

Mikrobiologie

Induzierte Expression von Toxigenen in Tumorzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Sylvia Püttmann-Cyrus, geb. Püttmann

aus Marl

2002

Dekan: Prof. Dr. A. Steinbüchel

Erste Gutachterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Paulus

Tag der mündlichen Prüfungen: 04. 12., 05. 12., 10. 12. 2002

Tag der Promotion: 10. 12. 2002

Inhaltsverzeichnis	I-VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX-X
Abkürzungsverzeichnis	XI-XII

Inhaltverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen der Gentherapie	1
1.2 Möglichkeiten der Genübertragung.....	2
1.3 Gentherapie unheilbarer Krankheiten	2
1.3.1 Gentherapieansätze maligner Erkrankungen	5
1.4 Verschiedene Ansätze der Suizid-Gentherapie	7
1.4.1 Indirekte Toxine.....	7
1.4.2 Direkt wirkende Toxine	9
1.5 Maligne Erkrankungen des Gehirns.....	10
1.5.1 Klinische Charakterisierung und Epidemiologie der Gehirntumoren.....	10
1.5.2 Therapiemöglichkeiten und deren Grenzen	11
1.6 Das Diphtherietoxin und seine Anwendung in der Gentherapie.....	11
1.6.1 Biologische Charakterisierung des Diphtherietoxins.....	11
1.7 Regulierbare Expressionssysteme	13
1.7.1 Das Tet-System	15
1.7.1.1 Das Tet-off-System.....	15
1.7.1.2 Das Tet-on-System	16
1.7.1.3 Die modifizierten Tet-on-System Varianten.....	17
1.7.1.3.1. Das Tet Silencer pTet-tTS System.....	17
1.7.1.3.2. Der tet-Transaktivator prtTA2S-M2	18
1.7.1.3.3. Der Tet-regulierte Transaktivator und Repressor System pCMV-Krab-rtTA	18

1.7.2	Das Ecdysone™-System.....	18
1.7.3	Das GeneSwitch™-System.....	20
1.7.4	Das Dimerizer-System.....	21
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Geräte für das Arbeiten mit DNA, Proteinen und Bakterien.....	25
2.1.2	Geräte für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	26
2.1.3	Chemikalien.....	27
2.1.4	Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien, Proteinen und eukaryotischen Zellen.....	28
2.1.5	Kits zur Bearbeitung von DNA.....	28
2.1.6	Kits zur Transfektion von DNA in eukaryotischen Zellen.....	28
2.1.7	Kits zur Bestimmung der Zellproliferation und des Zelltods.....	28
2.1.8	Verbrauchsmaterialien für Western Blot Analysen.....	29
2.1.9	Antikörper.....	29
2.1.10	Antibiotika, Enzyme, Standards und Induktionsmoleküle.....	30
2.1.11	Verbrauchsmaterialien für Tierversuche.....	31
2.1.12	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Standardlösungen.....	31
2.1.13	Verwendete Plasmide.....	32
2.1.14	Verwendete Oligonukleotide.....	33
2.1.15	Medien, Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen.....	33
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	34
2.2.2	Nährmedien für <i>E.coli</i>	34
2.2.3	Anzucht von <i>E.coli</i>	35
2.2.4	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	35

2.2.5	Transformation von <i>E.coli</i>	35
2.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	36
2.2.6.1	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	36
2.2.6.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	37
2.2.7	Enzymatische Modifizierung von DNA	37
2.2.7.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
2.2.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	38
2.2.7.3	DNA-Ligation.....	39
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung.....	39
2.2.9	DNA-Präzipitation mit Ethanol	40
2.2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	40
2.2.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	41
2.2.12	DNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.2.13	DNA-Sequenzanalyse	43
2.3	Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Proteinen	44
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen.....	44
2.3.2	Coomassie Brilliant Blue G250-Färbung.....	46
2.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	46
2.3.4	Western Blot Analyse	47
2.3.5	Ponceau-S-Färbung.....	48
2.3.6	Immunreaktion.....	49
2.3.7	Präparation von Zelllysaten für die Proteinanalyse	50
2.4	Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen in der Zellkultur	51
2.4.1	Eingesetzte Zelllinien.....	51
2.4.2	Zellkultivierung.....	51
2.4.3	Trypsinieren von Zellen.....	51
2.4.4	Präparation eines Tiefkühlaliquots (<i>freeze stock</i>).....	52

2.4.5	Auftauen und Revitalisieren von Tiefkühlaliquots	52
2.4.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	53
2.4.7	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	53
2.4.8	Subklonierung stabiler Klone.....	54
2.5	Biochemische Methoden zur Charakterisierung eukaryotischer Zellen in der Zellkultur.....	55
2.5.1	Luciferase Test.....	55
2.5.2	Cytotoxizitätstest (LDH-Test).....	56
2.5.3	Zell-Proliferationstest bzw. Vitalitätsbestimmung (MTT-Test).....	57
2.5.4	β -Galaktosidaseaktivitäts-Bestimmung	58
2.5.5	Analyse der Expression von β -Galaktosidase <i>in vitro</i> (X-Gal-Test)	59
2.5.6	Analyse des Bystander-Effektes	60
2.6	<i>In Vivo</i> Versuche	60
2.6.1	Intracraniale Implantation von stabil transfizierten C6 Zellen in Nacktmäuse	60
2.6.1.1	Versuchsgruppe: C6switch-lacZ5.....	61
2.6.1.2	Versuchsgruppe: C6switch-DT-A	61
2.6.2	Auswertung der <i>in vivo</i> Versuche	62
2.6.2.1	Versuch: C6switch-lacZ5 <i>in vivo</i>	62
2.6.2.2	X-Gal Färbung von Gewebeschnitten.....	63
2.6.2.3	Versuch: C6switch-DT-A <i>in vivo</i>	64
2.6.2.4	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	64
2.6.2.5	Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten.....	65
3.	ERGEBNISSE	66
3.1	Die Regulationssysteme	70
3.1.1	Konstruktion der Responseplasmide.....	70
3.1.2	Konstruktion des Reporter-Responsevektors des Dimerizersystems pZ ₁₂ I-lacZ-2.....	71

3.2	Transiente Transfektionen der C6 Zellen mit den verschiedenen Systemen	71
3.2.1	Die Regulationseffizienz der verschiedenen Tet-Systeme in C6 Zellen unter transienten Transfektionsbedingungen	72
3.2.1.1	Die Regulationskapazität des Tet-off-Systems in transienten Transfektionen.....	72
3.2.1.2	Die Regulationskapazität des Tet-on-Systems in transienten Transfektionen.....	73
3.2.1.3	Die Regulationskapazität des Tet-on-Systems im kombinierten Einsatz mit dem Silencerplasmid pTet-tTS.....	75
3.2.1.4	Die Regulationskapazität des tet-Transaktivators prtTA2S-M2 in transienten Transfektionen (modifiziertes Tet-on-M2 System)	76
3.2.1.5	Die Regulationskapazität des Tet-regulierten Transaktivator- und Repressor-Systems (Tet-on-Krab) in transienten Transfektionen	79
3.2.2	Die Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems in transienten Transfektionen	80
3.2.3	Die Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transienten Transfektionen	82
3.2.4	Die Regulationskapazität des Ecdysone™-Systems in transienten Transfektionen	84
3.3	Abschließende Bewertung der Regulationskapazitäten der einzelnen Systeme und der sich daraus ergebenden Konsequenz zur Etablierung stabil transfizierter C6 Zelllinien.....	86
3.4	Konstruktion von regulierbaren stabilen C6 Zelllinien mit den verschiedenen Regulationssystemen.....	87
3.4.1	Etablierung einer Tet-on stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz	88
3.4.2	Etablierung einer Tet-on und pTet-tTS stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz	89
3.4.3	Etablierung einer prtTA2S-M2 stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz	89

3.4.4	Etablierung einer pC ₄ N ₂ -RHS ₃ H/ZF3ZF stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz (Dimerizer-System)	91
3.4.5	Etablierung einer pSwitch stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz (GeneSwitch™-System)	94
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der stabilen Transfektionen der Regulatorplasmide der einzelnen Regulationssysteme	96
3.6	Die Etablierung stabil transfizierter Zielgen regulierbarer C6 Zellen.....	97
3.6.1	Die Etablierung einer stabil lacZ-Gen regulierbaren C6 Zelllinie (C6switch-lacZ)	97
3.6.2	Die Etablierung einer DT-A-Gen stabil transfizierten, regulierbaren C6switch Zelllinie	102
3.6.3	Die Charakterisierung der Regulationskapazitäten der C6switch-DT-A Klone mit biochemischen Methoden	104
3.6.3.1	Charakterisierung der Proliferationseigenschaften der vier C6switch-DT-A Klone mit dem Vitalitätstest (MTT-Test).....	104
3.6.3.2	Charakterisierung der DT-A vermittelten Cytotoxizität der vier C6switch-DT-A Klone mit dem Cytotoxizitätstest (LDH-Test)	107
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der stabil, Zielgen regulierbaren C6switch Zelllinien (C6switch-lacZ und C6switch-DT-A).....	110
3.8	Untersuchung des Bystander Effektes in Kokulturen von C6-SP-GFP und C6switch-DT-A Zellen.....	111
3.9	Die Regulationsfähigkeit der Zellklone C6switch-lacZ und C6switch-DT-A in <i>in vivo</i> Untersuchungen.....	114
3.9.1	<i>In Vivo</i> Analyse der kontrollierten Expression des lacZ-Gens in transplantierten C6switch-lacZ Zellen	114
3.9.2	Implantation der C6switch-DT-A Zellen in der Gehirn von Nacktmäusen und die Analyse des veränderten Tumorwachstums <i>in vivo</i>	117
3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse der stringenten Regulationsfähigkeit der etablierten Zelllinien in <i>in vivo</i> Experimenten	120
4.	DISKUSSION.....	121

4.1	Regulierbare Genexpressionssysteme in gentherapeutischen Anwendungen.....	121
4.2	Regulierbare Expressionssysteme zur kontrollierten Expression des Diphtherietoxins	122
4.2.1	Die Regulationskapazitäten der Tet-Systeme bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins	122
4.2.2	Die Regulationskapazität des Ecdysone™-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins	127
4.2.3	Die Regulationskapazität des Dimerizer-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins	128
4.2.4	Die Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins	130
4.2.5	Die Bedeutung des GeneSwitch™-Systems zur Regulation von Genen (in der Literatur)	136
4.2.6	Der Einsatz des GeneSwitch™-Systems in experimentellen Gentherapieansätzen und verschiedenen Gentransfermöglichkeiten.....	137
4.3	Die Bedeutung des Bystander Effektes für angewendete Gentherapie.....	138
4.4	Die Bedeutung und die bisher durchgeführten gentherapeutischen Ansätze in der Behandlung maligner Gehirntumoren.....	140
4.5	Ausblick	144
5.	ZUSAMMENFASSUNG	145
6.	LITERATUR.....	147
7.	LEBENS LAUF	172
8.	PUBLIKATIONS LISTE.....	173

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Statistische Verteilung der mittels Genterapie behandelten Patienten in klinischen Versuchen	4
Abb. 1.2	Statistische Verteilung der genterapeutisch eingesetzten Gentyphen zur Behandlung maligner Erkrankungen	7
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des Tet-off-Systems	16
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des Tet-on-Systems	17
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Ecdysone™-Systems	19
Abb. 1.6	Schematische Darstellung des GeneSwitch™-Systems	21
Abb. 1.7	Schematische Darstellung des Dimerizer-Systems	23
Abb. 2.1	Darstellung der intracranialen Implantationstechnik	62
Abb. 3.1	Regulation der lacZ-Genexpression in Zellen des Klons C6switch-lacZ5	99
Abb. 3.2	Western Blot Analyse zum biochemischen Nachweis der β -Galaktosidase Expression	101
Abb. 3.3	Vitalitätsverhalten von C6switch-DT-A-Zellen unter induzierten (+RU486) und reprimierten Bedingungen (-RU486)	103
Abb. 3.4	Graphische Darstellung der MTT-Testergebnisse des Klon 1 und der Negativkontrolle	107
Abb. 3.5	Graphische Darstellung der LDH-Testergebnisse des Klon 1 und der Negativkontrolle	109
Abb. 3.6	C6-SP-GFP Zellen	112
Abb. 3.7	Bystander-Effekt-Untersuchung	113
Abb. 3.8	Induzierte Expression des lacZ-Gens <i>in vivo</i>	117
Abb. 3.9	Induzierte Expression des DT-A-Gens <i>in vivo</i>	118
Abb. 3.10	Makroskopisch sichtbarer, extracranialer Tumor eines Versuchstieres	120

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Erkrankungen, die mit einer Gentherapie bereits in klinischen Phasen behandelt werden	3
Tab 1.2	Strategien der Krebsgentherapien	6
Tab. 1.3	Indirekte Toxine in der Gentherapie	8
Tab. 2.1	Übersicht über die verwendeten Plasmide	32
Tab. 2.2	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	33
Tab. 3.1	Expressions-und Regulationskapazität des Tet-off-Systems in transient transfizierten C6 Zellen	73
Tab. 3.2	Expressions-und Regulationskapazität des Tet-on-Systems in transient transfizierten C6 Zellen	74
Tab. 3.3	Expressions-und Regulationskapazität des kombinierten Tet-on/ptetTS Silencerplasmids in transient transfizierten C6 Zellen	76
Tab. 3.4	Expressions-und Regulationskapazität des Tet-on-M2-Systems in transient transfizierten C6 Zellen	77
Tab 3.5	Expressions-und Regulationskapazität des modifiziertenTet-on-Systems pCMV-Krab-rtTA in transient transfizierten C6 Zellen	79
Tab. 3.6	Expressions-und Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems in transient transfizierten C6 Zellen	81
Tab. 3.7a	Expressions-und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zellen (10nm AP1510)	82
Tab. 3.7b	Expressions-und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zellen (5nm AP1510)	83
Tab. 3.7c	Expressions-und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zellen (1nm AP1510)	83
Tab. 3.8	Expressions-und Regulationskapazität des Ecdysone™-Systems in transient transfizierten C6 Zellen	85
Tab. 3.9	Regulationskapazität der stabilen Tet-on-Regulatorplasmid transfizierten C6 Zellen	88
Tab. 3.10	Regulationskapazitäten von drei ausgewählten stabil transfizierten Tet-on-M2-Klonen	90
Tab. 3.11	Regulationskapazitäten von vier ausgewählten p C ₄ N ₂ -R _H S3H/ZF3ZF stabil transfizierten C6-Klonen (Dimerizer-System)	92
Tab. 3.12	Regulationskapazitäten von sechs ausgewählten pSwitch stabil transfizierten C6-Klonen (GeneSwitch™-System)	94

