virus sind und zum anderen aufgrund der AIDS-Pathogenese-Forschung über kaum ein anderes Virus so viel bekannt sein dürfte. Trotz der Komplexität des lentiviralen Genoms und der Pathogenität dieses Virus konnten mehrere Generationen replikationsdefizienter, vermeintlich sicherer Vektoren entwickelt werden, die hinsichtlich ihrer biologischen Sicherheit als unbedenklich angesehen werden. Da das Wirtsspektrum des Wildtyp-HIV lediglich Makrophagen und Lymphozyten umfasst, werden auf HIV basierende Vektoren pseudotypisiert. Mit Pseudotypisierung wird die Fähigkeit von viralen Vektoren bezeichnet, auch mit Hüllproteinen anderer Viren infektiöse Partikel bilden zu können. Insbesondere das VSV-G-Protein („Vesicular Stomatitis Virus“) wird zur Verpackung der lentiviralen Vektoren verwendet. Dieses Hüllprotein hat ein unspezifisches Wirtsspektrum, so daß nach Pseudotypisierung die unterschiedlichsten Zellen mit Lentiviren infiziert werden können (Naldini et al., 1996; Takahashi et al., 1999; Kafri et al., 1997).

## **Zu 2: Das Folypolyglutamat-Synthetase/Methotrexat-System**

Bei diesem System handelt es sich nicht um ein klassisches Suizidtherapie-System, das auf dem Transfer eines in der Regel nicht humanen Enzymgens basiert, das in den transduzierten Tumorzellen eine inaktive Substanzvorstufe („prodrug“) in einen toxischen Metaboliten umwandelt. Das hFPGS/MTX-System unterscheidet sich vom klassischen System in zwei wesentlichen Punkten (Aghi et al, 1999):

- i. Bei dem Enzym Folypolyglutamyl-Synthetase handelt es sich um ein humanes Enzym, welches ubiquitär in menschlichen Körperzellen vorkommt. Durch den Gentransfer wird also kein neues Enzym in den Zielzellen exprimiert, sondern die Überexpression eines zelleigenen Enzyms erreicht.
- ii. Bei Methotrexat handelt es sich nicht um eine inaktive Substanzvorstufe („prodrug“), sondern um ein hochpotentes Chemotherapeutikum mit hoher Toxizität auf bösartige, aber auch gesunde Zellen. Durch die hFPGS-Aktivierung wird diese Toxizität potenziert. Damit bietet das hFPGS/MTX-System in der Anwendung bei Osteosarkomen gegenüber anderen Suizidgen-Systemen den Vorteil, daß sich die Substanz Methotrexat schon seit Jahren in der klinischen Therapie dieses Tumors bewährt hat und das zentrale Chemotherapeutikum in modernen Therapieprotokollen (z.B. COSS-96-Protokoll) darstellt.

Die Anwendung des hFPGS-Suizidgensystems stellt also im weiteren Sinne einen Optimierungsversuch einer an sich wirksamen, bereits etablierten Chemotherapie dar. Man erwartet bei Erfolg der Gentherapie im Vergleich zur konventionellen Methotrexat-Behandlung eine deutlich höhere intratumorale Wirksamkeit sowie eine verminderte Toxizität auf normale Körperzellen aufgrund einer möglichen Methotrexat-Dosis-Reduktion. Hierdurch werden eine verbesserte Überlebenschancen und eine konservativere Lokaltherapie erhofft.

Die Wirkweise von hFPGS bei der Verstärkung der MTX-Wirkung läßt sich wie folgt erklären (Chu et al., 1993; Balinska et al., 1981):

Die biochemische Funktion des humanen Enzyms *Folypolyglutamyl-Synthetase* (hFPGS) besteht in der Umwandlung von Folat-Monoglutamaten in Folat-Polyglutamate. Da es sich bei dem Zytostatikum MTX biochemisch um ein Monoglutamat eines Folat analogons handelt, wird es in der Zelle durch hFPGS auch in Polyglutamate umgewandelt. Aufgrund dieser Umwandlung potentiert sich die MTX-Toxizität durch drei verschiedene Wirkmechanismen:

- i. Polyglutamiertes Methotrexat kann die Zelle nur schlecht verlassen und kumuliert. Es kommt also zu einer Verlängerung der MTX-Wirkdauer auf die Zelle.
- ii. Polyglutamiertes Methotrexat hat eine höhere Affinität zu dem Enzym Dihydrofolat-Reduktase, dem natürlichen Target von MTX in seiner zytotoxischen Wirkung als Folat analogon mit folat antagonistischer Wirkung. Es kommt also zu einer Zunahme der kompetitiven Enzymhemmung und damit zur Störung der Purin- und Pyrimidinbiosynthese mit konsekutivem Zelltod.
- iii. Durch die Polyglutamatbildung kommt es neben der Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase auch zur kompetitiven Hemmung der Thymidylat-Synthase. Diese wird nur durch polyglutamiertes und nicht durch monoglutaminiertes MTX gehemmt. Dies führt wieder durch Interaktion mit dem Purin- und Pyrimidinstoffwechsel zum Zelltod.

### **Zu 3: Der Osteocalcin-Promotor zur selektiven Toxizitätsteigerung in den Osteosarkomzellen**

Osteosarkome entstehen in der Regel aus entarteten Osteoblasten des Knochengewebes (Bielack et al., 2000). Deshalb findet in den meisten Osteosarkomen die für das Knochengewebe typische Osteoid (=Knochengrundsubstanz)-bildung statt. Das aus 49 Aminosäuren bestehende Osteocalcin - auch "bone gamma carboxylglutamic acid containing protein" (BGP) genannt - wird in den Osteoblasten synthetisiert und stellt 2% des totalen Knochenproteins dar. Es ist das einzige nicht-kollagene Knochenprotein des Osteoids, welches ausschließlich von Osteoid-produzierenden Zellen gebildet wird (Schulz et al., 1998). Alle anderen Proteine des Osteoids werden auch von anderen Bindegewebszellen des Körpers produziert, haben also nicht die gleich hohe Spezifität für knochenbildende Zellen.

Die physiologische Funktion des Osteocalcins ist weitgehend ungeklärt. Es besitzt eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit und induziert möglicherweise die Hy-

droxylapatitbildung in der Knochenmatrix. Außerdem vermutet man regulatorische Funktionen während der Knochenmineralisation. Die Biosynthese von Osteocalcin wird über die Aktivität der flankierenden Promotorregion u.a auch durch Einfluss von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D reguliert. Damit stellt der Osteocalcinpromotor ein Promotorsystem dar, das weitestgehend nur in osteogenen Zellen aktiv ist. (Ko et al.,1996; Cheon et al.,1997; Shirakawa et al. 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Grundlage für einen tumorspezifischen Suizidgentherapie-Ansatz zur Behandlung von Osteosarkomen zu entwickeln. Dazu wird das *hFPGS*-Gen mit Hilfe eines lentiviralen Vektorsystems stabil in den Zellkern verschiedener Osteosarkomzellen integriert. Durch die dadurch erreichte Überexpression dieses Gens kommt es zu einer vermehrten Polyglutaminierung von Methotrexat und damit zu einer erhöhten MTX-Toxizität auf die Zellen. Um eine osteosarkomspezifische Wirkung zu erreichen, wird die Expression des *hFPGS*-Gen über einen knorpelgewebespezifischen Promotor, den Osteocalcin-Promotor, gesteuert. Die hier dargestellten *in-vitro*-Untersuchungen an Osteosarkom-Zelllinien und nicht-osteogenen Zelllinien bilden die Grundlage für die Durchführung präklinischer Studien im Mausmodell.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Verwendete Materialien

#### 1.1. Chemikalien

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

#### 1.2. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt),
DNA-modifizierende Enzyme	Promega (Mannheim), Stratagene (Eppelheim)
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
RNase A	Roche

#### 1.3. DNA-Oligonukleotide

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

<u>Bezeichnung</u>	<u>Oligonukleotidsequenz (5'→3')</u>
T7	taa tac gac tca cta tag gg
M13 rev	cag gaa aca gct atg ac
egfp-N-seq	cgt cgc cgt cca gct cga cca g
luc-N-seq	ctt cca gcg gat aga atg gcg
oc1-s-Hind	aag ctt gct gac cgt cga gct gca c

oc2-as	ggc tct cct ggt gtc tcg
BamHI-Linker	cgg gat ccc g
EcoRI-Linker	cgg aat tcc g
HindIII-Linker	cca agc ttg g
NotI-Linker	ttg cgg ccg caa

#### 1.4. cDNA

Osteocalcin-Promotor	Eigenklonierung (s.u. 2.2.1)
<i>hfpgs</i> (Folypolyglutamat-Synthetase)	B. Shane (University of California, Berkeley, USA).

#### 1.5. Ausgangsplasmide

##### 1.5.1. Prokaryotische Expressionsvektoren

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

##### 1.5.2. Eukaryotische Expressionsvektoren

pEGFP-1	Clontech (Heidelberg)
pIRES2-EGFP	Clontech (Heidelberg)
pEGFP-N1	Clontech (Heidelberg)
pGL3-Expressionsvektoren	Promega
pRL-SV40	Promega
pGL3-OC	s.u. 2.2.2.
pCMV-FPGS-IRES2-EGFP	s.u. 2.2.3.1.
pOC-FPGS-IRES2-EGFP	s.u. 2.2.3.2.

### 1.5.3. Gateway®-Technologie (Invitrogen)

pENTR™1A Vector	Invitrogen
Gateway® Vector Conversion System	Invitrogen

### 1.5.4. Lentivirusvektoren und Plasmide zur Lentivirusproduktion

pLNT/MCS	A. Trasher (Institute of Child Health, London, UK)
pLNT/MCS/ccdB	s.u. 2.2.4.1.
pVSV-G	Clontech
pCMVΔR8.91	D. Trono (Institut für Biochemie, Universität Genf, Schweiz)
pcDNA HIV CS-CGW	M. Sena-Esteves (MGH East, Charlestown, MA, USA ) (Steffens et al., 2004)
pLNT-CMV-FPGS-EGFP	s.u. 2.2.4.2.
pLNT-OC-FPGS-EGFP	s.u. 2.2.4.3.

## 1.6. Zellkultur

### 1.6.1. Tumor-Zelllinien

HeLa (human, Cervixkarzinom)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)
MG63 (human, Osteosarkom)	DSMZ Braunschweig
TM791 (human, Osteosarkom)	DSMZ Braunschweig
ROS 17/2.8 (rat, Osteosarkom)	G.Stein (Department of Cell Biology and Cancer Center, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA )

### 1.6.2. Nicht-Tumor-Zelllinien

293 T (human, embryonale Nierenzellen) A. Rethwilm (Institut für Virologie der Universität Würzburg)

### 1.6.3. Zellkulturmedien

Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden von den Firmen Sigma und Life Technologies (Karlsruhe) bezogen und vor Gebrauch mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Life Technologies), 10 µg/ml Penicillin sowie 10 µg/ml Streptomycin (Sigma), 2 mM Glutamin (Sigma) und 1 mM Natriumpyruvat (Sigma) versetzt. Für die Zelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l (w/v) Glucose (Life Technologies), für die Lentivirusproduktion und Transduktion Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma) verwendet.

### 1.6.4. Transfektionsreagenzien

FuGENE™6 Roche

### 1.6.5. Antibiotika, Zytostatica und andere Zusätze

G418 (Neomycin-Analogon)	Life Technologies
Methotrexat (MTX)	Wyeth (Münster)
Calcitriol ( $1\alpha$ -25(OH) <sub>2</sub> -D3)	Sigma

### 1.7. Sonstiges

Sequenzierkit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
DNA-Längenmarker	Life Technologies

## **2. Methoden**

### **2.1. Molekularbiologische Techniken**

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

#### **2.1.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation**

Zur Anreicherung von Plasmiden wurden die *E.coli*-Stämme XL1, DH5 $\alpha$  (Invitrogen) und GM48 (Promega) verwendet. Die Transformation dieser Bakterien wurde mit Hilfe des Bio-Rad „*E.coli*-Pulsers“ (Bio-Rad, München) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.1.2. Isolierung von Nukleinsäuren**

##### **2.1.2.1. Plasmid-, Midi- und Maxipräparation**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zelllinien (2.3.2.) oder zur Klonierung von Vektoren wurden Plasmid-Midi- oder Maxi-Präparationen („Plasmid Midi-/Maxi-Preparation Kit“; Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

##### **2.1.2.2. Isolierung von genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA aus verschiedenen Zelllinien für präparative PCRs wurde der „QIAamp Blood Kit“ von Qiagen verwendet. Dabei wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen zur Gewinnung von 30 bis 40  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt.

### 2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide, die als Primer für eine hitzestabile DNA-Polymerase dienen. Alle Ansätze wurden mit dem „Taq PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden) bei einer Primer-Bindungs-temperaturen von 58°C und der Zugabe von „Q-Solution“ (Qiagen) durchgeführt. Präparative PCRs zur Generierung von Fragmenten für Klonierungen wurden in der Regel in einem 50 µl Ansatz mit 300 ng DNA, je 50 pmol „forward“- und „reverse“-Primer, 200 µM pro dNTP und 2,5 U Taq-Polymerase durchgeführt.

#### Temperaturprofil:

	5 Min. 94°C Denaturierung
25x	{ 30 Sek. 94°C Denaturierung
	{ 30 Sek. 58°C Primer-Bindung („Annealing“)
	{ 30-60 Sek. 72°C Elongation
	5 Min. 72°C terminale Elongation

Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Fragmentlänge der zu amplifizierenden Sequenz (pro kb der zu amplifizierenden Sequenz 30 Sek.). Nach Beendigung der PCR wurde die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und das amplifizierte Fragment entsprechend der unter 2.1.4. beschriebenen Vorgehensweise aufgereinigt.

### 2.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren

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

### 2.1.5. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mittels Dideoxynukleotiden (Sanger et al.,1977). Dazu wurden zunächst eine „Cycle-Sequencing“-PCR mit dem „Terminator-Ready-Reaction“-Mix (TRR;Applied Biosystems) durchgeführt, der abweichend von den Herstellerangaben in einer 1:1-Verdünnung eingesetzt wurde. In einem 20 µl Ansatz wurden somit 4 µl TRR-Mix, 200 bis 500 ng DNA und 5 pmol Primer eingesetzt. Anschließend wurde das PCR-Produkt unter Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 µl TSR (=“Template Supression Reagent“,Applied Biosystems) resuspendiert. Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA wurden die Proben für 2 Min. bei 90°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Abbruchprodukte wurden mittels eines automatischen Sequenzierers (ABI PRISM™ 310, Applied Biosystems) aufgetrennt und analysiert.

#### Temperaturprofil:

25x	{	30 Sek. 96°C Denaturierung
		30 Sek. 45-58°C Primer-Bindung
		4 Min. 60°C Elongation

### 2.1.6. Gateway®-Technologie-Cloning (Invitrogen)

Dieses Klonierungssystem beruht auf der sequenzspezifischen Rekombinationsfähigkeit der Integrations-Enzyme aus dem Bakteriophagen *Lambda*. Mit Hilfe dieser Enzyme werden DNA-Fragmente, die von *Lambda*-Rekombinations-Sequenzen flankiert sind (*attL*), aus einem sogenannten „Entry“-Vektor in den erwünschten „Destination“-Vektor (Zielvektor), der die korrespondierenden Rekombinations-Sequenzen (*attR*) enthält, transferiert. Die Identifizierung positiver Klone wird weiterhin dadurch erleichtert, dass die beiden *attR*-Sequenzen das *ccdB*-Gen flankieren. Dieses Genprodukt ist üblicherweise toxisch für *E. coli*-Bakterien. Der durch erfolgreiche Rekombination zwischen Entry- und Destination-Vektor eintretende Verlust des toxischen *ccdB*-Genes erlaubt deshalb nur „richtig“ positiven Klonen die Vermehrung in den verwendeten *E. coli*-Bakterien

DH5 $\alpha$ . Falschpositive Klone, die noch das toxische *ccdB*-Gen tragen, töten dagegen die DH5 $\alpha$ -*E.coli*-Bakterien ab und lassen sich damit in der Bakterienkultur nicht vermehren.

Für die Klonierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lentivirusvektoren haben wir einen lentiviralen Destinationsvektor kloniert, der auf dem Gateway-Klonierungssystem beruht. Die Klonierung dieses lentiviralen Destinationsvektor wird im Abschnitt 2.2.4. beschrieben.

## 2.2. Molekularbiologische Klonierungsarbeiten und Konstrukte

### 2.2.1. Generierung der Osteocalcin (OC)-Promotorfragmente

Ein 604 bp langes Osteocalcin (OC)-Promotorfragment ( $P_{oc}$ ) wurde mittels PCR an genomischer DNA aus den humanen Zelllinien HeLa und MG63 generiert. Die verwendeten Primer, deren Sequenz und Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1) in **Tab. 1** angegeben sind, wurden nach Angaben von *Lian et al. (1996)* ausgewählt. An die Sequenz des zum 5'-Ende des OC-Promotors komplementären „forward“-Primers wurde eine *HindIII*-Schnittstelle angefügt. Der zum 3'-Ende des OC-Promotors komplementäre „reverse“-Primer enthielt eine Mutation des Startcodons ATG zu ATT, da dieses Triplet innerhalb des ausgewählten Promotorfragmentes lag, aber in den klonierten Konstrukten nicht als Startpunkt der Translation dienen sollte.

Die PCR-Fragmente wurden zunächst zur Verifizierung der Nukleotidsequenz in den Klonierungsvektor pGEM-T-Easy kloniert. Dieser Klonierungsvektor liegt in linearisierter Form vor und besitzt überstehende 3'-T-Überhänge, welche die Ligation mit PCR-Fragmenten, die zumeist überstehende A-Nukleotide tragen, ermöglicht. Mit vektorspezifischen Primern (T7 und M13rev) konnten die inklonierten PCR-Produkte vom 5'- und 3'-Ende her vollständig sequenziert werden.

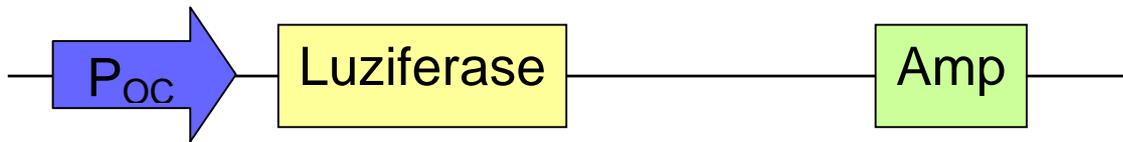
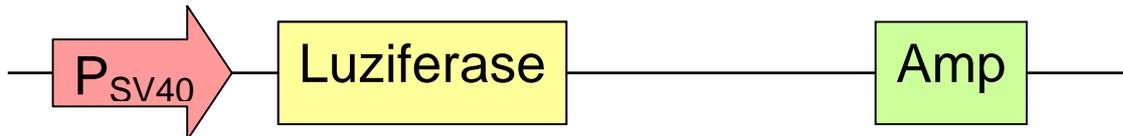
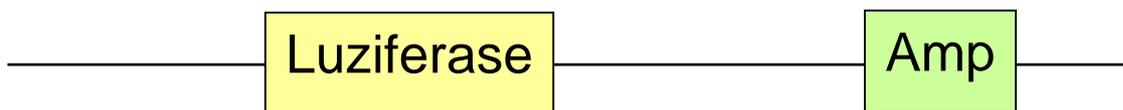
**Tab. 1. PCR-Primer zur Generierung von P<sub>OC</sub>.**

Primer	Bindungsstelle im Gen	Sequenz (5` → 3`)
<b>POC1sHind</b>	-548 bis -531	AAG CTT gct gac cgt cga gct gca c
<b>POC2as</b>	+39 bis +56	ggc tct <u>cct</u> ggt gtc tcg

Die Primerbindungsstellen sind in Bezug zum Transkriptionsstartpunkt (+1) angegeben. Die in Großbuchstaben dargestellten Nukleotide markieren die angefügte Sequenz zur Generierung der HindIII-Schnittstelle, und das unterstrichene Nukleotid markiert die eingefügte Punktmutation zur Zerstörung des Startcodons. (s=sense, as=antisense)

### 2.2.2. Klonierung der Luziferasegen-Konstrukte: pGL3-OC<sub>HeLa</sub> und pGL3-OC<sub>MG63</sub>

Dazu wurde das Osteocalcin-Promotorfragment P<sub>OC(HeLa)</sub> über die flankierenden EcoRI-Schnittstellen aus pGEM-T-Easy in den EcoRI-linearisierten Luziferasegen-Vektor pGL3-basic, in dem keine Promotor- und Enhancer-Elemente vorhanden sind, einkloniert. Der Übergang zwischen Promotorfragment und *luc*-5`-Ende wurde mit dem „reversen“ Primer luc-N-seq, der an Position +35 bis +55 relativ zum Translationsstartpunkt der *luc*-cDNA bindet, sequenziert. Es zeigte sich am Übergang die regelrechte Sequenz mit nur einem Startcodon (ATG). Genauso wurde mit dem Osteocalcin-Promotorfragment aus der MG63-Zelllinie P<sub>OC(MG63)</sub> verfahren. Die generierten Expressionsvektoren wurden als pGL3-OC<sub>HeLa</sub> und pGL3-OC<sub>MG63</sub> bezeichnet.

**a. pGL3-OC****b. pGL3-Control (Positiv-Kontrolle)****c. pGL3-basic (Negativ-Kontrolle)****Abb.1. Schematische Abbildung der verwendeten Luziferase-Genkonstrukte.**

Der OC-Promotor ( $P_{OC}$ ) wurde aus der HeLa-Zelllinie und der MG63-Zelllinie über PCR generiert und dann über die flankierenden EcoRI-Sites in den Luziferase-Vektor pGL3 inkliniert. Die entstandenen Plasmide pGL3-OC<sub>HeLa</sub> und pGL3-OC<sub>MG63</sub> sind beide 5458bp lang. Der 604bp lange OC-Promotor reicht jeweils von Position +41 bis +667. Ab Position +718 beginnt das Luziferase-Gen, welches über den OC-Promotor gesteuert wird. Der Vektor enthält auch ab Position +3713 ein Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp). Im pGL3-Control wird das *luc*-Gen durch den SV40-Promotor ( $P_{SV40}$ ) kontrolliert. Dieses Plasmid diene als Positiv-Kontrolle. Der pGL3-basic enthält keine Promotor- oder Enhancer-Elemente. Er diene als Negativ-Kontrolle.

**2.2.3. Klonierung der *hfpgs-ires2-egfp*-Konstrukte**

Als Ausgangsvektoren dieser Konstrukte dienten die Expressionsvektoren pEGFP-N1, pEGFP-1 und pIRES2-EGFP. Diese Vektoren sind in ihrem Grundgerüst identisch. Sie alle enthalten das *egfp*-Gen, dessen 5'-Ende von einem Polylinker (MCS = "multiple cloning site") mit singulären Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme flankiert wird. Zur Expression in eukaryotischen Zellen ist im pEGFP-N1 ein CMV-Promotor vorgeschaltet. Im pEGFP-1 ist dieser Promotor deletiert, und das *egfp* wird somit nicht durch einen Promotor oder Enhancer gesteuert. Der pIRES2-EGFP enthält vor dem *egfp* eine *ires2*-Sequenz, welche mit diesem Gen gekoppelt ist. Auch er enthält wie der pEGFP-1 keinen Promotor oder Enhancer.

cer. Alle drei Vektoren enthalten eine zweite Expressionskassette mit einem Neomycinresistenzgen, die als Selektionsmarker zur Isolierung stabil transfizierter Zellen genutzt werden kann.

Die *hfpgs*-cDNA lag im Expressionsvektor pTZ25-1 als 2158 bp grosses Genfragment vor, welches von EcoRI-Restriktionsseiten flankiert wurde. Zur Herstellung der Transkriptionseinheit *hfpgs-ires2-egfp* wurde das *hfpgs*-Genfragment mit Hilfe von EcoRI aus pTZ25-1 herausgeschnitten und in den durch EcoRI-Verdau linearisierten Klonierungsvektor pBluescript einkloniert. Nach Verifizierung der erwünschten 5'→3'-Orientierung durch Restriktionsenzym-analyse wurde mit SalI/SacII ein 2158 bp langes *hfpgs*-Fragment wiederum aus dem pBluescript-Vektor isoliert. Mit Hilfe dieses Fragmentes wurden dann die in den folgenden Abschnitten beschriebenen *fpgs-ires2-egfp*-Konstrukte kloniert.

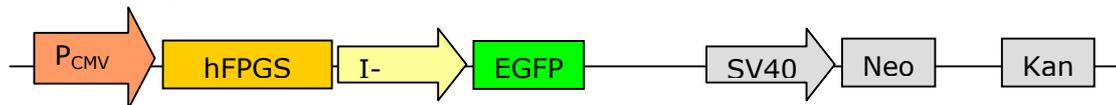
### 2.2.3.1. Klonierung des pCMV-FPGS-IRES2-EGFP (pFPGS-control)

Für die Klonierung des pFPGS-control wurde aus dem pIRES2-EGFP mit EcoRI/NotI das 1300bp lange *ires2/egfp*-Fragment herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde dann in den EcoRI/NotI linearisierten pEGFP-1 kloniert. Nach Linearisierung des neu entstandenen Vektors pEGFP-1-IRES2-EGFP mit SalI/SacII wurde dann das aus pBluescript isolierte 2158bp lange SalI/SacII *hfpgs*-Fragment vor die *ires2*-Sequenz kloniert. Der neue Vektor pEGFP-1-FPGS-IRES2-EGFP enthielt nun die Genkassette *hfpgs/ires2/egfp*. Über AccI/AflII konnte dann ein 3805bp langes Fragment mit dieser Genkassette aus pEGFP-1-FPGS-IRES2-EGFP herausgeschnitten und in den AccI/AflII linearisierten pEGFP-N1 kloniert werden. Im neuen Vektor pCMV-FPGS-IRES2-EGFP, kurz als pFPGS-control bezeichnet, ist nun die komplette Expressionskassette  $P_{CMV}/hfpgs/ires2/egfp$  enthalten (**Abb. 2a**). Die *hfpgs*-Expression wird in diesem Vektor durch den ubiquitär stark aktiven CMV-Promotor gesteuert. Gleichzeitig steuert dieser Promotor damit auch die *egfp*-Expression, da die Expression dieses Reportergen über das *ires2*-Element an die *hfpgs*-Genexpression gekoppelt ist. Der Expressionsvektor pFPGS-control wurde in Luziferase-Reportergen-Assays als Positivkontrolle verwendet.

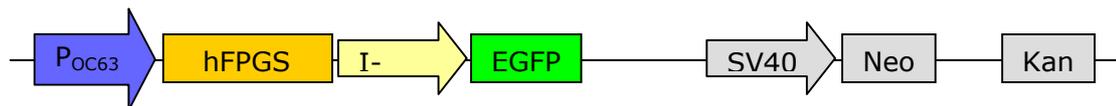
### 2.2.3.2. Klonierung des pOC-FPGS-IRES2-EGFP (pFPGS-OC)

Für die Klonierung des pFPGS-OC wurde das Osteocalcinpromotorfragment  $P_{OC-MG63}$  mit EcoRI aus pGem-T-easy ausgeschnitten und in den EcoRI-linearisierten pIRES2-EGFP kloniert. Auch in diesem Fall wurde durch Restriktionsenzymanalyse die richtige Orientierung des Promotorfragmentes überprüft. Zwischen OC-Promotorfragment und *ires2*-Element wurde der Vektor dann mit SalI/SacII linearisiert und das SalI/SacII-*hFPGS*-Fragment aus pBluescript einkloniert. So entstand die Genkassette  $P_{OC-MG63}/hfpgs/ires2/egfp$ . Der neue Expressionsvektor wurde als pOC-FPGS-IRES2-EGFP oder kurz als pFPGS-OC bezeichnet (**Abb. 2b.**). Er ist bis auf den Unterschied, daß die *hfpgs*-Expression anstatt über den unspezifischen CMV-Promotor über den spezifischen Osteocalcin-Promotor gesteuert wird, genauso aufgebaut wie pFPGS-control.

#### a. pFPGS-control



#### b. pFPGS-OC



**Abb. 2. Schematische Darstellung des pFPGS-control und des pFPGS-OC.**

Beide Vektoren enthalten die Genkassette *hFPGS-IRES2-EGFP*. Sie unterscheiden sich lediglich durch den der Genkassette vorgeschalteten CMV ( $P_{CMV}$ )- oder Osteocalcin ( $P_{OC-63}$ )-Promotor. 3'-wärts enthalten beide Vektoren ein Kanamycinresistenzgen für die Selektion in Bakterien und ein Neomycinresistenzgen für die Selektion in eukaryotischen Zellen.

### 2.2.4. Klonierung der lentiviralen Vektoren

Als Ausgangsvektor für die lentiviralen Vektoren diente pLNT/MCS. Dieser Vektor stellt einen sogenannten „self-inactivating“ Lentivirusvektor dar. Der Prototyp dieser Vektoren wird ausführlich in Abschnitt 2.3.4. beschrieben und ist in **Abb. 4c.** schematisch dargestellt.

Für die Klonierung unserer lentiviralen Konstrukte lag uns noch ein weiterer „self-inactivating“ lentiviraler Vektor vor: pLNT/Sffv/MCS/ccdB. Im Unterschied zum pLNT/MCS ist in diesem Vektor ein Sffv-Promotor 3'-wärts des cPPT-Elementes einkloniert. 3'-wärts des Sffv-Promotors enthält pLNT/Sffv/MCS/ccdB weiterhin die im Abschnitt 2.1.6. beschriebene Genkassette aus dem Gateway-Cloning-System, die den Einbau von Genfragmenten aus einem „Entry“-Vektor in den lentiviralen Vektor über homologe Rekombination erleichtert.

#### 2.2.4.1. Klonierung des lentiviralen „Destination“-Vektors pLNT/MCS/ccdB

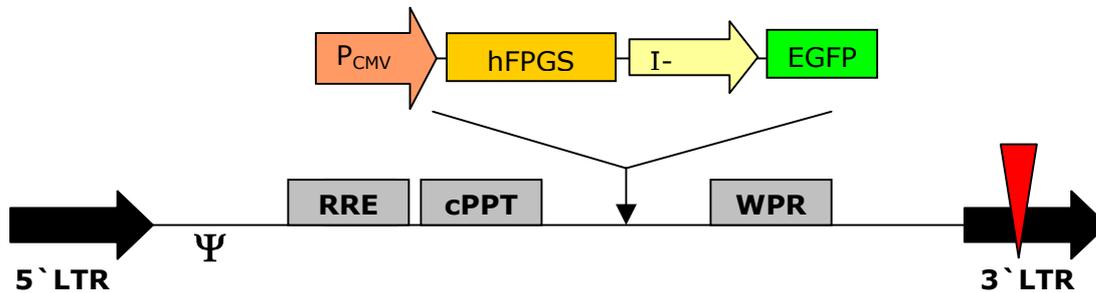
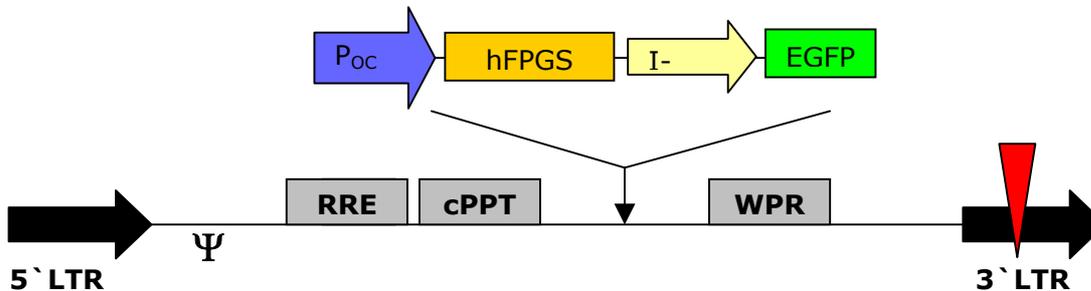
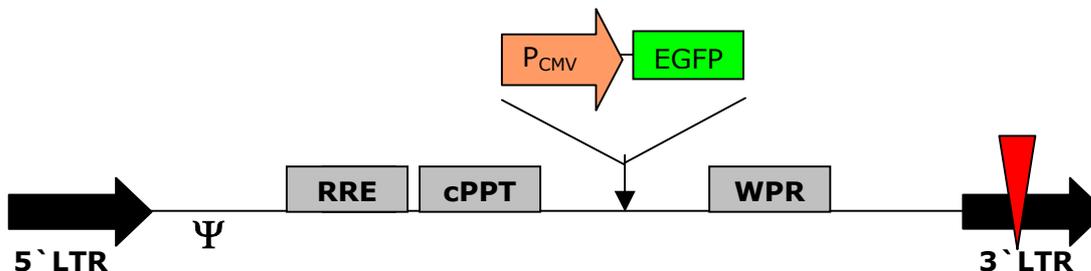
Um das Gateway-System zum Einbau von Genexpressionskassetten mit Promotor nutzen zu können, benötigten wir einen lentiviralen „Destination“-Vektor, der selbst keinen Promotor enthielt. Die Gegenwart eines anderen Promotors in unseren lentiviralen Konstrukten hätte sonst die Spezifität der OC-Promotor-Aktivität beeinträchtigen können. Deshalb wurde der lentivirale „Destination“-Vektor pLNT/Sffv/MCS/ccdB mit NheI linearisiert und anschliessend mit T4-Polymerase als „blunt end“ aufgefüllt. Dann wurde mit KpnI ein ca. 1900bp großes Fragment ausgeschnitten, welches die Genkassette aus dem Gateway-Cloning-System ohne Sffv-Promotor enthielt. Parallel wurde der pLNT/MCS mit SmaI (blunt end) und KpnI linearisiert. In diesen so linearisierten Vektor konnte dann die KpnI/blunt-Gateway-Genkassette kloniert werden. So entstand der promotorlose lentivirale „Destination“-Vektor pLNT/MCS/ccdB, der nach dem cPPT-Element die Genkassette aus dem Gateway-Cloning-System enthielt. Dieser Vektor wurde als Zielvektor für die weiteren „Gateway“-unterstützten Klonierungen verwendet.

#### 2.2.4.2. Klonierung des lentiviralen Vektors pLNT-CMV-FPGS-EGFP

Der pFPGS-control (s. Abschnitt 2.2.3.1.) wurde mit AseI linearisiert und danach „blunt end“ aufgefüllt. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde dann mit MfeI ein 4.300bp großes Fragment isoliert. MfeI ist kompatibel zu EcoRI. Somit konnte die 4.300bp große Genkassette gerichtet in den XmnI(blunt)/EcoRI linearisierten pENTR<sup>TM</sup>1A kloniert werden. In dem so neuentstandenen Vektor pENTR<sup>TM</sup>FPGS-control ist die Genkassette *P<sub>CMV</sub>/hfpgs/ires2/egfp* von attL-Rekombinations-Sequenzen flankiert, die unter Ausnutzung der „Gateway“-Rekombinationstechnologie den Einbau der Genkassette in den pLNT/MCS/ccdB erlaubte. Nach erfolgreicher Rekombination entstand der lentivirale Vektor pLNT-CMV-FPGS-EGFP (**Abb. 3a**).

#### 2.2.4.3. Klonierung des lentiviralen Vektors pLNT-OC-FPGS-EGFP

Der lentivirale Vektor pLNT-OC-FPGS-EGFP wurde in ähnlicher Weise wie der pLNT-CMV-FPGS-EGFP (2.2.4.2.) kloniert. Aus dem pFPGS-OC (2.2.3.2.) wurde mit BstBI/MfeI ein 4.300bp großes Fragment ausgeschnitten, welches die Genkassette *P<sub>OC</sub>/hfpgs/ires2/egfp* enthielt. Da BstBI blunt schneidet, konnte auch dieses Fragment gerichtet in den XmnI/EcoRI linearisierten „Entry“-Vektor pENTR<sup>TM</sup>1A kloniert werden. Aus dem so entstandenen Vektor pENTR<sup>TM</sup>FPGS-OC wurde auch hier mit Hilfe des „Gateway“-Rekombinationssystems die 4.300bp große Genkassette *P<sub>OC</sub>/hfpgs/ires2/egfp* in den lentiviralen „Destination“-Vektor pLNT/MCS/ccdB eingebaut. Es entstand der lentivirale Vektor pLNT-OC-FPGS-EGFP (**Abb. 3b**).