Tab. 3.13	Regulationskapazitäten von 6 ausgewählten C6switch-lacZ Klonen	98
Tab. 3.14	Proliferationstest zur Bestimmung der Vitalität von C6switch-DT-A-Klonen	105
Tab. 3.15	Cytotoxizitätstest von induzierten und reprimierten C6switch-DT-A-Klonen	108
Tab. 3.16a	Tumorentwicklung in RU486 ⁺ behandelten Mäusen	119
Tab. 3.16b	Tumorentwicklung in RU486 ⁻ unbehandelten Mäusen	119

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
EF2	Elongationsfaktor 2
et al.	et altera
f	femto
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GCV	Ganciclovir
h	Stunde
H ⁺	Proton
HSV	Herpes Simplex Virus
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
ip.	intraperitoneal
IPTG	1-Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Systems
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen

kD	Kilodalton
l	Liter
μ	mikro
m	milli
M	mol/l
MCS	multiple cloning site
min	Minuten
n	nano
NAD	Nicotinamidadenin
p.a.	per analysis
P _{min}	minimaler Promotor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfate
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
WHO	World Health Organisation
V	Volt
vergl.	vergleiche
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Gentherapie

Die Gentherapie bietet einen neuen Ansatz zur Behandlung von unheilbaren Krankheiten. Ihr Grundprinzip besteht in der Therapie von Erkrankungen mit dem Einsatz und Transfer von Genen. Zahlreiche Krankheiten beruhen auf Defekten von Genen und könnten durch die Verpflanzung von Genen behoben bzw. korrigiert werden. Bei solchen monogenetischen Erkrankungen wird in gentherapeutischen Studien versucht eine defekte Zellfunktion wiederherzustellen. Ein weiterer Aspekt ist, der Zelle eine zusätzliche Funktion zu vermitteln, wie z.B. bei der Übertragung toxischer Gene und der Bekämpfung von malignen Erkrankungen.

Die Gentherapie lässt sich in zwei Kategorien unterteilen (Großhans, 2000):

Die somatische Gentherapie

Bei der somatischen Therapie werden differenzierte Körperzellen durch einen Gentransfer modifiziert. Unterschieden werden in dieser Anwendung die *ex vivo* und die *in vivo* Therapie. Bei der *ex vivo* Therapie werden dem Patienten Körperzellen entnommen, im Labor genetisch verändert und anschließend dem Patienten wieder zugeführt. Bei der *in vivo* Therapie wird dem Patienten ein Vektor, der die genetische Information für das therapeutische Gen trägt, z.B. über die Blutbahn oder direkt ins Zielgewebe appliziert.

Die Keimbahntherapie

Bei der Keimbahntherapie werden die Keimzellen genetisch verändert, um so Erbkrankheiten zu behandeln. Bei Krankheiten wie dem Lesch-Nyhan Syndrom, das bereits in der frühesten Kindheit zu irreversiblen Schäden führt und somit für eine somatische Gentherapie nicht geeignet ist, wäre die therapeutische Anwendung durchaus sinnvoll. Bislang ist der Keimbahntransfer aber aus ethischen Gründen weltweit untersagt.

1.2 Möglichkeiten der Genübertragung

Von essentieller Bedeutung ist die Übertragungsart des spezifischen Gens. Diese lassen sich in drei Klassen einteilen (Gomez-Navarro et al., 2000):

Biologische Transfermethoden

Zu diesem Typ gehören alle biologisch, inaktivierten modifizierten Viren, die mit dem zu übertragenden Gen bestückt sind und es in die Targetzellen durch natürliche Infektion einschleusen. Zu diesem Zweck werden häufig Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Herpesviren eingesetzt. Während Retroviren und AAV das Fremdgen direkt in das Genom der Wirtszelle einbauen, liegt bei den anderen viralen Infektionen eine Einbringung der DNA in Form von extrachromosomaler DNA vor.

Chemische Transfermethoden

Zu dieser Klasse zählen die Nicht-viralen Vektoren (Liposomen) und die chemischen Hilfsstoffe (Calciumphosphat und DEAE-Dextran).

Physikalische Methoden

In diese Klasse gehören alle Methoden des Gentransfers, die auf physikalischen Kräften basieren, wie z.B. Elektroporation, Mikroinjektion, Partikelbeschuss, Jet-Injektion und die direkte Injektion.

1.3 Gentherapie unheilbarer Krankheiten

Der Bedarf an neuen Therapieformen ist sowohl bei erblich bedingten als auch erworbenen Erkrankungen gegeben. Potenziell die besten Aussichten auf eine Heilung durch die Gentherapie haben Krankheiten, die durch den Defekt eines einzelnen Gens resultieren, wie z.B. die Cystische Fibrose, familiäre Hypercholesterinämie oder auch SCID (Verma und Somia, 1997). In Tabelle 1.1 sind Krankheiten, die für eine Gentherapie interessant erscheinen und bei denen gentherapeutische Ansätze bereits klinisch erprobt werden, aufgelistet.

Erkrankung	Defekt	Häufigkeit	Zielzellen
Genetisch bedingt			
schwere kombinierte Immundefizienz (SCID/ADA)	Adenosin Desaminase (ADA) in 25% der SCID Patienten	selten	Knochenmark, T-Lymphozyten
Hämophilie A, B	Faktor VIII Defizienz Faktor IX Defizienz	1:10000 Männer 1:30000 Frauen	Fibroblasten, Knochenmark, Leber, Muskel,
Familiäre Hypercholesterolämie	Defizienz des LDL-Rezeptors	1:1 Million	Leber
Mukovizidose (Cystische Fibrose)	Verlust des CFTR-Gens	1:3000 Kaukasier	Lunge
Thalassämien, Sichelzellanämie	Defekte im α -oder β -Globin Gen	1:600 (ethnische Gruppen)	Knochenmark
Gaucher-Erkrankung	Defekt im Enzym Glucocerebrosidase	1:450 in Ashkenazi Juden	Knochenmark, Macrophagen
α_1 -Antitrypsindefizienz	Verlust von α_1 -Antitrypsindefizienz	1:3500	Leber/Lunge
Erworben			
Krebs	verschiedene Ursachen (genet./ Umweltfaktoren)	1 Million pro Jahr in USA	Krebszellen (Leber, Gehirn, Pankreas, Niere etc.)
Neurologische Defekte	Parkinson, Alzheimer,	1 Million Parkinson, 4 Millionen Alzheimer Pat. in USA	Gliazellen, Neurone, Schwannzellen
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Restinose, Atherosklerose	13 Millionen in USA	Aterien, vaskuläre Endothelzellen
Infektionskrankheiten	AIDS, Hepatitis B	steigende Zahlen	T-Zellen, Leber, Macrophagen

Tabelle 1.1: Erkrankungen, die mit einer Gentherapie bereits in klinischen Phasen behandelt werden (nach Verma und Somia, 1997).

Derzeit stehen für viele Erkrankungen keine Heilmethoden zur Verfügung, und gerade bei den Erbkrankheiten, die sich häufig auf monokausale Defekte zurückführen lassen, helfen die traditionellen Therapien nur unbefriedigend (Treacy et al., 1995). Da Erbkrankheiten häufig auf dem Defekt eines einzigen Gens beruhen, stellen sie für die Gentherapie eine

besonders attraktive Zielgruppe dar. In verschiedenen Therapieansätzen wurden durch das gezielte Einbringen eines intakten Gens Versuche zur Behandlung einiger vererbbarer Krankheiten unternommen (Friedmann, 2000). Dazu gehören Mukovizidose, Adenosin-Desaminase-Defizienz (ADA) und Duchenne Muskeldystrophie. Bis auf die Therapie des ADA-Mangels erzielen bisherige klinische Studien nur begrenzte Erfolge. Zurzeit stagniert die Forschung auf diesem Gebiet, da die aufgeführten Erkrankungen eher selten sind und somit auch nur begrenztes kommerzielles Potential aufweisen. Wahrscheinlicher ist es, dass Krebserkrankungen die ersten signifikanten klinischen Erfolge aufweisen werden können. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, zeigt sich, dass von den weltweit etwa 3000 Patienten, die bislang gentherapeutisch behandelt wurden, 68,5% (Patientenanzahl: 2392) an Krebs erkrankt waren. Nur 8,8% (Patientenanzahl: 309) wurden aufgrund einer Erbkrankheit behandelt (Daten aus www.wiley.co.uk/genmed/2002).

In der nächsten Abbildung ist die statistische Verteilung der einzelnen Gentherapieansätze bezogen auf die verschiedenen Erkrankungen graphisch dargestellt.

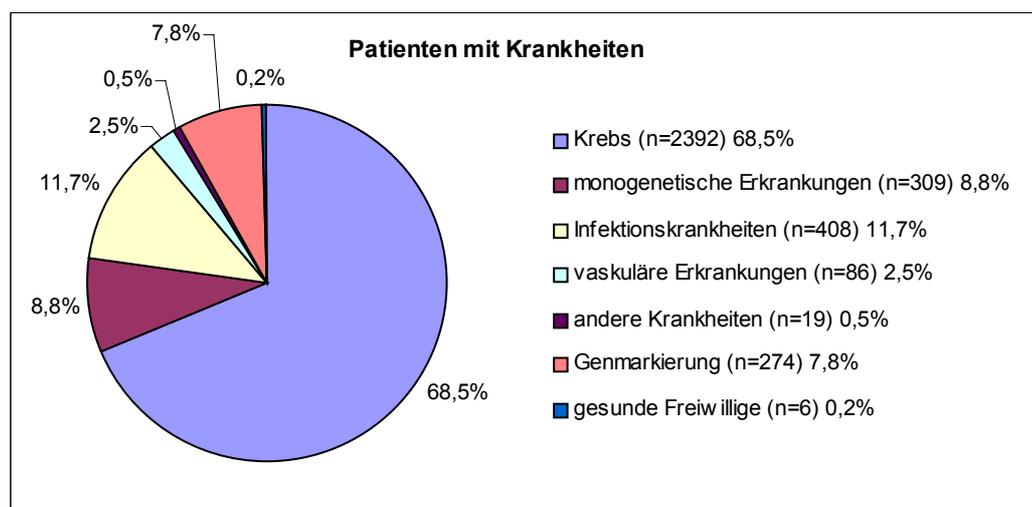


Abbildung 1.1: Statistische Verteilung der mittels Gentherapie behandelten Patienten in klinischen Versuchen (modifiziert nach www.wiley.co.uk/genmed/2002).

Die erste gentherapeutische Behandlung eines Menschen wurde im September 1990 in den USA an einem vierjährigen Mädchen durchgeführt, das an einer schweren Erbkrankheit litt – bezeichnet als schwerer kombinierter Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, SCID) (Blaese et al., 1995). Die Immunschwäche wird durch ein einziges defektes Gen verursacht und führt zu einer Fehlfunktion der Adenosin-Desaminase (ADA). Ohne dieses Protein reichern sich Abbauprodukte im Körper an und zerstören das Immunsystem. Zur Behandlung dieser Erkrankung wurden dem Kind Lymphozyten entnommen, im Labor in einer *ex vivo* Therapie mit einer korrekten Version des fehlenden Gens bestückt und in

einer anschließenden Infusion wieder in den Körper eingeschleust. Dieser Vorgang wird in regelmäßigen Abständen wiederholt. Das Mädchen führt heute ein fast „normales“ Leben.

Wenn die Gentherapie als neue Therapieform auch bei anderen Erkrankungen erfolgreich ist, so wird sie als vierte Revolution in die Geschichte der Medizin eingehen. Denn ähnlich wie die drei vorangegangenen Revolutionen – die Hygiene, die Chirurgie unter Anästhesie sowie der Einsatz von Antibiotika und Impfstoffen - könnte die Gentherapie die Medizin grundlegend wandeln und den vierten Durchbruch bei der Verhütung und Therapie von Krankheiten bringen (Anderson, 1995).

1.3.1 Gentherapieansätze maligner Erkrankungen

Maligne Erkrankungen sind bislang nur sehr eingeschränkt therapierbar und zählen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den zweithäufigsten Todesursachen. Sie beruhen auf genetischen Defekten auf somatischer Ebene, die zu Entartungen und Tumorbildungen führen. In der Regel ist eine nur begrenzte Zellzahl von diesen genetischen Defekten betroffen. Durch das Einbringen von Genen, die zur Korrektur des genetischen Defekts oder zur Eliminierung von Zellen innerhalb dieser Zellgruppe führen, könnte die Krebstherapie revolutioniert werden. Auch aufgrund der hohen Nachfrage bezüglich neuer Therapiemöglichkeiten und der großen Anzahl an Patienten erscheint die Gentherapie bei Krebserkrankungen aussichtsreich.

Bei der experimentellen und klinischen Genterapie von Tumoren werden eine Reihe unterschiedlicher Strategien verfolgt. In Tabelle 1.2 sind die verschiedenen Ansätze aufgelistet.

Therapeutische Funktion des übertragenden Gens	Beispiele der Gene oder Genprodukte
Stimulieren des Immunsystems	(GM-CSF), IGF-1, Antisense gegen transforming growth factor- β (as-TGF- β) Dekorin
Induktion der Apoptose	Caspasen, FADD, Bax, CD95/CD95L, DR4/DR5/Apo2L
Hemmung der Tumorangiogenese	VEGF-Rezeptoren, FGF-Rezeptoren, p53
Wiederherstellung von Tumorsuppressorfunktionen	p53, Retinoblastom-Gen (Rb)
Aktivierung von Toxinen (direkt oder indirekt)	<u>indirekt:</u> -Herpes simplex Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) und Ganciclovir (GCV) - <i>E. coli</i> -Cytosindeaminase (CD) und 5-Fluorocytosin (5-FU) <u>direkt:</u> -Diphtherietoxinkette A -Pseudomonas A Endotoxin

Tabelle 1.2: Strategien der Krebsgenterapien (modifiziert nach Chase et al., 1998; Roth et al., 1999; Bansal und Engelhard, 2000)

In der Abbildung 1.2 ist die prozentuale Verteilung der verschiedenen Gentyphen und die Anzahl der durchgeführten Protokolle (Anzahl n steht jeweils in Klammern) dargestellt. Mit 21,1% und 134 verschiedenen Ansätzen stehen Versuche, die auf dem Einsatz von Cytokinen basieren, an erster Stelle. Genterapien mittels Suizidgenen stellen einen Anteil von 8,6% und 55 verschiedenen Versuchsansätzen (www.wiley.co.uk/genmed/2002).

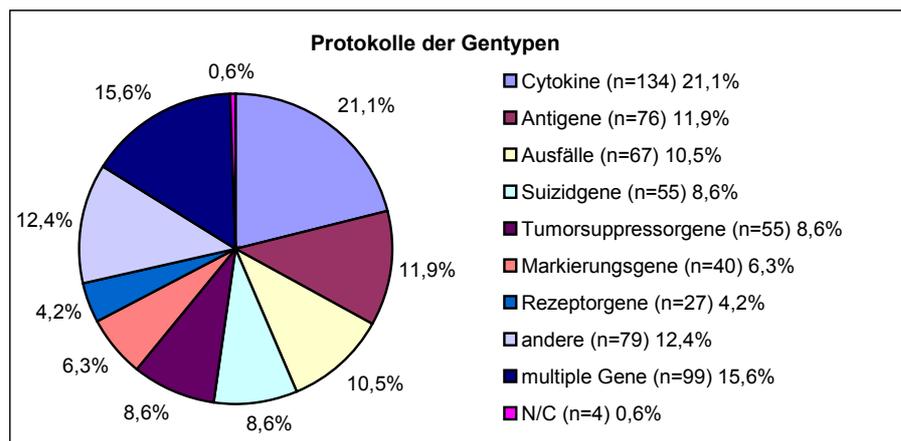


Abbildung 1.2: Statistische Verteilung der genterapeutisch eingesetzten Gentyphen zur Behandlung maligner Erkrankungen (modifiziert nach www.wiley.co.uk/genmed/2002).

1.4 Verschiedene Ansätze der Suizid-Gentherapie

Bei der Suizid-Gentherapie unterscheidet man zwei Varianten. Zum einen gibt es die Möglichkeit indirekte Toxine zu verwenden, die sogenannte „prodrugs“ in der Zelle aktivieren. Zum anderen lassen sich direkte Toxine einsetzen, die allein durch ihre Expression zum Tod der entsprechend transfizierten Zellen führen.

1.4.1 Indirekte Toxine

Der zentrale Ansatz der Enzym/Prodrug Gentherapie ist die Platzierung eines „Prodrug“ aktivierbaren Enzym-Gens oder eines funktionellen Proteins im Tumorgewebe und die anschließende systemische Gabe des Induktors, die zur Aktivierung des Enzyms bzw. des Proteins führt (Xu und McLeod, 2001). Es werden drei Möglichkeiten der Anwendung unterschieden:

- *gene-directed enzyme prodrug therapy* (GDEPT)
- *virus-directed enzyme prodrug therapy* (VDEPT)
- *antibody-directed enzyme prodrug therapy* (ADEPT)

GDEPT: Diese Form der indirekten Toxin-Gentherapie verwendet physikalische Applikationshilfen (z.B. Liposomen) um ein Gen, das für ein fremdes Enzym kodiert, gezielt in Tumorzellen einzuschleusen und so nach der systemischen Gabe des „Prodrugs“ zum Tod der Zellen führt (Clark et al., 1997; Friedlos et al., 1997; Nenny und Wilson, 1998; Niculescu-Duvaz et al., 1998).

VDEPT: Diese pharmakologisch orientierte Gentherapie basiert auf dem Einsatz von Viren als Genvehikel für Enzyme, die durch die Gabe eines systemisch applizierten, nicht toxischen Agens in ein cytotoxisches Agens verwandelt werden (Mullen et al., 1992; McNeish et al., 1998; Danks et al., 1999; Springer und Niculescu-Duvaz, 2000; Waxman et al., 1999). Es werden verschiedene Viren für diesen Zweck eingesetzt, wie z.B. Retroviren, Adenoviren, HSV, oder auch Adeno-assoziierte Viren (Xu und McLeod, 2001).

ADEPT: Bei dieser Variante ist ein Tumor-spezifischer monoklonaler Antikörper an das aktivierbare Enzym gekoppelt. Dieses Fusionsprotein wird dem Patienten über die Blutbahn appliziert, und nachdem sich der Antikörper an die Tumorzelloberfläche gebunden hat, erhält der Patient die ungiftige Aktivierungssubstanz. Diese wird durch das Enzym aktiviert und führt so zum Absterben der Krebszellen (Florent et al., 1999; Pedley et al., 1999; Syrigos und Epenetos, 1999; Wolfe et al., 1999). In Tabelle 1.3 sind Informationen zu den häufigsten angewendeten indirekten Toxinen dargestellt.

Enzym	Prodrug	Produkt	Mechanismus	Referenz
HSV-tk	Ganciclovir	Ganciclovir-Triphosphat	Blockierung der DNA Synthese	Moolten, 1986
Cytosin Desaminase	5-Fluorocytosin	5-Fluorouracil (5-FU)	Pyrimidin Antagonist: blockiert DNA und RNA Synthese	Trinh et al., 1995 Hanna et al., 1997
Nitroreduktase	Nitrobenzyloxycarbonyl-anthracyclin	Anthracycline	DNA crosslinking	Bridgewater et al., 1995
Carboxylesterase	CPT-11	SN38	Topoisomerase Inhibitor	Danks et al., 1998
Cytochrome P450	Cyclophosphamid	Phosphoramid Mustard	DNA alkylierendes Agens: blockiert DNA Synthese	Waxman et al., 1999
Purinnukleosid phosphorylase	6-Mercaptopurin-DR	6-Mercaptopurin	Purin Antagonist: blockiert DNA-Synthese	Sorcher, 1994

Tabelle 1.3: Indirekte Toxine in der Gentherapie (modifiziert nach McCormick, 2001)

Ein häufig verwendetes Beispiel für das GDEPT ist die Kombination der Herpes Simplex Thymidinkinase (HSV-TK) und des Nukleotidanalogs Ganciclovir (GCV). GCV ist ein antivirales Medikament, welches durch die HSV-TK und durch zelluläre Kinasen phosphoryliert wird und Triphosphate bildet. Diese wirken bei der DNA-Synthese als kompetitive Inhibitoren endogener Nukleotide, was schließlich zum Zelltod führt. Ein weiteres Beispiel stellt die Kombination der bakteriellen Cytosin Desaminase (CD) und des antifugalen Medikaments 5- Fluorocytosin (5-FC) dar. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen nach der Konversion des inaktiven 5-FC in die aktive Form durch die CD getötet werden konnten. Neben diesen beiden beschriebenen Formen gibt es noch weitere Beispiele für GDEPT, wie in Tabelle 1.3 dargestellt ist (McCormick, 2001).

1.4.2 Direkt wirkende Toxine

Viele bakterielle, pflanzliche und tierische Toxine zeigen auf Säugerzellen eine extrem giftige Wirkung, die häufig zu deren Tod führt. Damit sind solche Toxine potente therapeutische Agentien für den gezielten Tod von Tumorzellen. Es stehen verschiedene Möglichkeiten des Toxineinsatzes zur Verfügung (Syrigos et al., 1999; Chester et al., 2000; Rader und List, 2000):

- **Rekombinante Toxine:** das Toxin ist mit den Ligandenbindungsdomänen von Antikörpern, Cytokinen oder Wachstumsfaktoren fusioniert
- **Immunotoxine:** bakterielle/pflanzliche Toxine gekoppelt an einen spezifischen Antikörper, der zelluläre Liganden bindet
- **Transfer von Toxingenen:** Übertragung und kontrollierte Expression von Toxinen in Tumorzellen

Die Möglichkeit cytotoxische Gene in Tumorzellen mittels Gentherapie zu transferieren stellt eine vielversprechende neue Strategie zur Behandlung von Krebs dar (Cook et al., 1994).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen „Enzym-Prodrugs“-Systemen bieten direkte Toxine den Vorteil in extrem niedrigen Dosen wirksam zu sein. Zudem sind sie unabhängig von der Zellreplikation und erfordern zu ihrer Aktivierung nicht erst die Gabe von „Prodrugs“, wie z.B. GCV, welche häufig Nebenwirkungen zeigen (Kokoris et al.,

2000). Allerdings erfordert die Applikation von Toxingenen in gentherapeutischen Verfahren die stringente zeitliche und ortsgebundene Kontrolle des Expressionslevels (Kramm et al., 1995). Der Erfolg einer solchen Gentherapie ist dementsprechend von der stringenten Kontrolle und der effizienten Regulation der Genexpression abhängig. Verschiedene Toxine sind für gentherapeutisch-experimentelle Ansätze bereits untersucht worden. Es handelt sich dabei um bakterielle Toxine, wie z.B. das Pseudomonas A Endotoxin und das Diphtherietoxin (Kramm et al., 1995; Martin et al., 2000). Beide Proteine führen zu einer Inaktivierung des Elongationsfaktors 2, verursachen so einen Abbruch der Proteinbiosynthese und führen zum Tod der Zelle (Krueger und Barbieri, 1995). Es werden auch pflanzliche Toxine wie Ricin eingesetzt oder tierische Gifte wie z.B. das Schlangengift *Naja naja* (Rodriguez et al., 1998).

1.5 Maligne Erkrankungen des Gehirns

Die Therapie maligner Hirntumoren gehört zu den größten Herausforderungen interdisziplinärer onkologischer Forschung, da diese Tumoren die häufigsten Primärtumoren im humanen Gehirn bilden. Trotz stetiger Verbesserungen in den etablierten Therapieverfahren (Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie) sind in den letzten dreißig Jahren keine wesentlichen Therapieverbesserungen gefunden worden (Roth et al. 1999; Weller, 2000).

1.5.1 Klinische Charakterisierung und Epidemiologie von Gehirntumoren

Maligne Tumoren bilden 30% der primären Gehirntumoren von Erwachsenen und umfassen die anaplastischen Astrozytome, Oligoastrozytome, Oligodendrogliome (WHO-Grad III) und das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) (Markert et al., 2000; Weller, 2000). Das Glioblastom ist die häufigste, bösartigste Primärtumorart im humanen Gehirn und ist auf die Entartung der Neuroglia zurückzuführen.

Jährlich werden in Deutschland ca. 3000-5000 Neuerkrankungen von malignen hirneigenen Tumoren diagnostiziert, und das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 40. und dem 65. Lebensjahr. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Weller, 2000). Das klinische Bild manifestiert sich in morgendlichem Erbrechen, Kopfschmerzen, Visusstörungen, Stauungspapillen und auch im psychoorganischen Syndrom (Paulus, in Neuropathologie, Springer Verlag, 2002). Diese Reaktionen sind alle auf einen gesteigerten Hirndruck zurückzuführen. Je nach Lokalisation des Tumors finden sich

neurologische Herdsymptome wie z.B. Hemiparese, Ataxien und auch hormonelle Störungen. Intrakranielle Gliome und Meningiome gehen in 50-75% mit herdbetonten und generalisierten Krampfanfällen einher. Generell ist festzustellen:

Je maligner der Tumor ist, desto kürzer ist die Anamnese. 3-10% der Hirntumoren verlaufen symptomlos und werden erst nach der Autopsie diagnostiziert. Die Diagnostik erfolgt durch Computertomographie (CT), Magnet-Resonanz (NMR) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET). In der kranialen CT ist der Hirntumor ein mit 98%iger Sicherheit zu diagnostizierendes Syndrom (Paulus, in Neuropathologie, Springer Verlag, 2002).

1.5.2 Therapiemöglichkeiten und deren Grenzen

Trotz stetiger Verbesserung und Einsatz einer aggressiven, multimodalen Therapie (Chirurgie, Strahlentherapie oder Chemotherapie) beträgt die mediane Überlebenszeit in der Regel weniger als 12 Monate (Roth et al., 1999). Die Prognose hat sich in den letzten dreißig Jahren nicht wesentlich verbessert.

Ein neuer Ansatz, Tumorzellen zu eliminieren, ist die Übertragung direkt wirkender Toxine in einer gentherapeutischen Anwendung, wie es im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde. Zu diesem Zweck wurde das Diphtherietoxin verwendet, das im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

1.6 Das Diphtherietoxin und seine Anwendung in der Gentherapie

In dieser Arbeit soll das Diphtherietoxin als direkt wirkendes Toxin verwendet werden, um einen möglichen Einsatz in der Form einer regulierbaren Expression für einen gentherapeutischen Ansatz zu untersuchen. Im Folgenden soll das bakterielle Toxin nun beschrieben werden.