**a. pLNT-CMV-FPGS-EGFP****b. pLNT-OC-FPGS-EGFP****c. pcDNA HIV CS-CGW (pLNT-control; Steffens et al., 2004a)**

**Abb.3. Schematische Darstellung der drei verwendeten lentiviralen Gentransfer-Vektoren.** Die Vektoren **a** und **b** basieren auf dem pLNT/MCS und unterscheiden sich lediglich durch den Promotor, der die *hfgps-ires2-egfp*-Genkassette steuert. Vektor **a** wird durch den CMV-Promotor, **b** durch den OC<sub>MG63</sub>-Promotor gesteuert. Der Vektor **c** wird als Kontroll-Vektor benutzt. Er ist gut charakterisiert (Steffens et al., 2004a) und dient als Kontrolle für die lentivirale Infektion mit einem Vektor ohne Suizidgen, nur mit dem Reportergen *egfp*. Auch bei diesem Vektor wird ähnlich wie bei Vektor **a** das entsprechende Transgen durch den ubiquitär wirksamen CMV-Promotor gesteuert.

## **2.3. Zellkulturarbeiten und assoziierte Techniken**

### **2.3.1. Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Die verwendeten Zelllinien (siehe 1.6.) wurden in Zellkulturflaschen (Corning Costar, Bodenheim) mit DMEM Kulturmedium bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5 % v/v) in abgesättigter Atmosphäre kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freier PBS-Lösung (PAA, Cölbe) gewaschen und zur Zelldehäsion von der Unterlage über 2-5 Min. mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02% w/v;PAA) im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die Kryokonservierung zur Langzeitlagerung wurden die Zellen von der jeweiligen Zellkulturunterlage wie beschrieben abgelöst, in 5 ml Kulturmedium zentrifugiert (1400 UpM, 5 Min.,RT) und das resultierende Zellpellet in 1 ml Kulturmedium, versetzt mit 10% (v/v) DMSO (Sigma), resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der Gasphase bei -195 °C gelagert. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort mit 5 ml 37°C warmen Kulturmedium versetzt, um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu verringern. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen mit Medium überführt.

### **2.3.2. Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™6 zur transienten Genexpression**

Die Transfektion beschreibt das Einschleusen von Fremd-DNA in Säugetierzellen mittels physikalischen oder chemischen Maßnahmen. Wir verwendeten das kommerzielle Transfektionsreagenz FuGENE™6 (Roche). Hierbei handelt es sich um kationische Lipide, die mit DNA-Molekülen Komplexe bilden. Diese DNA-Lipid-Komplexe werden dann durch Interaktion mit der Zellmembran in die Zelle eingeschleust. Nur ein verschwindend geringer Bruchteil des eingeschleusten genetischen Materials wird ins Genom integriert und ermöglicht so eine stabile Ge-

nexpression, während der überwiegende Teil nach kurzer Expression schnell wieder abgebaut wird. Im Gegensatz zur stabilen Expression bezeichnet man diese kurzzeitige, limitierte Expression, die etwa 24-72 Std. nach Transfektion (je nach Transgen) am stärksten ist, als transient.

Vor Transfektion wurden jeweils  $2-5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz in 6-Loch-Platten oder  $5 \times 10^6$  Zellen in 10-cm-Platten mit 2 bzw. 10 ml Medium (DMEM) überführt und über Nacht inkubiert. Hierdurch sollte eine 70-80 %ige Konfluenz der Zellen erreicht werden, die als günstig für die Transfektion angesehen wird. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 1  $\mu\text{g}$  (6-Loch-Platte) bzw. 10  $\mu\text{g}$  (10cm-Platte) Plasmid-DNA mit dem jeweils 3-fachen Volumen an FuGENE™-Reagenz eingesetzt. Das Transfektionsreagenz wurde zunächst mit zusatzfreiem Medium auf Einzelvolumina von jeweils 100 bzw. 300  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die Lösung aus DNA und verdünntem Transfektionsreagenz wurde gemischt und 5 Min. bei RT inkubiert. Das FuGENE™-DNA-Gemisch wurde dann in das Kulturmedium der Zellen getropft. Nach Inkubation der Zellen im Transfektionsgemisch und Medium über Nacht bei 37°C wurden die Zellen in DMEM-Medium weiter kultiviert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion erfolgte die Untersuchung der Genexpression mittels Luciferasemessung (2.3.3.) oder Durchflußzytometrie (2.3.6.).

### **2.3.3. Promotorstudien mit Hilfe des Luziferase-Reporter-Gen-Assays**

Im Luziferase (Luc)-Assay wird das rekombinante Gen des Enzyms Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1985) als Reporter-Gen unter Expressionskontrolle eines spezifischen Promotors (z.B. Osteocalcinpromotor) verwendet, dessen Aktivität in verschiedenen Zelltypen bestimmt werden soll. Durch Messung der Photinus-Luziferase-Aktivität kann auf die jeweilige zelltypspezifische Aktivität des Promotors zurückgeschlossen werden.

Die Bestimmung der Photinus-Luziferase-Aktivität erfolgt durch eine Biolumineszenzreaktion, die durch die Luziferase katalysiert wird und auf der Oxidation des Käferleuchtstoffes Luciferin beruht. In einer ATP- und Magnesium-abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP-Zwischenstufe des Luciferins gebildet, die

in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert. Das angeregte Oxyluciferin fällt nachfolgend in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird. Die entsprechende Lichtemissionsreaktion wird mit Hilfe eines Luminometers (hier: Microlumat LB96P; Firma Berthold, Bad Wildbad) nach automatischer Injektion des Luziferasesubstrates in die Probe gemessen. Die Luziferaseaktivität wird dabei jeweils in RLUs („relative light units“) angegeben.

### **2.3.3.1. Dualer Luziferase-Assay**

Dieser Assay wurde mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) durchgeführt. Bei diesem Assay wird das Gen einer zweiten Luziferase, der Renilla-Luziferase aus dem Coelenteraten *Renilla reniformis*, als zusätzliches Reporter gen verwendet. Das Renilla-Luziferasegen steht unter Expressionskontrolle des konstitutionellen SV40-Promotors, der zelltypunabhängig eine starke Renilla-Luziferasegenexpression vermittelt. Auch die *Renilla*-Luciferase setzt in einer Biolumineszenzreaktion in Gegenwart von Sauerstoff ein Luciferinsubstrat unter Photonenemission um, nämlich das Coelenteralen-Luciferin zu Coelenteramid. Beim dualen Assay werden Plasmidkonstrukte mit dem Photinus-Luziferasegen unter Kontrolle des spezifischen Promotors (z. B. Osteocalcinpromotor) und mit dem Renilla-Luziferasegen unter Kontrolle des konstitutionellen SV40-Promotors in die verschiedenen Zelltypen kotransfiziert. Beide Luciferase-Aktivitäten können unabhängig voneinander im gleichen Ansatz gemessen werden. Die spezifische, z. B. durch den Osteocalcinpromotor vermittelte Photinus-Luziferase-Aktivität wird dabei immer auf die als interner Standard dienende SV40-Promotor-vermittelte Renilla-Luziferase-Aktivität bezogen. Somit können promotor-unabhängige Unterschiede in den spezifischen Luziferase-Aktivitäten verschiedener Zelltypen, z.B. durch zelltypabhängige Unterschiede in der Transfektionsrate, minimalisiert werden.

Im dualen Assay wurde zur Kotransfektion mit FuGENE™ (2.3.2.) pro Ansatz (in 6-Loch-Platten) insgesamt 1 µg DNA im Verhältnis von 1:4 (Renilla- zu Photinus-Luc-Plasmid) eingesetzt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die verschiedenen Luziferase-Aktivitäten in den transfizierten Zellen untersucht. Das Ernten der Zel-

lysate in jeweils 500  $\mu\text{l}$  „Passive Lysis“-Puffer und die anschließende Messung in schwarzen 96-Loch-Platten erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Messung wurden 5 oder 10  $\mu\text{l}$  des geernteten Lysats eingesetzt. Beide Luziferase-Substrate (LARIID und Stop & Go® Reagent) wurden abweichend von dem Herstellerangaben vor der Messung 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend über den Dispenser des Luminometers automatisch injiziert. Nach Abgleich der *Photinus*- mit den *Renilla*-Aktivitäten wurden die so standardisierten *Photinus*-Luziferase-Aktivitäten für jede Zelllinie in Relation zur jeweiligen Positivkontrolle dargestellt, die gleich 100% gesetzt wurde.

### 2.3.3.2. Singulärer Luziferase-Assay

Der singuläre Luziferase-Assay wurde neben dem dualen Assay ebenfalls durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des SV40-Promotors auf die spezifische Aktivität des Osteocalcinpromotors, wie er beim dualen Assay denkbar ist, auszuschließen. Beim singulären Luziferase-Assay wurde pro Ansatz 1  $\mu\text{g}$  des *Photinus*-Luc-Plasmids für die Transfektion verwendet, die Zellextrakte nach 48 Stunden geerntet und anschließend die Luziferase-Aktivität bestimmt. Zum Ernten der Lysate (2.3.3.1.) wurde der „Reporter Gene Assay Lysis“-Puffer (Roche) im Verhältnis von 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt.

#### Glycylglycin-Puffer:

25 mM Glycylglycin (pH 7,8)  
15 mM  $\text{MgSO}_4$   
4 mM EDTA  
(autoklavieren)

#### Luziferase-Puffer:

150  $\mu\text{l}$  Glycylglycin-Puffer  
30  $\mu\text{l}$  100 mM Kaliumphosphat (pH 7,8)  
2  $\mu\text{l}$  100 mM DTT  
2  $\mu\text{l}$  200 mM ATP  
(frisch ansetzen)

#### Luciferin:

55 mg DTT, auf Eis lösen, in  
35,7 ml Glycylglycin-Puffer (pH 7,8)  
+ 10 mg Luciferin  
in Aliquots bei  $-70^\circ\text{C}$  dunkel lagern

#### Luciferin-Lösung:

1 ml Luciferin  
4 ml Glycylglycin-Puffer (pH 7,8)  
40  $\mu\text{l}$  1 M DTT

Die anschließende Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit jeweils 25  $\mu\text{l}$  Zellsat. Unmittelbar vor der Messung wurden jeweils 184  $\mu\text{l}$  Luziferasepuffer zu den Proben dazugegeben. Die automatische Injektion der Luciferin-Lösung (pro Loch 100  $\mu\text{l}$ ) und die anschließende Messung der Lichtemission erfolgte mit Hilfe des Luminometers. Alle singulären Messungen wurden jeweils als unabhängige Doppelansätze durchgeführt. Zur Standardisierung wurden die singulären *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen (s.u. 2.3.3.3.) abgeglichen.

### **2.3.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

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

## 2.3.4. Lentivirale Vektortechniken

### 2.3.4.1. Lentivirusherstellung

Für die Herstellung von Lentivirus-Vektoren wurde die entsprechende Lentivirus-vektor-DNA mittels FuGENE™-Transfektion in 293T-Zellen eingeschleust. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem weiterentwickelten lentiviralen Vektorsystem gearbeitet (Srinivasakumar und Narasimhachar, 2001; Mochizuki et al., 1998; Dull et al., 1998; Trono et al., 2000), bei dem die zur Herstellung infektiöser Viruspartikel notwendige Lentivirus-DNA auf drei weitgehend voneinander unabhängige Plasmid-Vektoren verteilt ist:

Das Gen-Transfer-Plasmid oder Vektor-Plasmid enthält das zu verpackende genetische Material mit dem eigentlichen Transgen. Es dient dazu, daß dieses Transgen nach Umwandlung in RNA zusammen mit der lentiviralen RNA in das Viruspartikel verpackt wird, damit es später nach Infektion einer Zielzelle in deren Genom stabil integriert werden kann. Das Vektorplasmid enthält neben den „long terminal repeats“(LTR) und weiteren regulatorischen Genen auch als einziges der drei Plasmide das lentivirale Verpackungssignal ( $\Psi$ ), das die Verpackung der RNA in das Viruspartikel initialisiert.

Das Envelope-Plasmid enthält die genetische Information für das virale Hüllprotein („Virusenvelope“), das im wesentlichen Maße das Spektrum der infizierbaren Zielzellen bestimmt („Pseudotypisierung“).

Das *gag-pol*-Expressionsplasmid (Packaging-Plasmid, Verpackungsplasmid) liefert die Information für alle essentiellen viralen Bausteine, die für die Herstellung und Verpackung der Lentivirusvektoren neben den bereits im Vektorplasmid enthaltenen regulatorischen Elementen noch notwendig sind.

Aus biologischen Sicherheitsgründen sind verschiedene Schutzmechanismen in dieses lentivirale Generierungssystem eingebracht, die das Entstehen infektiöser replikationsfähiger Lentiviren verhindern sollen. Die wichtigste Sicherheitsmaßnahme ist die Verteilung der unterschiedlichen lentiviralen Gene auf drei ver-

schiedene Plasmide. Damit ist die vollständige Erbinformation für die Produktion eines Viruspartikels in der Produzentenzelle deutlich voneinander getrennt. Die Produktion eines replikationsfähigen Virus ist nur durch Rekombinationsprozesse zwischen den einzelnen Herstellungsplasmiden möglich. Außerdem wurde die Menge an überlappenden Gensequenzen, zwischen denen eine Rekombination von lentiviraler genetischer Information stattfinden kann, minimalisiert. Von den ursprünglich neun lentiviralen Genen (*gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef*) sind zudem nur noch fünf (*gag*, *pol*, *env*, *tat* und *rev*) auf den verschiedenen Plasmiden vorhanden. Das Fehlen von lentiviralen Genen beeinträchtigt zwar nicht die Herstellung infektiöser lentiviraler Partikel, doch sind diese Viren replikationsdefizient, d.h. sie können sich nicht in den infizierten Zielzellen vermehren.

Weiterhin handelt es sich bei dem von uns verwendeten lentiviralen Vektorsystem um ein selbstinaktivierendes Vektorsystem (Zufferey et al., 1998, 1997). Im Packaging-Plasmid und Envelope-Plasmid sind die typischen lentiviralen Promotorregionen, die long terminal repeats (LTR), durch andere Promotoren (z.B. CMV-Promotor) ersetzt. Im Gen-Transfer-Plasmid ist es nicht möglich, völlig auf die LTR zu verzichten, da sonst keine Infektion und Integration in das Genom der Zielzelle erfolgen könnte. Jedoch ist in diesem Vektor in der 3' LTR die U3-Region und die R-Region deletiert. Bei der Herstellung der lentiviralen Viruspartikel nach Triple-Transfektion spielt diese Deletion zunächst keine einschränkende Rolle. Nach Infektion der Zielzelle erscheint jedoch im Provirus, das in das Zielgenom integriert wird, die U3- und R- Deletion durch die Reverse Transkription nach Dopplung und Transfer auch im 5' LTR. Die Transgenexpression kann dann nicht mehr durch den 5' LTR-Promotor erfolgen, sondern muß durch einen zusätzlichen Promotor 5'wärts des Transgens gewährleistet werden. Neben der biologischen Sicherheit wird damit auch erreicht, daß in der Zielzelle der spezifische Promotor, der die Expression des Transgens regulieren soll, nicht durch den LTR-Promotor übersteuert wird.

Für die Produktion der lentiviralen Überstände in der vorliegenden Arbeit wurde stets das Plasmid pCMVΔR8.91 als Verpackungsplasmid und das pVSV-G als Envelope-Plasmid benutzt. Als Gen-Transfer-Plasmid wurde entweder das

pLNT/MCS oder das pcDNA HIV CS-CGW (etablierter EGFP-Kontrollvektor zur Überprüfung der lentiviralen Infektion; Steffens et al. 2004a) Plasmid verwendet. Als Produktionszelle diente in allen Ansätzen die 293T-Linie (**Abb.4**).

Nach erfolgreicher transients Triple-Transfektion von 293T-Zellen mit allen drei lentiviralen Plasmiden werden infektiöse Lentiviruspartikel in den Kulturüberstand sezerniert und können hieraus „geerntet“ werden. Für diese Umwandlung von 293T-Zellen in transiente Lentivirus-Produktionszellen wurden standardmäßig  $5,5 \times 10^6$  Zellen in 10-cm-Platten oder  $13,5 \times 10^6$  293T-Zellen in 162cm<sup>2</sup>-Zellkultur-Flaschen mit 10 bzw. 20 ml Medium überführt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert, so daß die Zellen vor Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 bis 90 % erreichen konnten. Pro Ansatz wurden jeweils 5µg (10-cm-Platte) bzw. 15 µg (162cm<sup>2</sup>-Zellkultur-Flaschen) der jeweiligen Plasmid-DNA (Gen-Transfer-Plasmid, Envelope-Plasmid und Packaging-Plasmid) mit 45 µl bzw. 100 µl FuGENE™-Reagenz für die Triple-Transfektion eingesetzt.

Nach 24 Stunden wurde das für die Transfektion eingesetzte Medium DMEM durch IMDM ersetzt. IMDM ist HEPES-haltig und weist dadurch eine deutlich bessere Pufferkapazität als DMEM auf. Die erhöhte Pufferkapazität war erforderlich, um zu gewährleisten, daß das Medium zum Zeitpunkt der „Virusernte“ noch ausreichende Pufferkapazität besaß. Ein Umschlagen in den sauren pH-Bereich führt nämlich zu einer Virusdegradation und damit zu einer signifikanten Reduktion der hergestellten Virusmenge. Zum IMDM-Medium wurde zusätzlich in einer Konzentration von 0,1 mM Natrium-Butyrat hinzugegeben, um die Virus-Sekretion aus den 293T-Zellen zu steigern. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurde der virushaltige Zellkulturüberstand abpipettiert und gefiltert (Einwegfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm; Sartorius, Göttingen), um Zellreste und noch lebende Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand bis zur Infektion auf Eis gelagert (max. 5 Std.) oder zwecks Langzeitlagerung in Aliquots bei -70°C eingefroren. Optional wurden die Überstände zusätzlich zwecks Virusanreicherung für 45 Min. bei 10 000 UpM und 4°C zentrifugiert. Bei diesen Umdrehungszahlen sedimentieren die Viruspartikel und erscheinen als Pellet, das durch Resuspension in einem kleineren Volumen IMDM konzentriert werden kann.

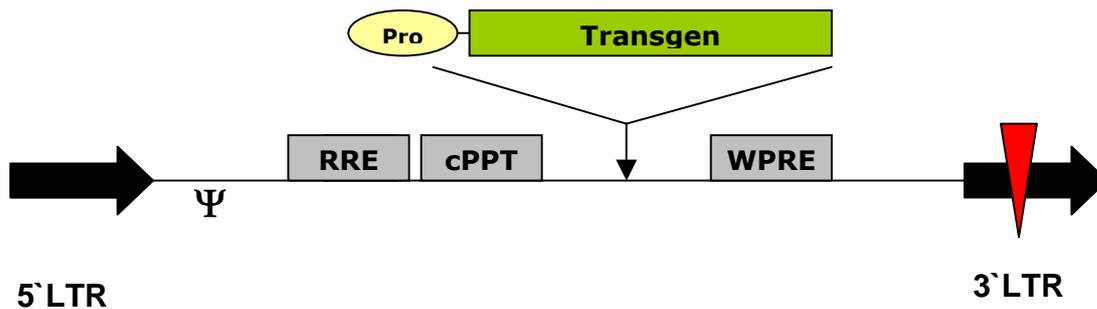
Folgende lentivirale Überstände wurden nach dieser Methode hergestellt: pLNT-CMV-FPGS-EGFP, pLNT-OC-FPGS-EGFP und pcDNA CS-CGW.