1.6.1 Biologische Charakterisierung des Diphtherietoxins

Das Diphtherietoxin wird von *Corynephagen* β infizierten *Corynebacterium diphtheriae* exprimiert. Das Toxin wird von dem Gen *tox* kodiert und ist ein monomeres 58kD- großes Protein (Greenfield et al., 1983). Die Expression des Toxins erfolgt, sobald Eisen der limitierende Faktor in der Umgebung des Bakteriums wird (Collier, 1975; Pappenheimer 1977). Das *Corynebacterium diphtheriae* infiziert den Bereich des Nasopharynx oder die

Haut, und das gram-positive Bakterium sekretiert das Exotoxin, das Diphtherie verursacht. Bei dem Diphtherietoxin handelt es sich um ein sogenanntes AB-Toxin, d.h. es besteht aus zwei Komponenten, einer A- und einer B-Kette (Falnes und Sandvig, 2000). Das Toxin bindet mit der B-Kette an einen Zelloberflächenrezeptor (Heparin-bindender-Epidermalen Wachstums-Faktor (HB-EGF)) und wird dann im Rahmen einer Endocytose in die Zelle transportiert (Naglich und Eidel, 1990, Naglich et al., 1992). Anschließend wird das Toxin in einem proteolytischen Prozess von der inaktiven- in eine aktive Form überführt. Bei den AB-Toxinen stellt die A-Untereinheit die enzymatisch aktive Komponente dar und modifiziert ein zelluläres Zielsubstrat, nachdem es in den cytosolischen Bereich gelangt ist. Das Diphtherietoxin gehört zu der Familie von bakteriellen Toxinen, die als ADP-Ribosyltransferasen bekannt sind. Seine Wirkungsweise resultiert im Transfer der ADP-Ribose auf einen posttranslational modifizierten Histidinrest (auch bezeichnet als Diphthamid), der in dem Elongationsfaktor-2 vorkommt (Honjo et al., 1968; Gill und Pappenheimer, 1971). Durch die Übertragung wird der Elongationsfaktor (EF-2) enzymatisch inaktiviert, und dieses führt zu einer Beendigung der Proteinsynthese und damit zum Zelltod (Leppla et al., 1980; Falnes und Sandvig, 2000).

Die Intoxikation einer Säugerzelle durch das DTA Toxin durchläuft vier charakteristische Phasen:

Zuerst findet eine Anbindung des Toxins an den Zelloberflächenrezeptor (Heparin-EGF) statt. Anschließend entstehen Cluster von gebundenen Rezeptoren in sogenannte „Coated pits“ und es folgt die Internalisierung der rezeptorvermittelten Endocytose. Daraufhin kommt es zur Acidifizierung der endocytotischen Vesikel durch die Membran assoziierte ATP-getriebene Protonenpumpe, zur Insertion der Transmembrandomäne und zur Abgabe der katalytischen Komponente (A-Kette) ins Cytosol. Hier katalysiert die A-Kette die ADP-Ribosylierung des EF-2 und führt zu folgender Reaktion:



Diese Reaktion endet in der irreversiblen Hemmung der Proteinbiosynthese und führt so zum Tod der Zelle (Leppla et al., 1980; Falnes und Sandvig, 2000). Bei dem Diphtherietoxin handelt es sich um ein sehr starkes Gift, und bereits ein Molekül kann eine Zelle töten (Yamaizumi et al., 1978).

1.7 Regulierbare Expressionssysteme

Die Möglichkeit der Expression von exogenen Genen in Säugerzellen (und in Tieren) bietet neue therapeutische Ansätze in der Medizin. Effektive Gentherapien, insbesondere bei der Verwendung toxischer Gene, erfordern die gerichtete und regulierbare Expression von therapeutischen Genen zur Behandlung von Krankheiten in den jeweiligen Zielzellen bzw. Geweben. Um eine große Anwendungsmöglichkeit zu bieten, müssen Genregulationstechniken eine stabile, schnelle, spezifische und reversible Induktion der Genaktivität ermöglichen. Daher hat ein optimales Genregulationssystem verschiedene Eigenschaften aufzuweisen:

1. **Spezifität:** das System muss sich indifferent zu endogenen Faktoren verhalten und sollte nur durch exogene, nicht toxische Induktoren aktivierbar sein
2. **Keine Interferenz:** die Komponenten des Systems dürfen keine Interaktionen mit zellulären Synthesewegen eingehen
3. **Induzierbarkeit:** im reprimierten Zustand sollte keine Basalaktivität vorhanden sein, und im aktivierten Zustand sollte es zu einer schnellen und hohen Genexpression des Zielgens kommen
4. **Applikation des Wirkstoffs:** das aktivierende Molekül sollte in der Lage sein, zügig alle Gewebe, die Blut-Hirn-Schranke und die Placenta passieren zu können
5. **Reversibilität:** ein multiples Schalten zwischen aktivierten und inaktivierten Zustand sollte je nach Gabe des Induktors möglich sein
6. **Dosisabhängigkeit:** die Aktivierung des Systems sollte sich proportional zur Dosisgabe verhalten

(Saez et al., 1997)

Gerade bei Therapien, die mit direkt wirkenden Toxinen arbeiten, ist eine regulierbare Expression des Proteins notwendig, um die Expression des Giftes erst in der transfizierten Tumorzelle zu starten. Im Fall dieser Arbeit sind die oben genannten Punkte 5 und 6 vernachlässigbar, da es sich im Falle der Expression des Diphtherietoxins um eine „Alles-oder-Nichts“-Reaktion handelt. Wurde das System einmal aktiviert, ist der Tod der Zelle nicht zu stoppen, und es sollte sich auch kein veränderter Zelltod aufgrund einer höheren Dosis an Induktormolekül feststellen lassen. Für andere Fragestellungen hingegen, wie z.B.

die Auswirkung der Expression bestimmter Gene während spezieller Entwicklungsphasen, könnten diese beiden Eigenschaften eines idealen regulierbaren Expressionssystems durchaus von Bedeutung sein. Die ersten Konstrukte der direkten Genexpression in Säugerzellen basierten auf endogenen zellulären Elementen, Promotoren und Enhancersequenzen, die auf exogene Signale oder auch Stress, wie Hitze, Hormone, Hypoxie, Cytokine und Metallionen reagierten (Rossi und Blau, 1998). Es zeigten sich bei all diesen Anwendungen sehr hohe Basaltranskriptionen und pleiotrope Effekte (Agha-Mohammadi und Lotze, 2000). Als Folge dessen wurde nicht nur das gewünschte Gen unter der Kontrolle des spezifischen Promotors exprimiert, sondern auch eine Vielzahl zellulärer Gene. Zudem wurde nur eine schwache Expression des Transgens im induzierten Zustand nachgewiesen. Obwohl Dosierung und Verabreichung solcher Induktoren in der Zellkultur relativ einfach durchzuführen sind, bereiten sie im Tiermodell die oben genannten Probleme. Um diese Probleme zu umgehen, wurden andere Expressionssysteme entwickelt, die Promotoren und Kontrollelemente nicht aus Säugern verwenden (Rossi und Blau, 1998). Die heute etablierten Systeme stellen chimäre Regulationssysteme dar, basierend auf pro- und eukaryotischen Elementen. Sie bieten eine größere Spezifität und werden durch den Einsatz natürlich vorkommender Promotoren erreicht. Es wurden verschiedene induzierbare Regulationssysteme entwickelt, die sich durch die Natur ihrer Inducer-Moleküle klassifizieren lassen. Zu diesen Inducer-Molekülen gehören Schwermetallionen, Antibiotika, Steroid-Hormone, IPTG (Isopropyl beta-D-Thiogalactosid) und Hitzeschock-Regulationselemente (Mills, 2001). Einige der Induktoren wirken jedoch toxisch auf Säugerzellen, oder sie beeinflussen die Expression endogener Gene, so dass ihre Verwendung eher von geringem Nutzen ist. In den letzten Jahren wurden vier verschiedene Regulationssysteme entwickelt, die durch Induktoren aktiviert werden, die an modifizierten Ligandenbindungsdomänen und intrinsischen oder extrinsischen DNA Bindungs- und Transaktivierungsdomänen binden und so ein regulierbares System ermöglichen (Gossen und Bujard, 1992; Wang et al., 1994; No et al., 1996; Rivera et al., 1996).

Bei den derzeit verwendeten Expressionssystemen handelt es sich um das Tetrazyklin-System, das Ecdysone™-System, das GeneSwitch™-System (RU486) und das Dimerizer-System (Rapamycin). Es gibt zwei weitere Systeme, die jedoch einige Nachteile in der Anwendung im Säugersystem zeigen, so dass sie in dieser Arbeit nicht verwendet wurden. Es handelt sich dabei um das Estrogen-System und das IPTG-Regulationssystem.

1.7.1 Das Tet-System

Das Tetrazyklin abhängige induzierbare System (Tet-System) gehört zu den ersten und populärsten Regulationssystemen und wurde von Gossen und Bujard im Jahr 1992 entwickelt (Gossen und Bujard, 1992). Das ursprüngliche Tet-System (Tet-off) wurde mehrfach modifiziert, hauptsächlich um die Basalexpression des Fremdgens im reprimierten Zustand zu reduzieren bzw. zu eliminieren.

1.7.1.1 Das Tet-off-System

Das System basiert auf den Elementen des Tetrazyklin Resistenz Operons – kodiert durch das bakterielle Transposon Tn-10. Die natürlich vorkommende Tetrazyklin kontrollierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) des *E.coli* Tet-Repressors (TetR) wurde mit der heterologen Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16 aus dem Herpes Simplex Virus fusioniert, um einen chimären Transaktivator (tTA) zu konstruieren. Dieses chimäre Protein ist in der Lage die Transkription in Säugerzellen von einem Tet-abhängigen Kontrollelement zu koordinieren. Das Tet abhängige Kontrollelement besteht aus 7 aufeinanderfolgenden Tet Operatorsequenzen, die mit dem aus dem Cytomegalievirus stammenden Minimalpromotor (CMV) fusioniert sind. In Abwesenheit des Tetrazyklins bindet der Transaktivator (tTA) an die Operatorsequenzen und aktiviert so die Transkription des gewünschten Gens. Die Zugabe von Tetrazyklin führt zur Repression. Im speziellen Fall der regulierbaren gentherapeutischen Anwendung ist eine dosierte Gabe des Induktormoleküls zu Aktivierung des Systems von Vorteil.

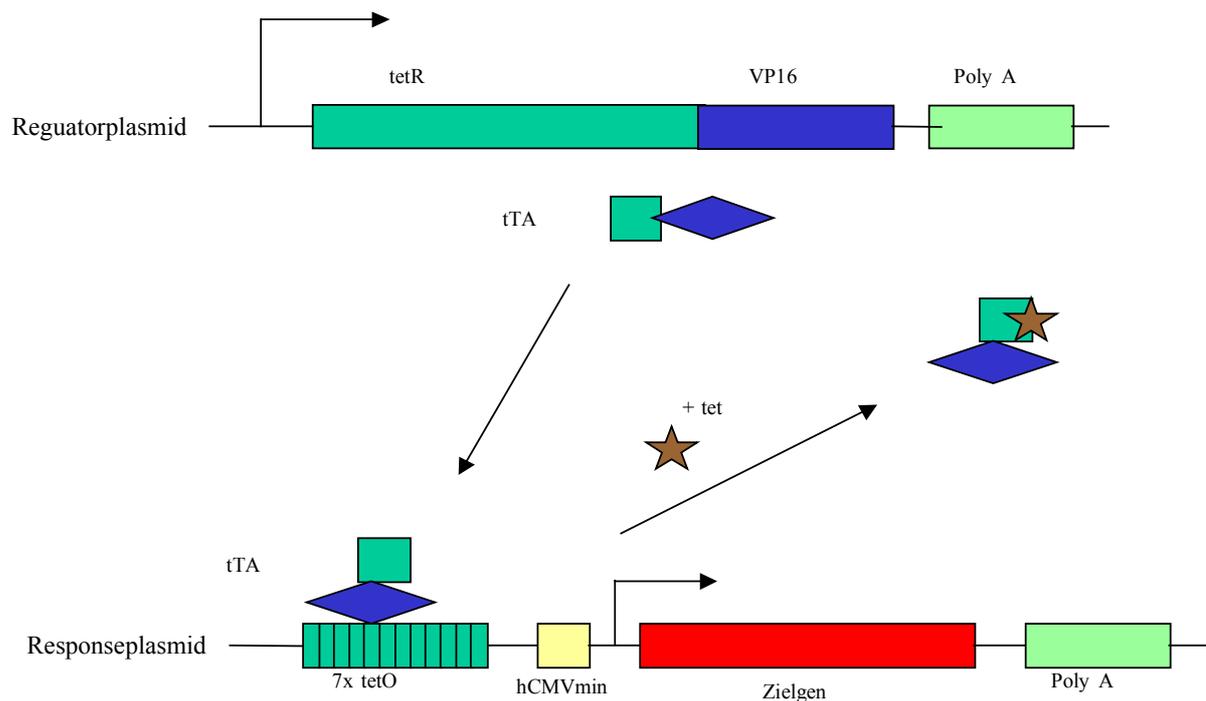


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Tet-off-Systems. Das Transaktivatorprotein tTA besteht aus dem Tet-Repressorprotein (tetR) und der VP16 Transaktivierungsdomäne (VP16) und wird vom Regulatorplasmid kodiert. In Abwesenheit des Induktormoleküls Tetrazyklin (tet) bindet tTA an das Tetrazyklin abhängige Kontrollelement (7x tetO), das aus 7 Operatorsequenzen besteht, im Responseplasmid. Dadurch wird die Transkription des Zielgens aktiviert. Sobald Tetrazyklin (tet) zum Medium gegeben wird, dissoziiert das Transaktivatorprotein von der Aktivierungssequenz und die Transkription des Zielgens wird gestoppt. (hCMVmin: minimaler humaner Cytomegalievirus Promotor; Poly A: Polyadenylierungssequenz). Modifiziert nach Agha-Mohammadi und Lotze, 2000.

1.7.1.2 Das Tet-on-System

Durch Mutagenese und gezielte Selektion wurde aus *E.coli* eine mutierte Variante des Tet-Repressorproteins (tetR) isoliert, die nur in Anwesenheit des Induktors an die tetO bindet und die Transkription auf diese Art aktiviert (Gossen et al., 1995). Dieses System wird als reverses Tet System (rtTA) bezeichnet und aktiviert die Transkription nur in Gegenwart von Doxzyklin (andere Tetrazyklin Derivate wirken schwächer). Die Verwendung der Tet-Systeme ist weit verbreitet und wird in *in vitro* und *in vivo* Versuchen verwendet. Für die Anwendung des Systems in dieser Arbeit sprach vor allem die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von Tetrazyklin-Derivaten, die eine Regulation im Gehirn ermöglicht (Mansuy und Bujard, 2000).

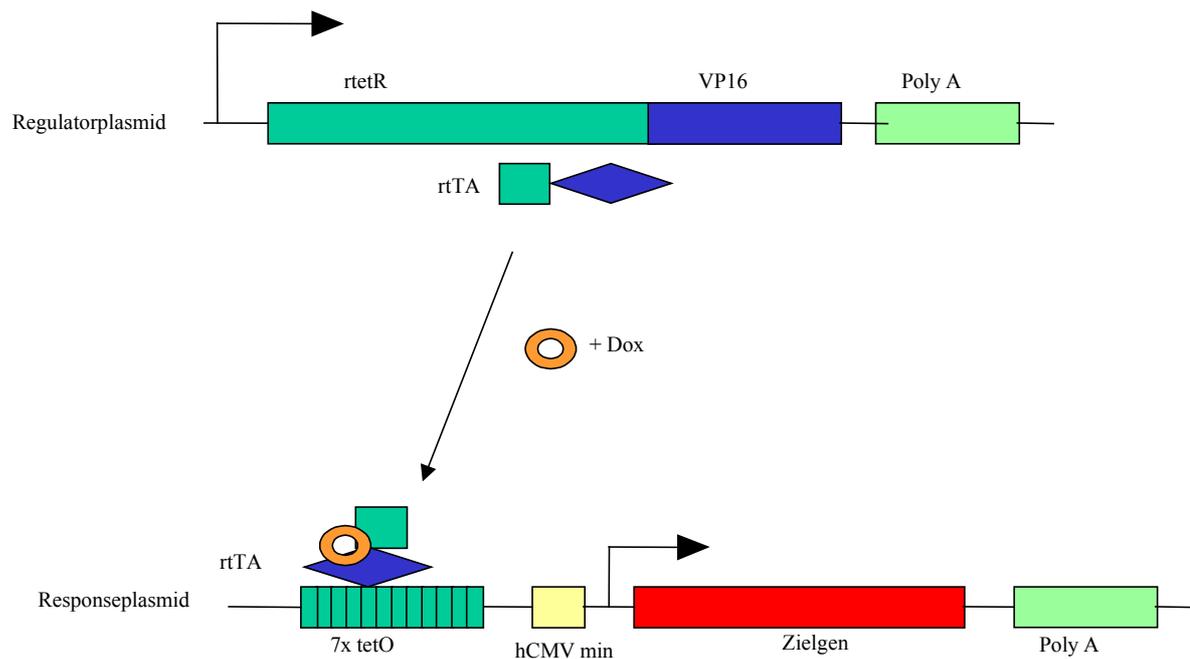


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Tet-on-Systems. Das Transaktivatorprotein *rtTA* besteht aus dem reversen Tet-Repressorprotein (*rtetR*) und der *VP16* Transaktivierungsdomäne (*VP16*) und wird vom Regulatorplasmid kodiert. In Anwesenheit des Induktormoleküls Doxozyklin (*Dox*) bindet *rtTA* an das Doxozyklin abhängige Kontrollelement (*7x tetO*), das aus 7 Operatorsequenzen besteht, im Responseplasmid. Dadurch wird die Transkription des Zielgens aktiviert. Sobald Doxozyklin (*Dox*) wieder entfernt wird, dissoziiert das Transaktivatorprotein von der Aktivierungssequenz und die Transkription des Zielgens wird gestoppt. (*hCMVmin*: minimaler humaner Cytomegalievirus Promotor; *Poly A*: Polyadenylierungssequenz). Modifiziert nach Mansuy und Bujard, 2000.

1.7.1.3 Die modifizierten Tet-on-System Varianten

Bei den verschiedenen Tet-System Varianten handelt es sich stets um modifizierte Formen des Tet-on-Systems.

1.7.1.3.1 Das Tet Silencer pTet-tTS System

Um unerwünschte Basisexpression zu unterdrücken, wurde das Silencerplasmid *pTet-tTS* konstruiert (Freundlieb et al., 1999). Es kodiert für einen Tetrazyklin-kontrollierten Transkriptionssilencer (*tTS*) und stellt ein Fusionsprotein aus dem *tet*-Repressor und der *KRAB-AB*-Silencing Domäne (*SD*) aus dem *Kid-1* Protein (*SDKid-1*) - einem starken Transkriptionsrepressor dar. Solange das Induktormolekül Doxozyklin fehlt, bindet *tTS* an die *tetO*-Sequenz im Tet-Response-Element (*TRE*) des Responseplasmids und blockiert die Expression des Gens. In Anwesenheit von Doxozyklin dissoziiert das *tTS*-Protein von der *TRE*-Region und die Expression des gewünschten Gens beginnt. Durch die

Verwendung des Silencerplasmids soll eine integrationsunabhängige Kontrolle der Genexpression in transienten und stabilen Transfektionen möglich sein.

1.7.1.3.2 Der tet-Transaktivator prtTA2S-M2

Durch gezielte Mutagenisierungsexperimente wurde das rtTA-Protein in seinen Eigenschaften verändert. Die Vorteile, die sich durch die Änderung ergeben sollen, sind: geringere Konzentrationen von Doxzyklin für die Induktion, eine höhere Stabilität in eukaryontischen Zellen und eine niedrigere Basalexpression (Urlinger et al., 2000).

1.7.1.3.3 Das Tet-regulierte Transaktivator und Repressor System pCMV-Krab-rtTA

Dieses modifizierte Tet-System beinhaltet einen Tetrazyklin - (bzw. seiner Derivate) induzierbaren Transaktivator und einen Tetrazyklin-regulierten Repressor, die beide den selben Promotor kontrollieren. Die transkriptionelle Repression wird durch ein chimäres Protein vermittelt, das aus dem N-Terminus der Krab-Repressor-Domäne des aus dem Säugertier stammenden Kox1-Proteins und dem Tet-Repressor besteht. Dieser Transrepressor bindet an die Tet-Operator-Sequenz in Abwesenheit des Induktormoleküls Doxzyklin, um so die basale Transkriptionsaktivität zu reduzieren. In Anwesenheit des Doxzyklins dissoziiert der Repressor von der Tet-Operator Sequenz und der reverse tTA (rtTA) bindet an die Sequenz. Daraufhin startet die Transkription des gewünschten Gens. Auch diese Modifikation des Tet-Systems soll sich durch eine besonders hohe Repressionsfähigkeit auszeichnen (Forster et al., 1999).

1.7.2 Das Ecdysone™-System

Das Ecdysone™-System basiert auf dem Insektensteroid Ecdysone und wurde so modifiziert, dass es im Säugersystem als Regulationssystem einsetzbar ist (No et al., 1996). Während der Metamorphose und Entwicklung von Insekten, wie z.B. bei *Drosophila* wird eine Kaskade von morphologischen Veränderungen durch das Hormon Ecdysone gesteuert. Dieses Hormon führt zur Degeneration des larvalen Gewebes und zur Bildung des adulten Habitus. Vermittelt wird dieser Prozess durch den funktionellen Ecdysone Rezeptor, einem Heterodimer des Ecdysone Rezeptors (EcR) und des Ultraspiracle Proteins (USP) (Mangelsdorf und Evans, 1995). Das Ecdysone –induzierbare System basiert auf einem Heterodimer des Ecdysone Rezeptors (VgECR) und des humanen Retinoid X Rezeptors (hRXR α), der an ein Hybrid Ecdysone Response Element (E/GRE)

bindet, sobald das synthetische Analogon zu Ecdysone – das Ponasterone A zugeführt wird (No et al., 1996). Der Ecdysone Rezeptor (VgEcR) stammt aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und wurde so modifiziert, dass er nun die VP16-Transaktivierungsdomäne aus HSV 1 enthält (Cress und Triezenberg, 1991; Sadowski et al., 1988, Triezenberg et al., 1988 a; Triezenberg et al., 1988 b). Der Retinoid Rezeptor ist das Säuger-Homolog des USP, dem natürlichen Partner des *Drosophila* Ecdysone Rezeptors (Yao et al., 1992, Yao et al., 1993). Desweiteren wurde die P-Box Region der VgEcR DNA bindenden Domäne so modifiziert, dass es zu einem Teil aus dem natürlichen Ecdysone Response Element und einem Teil des Glucocorticoid Response Elements besteht (Umesono und Evans, 1989). Dieses Hybrid Response Element reduziert mögliche Interaktionen mit endogenen Säuger-Rezeptoren, die mit dem natürlichen EcRE reagieren könnten (Forman und Evans, 1995). Ein weiterer Vorteil für die Anwendung in Säugerzellen ist die Tatsache, dass das Ecdysone Analog weder toxisch noch teratogen auf Zellen wirkt. Darüberhinaus wird es zügig abgebaut und ausgeschieden (No et al., 1996; Lafont et al., 1988). Die pharmakokinetischen Eigenschaften des Systems charakterisieren es als ein optimales, spezifisch induzierbares System – besonders geeignet für die Anwendung *in vivo*.

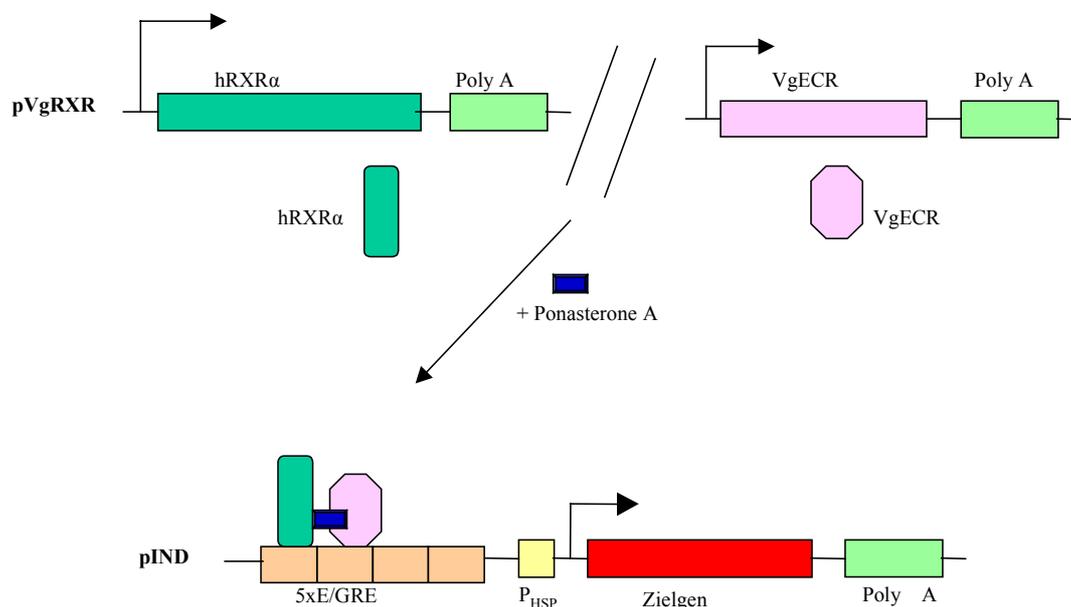


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Ecdysone™-Systems. Die beiden Komponenten (hRXRα und VgEcR) des Transaktivators werden vom Regulatorplasmid pVgRXR exprimiert. Die Zugabe des Induktormoleküls Ponasterone A führt zur Heterodimerisierung von hRXRα und VgEcR und zur Bindung an das Hybrid Resonance Element (5xE/GRE) im Responsevektor pIND. Die Transkription des Zielgens wird dann über den minimalen Hitzeschock Promotor (P_{HSP} aus *Drosophila*) aktiviert (PolyA: Polyadenylierungssequenz). Modifiziert nach Agha-Mohammadi und Lotze, 2000.