Nach Ernten der Überstände wurden die transfizierten Verpackungszellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz als Hinweis auf ihre Virusherstellungsleistung fluoreszenzmikroskopisch und mittels FACS-Messung auf EGFP-Expression untersucht (2.2.5.). Das *egfp*-Reporter-gen ist in allen verwendeten Lentivirusvektoren als Reporter-gen enthalten.

#### **2.3.4.2. Lentivirale Infektion von Säugetierzellen**

Einen Tag vor Infektion wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen in 12-Loch-Platten überführt, so daß die Zellen vor Infektion eine Konfluenz von 10 bis 15 % aufwiesen. Für die Infektion der verschiedenen Säugetierzellen (293T, Hela, ROS 1.7 2.8, MG63 und TM791) wurden für jede Viruspräparation (pLNT-CMV-FPGS-EGFP, pLNT-OC-FPGS-EGFP und pcDNA CS-CGW) definierte Virustiter von  $1 \times 10^6$  infektiöser Partikel/ml verwendet. Die Bestimmung der Virustiter wird in Abschnitt 2.3.4.3. beschrieben.

Zur Infektion wurde das Kulturmedium entfernt und anschließend  $1000 \mu\text{l}$  Virusüberstand, entsprechend  $0,5 \times 10^6$  infektiöser Virus-Partikel pro Loch auf die Zellen gegeben. Für 16 Stunden wurden die Zellen mit diesem Virusüberstand inkubiert. Anschließend wurde dieser durch reguläres Kulturmedium ersetzt. Zweiundsiebzig Stunden nach Infektion wurden die Zellen für die FACS-Analyse (2.3.6.) geerntet bzw. für die Untersuchung der MTX-Sensitivität (2.3.7.) vermehrt.

**a. Verpackungsplasmid (pCMVΔR8.91; Zufferey et al., 1997)****b. Envelope Plasmid (pVSV-G)****c. Gen-Transfer-Plasmid (pLNT/MCS)**

**Abb. 4. Schematische Darstellung eines aktuellen Lentivirus-Vektor-Generierungssystems.** Ein solches System besteht aus 3 verschiedenen Plasmiden (a. Verpackungsplasmid, b. Envelope-Plasmid, c. Gentransfer-Vektor). Nur wenn alle 3 Plasmide gleichzeitig in einer Zelle transkribiert werden, können funktionsfähige Viruspartikel produziert werden. Im Gen-Transfer-Vektor ist ein Packaging-Signal ( $\Psi$ ) vorhanden, in den anderen beiden Vektoren fehlt es hingegen. Mit dem Pfeil ist angedeutet, wo üblicherweise eine Genkassette (Promoter plus Transgen) in den Gen-Transfer-Vektor inkloniert werden kann. Die typischen lentiviralen Promotor-Regionen (LTR) sind nur im Gen-Transfer-Vektor vorhanden. In der 3`LTR sind allerdings die U3- und die R-Regionen deletiert, wodurch ein sogenannter „Self-Inactivating“-Vektor entsteht. Die ebenfalls im Vektor vorhandenen lentiviralen Gene Rev und RRE sind auch hier für den Transport der RNA aus dem Nukleus in das Cytoplasma verantwortlich. Das cPPT-Element („central polypurine tract“) kommt in allen Lentiviren vor und ist bedeutsam für die reverse Transkription. Durch cPPT ist die Bildung eines dreisträngigen DNA-Moleküls während der Reversen Transkription möglich. (Charneau et al., 1994). Das WPRE-Element („Woodchuck Post-Transcriptional Regulatory Element“) kann die Genexpression der Genkassette um das 5-8 fache fördern. Der genaue Mechanismus dieser Steigerung ist nicht bekannt. Auch trägt es zur Stabilisierung der Transgenexpression bei (Zufferey et al., 1999).

### 2.3.4.3. Bestimmung der lentiviralen Virustiters

Der Virustiter ist ein Maß dafür, wieviele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Virusüberstand enthalten sind. Die Titer der hergestellten Überstände wurden zunächst durch FACS-Analyse der Expression des Markergens EGFP in transduzierten Zielzellen ermittelt (Flasshove et al., 2000). Bei dieser Methode zur Titerbestimmung ist wichtig, daß der Promotor, der die *egfp*-Expression steuert, in den infizierten Zellen auch wirklich aktiv ist. Ansonsten kann auch bei erfolgreicher Infektion keine zuverlässige EGFP-Expression im FACS gemessen werden. Diese offensichtliche Binsenwahrheit ist bei Verwendung der FACS-Methode zur Titerbestimmung von „self-inactivating“ Lentiviren mit spezifischer Transgenexpression durchaus problematisch. Zum Beispiel ist in 293T-Zellen der Osteocalcin-Promotor nicht aktiv. Deswegen muss die Titerbestimmung des lentiviralen Vektors mit Osteocalcinpromotor-vermittelter Transgenexpression nicht in 293T-Zellen, sondern in den Osteocalcin-positiven ROS-Zellen durchgeführt werden. Die auf EGFP-FACS-Messung beruhende Titerbestimmung hängt dabei in sehr starkem Maße von der Dichte der jeweiligen „Envelope“-Rezeptoren auf der Oberfläche der jeweiligen Zielzellen und damit deren „Infizierbarkeit“ als auch von der Stärke der Promotoraktivität in eben diesen ab. Beide Einflussfaktoren können zu einer fehlerhaften Messung des tatsächlichen Titers eines lentiviralen Vektors führen. Deswegen haben wir die Titerbestimmung an allen Virusüberständen auch noch mit Hilfe der p24-ELISA-Messung durchgeführt (Wittek et al., 1987; Nishanian et al., 1990). Hierdurch kann zelltypunabhängig durch Messung der Konzentration des lentiviralen Proteins p24 auf die vorliegende Anzahl der Viruspartikel zurückgeschlossen werden. Ein möglicher Fehler dieser zweiten Methode könnte aus der Neigung der Lentiviren zur Pseudopartikel-Bildung resultieren. Diese sind Viruspartikel, die ohne Hüllprotein aus der Zelle ausgeschleust werden. Sie enthalten dann zwar das p24-Protein, sind aber wegen der fehlenden Hülle nicht infektiös. Diese Pseudopartikel werden bei einem p24 ELISA mitbestimmt und können zur Bestimmung eines überhöhten Virustiters führen. Durch die Kombination beider Verfahren zur Virusbestimmung erhoffen wir letztendlich eine aussagekräftige Bestimmung der jeweiligen lentiviralen Titer.

### 2.3.4.3.1. EGFP-FACS-Methode

Für diese Methode der Titerbestimmung wurden jeweils  $3 \times 10^5$  293T- oder ROS-Zellen je Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zielzellen mit einer Verdünnungsreihe ( $1 - 10^{-5}$  fach) der jeweiligen viralen Überstände ( $500\mu\text{l}/\text{Loch}$ ) infiziert. (2.3.4.2.). Vierundzwanzig Stunden nach Infektion erfolgte die Zugabe von 1 ml Medium, und 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (2.3.6.) auf den Anteil an EGFP-positiven Zellen untersucht. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen kann mit Hilfe der folgenden Formel auf die zum Zeitpunkt der Transduktion je ml Überstand enthaltenen transduzierenden Einheiten (TE/ml) geschlossen werden:

$$\text{TE/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion}}{100 \%} \times \underbrace{\text{positive Zellen (\%)} \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor}}_{\text{Infektion mit } 500 \mu\text{l Virusüberstand}}$$

### 2.3.4.3.2. p24-Assay

Bei dieser Virustiterbestimmungsmethode wurde die p24-Konzentration in den Virusüberständen mittels eines ELISAs (enzyme-linked-immunosorbent assay) gemessen. p24 ist ein auch nach Viruslyse stabiles lentivirales Protein. Mit Hilfe einer Standardkurve kann von der jeweiligen p24-Konzentration eines Virusüberstandes auf die Anzahl der initial darin enthaltenen Viruspartikel geschlossen werden. Die p24-ELISAs wurden dankenswerterweise von Herrn PD Dr. Adams, Institut für Virologie (Universitätsklinikum Düsseldorf), mit Hilfe eines Abbott-Murex HIV-Ag-Assays durchgeführt.

### 2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Bereits 24 Stunden nach Transfektion kann die EGFP-Expression als Maß für die erfolgreiche Transduktion fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem inversen Durchlichtmikroskop („Axiovert 25“; Carl Zeiss, Oberkochen) bei 470 nm Filter.

### **2.3.6. Durchflußzytometrie**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Synonym: FACS = „Fluorescence-activated cell sorting“) können verschiedene Parameter einer Zelle erfaßt werden. Neben der Zellgröße und Granularität ermöglicht es auch den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Molekülen nach Anfärbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Radbruch, 1999). Ebenso können eigenfluoreszierende Proteine (z.B. das „enhanced“ grün-fluoreszierende Protein = EGFP) und Farbstoffe in der Zelle per FACS analysiert werden. Für die Messung werden die Zellen einzeln an einem Argon-Laser vorbeigeleitet. Nach Anregung bei 488 nm können von verschiedenen Detektoren unterschiedliche Lichtemissionen jeder einzelnen Zelle erfaßt werden: Das Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FCS), das Seitwärtsstreulicht („sideward light scatter“, SSC) und die Emission etwaiger Fluoreszenzfarbstoffe im grünen (525 nm; FL1-Detektor), roten (578nm; FL2-Detektor) oder dunkelroten Wellenlängenbereich (680 nm; FL3-Detektor). In der vorliegenden Arbeit wurden grün (EGFP) bzw. rot fluoreszierende Farbstoffe (PI = Propidiumiodid) verwendet.

Der FCS ist ein Maß für die Größe der Zelle, während die intrazelluläre Granularität durch das SSC erfaßt wird (Radbruch, 1999). Durch eine Dot-Plot-Darstellung des FCS gegen das SSC können tote Zellen oder Partikel aufgrund ihrer geringeren Größe und Granularität von lebenden Zellen unterschieden und somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Zusätzlich können tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumiodid markiert und somit ebenfalls von der lebenden Zellpopulation abgegrenzt werden (Pollack et al., 1990).

### **2.3.6.1. FACS-Analyse**

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit 5 mM EDTA in PBS abgelöst. Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in einem FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) sedimentiert (1600 UpM, 6 Min., RT) und der Überstand vollständig dekantiert. Danach wurden die Zellen zur Antikörperfärbung in 100  $\mu$ l PBS / 0,5 % (w/v) BSA (Sigma) bzw. zur direkten Messung in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem FACScan oder FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Zur Datenerfassung von jeweils 10 000 Zellen pro Ansatz und der anschließenden Auswertung diente ein Apple Power Macintosh G3-Computer mit der dazugehörigen „Cell Quest“-Software (Becton Dickinson).

### **2.3.7. Methotrexat (MTX) -Sensitivitätstest**

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung einer MTX-Behandlung auf die Tumorzellen wurden die jeweiligen Zellen (293T, Hela, ROS 1.7 2.8, MG63 und TM791) unter Einschluß entsprechender Negativ-Kontrollen über 4 Stunden mit verschiedenen MTX-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde mittels eines Proliferations-Assays (2.3.7.1.) die Überlebensrate bestimmt.

#### **2.3.7.1. Proliferations-Assay mittels Zellzählung**

Die verschiedenen Zellen wurden in 6-Loch-Platten in Kulturmedium mit verschiedenen MTX-Konzentrationen (0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 und 10,0 nmol/ml) überführt und über 4 Stunden im Brutschrank behandelt. Dazu wurden je nach Wachstumsrate  $1 \times 10^5$  bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch verwendet (Aghi et al., 1999). Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin pro Ansatz aus den Löchern abgelöst. Die Zellzahl der Proben wurde dann mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden pro Zellzahlbestimmung immer Dreifach-Ansätze durchgeführt. Die Zellzahl der unbehandelten Ansätze diente als Positivkontrolle und wurde deshalb für jede Zelllinie mit 100% definiert. Die Zellzahlen der korrespondierenden behandelten Ansätze wurde dann jeweils in Relation dazu gesetzt.

### **2.3.8. Behandlung von Zellen mit Calcitriol ( $1\alpha$ - $25(\text{OH})_2$ - $\text{D}_3$ ; Vitamin D)**

Nach Transfektion mit FuGENE™6 wurden die Zellen mit Calcitriol zur Erhöhung der Osteocalcinpromotoraktivität behandelt. Dafür wurde zu jedem Ansatz einer 6-Loch-Platte 1nmol Calcitriol pro ml Medium gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte dann ein Medium-Wechsel und die weitere Prozessierung der Zellen für den Luciferase-Assay (2.3.3.).

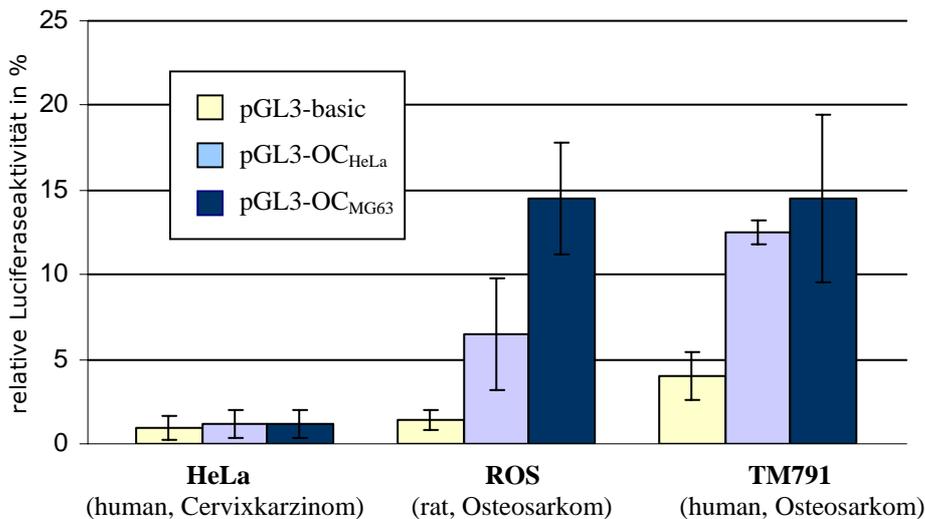
## III. Ergebnisse

### 1. Luciferase-Expressionsmessungen

In transienten Transfektionsexperimenten wurde die osteosarkomspezifische Expressionskontrolle der klonierten Osteocalcin-Promotorfragmente  $P_{OC-Hela}$  und  $P_{OC-MG63}$  mittels transienter Luziferase-Reporter-Expression in verschiedenen Osteocalcin-positiven und -negativen Zelllinien untersucht. Die Luziferase-Expression wurde sowohl mittels dualem Assay (II. 2.3.3.1.) mit Photinus-Luziferase zur spezifischen Promotoraktivitätsbestimmung und Renilla-Luziferase zur internen Kontrolle als auch mittels singulärem Assay (II. 2.3.3.2.) nur mit Photinus-Luziferase bestimmt. Da die Ergebnisse der singulären Messungen mit denen der dualen Messungen übereinstimmten, konnte eine Wechselwirkung der Promotoren beim dualen Assay ausgeschlossen werden. Dargestellt sind die Ergebnisse des dualen Assays (**Abb. 5**).

Sowohl mit  $P_{OC-Hela}$  als auch mit  $P_{OC-MG63}$  wird jeweils nur eine relativ geringe Luziferase-Aktivität in den von uns untersuchten Osteocalcin-positiven Osteosarkomzelllinien (ROS, TM791) erzielt. Im Vergleich zur Positivkontrolle (pGL3-control mit SV40-Promotor) induzieren beide Osteocalcinpromotorfragmente nur ca. 8-15 % der  $P_{SV40}$ -vermittelten Luziferaseaktivität. Interessanterweise zeigt  $P_{OC-MG63}$  in ROS-Zellen eine etwa zwei- bis dreimal stärkere Aktivität als  $P_{OC-Hela}$ . Auch in TM791 scheint  $P_{OC-MG63}$  stärker zu sein, allerdings nicht so deutlich wie in ROS (**Abb. 5**).

In der Osteocalcin-negativen HeLa-Zelllinie scheinen beide Osteocalcinpromotorfragmente nicht aktiv zu sein. Hier liegen sowohl die  $P_{OC-Hela}$  als auch die  $P_{OC-MG63}$ -vermittelte Luziferaseaktivität etwa im Bereich der promotorlosen Negativkontrolle (pGL3-basic). Die Negativkontrolle weist insgesamt keine gesteigerte Luziferaseaktivität, weder in den ROS- noch in den HeLa-Zellen, auf. Sie erreicht in beiden Zelllinien lediglich 0-1 % der Luziferaseaktivität der Positivkontrolle. In der Osteocalcin-negativen Osteosarkomzelllinie TM791 erreicht die Negativkontrolle ca. 2-4 % der Luziferaseaktivität der Positivkontrolle.



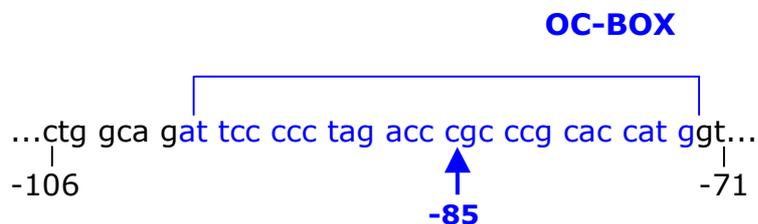
**Abb.5. Zellspezifische Luciferaseaktivität 48 Std.nach Transfektion mit den Konstrukten pGL3basic, pGL3-OC<sub>HeLa</sub> und pGL3-OC<sub>MG63</sub>.** Der Luciferase-Assay wurde mit den Zelllinien HeLa, ROS und TM791 durchgeführt, die mit den verschiedenen pGL3-Konstrukten transfiziert wurden. Die Werte sind in Bezug zur Positivkontrolle (pGL3-control, nicht gezeigt) dargestellt, deren Luziferaseaktivität für jede Zelllinie jeweils gleich 100% gesetzt wurde. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 2-5 unabhängigen dualen Luciferase-Assays.