1.7.3 Das GeneSwitch™-System

Wang et al. (1994) haben ein System entwickelt, dass zur Expression von Zielgenen *in vivo* und *in vitro* in einem bestimmten Zielgewebe, zu einer bestimmten Zeit und durch die orale Gabe eines nicht toxischen, chemischen Produkts induziert werden kann (Wang et al., 1994; Wang et al., 1997a; Wang et al., 1997b). Dieses regulierbare System besitzt einen Transaktivator, der aus der VP16 Transaktivierungsdomäne des HSV1, einer Liganden-bindenden Domäne, einer mutierten Form des humanen Progesteron Rezeptors (bindet nicht länger Progesteron, sondern das Antiprogesteron Mifepristone) und der GAL4 DNA-Bindungsdomäne aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht. In Gegenwart des Mifepristones (RU486) bindet der chimäre Regulator an das Zielgen, das eine 17-mer GAL4 upstream Aktivierungssequenz (UAS) aufweist, und dieses führt zu einer effizienten Ligandeninduzierbaren Transaktivierung des Zielgens (Wang et al., 1997a; Burcin et al., 1998). Endogene Moleküle (wie z.B. Hormone), die in tierischen Geweben und Organen vorkommen, können das System nicht aktivieren (Wang et al., 1997a; Burcin et al., 1998). Ein wichtiger Aspekt ist, dass das System bereits auf sehr niedrige Konzentrationen an Mifepristone reagiert, die zu keiner endogenen Antiprogesterone oder Antigluococorid Aktivität führen (Burcin et al., 1998). Da das virale VP16 Protein zu einer Immunantwort führen kann und eine hohe Expressionsrate des Proteins toxisch auf Zellen wirken kann (Ptashne und Gann, 1990; Triezenberg et al., 1988a, Triezenberg et al., 1988b) ersetzten Burcin und Mitarbeiter die Domäne gegen eine humane Aktivierungsdomäne, die 65 Sequenz- einem Mitglied der humanen NFκB-Familie (Burcin et al., 1998). Hierbei handelt es sich um einen Partner des NFκB im humanen RelA heterodimeren Transkriptionsfaktor, einem starken Aktivator der Transkription (Schmitz und Baeuerle, 1991). Im Vergleich zeigten beide Regulatoren eine ähnliche Induzierbarkeit nach Gabe des RU486 (Burcin et al., 1999).

Die Dosis des Induktors RU486 liegt mit 0,1-0,5mg/kg weit unter dem Level, der für eine antiprogesterone Wirkung, z.B. das Beenden einer Schwangerschaft von 10mg/kg notwendig wäre (Burcin et al., 1999). Das Medikament wird bereits zur täglichen Behandlung anderer Erkrankungen (z.B. Meningiom) beim Menschen eingesetzt, und diese Konzentrationswerte liegen ebenfalls weit über dem für eine Induktion notwendigen Wert (Grunberg et al., 1991; Brogden et al., 1993). Daher ist RU486 durchaus für die gentherapeutische Anwendung im Menschen geeignet.

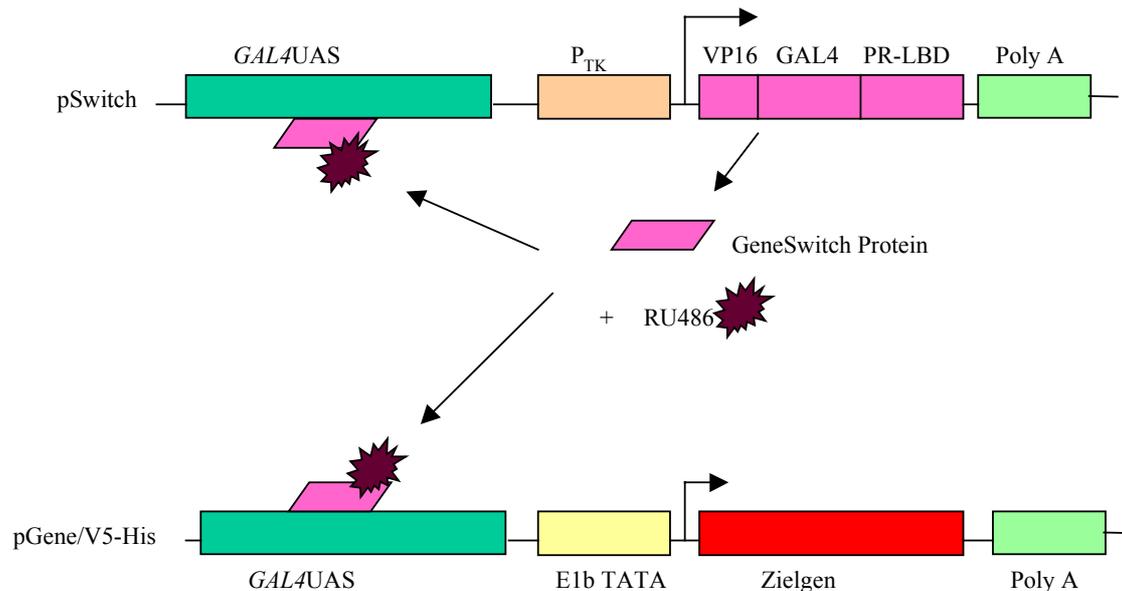


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des GeneSwitch™-Systems. Das Transaktivator-Protein (GeneSwitch Protein) besteht aus der VP16-Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus (VP16), der aus der Hefe stammenden GAL4 DNA-Bindungssequenz (GAL4) und der mutierten humanen Progesteron-Liganden Bindungssequenz (PR-LBD). Die Zugabe des Induktors RU486 aktiviert das Protein an die Konsenselemente GAL4UAS der GAL4 DNA-Bindungssequenz im Responseplasmid pGene/V5-His und auch im Regulatorplasmid pSwitch zu binden. Der GeneSwitch Protein-RU486 Komplex aktiviert dann die Transkription über den Hybridpromotor (GAL4 UAS und der adenoviralen E1b TATA Box) des Zielgens. Zusätzlich wird die Expression des GeneSwitch Regulatorproteins über die Aktivierung eines weiteren Hybridpromotors, der aus der GAL4 UAS und dem minimalen Promotor des Thymidinkinase Gens (P_{TK}) des Herpes Simplex Virus besteht, aktiviert. (Poly A: Polyadenylierungssequenz). Modifiziert nach Invitrogen, „GeneSwitch™ System“ Instruction Manual, 1999 und Agha-Mohammadi und Lotze, 2000.

1.7.4 Das Dimerizer-System

Die Aktivierung der Genexpression von Eukaryonten wird durch Anbindung von Transkriptionsfaktoren an Zielgene induziert. Transkriptionsfaktoren sind bifunktionelle Proteine, die spezifische DNA Sequenzen in der Nähe von Zielgenen erkennen und daraufhin die Transkriptionsmaschinerie der Zelle aktivieren. Zwei Domänen sind hierfür verantwortlich, sie sind funktionell unterschiedlich und können als Sequenzspezifischer Transkriptionsaktivator rekonstruiert werden - sogar wenn sie als individuelle Proteine exprimiert werden und durch eine nicht kovalente Interaktion miteinander verbunden werden. Dieser Umstand wurde bei der Konstruktion einer Methode zur kontrollierten Gentranskription ausgenutzt. Die Strategie basiert auf der Verwendung von chemischen Induktoren der Dimerisierung - sogenannte Dimerizer, um die Interaktion von Transkriptionsfaktorproteinen zu induzieren. Ein solches Dimerizermolekül weist zwei

verschiedene Motive auf, die jeweils mit hoher Affinität an bestimmte Proteinstrukturen binden können. Durch die Fusion solcher Module an eine DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne, lässt sich ein funktioneller Transkriptionsfaktor rekonstruieren. Das Original Dimerizer-System wurde im Jahr 1996 von Rivera und Kollegen konstruiert (Rivera et al., 1996). Das Dimerizer-System basiert auf der transkriptionellen Kontrolle von Rapamycin (bzw. eines Analogons), das die Heterodimerisierung von zwei funktionellen Regionen zweier zellulärer Proteine, dem Immunophilin FK506 bindenden Protein (FKBP) und dem Homolog der Lipidkinase FRAP- bezeichnet als FRB, zu einem bipartiellen Transkriptionsfaktors vermittelt. Der bifunktionelle Transkriptionsfaktor besteht aus zwei chimären humanen Peptiden. Die DNA-bindene Domäne ZFHD1 wurde an das FKBP 12 fusioniert und wird nicht von anderen endogenen Transkriptionsfaktoren erkannt. Das zweite Peptid besteht aus der Aktivierungsdomäne p65 des humanen NFκB Faktors fusioniert mit dem zellulären Protein FRAP. Durch die Gabe des Rapamycins (oder eines Analogons) bindet das ZFHD1-FKBP Protein an das FRB-p65 Fusionsprotein und bildet einen Komplex, der sich an die ZFHD 1-Bindungsseite anlagert und die Expression der dahinter lokalisierten Gene induziert. Rapamycin als Induktormolekül ist für die Anwendung einer Gentherapie beim Menschen nicht geeignet, da es sich hierbei um ein Immunsuppressivum handelt. Aus diesem Grund wurden von der vertreibenden Firma „Ariad“ synthetische nicht immunsuppressive Derivate zum Rapamycin konstruiert, wie z.B. AP1510 (Quelle: www.ariad.com/reagent.html).

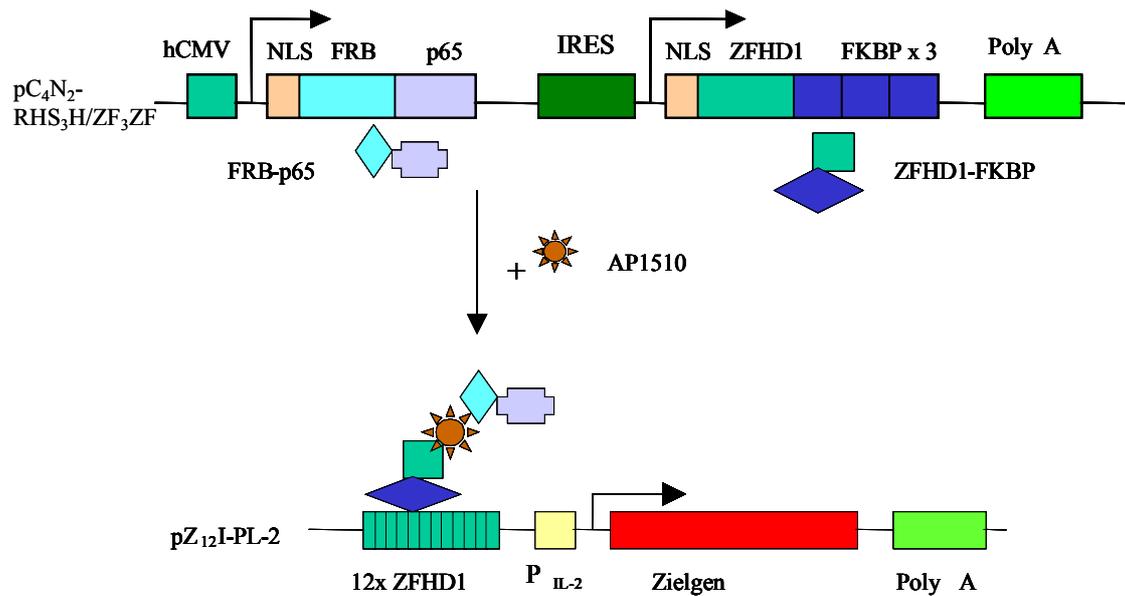


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Dimerizer-Systems. Der bipartielle Transkriptionsfaktor des Systems besteht aus 2 chimären humanen Peptiden, einer DNA-Bindungsdomäne (ZFHD1 und FKBPx3) und einer Aktivierungsdomäne (FRB und der p65-Domäne des humanen NF κ B-Faktors), die beide vom Regulatorplasmid (pC₄N₂-RHS₃H/ZF₃ZF) kodiert werden. Das Induktormolekül AP 1510 induziert die Dimerisierung der beiden Fusionsproteine und führt zur Bindung an die DNA-Bindungssequenz (12x ZFHD1) im Responseplasmid (pZ₁₂I-PL-2). Dadurch wird die Transkription des Zielgens aktiviert. (Poly A: Polyadenylierungssequenz) Modifiziert nach Ariad „Argent™ Regulated Transkription Plasmid Kit“, Instruction Manual, 2001.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Eine Gentherapie zur Behandlung maligner Erkrankungen basierend auf dem Einsatz von direkt wirkenden Toxinen stellt einen neuen Ansatz der Therapie dar. In dieser Arbeit wurde der Einsatz eines solchen Toxins (A-Kette des Diphtherietoxins) in Kombination mit den aktuellen Möglichkeiten der stringent regulierten Genexpression zur Therapie von Tumorzellen getestet. Die Voraussetzung für einen optimalen Einsatz ist vor allem die stringente Kontrolle der Genexpression mit möglichst wenig Nebenwirkungen für die Säugerzellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die derzeit zur Verfügung stehenden Regulationssysteme (Tet-Systeme (Tet-on/ Tet-off und deren modifizierten Formen), GeneSwitch™-System, Ecdysone™-System und Dimerizer-System) für die regulierte Expression des Diphtherietoxins in transienten und stabilen Transfektionen in Gliomzellen getestet und miteinander verglichen werden. Darüberhinaus sollte nach Möglichkeit auch die Einsatzfähigkeit des in *in vitro* Untersuchungen als optimales System charakterisierten Regulationssystems in *in vivo* Untersuchungen getestet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion einer regulierbaren Gioblastomzelllinie für das cytotoxische Diphtherietoxin. Die etablierte Zelllinie sollte im induzierten Zustand das Diphtherietoxin exprimieren und somit absterben. Im nicht induzierten Zustand jedoch sollte kein Zelltod stattfinden und somit das Toxin erfolgreich reprimiert werden. Dazu sollten die derzeit für die Gentherapie erfolgreichsten verwendbaren Regulationssysteme in ihrer Eignung der Regulationsfähigkeit des Diphtherietoxingens getestet und nach Möglichkeit eine stabil transfizierte Zelllinie konstruiert werden, die sich beliebig induzieren lässt. Sollte sich ein Zellklon mit entsprechenden Eigenschaften isolieren lassen, sollte dieser mit verschiedenen biochemischen Methoden hinsichtlich des induzierten Zelltods charakterisiert werden. Sollte dieser Schritt gelingen, so war die Untersuchung der Regulationsfähigkeit *in vivo* zu testen. Dazu sollten Nacktmäuse die klonierte Zelllinie implantiert bekommen und das Regulationssystem durch administrative Gabe des Induktormoleküls induziert werden. Die Gruppe, die den Aktivator appliziert bekam, sollte mit einer Kontrollgruppe hinsichtlich des veränderten Tumorwachstums verglichen werden. Daneben soll eine Reporterzelllinie konstruiert werden, an der die Effizienz und die Kinetik der induzierbaren Genexpression analysiert werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte für das Arbeiten mit DNA, Proteinen und Bakterien

Autoklav, HV85	BPW Labortechnik, Süßen
Brutschrank Typ B6	Heraeus, Hanau
Eismaschine, AF10 ASB 0600	Scotsman, Mailand
Elektrophoresekammer, vertikal	BioRad Laboratories, München
ELISA-Reader	BioRad Laboratories
Geldokumentationsanlage	UVP, Cambridge England
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, England
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf, Hamburg
Ionenaustauscher	Diatec, Hallstadt
Magnetrührer	IKA, Labortechnik, Staufen
Mikrowellenherd (Priveleg 8017)	Quelle-Schickedanz, Fürth
Multipette	Eppendorf
pH-mV-Meter pH526	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf
Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Schüttelinkubator	UniEquip GmbH, Martinsried, München
<i>Li-Cor®</i> - Sequenziergerät Modell 4000	MWG Biotech, Ebersberg
Spannungsgeräte	BioRad Laboratories
Spektrophotometer	BioRad Laboratories
Sterilbank	Heraeus
TechMate™ Horizon	DAKO, Hamburg
Thermocycler (MultiCycler PTC 200 und PTC 225 Tetrad)	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Tissue-Tek VIP	Firma Vogel, Deutschland
Videodokumentationsanlage (Video Graphik Printer)	Sony, USA
Vortex, Genie II	Scientific Industries, Inc., New York, USA

Waagen

Waage, BP 3100S	Sartorius, Göttingen
Feinwaage, AE120	Bosch, Deutschland

Zentrifugen

BiofugeStratos	Heraeus
Minifuge	Heraeus
Eppendorf 5414 und 5415	Heraeus
Kühlzentrifuge	Heraeus
Megafuge 1.0	Heraeus
Ultrazentrifuge	Heraeus
SS34 (Rotor für die Megafuge 1.0)	Heraeus
Wasserbäder (Schüttelwasserbad)	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel

2.1.2 Geräte für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO ₂ - Atmosphäre, Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 405M	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Olympus Axiovert IX 50	Zeiss, Deutschland
Kyro-Dewar-Gefäß	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Lichtmikroskop ID03	Zeiss, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank, Lamina Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank	Teclab, USA
Fotokamera Olympus DP 10	Olympus, Hamburg
Film, Ektachrome	Kodak, Stuttgart
Hydrotech Vakuum Pumpe	BioRad, München

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a.. Alle Lösungen wurden in Wasser der Qualität MilliQ angesetzt.

Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	BioRad, München
Agar-Agar	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose electrophoresis grade	ICN, Meckenheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Carboxymethylcellulose Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth GmbH, Karlsruhe
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Nestle, Frankfurt/M.
Methylenblau	Roth GmbH, Karlsruhe
MTT (Tetrazolium Salz 3,[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan (Tris)	ICN, Meckenheim
Tween 20, 80	Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden in Reinheitsgrad p.A. von den Firmen Merck und Roth bezogen.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien, Proteinen und eukaryotischen Zellen

Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Kryoröhrchen für Zellen	Greiner
Plastikpipetten, steril (1, 5, 10, 25ml)	Greiner
Plastikröhrchen, steril (15, 50ml)	Greiner
Reaktionsgefäße (0.5; 1.5; 2ml)	Sarstedt; Braunschweig
Sterile 6-, 12, 24, 48, 96-Loch- Platten	Greiner
Sterilfilter Minisart NML, 0,45µm	Satorius AG, Göttingen
Spritze, steril (1, 5, 10, 20ml)	Braun, Melsungen
Zentrifugenbecher (Polypropylen)	Beckmann, München

2.1.5 Kits zur Bearbeitung von DNA

MiniElute Gel Extraction	Qiagen, Hilden
Qiaspin-Plasmid Mini Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Endofree Maxi Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification	Qiagen
DNeasy Tissue Kit	Qiagen
SequiTherm™ Excel II DNA-Sequenzier Kit LC (für 25cm-41cm Gele)	Epicentre Technologies, Madison USA

2.1.6 Kits zur Transfektion von DNA in eukaryotischen Zellen

Effectene™ Transfection Kit	Qiagen
-----------------------------	--------

2.1.7 Kits zur Bestimmung der Zellproliferation und des Zelltods

Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
MTT-Proliferation-Cell Assay	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Galacto-Light™ & Galacto-Light Plus™	Tropix, PE Biosystems USA
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH

2.1.8 Verbrauchsmaterialien für Western Blot Analysen

Immobilon™-P (Transfer Membran)	Millipore, Bedford/USA
Nitrocellulose Membran (Hybond ECL, Porengröße 0,2µm, 30cmx 3m)	Schleicher & Schnell, Dassel
Whatman 3MM Papier	Whatman, Kent/UK
Röntgenfilm Biomax MR	Kodak, Stuttgart
Semidry-Blot-Apparatur	BioRad, München
β-Galaktosidase-Referenzprotein	BioRad, München
ECL-Detektionskit (RPN 2108)	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.9 Antikörper

Anti-GFAP: Dieser Antikörper (Subklasse Isotyp IgG1) ist gegen das saure Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein/GFAP) gerichtet, das in Gliazellen als Intermediärfilament lokalisiert ist. Mit Hilfe des Antikörpers wird das Zytoplasma von Astrozyten und deren fibrilläre Strukturen angefärbt. Er wurde in einer Konzentration von 1:4000 im Automaten für immunhistochemische Färbungen TechMate™ Horizon unter der Verwendung des DAKO ChemMate™ Detection Kit eingesetzt. Sowohl der Antikörper als auch das Kit wurden von DAKO, Hamburg bezogen.

Anti-beta-Galaktosidase: Dieser monoklonale Antikörper (Subklasse IgG2 a(k)) stammt aus Maushybridomzellen. Er wurde von der Firma Promega bezogen.

Anti-Mouse IgG-Peroxidase gekoppelt: Dieser Sekundärantikörper dient zur Detektion des Primärantikörpers und wurde von der Firma Sigma bezogen.

2.1.10 Antibiotika, Enzyme, Standards und Induktionsmoleküle

Antibiotika

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva
Neomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Geneticin® (G418)	Gibco BRL
Penicilin/Streptomycin	Gibco BRL
Zeozin	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin	Invitrogen
Tetracyclin	Merk, Darmstadt

Enzyme

Klenow-Fragment	Boehringer Mannheim
T4-DNA Ligase	Biolabs, Heidelberg
T4-Polymerase	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Boehringer Mannheim

Standards

SmartLadder	Eurogentec, Seraing
Rainbow „coloured protein“ MG Standard	Amersham, Braunschweig

Induktionsmoleküle

Molekül	Anwendung	Vertreiber	System
Mifepristone (RU486)	<i>in vitro</i>	Invitrogen, Karlsruhe	GeneSwitch™-System
Mifepristone (RU486)	<i>in vivo</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	GeneSwitch™-System
Doxycycline	<i>in vitro</i>	Clontech	Tet-on-System
Tetracycline	<i>in vitro</i>	Clontech	Tet-off-System
Ponasterone	<i>in vitro</i>	Invitrogen	Ecdysone™-System
AP 1015	<i>in vitro</i>	Ariad, USA	Dimerizer-System

2.1.11 Verbrauchsmaterialien für Tierversuche

Histoacryl (Gewebekleber aus Enbucrilat)	Braun, Aesculap AG Tuttlingen
Ketanest ((S)-Ketaminhydrochlorid)	Parke-Davis GmbH Berlin/ Freiburg
NaCl (0,9% Lösung, steril)	Fresenius AG, Bad Homburg
Rompun (Xylazin)	Bayer AG, Leverkusen

2.1.12 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Standardlösungen

Agarosegel-Probenpuffer (DNA-Probenauftragungspuffer)

10M Tris, 1mM EDTA, 50% (w/v) Glycerin, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2

50x TAE-Puffer

2M Trisbase, 1M Essigsäure, 100mM EDTA, pH 8.1

10x TBE-Puffer

890mM Tris, 890mM Borsäure, 20mM EDTA, pH 8,1

Kristallviolett-Lösung

5g Kristallviolett, 2g Natriumacetat à 1000ml H₂O bidest; pH 3.6 mit und gefiltert (Whatman Papier).

4% PFA

20g Paraformaldehyd wurden in 300ml H₂O bidest bei 55-60°C gelöst, dann wurde tropfenweise 1M NaOH zugegeben bis die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde dann auf RT abgekühlt und der pH-Wert mit NaOH auf 7.0 eingestellt. Danach wurden 100ml 0.5M Natriumphosphat Puffer pH 7.0 dazugegeben und mit H₂O bidest auf 500ml aufgefüllt.

Methylenblau-Lösung zur Färbung eukaryotischer Zellen

1,25% Glutaraldehyd (Stammlösung 25%), 0,06% Methylenblau (Stammlösung 2% (w/v) in Wasser) in PBS-Puffer.

2.1.13 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
pcDNA3.1/zeo	Invitrogen	Expressionsplasmid, kodiert Zeozin-Resistenz
pcDNA3.1/neo	Invitrogen	Expressionsplasmid, kodiert Neomycin-Resistenz
pC ₄ N ₂ -RHS ₃ H/ZF ₃	Ariad	Transaktivatorplasmid (Dimerizer-System)
pZ ₁₂ I-PL-2	Ariad	Responsevektor/ Klonierungsvektor
pZ ₁₂ I-DTA-2	Ariad/ S.Püttmann	Responsevektor kodiert DT-A
pZ ₁₂ I-hGH-2	Ariad	Responsevektor kodiert humanen Growthfactor
pZ ₁₂ I-lacZ-2	Ariad/ S.Püttmann	Responsevektor kodiert lac-Z
pVgRXR	Invitrogen	Transaktivatorplasmid (Ecdysone-System)
pIND	Invitrogen	Responsevektor (Ecdysone-System)
pIND-DTA	Invitrogen/ S.Püttmann	Responsevektor kodiert DT-A
pIND/lacZ	Invitrogen	Responsevektor kodiert lac-Z
pSwitch	Invitrogen	Transaktivatorplasmid (GeneSwitch-System)
pGene/V5-HisA	Invitrogen	Responsevektor
pGene/V5-HisA-DTA	Invitrogen/ S.Püttmann	Responsevektor kodiert DT-A
pGene/V5-His/lacZ	Invitrogen	Responsevektor kodiert lac-Z
pUHD 15-1	Gossen, M.	Tet-off Transaktivator Plasmid
pUHD 17.1	Gossen, M.	Tet-on Transaktivator Plasmid
pUHD 10.3	Gossen, M.	Tet-System Response Plasmid
pUHD-DTA	Paulus, W.	Responsevektor kodiert DT-A
pTet-tTS	Clontech	Silencerplasmid des Tet-on-Systems, soll unregulierte Genexpression im inaktiven Zustand verhindern
pUHrT62-1	Knott, A. und Hillen (Erlangen)	Tet-on-Plasmid kodiert Silencerdomäne, soll unregulierte Genexpression im inaktiven Zustand verhindern
pCMV-Krab-rtTA	Hillen	Tet-on Plasmid kodiert Silencerdomäne, soll unregulierte Genexpression im inaktiven Zustand verhindern
pUHD-13.3	Gossen, M	Reporterplasmid des Tet-Systems (Tet-on + Tet-off), kodiert Luciferase
pSVluc	Promega	Expressionsplasmid, kodiert Luciferase
pMPSGGFP	Hahnenkamp, A.	Expressionsplasmid, kodiert GFP

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Plasmide

2.1.14 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - → -3')
Sequenzierprimer (MWG Biotech, Ebersberg): am 5'-Ende mit Farbstoff IR41 bzw. IRD 800 markiert für Infrarot- Detektion Sequenz: IR41-5'-xxxxxxxx-3'	
Ecdysone Forward Primer	5' - TCTGAATACTTTCAACAAGTTAC-3'
pcDNA3.1/BGH Reverse Primer	5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
pGene Forward Primer	5' - CTGCTATTCTGCTCAACCT-3'
Dimerizer Forward Primer	5' - AGTAACCTCAACTCCTG-3'
Dimerizer Reverse Primer	5' - TCATGTCTGCTCGAAGC-3'
Sequenzen der verwendeten PCR-Primer	
C6-DTA Klone (PCR) Forward	5' - GCTGATGATGTTGTTGATTC-3'
C6-DTA Klone (PCR) Reverse	5' - TCCTGCACAGGCTTGAG-3'

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

2.1.15 Medien, Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Saline (1x PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,5g/l)	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Es wurden in der Arbeit folgende Bakterienstämme verwendet:

DH5 α F⁻/endA1hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 recA1gyrA(Nal^r) relA1 6(lacIZYA-argF)
UI69 deoR (80dlac (lacZ) M15 (Woodcock et al., 1989)

XL2-blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1hsdR17 supE44 relA1 lac [F[']proAB lacL^qZ Δ M15
Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a (Bullock et al., 1987)

2.2.2 Nährmedien für *E. coli*

Die Nährmedien wurden bei 121°C für 20 min. autoklaviert und bei RT gelagert. Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2 YT-Medium

16g/l Pepton tryptisch verdaut, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, ad 1l H₂O

2YT-Agar

16g/l Pepton tryptisch verdaut, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 15g Agar ad 1l H₂O

2YTA-Medium

2YT-Medium, Ampicillin (50mg/l)

2YTK-Medium

2YT-Medium, Kanamycin (70mg/l)

2YTZ-Medium

2YT-Medium, Zeozin(25mg/l)

SOC Medium

20mM Glucose, 20g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 0.5g/l NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, pH7.5

2.2.3 Anzucht von *E. coli*

Die transformierten *E. coli* Stämme wurden von einer Agarplatte in Flüssigmedium angeimpft. Dauerkulturen wurden angelegt, indem 500µl einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen *E. coli* Kultur mit 500µl sterilem Glycerin versetzt und gemischt wurde. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

2.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Bakterien sind in einem geringem Umfang in der Lage, DNA aus ihrer Umgebung selbstständig aufzunehmen. Durch die Behandlung von *E. coli* mit Calciumchlorid (CaCl_2) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, DNA aufzunehmen um ein Vielfaches.