### 1.1. Promotoraktivität in Abhängigkeit von Mutationen im Bereich der OC-Box

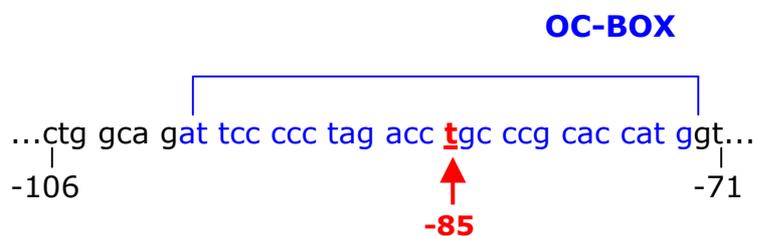
Der Unterschied in der spezifischen Luziferasegenexpression, wie er vor allem in ROS-Zellen zwischen den aus HeLa und MG63 klonierten Osteocalcinpromotorfragmenten P<sub>OC-HeLa</sub> und P<sub>OC-MG63</sub> deutlich zu finden war, war überraschend. Wir waren nämlich intial davon ausgegangen, dass die fehlende Osteocalcinexpression in HeLa wohl eher durch Unterschiede auf Ebene der Transkription und der Promotoraktivität bedingt ist und weniger auf Unterschiede in der DNA-Sequenz beruht, die ja eigentlich in Osteocalcin-negativen (HeLa) und -positiven (MG63) Zellen identisch sein sollte. Tatsächlich lag jedoch bei den P<sub>OC-HeLa</sub> im Vergleich zu P<sub>OC-MG63</sub> genau in Position -85 des Osteocalcin-Gens (Promotorregion!) ein Austausch von Cytosin gegen Thymidin vor. Dieser Basenaustausch war in allen Promotorfragmenten zu finden, die in der vorliegenden Arbeit aus der HeLa-Zelllinie kloniert worden waren, nicht jedoch in den aus MG63 klonierten OC-Fragmenten, deren Sequenzen der entsprechenden Datenbanksequenz entsprach. Der beim P<sub>OC-HeLa</sub>-Promotor nachgewiesene Basenaustausch liegt interes-

santerweise in der sogenannten OC-Box (**Abb. 6**), die den für die spezifische Aktivität des Osteocalcin-Promtors kritischen Bereich darstellt (Lian et al., 1996; Hoffmann et al., 2000). Da für die weiteren Untersuchungen mit dem Osteocalcin-Promotor eine möglichst starke Promotor-Aktivität erforderlich war, wurde für die nachfolgenden Experimente nur noch das MG63-Promotorfragment  $P_{OC-MG63}$  benutzt.

#### OC-Promotor $P_{OC-MG63}$ (aus OC-positiven MG63-Zellen isoliert):



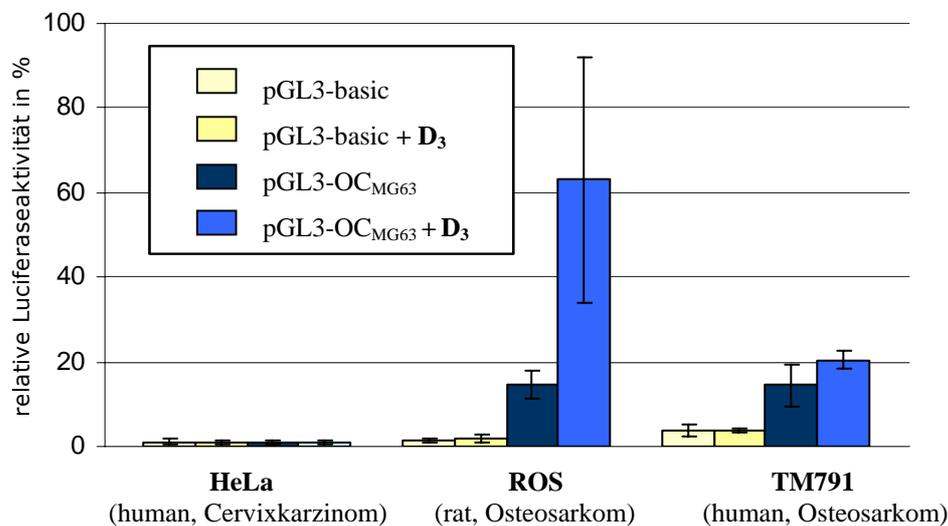
#### OC-Promotor $P_{OC-HeLa}$ (aus OC-negativen HeLa-Zellen isoliert):



**Abb. 6. Ausschnitt aus der 5`-flankierenden Nukleotidsequenz der Osteocalcin-Promotorregion im Bereich der sogenannten OC-Box.** Diese Box stellt eine Proteinbindungsstelle dar, die für die basale Promotoraktivität offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt (Lian et al., 1996; Hoffmann et al., 2000). Hervorgehoben ist der  $c \rightarrow t$ -Basenaustausch in Position -85, welcher in allen aus der HeLa-Zelllinie geklonten OC-Promotorfragmenten auftrat. Hingegen entspricht die Sequenz aller aus MG63 geklonten OC-Promotorfragmenten der entsprechenden Datenbank-Sequenz.

## 1.2. Steigerung der Osteocalcinpromotoraktivität durch Vitamin D

Im Knochenstoffwechsel spielt Vitamin D (Calcitriol) eine entscheidende Rolle. Unter anderem steht es in Wechselwirkung mit der OC-Promotor-Region. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des OC-Promotors und die damit verbundene Translation des Proteins Osteocalcin unter der Induktion mit Vitamin D stark zunimmt (Lian et al., 1996). Diesen Effekt durch Vitamin D konnten wir in unseren Luziferase-Experimenten ebenfalls zeigen, wobei die Luziferaseaktivität unter Vitamin D-Einfluß bis zum 5-fachen zunahm.



**Abb. 7. Zellspezifische Luciferaseaktivität 48 Std. nach Transfektion mit den Konstrukten pGL3basic und pGL3-OC<sub>MG63</sub> mit und ohne Vitamin D (D<sub>3</sub>)-Behandlung.** Die abgebildeten Luciferaseaktivitäten repräsentieren Mittelwerte aus 2-5 unabhängigen Experimenten.

In ROS zeigt P<sub>OC-MG63</sub> unter Vitamin-D-Induktion eine 3–5-fach höhere Luciferaseaktivität als ohne Vitamin D. Auch in der TM791-Zelllinie läßt sich ein aktivitätssteigernder Effekt von Vitamin D auf den OC-Promotor nachweisen. In der HeLa-Zelllinie hingegen ist keine signifikante Promotorinduktion durch Vitamin D zu erreichen. Auch die Luziferaseaktivität des promotorlosen Kontrollvektors pGL3-basic läßt sich durch Vitamin D nicht erhöhen (**Abb.7**).

## 2. Untersuchung der *egfp*-Expression nach lentiviraler Infektion

### 2.1. Generierung und Titerbestimmung transienter lentiviraler Überstände

Zur Infektion verschiedener Zelllinien mit den Lentivirusvektoren pLNT-CMV-FPGS-EGFP, pLNT-OC-FPGS-EGFP und pcDNA CS-CGW wurden zunächst transiente Virusüberstände generiert (II.2.3.4.1.). Anschliessend wurden die Titer dieser Virusüberstände, wie in II.2.3.4.3 beschrieben, sowohl mit Hilfe der EGFP-FACS-Messungsmethode als auch mit dem p24-Assay bestimmt. Alle Ergebnisse der Virustiterbestimmungen sind in **Tab. 2** einander gegenübergestellt und zeigen folgende Ergebnisse:

Wie zu erwarten ist keine vermehrte *egfp*-Expression nach Infektion von 293T-Zellen mit dem pLNT-OC-FPGS-EGFP-Vektor nachzuweisen. Der Virustiter für dieses lentivirale OC-Promotor Plasmid ist in dieser Zelllinie also nicht bestimmbar. In den ROS-Zellen ergeben sich dagegen für die pLNT-OC-FPGS-EGFP-Überstände Virustiter im Bereich von  $5 \times 10^6$ . Bei Infektion mit dem „unspezifischen“ Vektor pLNT-CMV-FPGS-EGFP zeigen sich gleiche Virustiter von jeweils  $5 \times 10^6$  infektiöser Partikel pro ml sowohl in 293T- als auch in ROS-Zellen. Für den EGFP-Kontrollvektor pcDNA CS-CGW-Plasmid liegen die bestimmten Virustiter insgesamt höher: In 293T wird ein Titer von  $1,8 \times 10^7$  und in ROS von  $1,1 \times 10^7$  infektiöser Partikel pro ml erreicht.

Wie zu erwarten liegen die Virustiter, die mit den p24-Assay bestimmt wurden und damit unabhängig sind von der Dichte der „Envelope“-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und der Stärke der Promotoraktivität, bei allen gemessenen Überständen in einem ähnlich hohen Konzentrationsbereich (4400 - 5800 ng/ml). Mit diesem Ergebnis können stärkere Titerunterschiede zwischen den verschiedenen Überständen ausgeschlossen werden

**Tab. 2. Gegenüberstellung der durch unterschiedliche Verfahren bestimmten Virustiter der transient hergestellten lentiviralen Überstände pDNA CS-CGW, pLNT-CMV-FPGS-EGFP und pLNT-OC-FPGS-EGFP.**

<b>Überstand</b>	<b>EGFP auf 293T TE/ml</b>	<b>EGFP auf ROS TE/ml</b>	<b>P24-ELISA ng/ml</b>
<b>pcDNA CS-CGW</b>	$1,8 \pm 0,3 \times 10^7$	$1,1 \pm 0,07 \times 10^7$	4976
<b>pLNT-CMV-FPGS-EGFP</b>	$5,4 \pm 1,3 \times 10^6$	$5,5 \pm 0,6 \times 10^6$	4408
<b>pLNT-OC-FPGS-EGFP</b>	Nicht zu bestimmen	$5,4 \pm 1,0 \times 10^6$	5776

TE=Transduzierende Einheiten

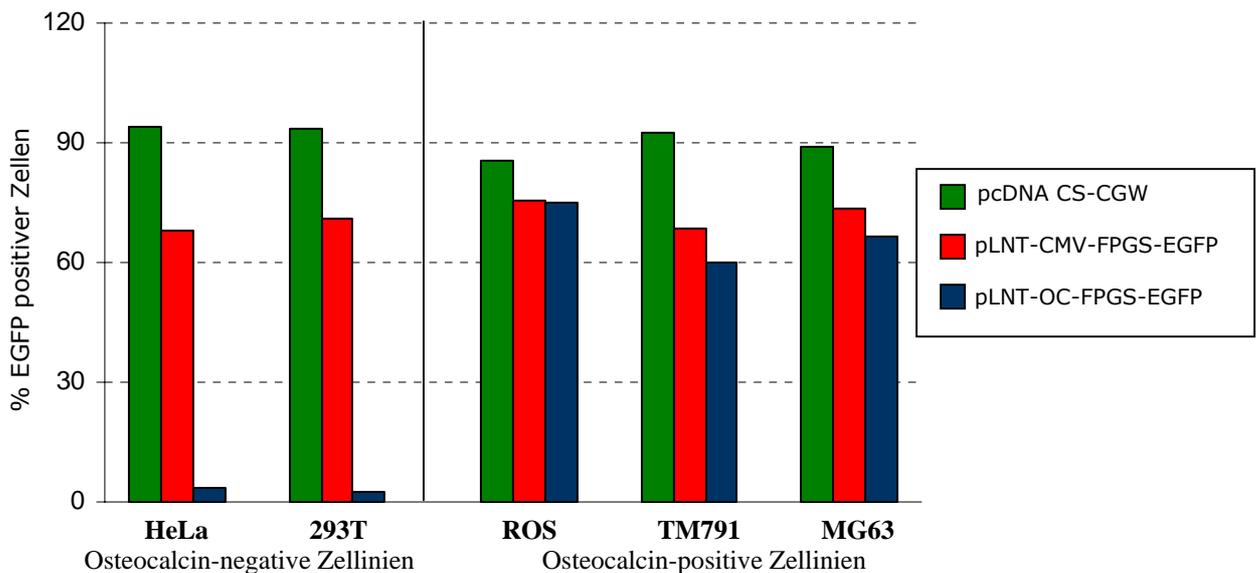
Die Virustiter wurden bestimmt über EGFP-FACS-Messung nach Infektion der humanen Osteocalcin-negativen 293T-Zelllinie und der murinen Osteocalcin-positiven ROS-Zelllinie und über einen p24-ELISA. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse für die Virusüberstände, die später für die Infektion der zu untersuchenden Zelllinien eingesetzt wurden.

## **2.2. Lentivirale Infektion verschiedener Osteocalcin-positiver und -negativer Zellen**

Drei unterschiedliche Osteocalcin-positive Osteosarkomzelllinien (TM791, MG63 und ROS) und zwei verschiedene Osteocalcin-negative Zelllinien (HeLa und 293T) wurden zur Untersuchung einer osteosarkomspezifischen Transgenexpression mit den generierten Virusüberständen (pLNT-CMV-FPGS-EGFP, pLNT-OC-FPGS-EGFP und pcDNA CS-CGW) infiziert. Anschliessend wurde die EGFP-Expression mittels FACS-Analyse ermittelt.

Beide CMV-Promotor-Konstrukte (pcDNA CS-CGW und pLNT-CMV-FPGS-EGFP) weisen 72 Stunden nach Infektion mit den lentiviralen Vektoren in allen Zelllinien eine starke EGFP-Expression (zwischen 70-95% EGFP positive Zellen) auf, pLNT-OC-FPGS-EGFP hingegen induziert eine deutliche Expression nur in den Osteocalcin-positiven Osteosarkomzelllinien. In der ROS-Zelllinie erreicht pLNT-OC-FPGS-EGFP eine in etwa gleichstarke Expression wie die CMV-Promotor-Konstrukte. In

der MG63-Zelllinie und der TM791-Zelllinie ist die Expression dagegen schwächer. Hier sind nur ca. 60 – 65 % der Zellen deutlich EGFP-positiv. Es ist jedoch auch in dieser Zelllinie ein deutlicher Unterschied zu den Osteocalcin-negativen Zelllinien zu erkennen. Hier liegt der Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP bei ca. 5% (**Abb. 8**).



**Abb. 8. EGFP-Expression nach lentiviraler Transduktion verschiedener Osteocalcin-negativer Zelllinien und Osteocalcin-positiver Osteosarkom-Zelllinien mit den Konstrukten pcDNA CS-CGW, pLNT-CMV-FPGS-EGFP und pLNT-OC-FPGS-EGFP.** Nach Transduktion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP ist in den Osteocalcin-negativen Zelllinien nur eine schwache Basalexpression zu messen. Hingegen zeigen die Osteosarkomzelllinien eine deutliche EGFP-Expression. Die beiden „unspezifischen“  $P_{CMV}$ - Konstrukte zeigen in allen Zelllinien eine ähnlich starke Expression.

Eine solche Darstellung reiner Prozentzahlen EGFP-positiver Zellen liefert jedoch keine detailliertere Aussage über die Selektivität der verwendeten Vektoren, da die jeweilige Stärke der induzierten EGFP-Expression nicht miteinfließt. Deshalb sind zusätzlich die Ergebnisse der FACS-Messungen in HeLa- und ROS-Zellen nach lentiviraler Infektion exemplarisch als Dotplots dargestellt (**Abb.9**). Hier lassen sich nicht nur die verschiedenen Prozentzahlen, die bevorzugt die stark-EGFP-positiven Zellen erfassen, sondern auch die allgemeinen Unterschiede in der Stärke der EGFP-Expression zwischen Osteocalcin-negativen (HeLa) und -positiven (ROS) Zellen erkennen.

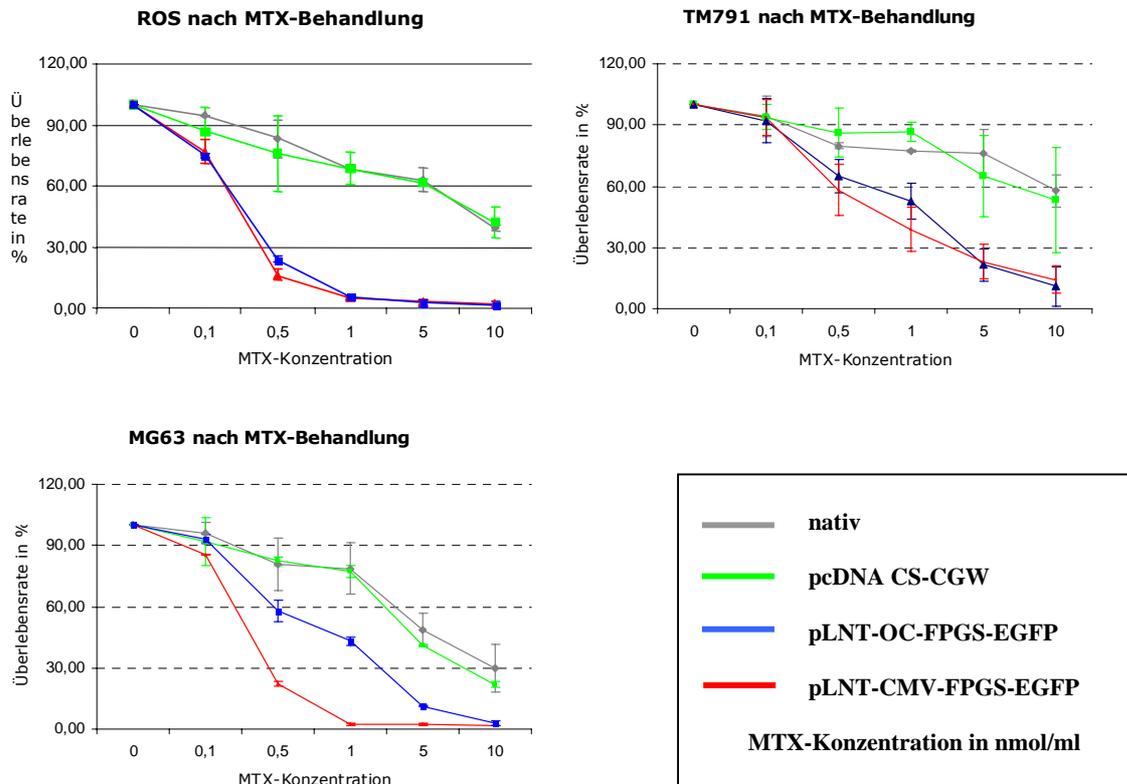


### 3. Untersuchung der Methotrexat -Sensitivität der infizierten Zellen

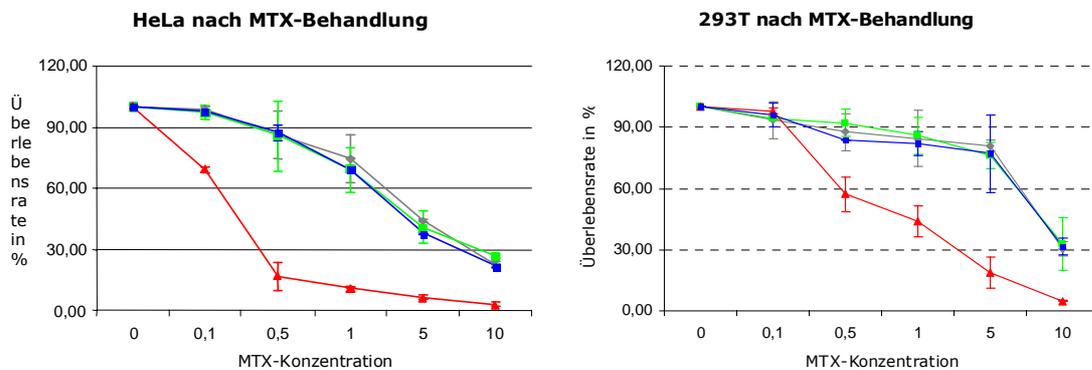
Mit allen infizierten Zelllinien (TM791, MG63, ROS, HeLa und 293T) wurden Methotrexat-Sensitivitäts-Assays wie in II.2.3.7. beschrieben durchgeführt. Hierdurch ist in den mit pLNT-OC-FPGS-EGFP-Überständen infizierten Zellen zu überprüfen, ob der Unterschied der OC-Promotor vermittelten FPGS-Expression zwischen Osteocalcin-positiven Osteosarkomzellen und Osteocalcin-negativen Zellen ausreichend ist, um im Rahmen einer Suizidgen-therapie einen signifikanten Toxizitätsunterschied zwischen Osteosarkomzellen und anderen Zellen zu erreichen. Als Positivkontrolle wurden die mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP-Überständen infizierten Zellen benutzt, die in allen Zelllinien eine verstärkte Methotrexattoxizität induzieren sollten. Die mit pcDNA CS-CGW-Überständen infizierten Zellen fungierten dagegen als Negativ-Kontrolle, da sie kein *hfpgs* als Suizidgen enthielten und damit eigentlich auch keine erhöhte Methotrexat-Sensitivität zeigen sollten. Nicht infizierte Zelllinien wurden als weitere Negativkontrollen verwendet, um die Toxizität der MTX-Behandlung ohne genetische Manipulation für jede Zelllinie zu dokumentieren. Der Anteil überlebender Zellen nach MTX-Behandlung wurde in allen Assays prozentual in Bezug zu unbehandelten Zellen (=100%) angegeben.

Die Methotrexat-Sensitivität in den mit pcDNA-CS-CGW infizierten Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zu den nicht infizierten (nativen) Zellen. Damit kann ein zytotoxischer Effekt durch die EGFP-Expression oder die lentivirale Infektion selbst weitgehend ausgeschlossen werden. Die mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP infizierten Zellen zeigen dagegen in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Zunahme der Absterberate unter Methotrexat. Die mit pLNT-OC-FPGS-EGFP infizierten Zellen induzieren nur in den Osteosarkomzelllinien eine signifikante Zunahme der Absterberate. In den Osteocalcin-negativen Zelllinien ist diese Zunahme nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP nicht zu beobachten (**Abb. 10**).

**a. Osteocalcin-positive Osteosarkomzelllinien**



**b. Osteocalcin-negative Zelllinien**



**Abb. 10. MTX-Sensitivität verschiedener Zelllinien nach lentiviralem *fpgs*-Gentransfer in Abhängigkeit vom verwendeten Promotorkonstrukt.** Unter **a)** sind die Osteocalcin-positiven Osteosarkomzelllinien dargestellt, unter **b)** die Osteocalcin-negativen Zelllinien HeLa und 293T. Untersucht wurden sowohl unbehandelte (native) Zellen als auch Zellen, die mit den drei verschiedenen Lentivirusüberständen infiziert wurden. Alle Zellen sind über einen Zeitraum von vier Stunden mit MTX behandelt worden. Zweiundsiebzig Stunden nach MTX-Behandlung erfolgte dann die Bestimmung der überlebenden Zellen. Die mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP infizierten Zellen zeigen in allen Zelllinien eine signifikant erhöhte Absterberate. Die mit pLNT-OC-FPGS-EGFP infizierten Zellen sterben nur in den Osteosarkomzelllinien vermehrt ab. Die Infektion mit pcDNA-CS-CGW (ohne Suizidgen) hat keine Auswirkung auf die MTX-Sensitivität der Zellen.

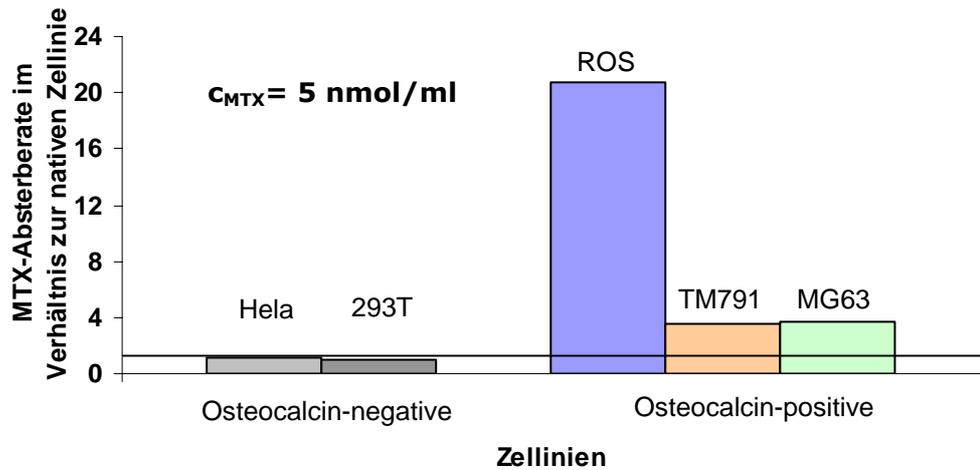
Stellen wir die MTX-induzierte Absterberate der mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP und der mit pLNT-OC-FPGS-EGFP infizierten Zellen im Verhältnis zu den jeweiligen nicht infizierten (nativen) Zellen dar (**Abb. 11**), kommen wir zu folgenden Ergebnissen:

Nach der Infektion mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP weisen alle Zelllinien eine signifikant erhöhte Absterberate unter Methotrexat-Behandlung auf. Hingegen ist die Absterberate nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP nur in den Osteosarkomzelllinien signifikant erhöht. Die Absterberate in Osteocalcin-negativen Zelllinien bleibt unverändert.

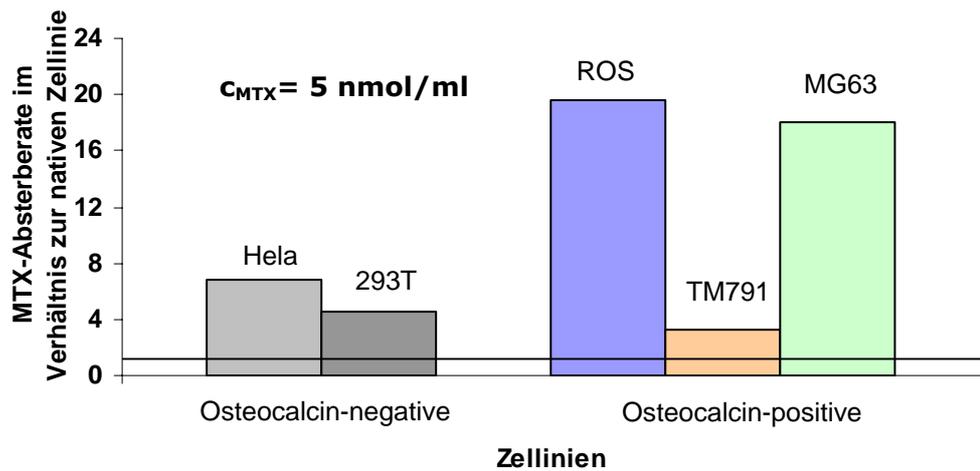
Auffällig ist, daß nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP nur in der ROS- und der TM791-Zelllinie ähnlich hohe Absterberaten erreicht werden wie nach Infektion mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP. In der MG63 Zelllinie hingegen ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Absterberaten nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP (ca. 3,5 fach erhöhte Absterberate) und Infektion mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP (ca. 20 fach erhöhte Absterberate) auszumachen.

In den TM791 Zellen wird sowohl nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP und pLNT-CMV-FPGS-EGFP jeweils nur eine ca. 3,5 fach erhöhte Absterberate erreicht, während in der MG63- und der ROS-Zelllinie hingegen ca. 20 fach erhöhte Absterberaten gemessen werden.

**a) Zellen nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS**



**b) Zellen nach Infektion mit pLNT-CMV-FPGS**



**Abb.11. Absterberate der verschiedenen infizierten Zelllinien im Verhältnis zu den nativen, also nicht infizierten Zellen nach MTX-Behandlung über 4 Std (Konzentration: 5 nmol/ml).** In **a)** ist dieses Verhältnis nach Infektion mit pLNT-OC-FPGS-EGFP dargestellt. In den Osteocalcin-negativen Zelllinien zeigt sich keine signifikant erhöhte Absterberate. In den Osteosarkomzellen ist die MTX-Sensitivität jedoch gesteigert. In **b)** ist das Verhältnis nach Infektion mit pLNT-CMV-FPGS-EGFP gezeigt. Hier erhöht sich die MTX-Sensitivität in allen infizierten Zelllinien signifikant. Die waagrechte Linie in beiden Abbildungen entspricht der relativen Absterberate der jeweiligen nicht infizierten (nativen) Zellen (=1).

## IV. Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlage für eine tumorspezifische Suizidgentherapie zur Behandlung von Osteosarkomen zu entwickeln. Dabei sollte die Expression des therapeutischen Gens, im vorliegenden Fall des *hfpgs*-Gens, über einen Osteosarkom-selektiven Promotor reguliert werden. Als aussichtsreichster Kandidat für eine solche Osteosarkom-selektive Genexpression kam der Osteocalcin-Promotor in Frage, der im menschlichen Körper ausschliesslich in knochenbildenden Zellen (physiologisch: Osteoblasten; pathologisch: Osteosarkomzellen) aktiv ist. In allen anderen, nicht knochenbildenden Körperzellen wird Osteocalcin nicht exprimiert, d.h. der Promotor ist hier wahrscheinlich nicht aktiv.

Die Zellspezifität der Osteocalcin-Expression wurde schon in früheren Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Osteosarkom-spezifische Gentherapie überprüft (Ko et al.,1996; Cheon et al.,1997; Shirakawa et al.,1998). In der Untersuchung von Ko et al. (1996) wurden Osteosarkomzellen (ROS und MG63) mit einem Adenovirus infiziert, um das Gen für Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase (*HSV-tk*-Gen) unter Expressionskontrolle des Osteocalcin-Promotors in die Tumorzellen einzubringen. Die infizierten Zellen mit *HSV-tk* zeigten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine erhöhte Absterberate unter Behandlung mit Aciclovir. Bezüglich der osteosarkomspezifischen Selektivität dieses Ansatzes konnte gezeigt werden, daß nach Infektion mit dem gleichen Adenovirus in nicht osteogenen Zelllinien weder eine vermehrte *HSV-tk*-Genexpression noch eine erhöhte Absterberate unter Aciclovir gefunden wurde. Diese Ergebnisse wurden *in vitro* als auch im Nacktmausmodell mit subcutanen Tumoren erhoben. In einer interessanten Variante des Osteosarkomtiermodells behandelten Shirakawa et al. (1998) Nacktmäuse mit Lungenmetastasen einer Osteosarkomzelllinie (ROS 17/2.8) ebenfalls erfolgreich mittels Adenovirus-vermittelter Suizidgentherapie, wobei das verwendete *HSV-tk*-Gen über den Osteocalcin-Promotor gesteuert wurde.

Diese präklinischen Versuche bildeten u.a. auch die Grundlage für die Planung erster klinischer Phase I-Studien, in denen der Osteocalcin-Promotor für eine tumorspezifische zytotoxische Gentherapie eingesetzt wurde. Im Jahr 2001 wurde

von Benjamin et al. eine klinische Phase I Studie initiiert, in der Patienten mit chemoresistenten Lungenmetastasen eines Osteosarkoms intravenös mit einem Adenovirus behandelt wurden. Auch hier wurde der Osteocalcin Promotor eingesetzt, der die Expression des adenoviralen E1a Protein steuerte. Zwei weitere klinische Phase I Studien wurden von Shirakawa et al. im Jahre 2000 und von Kubo et al. im Jahr 2003 veröffentlicht. In beiden Studien wird eine auf dem Osteocalcin-Promotor basierende zytotoxische Gentherapie an Patienten mit Knochenmetastasen eines Prostata-Karzinoms getestet.

Die Spezifität des Osteocalcin-Promotors für knochenbildende Tumore und Metastasen ist also durch eine Reihe von präklinischen und auch klinischen Studien gut belegt. Die Grundlagen für die beschriebenen Gentherapiestrategien bildete die Sequenzierung des Osteocalcin-Gens (Price et al.,1976) einschliesslich des 5' flankierenden Bereichs mit der Identifikation wichtiger regulatorischer Promotorbereiche, die dann durch detaillierte Reporteranalysen zur weiteren Charakterisierung des eigentlichen Osteocalcin-Promotors führten (Morrison et al.,1989; Lian et al.,1989). Der für eine spezifische Expression in knochenbildenden Zellen essentielle Promotorbereich konnte von Lian et al. (1996) mittels verschiedener Deletionen auf einen Bereich von 108 Basenpaaren eingegrenzt werden. Die optimale spezifische Promotoraktivität fand sich allerdings bei Verwendung eines definierten 5'-flankierenden Fragmentes von 531 Basenpaaren. Das in der vorliegenden Arbeit klonierte Osteocalcin-Promotorfragment basiert auf dieser Untersuchung von Lian et al. (1996). Es reicht von Position - 531 bis +56 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Osteocalcin-Gens.

Für die vorliegende Arbeit wurde initial zunächst versucht, mit *egfp* als Reporter gen die Spezifität des von uns klonierten Osteocalcin-Promotorfragmentes zu testen. Dieses bot sich an, da die EGFP-Expression einfach und zuverlässig per FACS-Analyse quantifizierbar ist. Weiterhin läßt sich das Genprodukt direkt in lebenden Zellen nachweisen, und zwar ohne daß ein Substrat zugegeben werden muß oder die Zellen lysiert werden müssen, wie dies beispielsweise beim Luciferase-Assay erforderlich ist. Trotz dieser augenscheinlichen Vorteile ist das *egfp*-System bisher jedoch als Reporter gen keineswegs etabliert. Es gibt nur wenige

Vorstudien, in denen *egfp* direkt in Promotorstudien getestet wurde (Lissemore et al., 2000; Zhang et al., 1998; Steffens et al. 2004b).

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst Vektoren kloniert, die *egfp* unter Expressionskontrolle des Osteocalcin-Promotors und des CMV-Promotors enthielten. Es zeigte sich in den nachfolgenden Versuchen dann aber, daß die transiente Transfektionseffizienzen der untersuchten Osteosarkomzelllinien (ROS 17/2.8, MG63, TM791, SAOS2 und HOS) zu gering waren, um mittels FACS-Messung der *egfp*-Expression signifikante Unterschiede zwischen den Promotoren nachweisen zu können. So war der CMV-Promotor in den transfizierten Zellen nur schwach aktiv, und beim OC-Promotor konnte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (*egfp*-Gen ohne vorgeschalteten Promotor, pEGFP-1) kaum eine Aktivitätszunahme ausgemacht werden (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

Aufgrund dieser nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der *egfp*-Promotorstudien wurde dann doch zum Luziferase-System als Reporter gen gewechselt. Dazu wurde der Osteocalcin-Promotor in einen Luciferase-Expressionsvektor (pGL3basic) kloniert. Bei dem Luciferase-Reportersystem wird die Genexpression indirekt über eine enzymatisch vermittelte Lichtreaktion gemessen (Gould et al., 1988; Vieites et al. 1994) Diese Nachweismethode ist durchaus sensibler als die Messung der *egfp*-Expression (Steffens et al. 2004), bei der das Protein selbst direkt über seine Eigenfluoreszenz detektiert werden muß, während die Enzymwirkung der Luziferase einen potenzierenden Effekt bedingen kann.

In den initialen Luziferase-Assays wurde jedoch deutlich, dass das zunächst verwandte Osteocalcinpromotorfragment vor allem in den ROS-Zellen nur eine relativ schwache Aktivität zeigte, obwohl insgesamt im Gegensatz zu den oben beschriebenen EGFP-FACS-Messungen bei den Luziferase-Assays eine deutliche Aktivitätszunahme des Osteocalcin-Promotors im Vergleich zur Negativkontrolle zu verzeichnen war. Das in diesen initialen Versuchen verwendete Osteocalcin-Promotorfragment war aus der humanen Cervixkarzinomzelllinie HeLa kloniert worden. Obwohl HeLa Osteocalcin-negativ ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ursprünglich davon ausgegangen, dass die Osteocalcin-Promotor-DNA in allen

humanen Zellen intakt sein sollte und dass die Entscheidung, ob Osteocalcin exprimiert wird oder nicht, vielmehr auf Transkriptionsebene stattfindet.

Allerdings zeigte die Sequenz aller aus HeLa klonierten Osteocalcin-Promotorfragmente im Vergleich zur veröffentlichten Gensequenz konstant einen Basenaustausch in Position 85 (relativ zum Transkriptionsstartpunkt). Dieser Basenaustausch ist genau in der Region lokalisiert, die von Lian et al. (1996) als OC-BoxI bezeichnet worden war und sich zwischen Position -76 bis -99 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Osteocalcingenes befindet. Die OC-BoxI scheint essentiell für die gewebespezifische Osteocalcin-Expression zu sein. Ein für das Knochengewebe spezifischer Transkriptionsfaktor (OC-Box-Binding-Protein) bindet sich hier an die Promotor-Region und induziert die Osteocalcin-Expression (Hoffmann et al., 2000). Mutationen im Bereich der OC-BoxI führen zu einer Abnahme der Promotoraktivität (Lian et al., 1996). Aufgrund dieser Vorarbeiten schien es durchaus naheliegend, dass die oben beschriebene Sequenzabweichung der aus HeLa klonierten Osteocalcin-Promotorfragmente für die relativ schwache Luziferase-Aktivität in der ROS-Zelllinie verantwortlich war. Alternativ könnte natürlich die gefundene Abweichung der Promotorsequenz durchaus auch bedeutungslos für die Promotoraktivität sein. Dann würde die schwache Promotoraktivität ein allgemeineres Phänomen darstellen, das die Intention der vorliegenden Arbeit, eine osteosarkomselektive Gentherapiestrategie zu entwickeln, erheblich erschweren würde.

Um dieses Problem zu klären, wurde das Osteocalcin-Promotorfragment zusätzlich aus einer Osteocalcin-positiven Zelllinie, der humanen Osteosarkomzelllinie MG63, kloniert. Interessanterweise entsprach die Sequenz aller aus MG63-resultierender Osteocalcin-Promotorfragmente der Original-Sequenz aus der Datenbank. Insbesondere lag keine Sequenzabweichung im Bereich der OC-BoxI vor. In den darauffolgenden Luziferase-Assays war mit dem OC<sub>MG63</sub>-Promotor in den ROS-Zellen eine in etwa zweifache Aktivitätszunahme im Vergleich zum OC<sub>HeLa</sub>-Promotor zu verzeichnen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass wahrscheinlich die minimale Sequenzabweichung in der kritischen OC-BoxI an Basenposition 85 für die deutliche Aktivitätsminderung des OC<sub>HeLa</sub> in ROS-Zellen verantwortlich ist. Ob es sich hierbei tatsächlich um eine Punktmutation

handelt, sei dahingestellt, da mit dieser Sequenzabweichung kein eigentlicher Krankheitswert assoziiert ist. Wahrscheinlicher ist eher, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt. Dafür könnte auch sprechen, dass z.B. eine Aktivitätsminderung von OC<sub>HeLa</sub>-Promotor im Vergleich zu OC<sub>MG63</sub>-Promotor in TM791-Osteosarkomzellen nicht zu beobachten war. Auf jeden Fall entschlossen wir uns aber nach den Ergebnissen des Luziferaseassays für die folgenden Versuche nur noch den OC<sub>MG63</sub>-Promotor zu verwenden, um eine möglichst hohe Promotoraktivität für unseren Suizidtherapieansatz zu gewährleisten.

Dem gleichen Zweck diene auch die Bestrebung, die Aktivität des Osteocalcin-Promotors durch Applikation von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> zu steigern. Grundlage hierfür war die Beobachtung, dass die Aktivität des Osteocalcin-Promotors durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D hochreguliert werden kann (Lian et al., 1989; Morrison et al., 1989; Arbour et al., 1995). Verantwortlich hierfür ist das sogenannte vitamine D<sub>3</sub>-responsive element (VDRE), welches in Position -513 bis -493 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Osteocalcin-Gens lokalisiert ist (Morrison et al., 1989). Interessant ist dabei in diesem Zusammenhang, daß auch eine Hemmung des Osteocalcin-Promotors nach 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Gabe in der murinen MC3T3-Osteoblastenlinie beobachtet worden war.

Unsere eigenen Luziferase-Reporter-Gen-Assays in den verschiedenen Osteocalcin-positiven Osteosarkomzelllinien bestätigten allerdings die Hochregulierung des Osteocalcin-Promotors durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>. Nach Applikation des Vitamin D-Derivats kam es nämlich zu einer mehr als dreifachen Aktivitätssteigerung des OC<sub>MG63</sub>-Promotors in ROS-Zellen. Neben der ROS-Zelllinie (Ratten-Osteosarkom) wurden auch noch andere humane Osteosarkomzelllinien (TM791, MG63, SAOS2 und HOS) untersucht. Leider bestand bei ihnen allen das Problem einer zu geringen Transfektionseffizienz. Die gemessenen Luciferaseaktivitäten waren daher meistens insgesamt zu schwach, um signifikante Ergebnisse ableiten zu können. Lediglich bei der TM791-Zelllinie war eine Auswertung möglich, die zwar nicht in gleichem Ausmaße wie in ROS-Zellen, aber doch zumindestens tendenziell das Induktionspotential von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> für den Osteocalcin-Promotor erkennen liess. Wichtig für den eventuellen Einsatz von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> im Rahmen einer auf dem Osteocalcin-Promotor basieren-

den Gentherapiestrategie ist sicherlich auch die Beobachtung, dass es in Osteocalcin-negativen Zellen durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> zu keiner signifikanten Erhöhung der „background“-Aktivität des Osteocalcin-Promotors kam. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> kann also durchaus zur selektiven Aktivitätssteigerung des Osteocalcin-Promotors in Osteosarkomzellen verwendet werden.

Da in den Reporter-gen-Assays die Transfektionseffizienz einen stark limitierenden Faktor darstellte, wurde nach effektiveren Transduktionsverfahren und Vektorsystemen gesucht. Da eine stabile Transgenexpression über mehrere Tage für alle geplanten Zytotoxizitätsassays absolut erforderlich war, bot sich eigentlich nur ein virales Vektorsystem mit der Fähigkeit zur stabilen Integration des Transgens ins Zielzellgenom an. Vorversuche mit transfizierten und anschließend stabil selektionierten Zellen gestalteten sich äusserst schwierig, da die Vergleichbarkeit der Osteocalcin-Promotoraktivität zwischen Osteocalcin-positiven und -negativen Zelllinien nur durch Abgleich mit einem „unspezifischen“ Promotor gewährleistet schien. Bei einer sehr geringen Ausgangstransfektionsrate von  $\leq 1-2\%$  der Zellen konnten nach Antibiotikaselektion stabiler Zelllinien keine zuverlässigen und reproduzierbaren Daten erhoben werden. Am ehesten ist dies dadurch zu erklären, dass wahrscheinlich durch die initial geringe Anzahl positiver Zellen keine repräsentativen Klone, sondern Klone mit sehr unterschiedlicher Transgenexpression selektioniert wurden. Genausowenig erfolgsversprechend erschien der Einsatz von retroviralen Vektoren, die sich bei einer ähnlichen Fragestellung in Neuroblastomzellen als ungeeignet erwiesen hatten, da die Transduktionseffizienz der retroviralen Vektoren ebenfalls zu niedrig lag (Steffens et al, 2004b). Außerdem hatten sie sich in der klinischen Suizdgentherapie nicht bewährt (Rainov,2000).

So kamen eigentlich nur lentivirale Vektorsysteme in Frage. Diese versprachen eine deutlich höhere Transduktionseffizienz als Retrovirusvektoren, da man sie in deutlich höheren Titern einsetzen konnte. Zudem bedingen sie auch einen stabilen Gentransfer mit Integration des Transgens in das Zielzellgenom. Unsere Vorstellung war, durch einen standardisierten Infektionsvorgang mit gleichen Titern aller verwendeten Lentiviruspräparationen in allen zu untersuchenden Zelllinien

eine ausreichende hohe Transduktionseffizienz zu erreichen, die die zuverlässige und reproduzierbare Durchführung der geplanten Zytotoxizitätsassays erlaubte.

Zum Monitoring des Gentransfers und damit der Transduktionseffizienz wurde in der vorliegenden Arbeit ein einfaches *in vitro*-Untersuchungsmodell entwickelt, mit der die Transgenexpression nach lentiviraler Transduktion visualisiert werden kann. Hierfür wurde das Reporter-gen *egfp* (Chalife et al. 1994, Zhang et al. 1996) über das Transkriptionselement „internal ribosomal entry site“ (*IRES*; Jang et al., 1989, 1990; Gurtu et al, 1996) mit dem Suizidgen *hfpgs* gekoppelt. Durch diese *IRES*-Kopplung werden sowohl *egfp* als auch *hfpgs* unter Kontrolle des gleichen vorgeschalteten Promotors exprimiert. Im Gegensatz zu einem Fusionsgen werden beide Gene aber als zwei verschiedene mRNA transkribiert, so dass letztendlich nicht ein einzelnes Fusionsprotein, sondern die zwei eigenständigen Ursprungsproteine translatiert werden. Der *IRES*-Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit der Fusionsgen-Variante deswegen vorgezogen, weil bei der Generierung eines Fusionsgens zuweilen Eigenschaften der einzelnen Komponenten des Genproduktes verlorengehen können und sich auch deren intrazelluläre Lokalisation verändern kann. Der Nachteil einer *IRES*-Transkriptionseinheit besteht vor allem darin, dass die Expressionsstärke des Genes, das downstream des *IRES*-Elementes lokalisiert ist, im Vergleich zum „upstream“-Gen deutlich reduziert sein kann (Gurtu et al, 1996). Durch die Verwendung des weiterentwickelten „*IRES2*“-Elementes ist die Expression des „downstream“-Genes zwar verbessert worden (Jang et al., 1989, 1990; Gurtu et al, 1996), aber bei einem Vektorsystem mit insgesamt schwacher Expression kann der Nachweis des „downstream“-Genes immer noch erheblich erschwert sein. Da durch die Verwendung von lentiviralen Vektoren insgesamt eine starke Genexpression erwartet wurde, sahen wir die Verwendung des „*IRES2*“-Elementes mit *hfpgs* „upstream“ und *egfp* „downstream“ als nicht problematisch und limitierend an. In der Tat wurde in allen Versuchen mit diesem Ansatz eine gut nachweisbare Expression des Reportergens *egfp* erreicht. Über die EGFP-Expression wurde nicht nur die Gentransfereffizienz in den jeweiligen Zielzellen bestimmt, sondern auch vorab in ausgewählten Zelllinien eine Virustiterbestimmung durchgeführt.

Die Infektion der verschiedenen Zelllinien mit Lentivirusüberständen gleichen Titers führte zu erfreulich hohen Transduktionsraten. In allen Zelllinien hatte nach einfacher lentiviraler Infektion in über 85% der Zellen ein Gentransfer stattgefunden. Da es sich hierbei um einen stabilen Gentransfer handelt, zeigten die infizierten Zellen auch nach mehreren Wochen eine gleichbleibend starke EGFP-Expression. Nun war es möglich, zuverlässig in MTX-Zytotoxizitätsassays die spezifische Aktivität des Osteocalcin-Promotors in den verschiedenen Osteocalcin-positiven und -negativen Zelllinien zu bestimmen und mit der Aktivität des „unspezifischen“ CMV-Promotors zu vergleichen. Hierbei zeigte sich, dass mit dem unspezifischen CMV-Promotor in allen Zelllinien unabhängig vom Osteocalcin-Status eine erhöhte MTX-Sensitivität zu beobachten war. Mit dem Osteocalcin-Promotor zur Expressionskontrolle von *hfpgs* wurde dagegen eine erhöhte MTX-Sensitivität nur in den Osteocalcin-positiven Osteosarkomzelllinien deutlich. Die MTX-Wirkung erschien in allen *hfpgs*-exprimierenden Zellen schon ab einer Konzentration von ca. 0,5 nmol/ml Medium deutlich erhöht; 0,5 nmol/ml entspricht dabei einer Konzentration von 0,5 µmol/l, der Einheit, in der üblicherweise MTX-Serumspiegel bei Patienten wiedergegeben werden. Zum Vergleich: Bei einer Hochdosis-MTX-Therapie von Osteosarkompatienten werden üblicherweise MTX-Serumspiegel von maximal über 1000 µmol/l mit entsprechendem Toxizitätsrisiko erreicht, die im Zeitraum von ca. 4-7 Tagen auf Spiegel unter 0,05 µmol/l abfallen. Die selektive Wirkung des *hfpgs*-Suizidtherapiesystems in den Osteosarkomzellen könnte also nach den hier vorgestellten Ergebnissen über diesen Zeitraum zu einer deutlich verstärkten Anti-Tumor-Wirkung des Methotrexats in transduzierten Zellen führen.

Für zukünftige Untersuchungen sehr interessant wäre es, das *hfpgs*/MTX-System mit anderen Suizidgenen zu kombinieren. Dafür käme zum einen andere potentielle Suizidgenkandidaten zur weiteren Verstärkung der MTX-Wirkung, zum anderen aber auch bereits etablierte Suizidgensysteme im Sinne einer „Polygentherapie“ in Frage.

Ein Beispiel für die erste Variante könnte das Gen für den Folat-Carrier darstellen, der den aktiven Transport von MTX in die Tumorzelle bedingt. Durch eine Überexpression in Osteosarkomzellen würde vermehrt MTX in die Zellen aufge-

nommen, und es könnte in Kombination mit dem *hfpgs*-Transfer zu einer noch deutlicheren Wirkungsverstärkung kommen. Die Wirksamkeit des murinen Folat-Carriers als potentielles Suizidgen wurde bereits in hämatopoetischen Zellen vorbeschrieben (Liu et al., 2002).

Ein Beispiel für die 2. Variante könnte z.B. die Kombination des *hfpgs*-Systems mit dem *HSV-tk*-System darstellen. Auch hier gibt es bereits eine Untersuchung, die eine Kombination beider System als sehr aussichtsreich erscheinen lässt (Cheon et al., 1997). In dieser Studie wurde im Osteosarkomtiermodell eine konventionelle Methotrexatchemotherapie mit der *HSV-tk*-Suizidgentherapie kombiniert, und es zeigte sich in der Tat ein signifikanter synergistischer Therapieeffekt für diesen Kombinationsansatz. Zukünftige Versuche werden die Kombination des *hfpgs*/MTX-Systems mit anderen Enzymgensystemen aus dem MTX-Stoffwechsel, aber auch die Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Suizidgensystemen im Detail überprüfen.

Eine wichtiger Diskussionspunkt ist sicherlich auch die Wahl des Gentransfersystems. In der vorliegenden Arbeit wurden selbstinaktivierende Lentivirusvektoren verwendet. Diese zeigten sich gegenüber nichtviralen Gentransfertechniken und auch gegenüber oncoretroviralen Vektoren in Bezug auf ihre Gentransfereffizienz bei weitem überlegen. Die vorliegende Untersuchung stellt dabei die erste ihrer Art dar, in der lentivirale Vektoren für den Gentransfer in Osteosarkomzellen verwendet wurden. Auch für Osteoblasten als physiologische knochenbildende Zellen ergab die Literaturrecherche keine Voruntersuchungen, in denen lentivirale Vektoren beim Gentransfer zum Einsatz kamen. Allerdings gibt es aber schon mehrere präklinische Untersuchungen, in denen Lentiviren erfolgreich zur Gentherapie von Prostatakarzinomen verwendet wurden (Loimas et al. 2001; Yu et al. 2001, 2004; Zheng et al. 2003; Bastide et al. 2003).

Prostatakarzinome können Osteocalcin-positive Knochenmetastasen streuen. Die lentiviralen Studien verwendeten allerdings nicht den Osteocalcin-Promotor, sondern den Promotor für das prostata-spezifische Antigen (PSA), um eine tumorspezifische Genexpression zu erreichen.

Alternativ zu den lentiviralen Vektoren bieten sich eigentlich zur Zeit nur adenovirale Vektoren (ADV; Hemminki et al., 2003; Kubo et al., 2003; Matsubara et al., 2001) und adenoassoziierte virale Vektoren (AAV; Gafni et al., 2004) an, um eine tumorselektive Gentherapie mit Hilfe des Osteocalcin-Promotors zu entwickeln. Der Hauptvorteil beider Vektorsysteme besteht sicherlich darin, dass sie bereits klinisch erprobt sind und damit viel leichter in zukünftige klinische Protokolle integriert werden können als lentivirale Vektoren, die bisher noch nicht in klinischen Versuchen zum Einsatz kamen. Trotz der multiplen genetischen Sicherheitsvorkehrungen bei der Lentivirusgenerierung ist aufgrund der Abstammung vom HIV-Genom die Barriere zum klinischen Einsatz dieses potenten Vektorsystems bisher unüberwindlich. Erste Protokolle befinden sich allerdings zur Zeit in der Explorationsphase für die Anmeldung zum klinischen Einsatz.

Vor allem Adenoviren sind in der Tumorgentherapie beliebte Vektorsysteme und damit starke „Konkurrenten“ für Lentiviren, da sie für den Einsatz in der Tumorthherapie eine relativ starke initiale Genexpression versprechen. Die Stärke der Genexpression fällt allerdings dann sehr stark in den ersten Tagen ab, da es sich beim adenoviralen Gentransfer in der Regel um einen transienten Vorgang handelt mit nachfolgender rascher intrazellulärer Transgendegradation. Weiterhin können adenovirale Vektoren auch eine starke Immunreaktion auslösen, was in der Vergangenheit zum Tod eines Patienten mit Stoffwechselerkrankung durch adenoviral-induziertes Leberversagen nach intrahepatischer Vektorapplikation geführt hatte (Carmen, 2001). Ausserdem kann die Immunreaktion gegen adenoviral transduzierte Zellen die Effektivität einer nachfolgenden Suizidgentherapie erheblich abschwächen. Neue, weniger immunogene und z.T. auch selektiv in Tumorzellen replizierende Adenovirusvektoren („Onkolytische Vektoren“; Hemminki et al., 2003) haben die Einsatzmöglichkeiten von Adenovirusvektoren sicherlich erhöht, obwohl in den bisherigen klinischen Suizidgentherapiestudien Adenovirusvektoren ähnlich wie Retrovirusvektoren ebenfalls keinen therapeutischen Durchbruch erzielen konnten (Zeimet et al., 2003; Rainov et al., 2003).

Ein weiterer potentieller Lentivirus-Konkurrent, die AAV Vektoren, besitzen z. T. ein eingeschränktes Wirtszellspektrum, können aber offensichtlich knochenbildende Zellen infizieren (Gafni et al., 2004). Inwieweit diese Vektoren, die auf-

grund ihrer eigenen relativ geringen Grösse eine eingeschränkte Aufnahme- und damit auch Transferkapazität für genetisches Fremdmaterial besitzen, Bedeutung für die Tumorbehandlung erlangen können, ist fraglich. Die generierbaren Titer und damit die Gentransfereffizienz erscheinen im Vergleich zu den lentiviralen Vektoren limitiert.

Lentivirusvektoren sind somit im direkten Vergleich mit den „Konkurrenten“ sicherlich attraktive Gentransfersysteme, die ein grosses Potenzial für den klinischen Einsatz versprechen. Neben den Sicherheitsbedenken im Zusammenhang mit der HIV-Abstammung müssen in Zukunft allerdings auch Vorbehalte hinsichtlich einer etwaigen malignen Transformation von Normalzellen ausgeräumt werden, wie sie nach dem klinischen Einsatz von oncoretroviralen Vektoren in Kindern mit angeborenem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) beobachtet wurde. Zwei Kinder hatten höchstwahrscheinlich aufgrund des retroviralen Gentransfers eine T-Zell-Leukämie entwickelt. Zwar ist nach einer weltweiten konzentrierten Forschungsbemühung die maligne Transformation nicht allein auf den Gentransfer, sondern vor allem auch auf das transferierte Transgen zurückgeführt worden (Berns et al., 2004), doch sind die allgemeinen Sicherheitsvorbehalte gegen Vektorsysteme wie Oncoretroviren und Lentiviren, die ihr Genom in das Wirtszellgenom ungerichtet integrieren, sicherlich deutlich gewachsen.

Eine Tumor-spezifische Transduktion könnte dabei nicht nur das Toxizitätsrisiko, sondern auch das Transformationsrisiko für normale Körperzellen wahrscheinlich deutlich vermindern. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der lentiviralen Transduktionsselektivität könnte dabei durch eine tumor-selektive Pseudotypisierung erreicht werden. Für Lentivirusvektoren ist der als Pseudotypisierung bezeichnete Austausch des lentiviralen Envelope-Proteins (ENV) durch ein anderes virales ENV möglich. So wurde das initial weitgehend auf CD4-positive hämatopoetische Zellen beschränkte Wirtsspektrum von Lentivirusvektoren deutlich erweitert. Durch Verwendung eines ENV's, das für Osteosarkomzellen eine besonders hohe Affinität aufweist, wäre es durchaus vorstellbar, eine gewisse Transduktionsselektivität für diese Tumorzellen im Vergleich zu anderen Zellen zu erreichen. Ähnliches ist schon für andere Zell- und Tumortypen, u.a. auch für verschiedene Hirntumore (Steffens et al., 2004a) vorbeschrieben.

---

Neben allen *in vitro*-Untersuchungen, die die Wirkungsoptimierung des *hfggs*-Systems durch Kombination mit anderen Enzymgenen des MTX-Stoffwechsels oder auch durch Kombination mit etablierten Suizidgensystemen sowie die Weiterentwicklung des lentiviralen Gentransfersystems zur Aufgabe haben werden, muss sicherlich auch der Schritt hin zu *in vivo*-Versuchen im Osteosarkomtiermodell erfolgen. Nur so lassen sich präklinische Studien vervollständigen. Neben dem Nacktmausmodell mit subcutan implantierten Osteosarkomen (Cheon et al., 1997) käme hierfür auch das bereits oben angesprochene Lungenmetastasenmodell (Shirakawa et al., 1998) zur Überprüfung der Therapieeffizienz des hier vorgestellten Suizidgentherapie-Ansatzes und des lentiviralen Gentransfers in Frage.

## V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für eine Osteosarkom-spezifische Suizidgentherapie zu entwickeln. Dabei wurde nicht auf einen Vertreter der „klassischen“ Suizidgentherapie zurückgegriffen, da die Wirkung eines Enzymgens, welches in transduzierten Tumorzellen eine inaktive Substanzvorstufe („prodrug“) in einen toxischen Metaboliten umwandelt, sich in der Klinik aufgrund einer unbefriedigenden Gentransferrate leider nicht bewährt hat. In der vorliegenden Arbeit wurde vielmehr das humane Folypolyglutamatsynthetase-Gen (*hfpgs*)-System gewählt. Durch dieses Enzymgen wird keine inerte Substanz aktiviert, sondern es wird das an sich schon sehr toxische Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX) in seiner Wirkung deutlich verstärkt. Hierdurch hängt der gesamte Therapieerfolg nicht von der Suizidgentherapie als alleinigem Wirkungsprinzip ab, sondern die Suizidgentherapie wird adjuvant zu einem etablierten Therapieverfahren angewandt. Als Vektorsystem wurden in der vorliegenden Arbeit lentivirale Vektoren verwendet, da diese unter den zur Zeit verfügbaren Gentransfersystemen die beste Transduktionseffizienz versprochen. Um die Toxizität des lentiviralen Suizidgentransfers weitgehend auf Osteosarkomzellen zu beschränken, wurde zur Suizidgenexpression der osteosarkomspezifische Osteocalcin-Promotor verwendet. Die Osteosarkom-Spezifität des neu klonierten Osteocalcin-Promotorfragmentes wurde vorab mittels Luciferase (Luc)-Reporter-Gen-Assays bestätigt. Für die eigentlichen Suizidgenexpressionsstudien wurde das Reporter-Gen *egfp* über eine *ires2*-Site an das Suizidgen *hfpgs* gekoppelt, um die Suizidgenexpression und die Promotorspezifität kontinuierlich monitoren zu können. Die gesamte *hfpgs-ires2-egfp*-Transkriptionskassette wurde dann in ein lentivirales Vektorsystem kloniert. Mit den generierten lentiviralen Überständen zeigte sich beim Osteocalcin-Promotor sowohl in der *egfp*-Expression als auch in der MTX-Sensitivität ein deutlicher Unterschied zwischen Osteosarkomzellen und nicht osteogenen Zellen. Die Osteosarkom-Spezifität des Osteocalcinpromotors liess sich dabei noch einmal durch Zusatz von Vitamin D<sub>3</sub> signifikant erhöhen. Die hier vorgestellte Suizidgentherapiestrategie mit einem lentiviralen Vektor und einer Expressionskassette, bestehend aus Osteocalcin-Promotor und *hfpgs*-Gen, stellt insgesamt einen vielversprechenden Ansatz zur Wirkungsverstärkung einer konventionellen Methotrexat-Chemotherapie dar. Zukünftige präklinische Versuche werden dieses System in einem einfachen und einem disseminierten Osteosarkomtiermodell testen.

## VI. Literaturverzeichnis

- Aghi, M., C. M. Kramm, et al. (1999). "Folypolyglutamyl synthetase gene transfer and glioma antifolate sensitivity in culture and in vivo." J Natl Cancer Inst **91**(14): 1233-41.
- Arbour, N. C., H. M. Darwish, et al. (1995). "Transcriptional control of the osteocalcin gene by 1,25-dihydroxyvitamin D-2 and its 24-epimer in rat osteosarcoma cells." Biochim Biophys Acta **1263**(2): 147-53.
- Ausubel, F. M. (1992). Current Protocols in Molecular Biology. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Bastide, C., N. Maroc, et al. (2003). "Expression of a model gene in prostate cancer cells lentivirally transduced in vitro and in vivo." Prostate Cancer Prostatic Dis **6**(3): 228-34.
- Berns, A. (2004). "Good news for gene therapy." N Engl J Med **350**(16): 1679-80.
- Bielack S, Flege S, Kempf-Bielack B (2000). "Behandlungskonzept des Osteosarkoms." Onkologe **6**: 747-759.
- Bukrinsky, M., N. Sharova, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 2-LTR circles reside in a nucleoprotein complex which is different from the pre-integration complex." J Virol **67**(11): 6863-5.
- Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." Nature **365**(6447): 666-9.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1993). "Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6125-9.
- Carmen, I. H. (2001). "A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath." Mol Ther **3**(4): 425-8.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.
- Charneau, P., G. Mirambeau, et al. (1994). "HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome." J Mol Biol **241**(5): 651-62.

- Cheon, J., S. C. Ko, et al. (1997). "Chemogene therapy: osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model." Cancer Gene Ther **4**(6): 359-65.
- Coffin, J. M., H. H. Stephen, H. E. Varmus "Retroviruses", 1997.
- Culver, K. W., Z. Ram, et al. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors." Science **256**(5063): 1550-2.
- Deutsches Kinderkrebsregister am IMBEI, 55101 Mainz „Jahresbericht 2003“.
- Dull, T., R. Zufferey, et al. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." J Virol **72**(11): 8463-71.
- Ezzeddine, Z. D., R. L. Martuza, et al. (1991). "Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene." New Biol **3**(6): 608-14.
- Gafni, Y., G. Pelled, et al. (2004). "Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2-based gene expression system." Mol Ther **9**(4): 587-95.
- Gallay, P., T. Hope, et al. (1997). "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9825-30.
- Gould, S. J. and S. Subramani (1988). "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology." Anal Biochem **175**(1): 5-13.
- Gurtu, V., G. Yan, et al. (1996). "IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines." Biochem Biophys Res Commun **229**(1): 295-8.
- Hemminki, A., M. Wang, et al. (2003). "Production of an EGFR targeting molecule from a conditionally replicating adenovirus impairs its oncolytic potential." Cancer Gene Ther **10**(8): 583-8.
- Hoffmann, H., J. Green, et al. (2000). "Expression screening of factors binding to the osteocalcin bone-specific promoter element OC box I: isolation of a novel osteoblast differentiation-specific factor." J Cell Biochem **80**(1): 156-68.
- Jang, S. K., M. V. Davies, et al. (1989). "Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo." J Virol **63**(4): 1651-60.

- Jang, S. K., T. V. Pestova, et al. (1990). "Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site." Enzyme **44**(1-4): 292-309.
- Kafri, T., U. Blomer, et al. (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors." Nat Genet **17**(3): 314-7.
- Ko, S. C., J. Cheon, et al. (1996). "Osteocalcin promoter-based toxic gene therapy for the treatment of osteosarcoma in experimental models." Cancer Res **56**(20): 4614-9.
- Koeneman, K. S., C. Kao, et al. (2000). "Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis." World J Urol **18**(2): 102-10.
- Kubo, H., T. A. Gardner, et al. (2003). "Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer." Hum Gene Ther **14**(3): 227-41.
- Lian, J., C. Stewart, et al. (1989). "Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1143-7.
- Lian, J. B., G. S. Stein, et al. (1989). "Osteocalcin: characterization and regulated expression of the rat gene." Connect Tissue Res **21**(1-4): 61-8; discussion 69.
- Lian, J. B., G. S. Stein, et al. (1996). "The osteocalcin gene promoter provides a molecular blueprint for regulatory mechanisms controlling bone tissue formation: role of transcription factors involved in development." Connect Tissue Res **35**(1-4): 15-21.
- Lian, J. B., V. Shalhoub, et al. (1997). "Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression." Endocrinology **138**(5): 2117-27.
- Lissemore, J. L., J. T. Jankowski, et al. (2000). "Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in E. coli." Biotechniques **28**(1): 82-9.
- Liu, S., L. Song, et al. (2002). "The murine-reduced folate carrier gene can act as a selectable marker and a suicide gene in hematopoietic cells in vivo." Hum Gene Ther **13**(14): 1777-82.
- Loimas, S., M. R. Toppinen, et al. (2001). "Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy." Cancer Gene Ther **8**(2): 137-44.

- Matsubara, S., Y. Wada, et al. (2001). "A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis." Cancer Res **61**(16): 6012-9.
- Mochizuki, H., J. P. Schwartz, et al. (1998). "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." J Virol **72**(11): 8873-83.
- Morrison, N. A., J. Shine, et al. (1989). "1,25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene." Science **246**(4934): 1158-61.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
- Pollack, A., Ciancio, G. (1990) Zell-zyklus-Phasen-spezifische Analyse der Lebensfähigkeit von Zellen. Methods Cell Biol. **33**, 19-24
- Price, P.A., J.W. Poser et al. (1976). "The sequence of osteocalcin" Proc Natl Acad Sci **73**: 3374-5.
- Rainov, N. G., C. M. Kramm, et al. (1996). "Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm." Cancer Gene Ther **3**(2): 99-106.
- Rainov, N. G., C. M. Kramm, et al. (2000). "Immune response induced by retrovirus-mediated HSV-tk/GCV pharmacogene therapy in patients with glioblastoma multiforme." Gene Ther **7**(21): 1853-8.
- Rainov, N. G. and H. Ren (2003). "Gene therapy for human malignant brain tumors." Cancer J **9**(3): 180-8.
- Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1993a). "Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors." J Neurosurg **79**(3): 400-7.
- Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1993b). "In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats." Cancer Res **53**(1): 83-8.
- Ram, Z., K. Culver, et al. (1995). "Summary of results and conclusions of the gene therapy of malignant brain tumors: Clinical study." J Neurosurg **82**: 343 A.
- Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1997). "Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells." Nat Med **3**(12): 1354-61.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Schulz, A., B. Loreth, et al. (1998). "[Bone matrix production in osteosarcoma]." Verh Dtsch Ges Pathol **82**: 144-53.
- Shirakawa, T., S. C. Ko, et al. (1998). "In vivo suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis with intravenous osteocalcin promoter-based toxic gene therapy." Cancer Gene Ther **5**(5): 274-80.
- Srinivasakumar, N. (2001). "HIV-1 vector systems." Somat Cell Mol Genet **26**(1-6): 51-81.
- Steffens, S., J. Tebbets et al. (2004a). „Transduction of human glial neuronal tumor cells with different lentivirus vector pseudotypes“ J Neurooncol **70**(3):281-8.
- Steffens, S., A. Sandquist, et al. (2004b). "A neuroblastoma-selective suicide gene therapy approach using the tyrosine hydroxylase promoter." Pediatr Res **56**(2): 268-77.
- Takahashi, M., H. Miyoshi, et al. (1999). "Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer." J Virol **73**(9): 7812-6.
- Trono, D. (2000). "Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent." Gene Ther **7**(1): 20-3.
- Vieites, J. M., F. Navarro-Garcia, et al. (1994). "Expression and in vivo determination of firefly luciferase as gene reporter in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **10**(10): 1321-7.
- Yu, D., D. Chen, et al. (2001). "Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors." Cancer Gene Ther **8**(9): 628-35.
- Yu, D., W. W. Jia, et al. (2004). "Prostate-tumor targeting of gene expression by lentiviral vectors containing elements of the probasin promoter." Prostate **59**(4): 370-82.
- Zeimet, A. G. and C. Marth (2003). "Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer?" Lancet Oncol **4**(7): 415-22.
- Zhang, Q., T. R. Tiersch, et al. (1998). "Inducible expression of green fluorescent protein within channel catfish cells by a cecropin gene promoter." Gene **216**(1): 207-13.

Zheng, J. Y., D. Chen, et al. (2003). "Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A." Cancer Gene Ther **10**(10): 764-70.

Zufferey, R., D. Nagy, et al. (1997). „Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.“ Nat Biotechnol **15**(9): 871-5.

Zufferey, R., T. Dull, et al. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-80.

Zufferey, R., J. E. Donello, et al. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol **73**(4): 2886-92.

## Danksagung

Mein vordringlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Christof Kramm für das interessante Thema, seine intensive Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, durch die zahlreiche kreative Ideen entstanden und umgesetzt werden konnten.

Herrn Prof. Dr. U. Göbel danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie des Zentrums für Kinderheilkunde der Universitätsklinik Düsseldorf. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Göbel für seine Bemühungen zur finanziellen Förderung des Projektes danken, hier sei vor allem die „Elterninitiative Kinderkrebsklinik Düsseldorf e.v.“ für ihre großzügigige finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten hervorgehoben.

Herzlichen Dank an PD Dr. Orthwin Adams für die p24-Elisa-Messungen.

Vielen Dank an Prof. Dr. A. Thrasher, Dr. S. Howe und Dr. B. Gaspar für die Bereitstellung der lentiviralen Plasmide pLNT/MCS und pLNT/MCS/sffv/ccdB.

Vielen Dank an Dr. M. Sena-Esteves für die Bereitstellung der lentiviralen Plasmide pcDNA HIV CS-CGW und pCMV $\Delta$ R8.91.

Vielen Dank an Prof. Dr. J.B. Lian, Dr. G.S. Stein und Dr. H.M. Hoffmann für die Bereitstellung der Zelllinie ROS und die vielen Daten über den Osteocalcin-Promotor.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Labors für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Kinderklinik gilt der besondere Dank für die hervorragende Unterstützung und die vielen konstruktiven Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich hier die Unterstützung von Frau Dr. Susanne Frank und Frau Dr. Sabine Steffens, die mir das Klonieren und die grundlegenden Zellkulturtechniken beibrachten; Frau Dr. Sandra Klümper, die mich in der letzten Zeit viel unterstützte; Frau Dr. Cordula Leurs, die mir die Herstellung von lentiviralen Vrusüberständen und die lentivirale Infektion von Säugetierzellen beigebracht hat; Frau Dr. Ludmilla Glouchkova, die dauernd meine Zellen splitten mußte und der ich deswegen noch mehrere Einladungen zum Essen schulde; und Herrn Dr. Oliver Feyen und Herrn Dr. Carsten Burry, die mir immer mit guten Ratschlägen und Anregungen zur Seite standen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern sehr herzlich bedanken, die mich während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt haben, und natürlich auch bei meiner Freundin Jo, die eine unglaubliche Geduld aufbringen mußte, da sie dauernd auf mich wartete, während ich noch Messungen im Labor durchführte.

## **Lebenslauf**

Geboren am 19.09.1975 in Reutlingen als Sohn von Ursula Bienemann (geb. Hercher) und Manfred Bienemann.

Schulbildung von 1982 bis 1995 in Wuppertal. Im Juni 1995 Abitur.

Zum Sommersemester 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Physikum 1998, erstes und zweites Staatsexamen 1999 und 2001.

Im September 1999 Beginn der vorliegenden Dissertation bei Herrn PD Dr. Christof Kramm im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Kinderklinik der Universität Düsseldorf.

Praktisches Jahr 2001 bis 2002 an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. November 2002 drittes Staatsexamen.

Seit März 2003 Arzt im Praktikum an der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie, und -Immunologie (Direktor: Prof. Dr. Ulrich Göbel).

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“
Env	„envelope“ (retrovirales Hüllprotein)
et al.	et alteres (und andere)
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GCV	Ganciclovir
hFPGS	humane Folypolyglutamat-Synthetase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HSV-TK	<i>Herpes-simplex-Virus</i> -Thymidinkinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
lacZ	β-Galactosidase-Gen
LB	Luria Bertani
LTR	„long terminal repeat“ (retrovirales Element)
Luc	Luciferase
m	milli- ( $1 \times 10^{-3}$ )
Min.	Minute
MuLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
u	„units“
μ	mikro- ( $1 \times 10^{-6}$ )

## Abkürzungsverzeichnis

---

n	nano ( $1 \times 10^{-9}$ )
neo	Neomycin-Resistenzgen
NTP	Nukleotid-5´-Phosphat
OC	Osteocalcin
P	Promotor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMS	Phenazinmethosulfat
RLU	„relative light unit“
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunden
Std.	Stunde
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
UpM	Umdrehungen pro Minute
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