Durchführung

Chemisch kompetente *E. coli* Bakterien wurden nach der Calciumchloridmethode hergestellt (Dagert und Ehrlich, 1979). 3ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Am folgenden Tag wurden mit dieser Vorkultur 500ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD_{590} von 0.375 geschüttelt. Die Zellen wurden auf vorgekühlte Falconröhrchen verteilt und für ca. 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei $1700\times g$ für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml eiskaltem CaCl_2 (0,1M CaCl_2) aufgenommen. Die Zellen wurden zweimal für 5min bei $1100\times g$ zentrifugiert und das Pellet zunächst in 10ml, dann in jeweils 3ml CaCl_2 aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in 300µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.5 Transformation von *E. coli*

Als Transformation wird das Einbringen bzw. die Aufnahme fremder DNA in eine Empfängerzelle bezeichnet.

Durchführung

Zur Transformation von Bakterien wurden kompetente *E. coli XLI blue* und *DH5 α* verwendet. Die kompetenten Zellen (100µl) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1ng supercoiled Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Heatshock bei 42°C für 90sec. Darauf wurden die Zellen 5min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500µl SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und für 45min

bei 37°C im Schüttler inkubiert (*outgrowth* zur Proteinexpression des Antibiotikaresistenz vermittelnden Proteins). Die Transformationsansätze wurden schließlich auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E coli*

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA für Transfektionen eukaryotischer Zellen, Sequenzierungen oder Klonierungen wurden die entsprechenden Kits der Firma Qiagen verwendet. Für einige Transfektionen wurde die DNA mittels Endofree Maxi Kit aufgereinigt, um toxische Stoffwechselprodukte der Bakterien zu entfernen und somit die Transfektionseffizienz der eukaryotischen Zellen zu steigern. Die Präparationen der Plasmid-DNA erfolgte aus Übernachtskulturen mit einem Volumen von 5ml (Minipräp) oder 200ml (Maxipräp) mit der Hilfe der Qiagen Plasmidkits nach der Standardvorschrift.

2.2.6.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Plasmid Handbook, 3/96)

In einer Minipräparation werden kleine Mengen an Plasmid-DNA isoliert, die zu Analysezwecken ausreichen. Alle eingesetzten Puffer wurde aus dem Qiaspin-Plasmid Mini Kit verwendet.

Durchführung

5ml Antibiotika haltiges 2YT-Medium wurden mit einer Bakterienkultur angeimpft und für ca. 12-16h bei 37°C im Schüttler inkubiert. 3ml dieser Bakterienkultur wurden anschließend für 5min bei 10.000xg in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 250µl Puffer 1 resuspendiert und durch die Zugabe von 250µl Puffer 2 erfolgte die 5 minütige Lyse der Bakterienzellen. Anschließend wurden 350µl des Puffers N3 zugefügt, die Lösung kurz gemischt und schließlich für 10min bei 10.000xg in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Qiaquick-Säulen gegeben und erneut für 60sec zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 750µl Puffer PE (Waschpuffer) gefüllt und wieder 60sec zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule 60sec zentrifugiert um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Anschließend ist die Säule auf ein 1,5ml Eppendorf-Zentrifugenröhrchen plziert und mit 50µl EB-Puffer (Elutionspuffer) befüllt worden. Nach einer Minute wurde die Säule erneut zentrifugiert. Das Eluat enthielt die Plasmid-DNA.

2.2.6.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Plasmid Purification Handbook, 01/1997)

Maxipräparationen wurden durchgeführt, um größere Mengen an Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben, wie sie z.B. für Transfektionen von Säugerzellen benötigt werden.

Durchführung

200ml Antibiotika haltiges 2YT-Medium wurden mit einer Vorkultur (3ml) angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Kultur bei 1.700xg für 15min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml Puffer P1 resuspendiert und sofort mit 10ml Puffer P2 versetzt, mehrmals invertiert und 5min bei RT inkubiert. Dann wurden 10ml Puffer P3 zu den Proben gegeben, sofort vorsichtig 4-6x invertiert und anschließend für 15-20min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 10.000xg im Sorvall SS-34 Rotor. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter gegeben und der Durchfluss auf die mit 10ml Puffer QBT equilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde 2x mit je 30ml Puffer QC gewaschen und die DNA schließlich mit 15ml Puffer QF eluiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch die Zugabe von 10.5ml Isopropanol und einer 30minütigen Zentrifugation bei 10.000xg bei 4°C. Das Pellet wurde mit 5ml 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 10.000xg für 15min bei 4°C abzentrifugiert.

Das Pellet wurde für 5min an der Luft getrocknet und dann in 450µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration und Qualität wurde sowohl spektrometrisch als auch über eine Gelelektrophorese bestimmt.

2.2.7 Enzymatische Modifizierung von DNA

2.2.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonuklasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden eingesetzt, um Plasmide anhand spezifischer Restriktionsmuster zu identifizieren und zur Herstellung definierter DNA-Fragmente für Klonierungsansätze. Diese Enzyme hydrolysieren die Bindung benachbarter Nukleotide an spezifischen 4-8bp (meist palindromischen) langen Nukleotidsequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA und spalten so die DNA. Einige Enzyme spalten die DNA exakt im mittleren Teil ihrer Erkennungssequenz, so dass glatte Enden (blunt ends) entstehen. Andere Restriktionsendonukleasen spalten die DNA-Doppelstränge nicht genau

an derselben Stelle, sondern versetzt, gewöhnlich um zwei oder vier Nukleotide, so dass die DNA Fragmente an ihren Enden kurze überstehende sog. klebrige oder kohäsive Einzelstrangabschnitte (sticky ends) aufweisen. Ihre Aktivität wird in Units angegeben, wobei 1 Unit der Menge eines Restriktionsenzym entspricht, die in einer Stunde 1 μ g Lambda-DNA vollständig verdaut.

Ein typischer analytischer 10 μ l-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen

10xPuffer	1 μ l
10x BSA (falls nötig)	1 μ l
H ₂ O bidest	6-7 μ l
DNA (100-200ng/ μ l)	1 μ l
Restriktionsenzym (1-2U/ μ l)	1 μ l

Ein präparativer 30 μ l-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen

10xPuffer	3 μ l
10x BSA (falls nötig)	3 μ l
DNA (100-200ng/ μ l)	23-26 μ l
Restriktionsenzym (10U/ μ l)	1 μ l

Die Inkubationszeit für analytische Ansätze lag bei 1-3h und die der präparativen Ansätze bei ca. 24h. Nach der Restriktion wurde das Enzym (bei nicht thermostabilen Restriktionsenzymen) durch Erhitzen auf 65°C für 20min inaktiviert.

2.2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation eines linearisierten Vektors mit kompatiblen Enden bei Klonierungen zu vermeiden, wurden durch die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (Calf intestine Phosphatase CIP, NEB) die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch entfernt (Ullrich et al., 1977). Die Dephosphorylierung wurde immer im Anschluss an eine enzymatische Reaktion mit Restriktionsenzymen durchgeführt.

Die Alkalische Phosphatase ist in allen Puffern der Restriktionsenzyme aktiv und konnte direkt zu dem Ansatz [1 μ l CIP (1U/ μ l)] gegeben werden. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.7.3 DNA-Ligation

Linearisierte DNA-Moleküle lassen sich durch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3`Hydroxyl- und 5`Phosphatenden miteinander verbinden. Die T4-DNA Ligase katalysiert die Verknüpfung unter Hydrolyse von ATP.

Durchführung

Ein typischer 10µl-Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1µl
Fragment 1/Vektor (20-50ng/µl)	1-3µl
Fragment 2/ Insert (50ng/µl)	2-4µl
H ₂ O bidest	1-5µl
T4-DNA-Ligase (400U/µl)	1µl

Für die Insertion eines Fragments in den Vektor wurde das Fragment in 4-fach molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 16°C für ca. 10-15h.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration einer Probe wurden die folgenden Methoden in dieser Arbeit angewendet.

Photometrische Messung

Die photometrische Messung der DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260nm gegen H₂O in einer Quarzküvette durchgeführt. Dabei entsprach eine OD₂₆₀=1 einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

Konzentrationsmessung im Gel

Um sehr kleine Mengen an DNA zu bestimmen, eignet sich die Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarosegel. In einem 1%igen Agarosegel (0,5µg Ethidiumbromid/ml) wurde die DNA-Probe und der DNA-Standardmarker der Firma Eurogentec mit verschiedenen Fragmentgrößen aufgetragen. Im Anschluss an den Gellauf

lassen sich unter UV-Bestrahlung die Fluoreszenz Intensitäten der DNA Probe mit denen des Markers vergleichen und somit die Konzentration der Probe abschätzen.

2.2.9 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Bei geringen Mengen an DNA, z.B. nach der Eluierung aus einem Agarosegel, lässt sie sich durch die Präzipitation mit Ethanol konzentrieren.

Durchführung

Um DNA zu konzentrieren, wurde das Volumen der DNA Lösung bestimmt und mit 0,1 Volumenanteil 3M Natrium-Acetat (pH5.2) vermengt. Diesem Gemisch wurden 2 Volumenanteile reiner Alkohol zugesetzt und je nach DNA-Konzentration 30min bis 24h bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde die DNA bei 4°C und $10.000\times g$ in der Kühlzentrifuge 30min abzentrifugiert. Es folgte ein Waschen des Pellets mit 70% Ethanol und eine erneute Zentrifugation bei 4°C , 20min, $10.000\times g$. Anschließend wurde das Pellet 10min an der Luft getrocknet und schließlich in einem geringen Volumen H_2O bidest aufgenommen (ca. $1\mu\text{g DNA}/\mu\text{l H}_2\text{O}$).

2.2.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Linearisierte DNA-Moleküle zwischen 0,5 und 25kb lassen sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld nach Molekülgröße auftrennen. Abhängig vom Größenbereich der DNA-Fragmente, muss eine unterschiedliche Agarosekonzentration gewählt werden.

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,6	20-1
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Durchführung

Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer unter Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$) in die noch flüssige Lösung gegeben und anschließend in spezielle Gelkammern gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht eine Detektion der DNA durch das Emittieren von sichtbarem Licht nach Anregung mit UV-Licht (260nm). Zur Ausbildung

der DNA-Probetaschen wurde ein Plastikamm in das Gel bis zur Erstarrung gehängt. Dann wurde der Probenamm wieder entfernt und die Gelkammer mit Gelpuffer (1x TBE) befüllt. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer [50% Glycerin, 50mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau (w/w)] versetzt und in die Probetaschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 100V und 40mA für 1h angelegt. DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats von der Kathode zur Anode. Anschließend wurde das Gel photographiert und die Auftrennung der DNA dokumentiert.

2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Um DNA Fragmente nach ihrer Auftrennung im Agarosegel aus dem Gel eluieren zu können, wurde standardmäßig der MiniElute Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Nach der Auftrennung wurde das entsprechende DNA-Fragment unter UV-Kontrolle aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit einer bestimmten Menge Puffer (enthält chaotrope Salze) versetzt und aufgelöst. Die DNA wird an Siliciumkugeln gebunden und nach verschiedenen Waschschritten eluiert. Die Ausbeute lag zwischen 60-90%. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Protokollheftes der Firma Qiagen (Stand April 2001).

2.2.12 DNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente in einem zyklischen Protokoll amplifiziert werden. Eine DNA-Probe wird in Gegenwart von Nukleotiden in einem geeigneten Puffergemisch und entsprechenden Primern von einer DNA-Polymerase mehrfach repliziert. Dazu wird das Gemisch immer wieder unter hohen Temperaturen denaturiert, um so den DNA-Doppelstrang in die beiden Einzelstränge aufzuschmelzen. Es folgt eine Abkühlungsphase, die es den Primern erlaubt sich an die komplementären Sequenzen anzuheften, so dass die DNA-Polymerase die Primer durch das Anknüpfen der dNTP's zu einem neuen DNA-Doppelstrang verlängern kann. Im folgenden Zyklus werden die Tochterstränge wieder getrennt und dienen dann selbst als Matrize für die nächste DNA-Synthese. So lässt sich innerhalb von 20 PCR Zyklen ein DNA-Molekül um ein Vielfaches amplifizieren.

Durchführung

Für die Extraktion der genomischen DNA wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit von Qiagen nach dem Protokoll für kultivierte tierische Zellen behandelt. Die PCR wurde mit 300ng genomischer DNA durchgeführt.

Reaktionsansatz:

25,5µl Aqua bidest
5µl 10x Puffer (Qiagen)
4µl dNTP (2,5mM)
2,5µl C6 DTA forward-Primer
2,5µl C6 DTA reverse-Primer
0,5µl Hot Star Taq
10µl DNA (= 300ng)

Das Protokoll für die PCR mit 35 Zyklen sah folgendermaßen aus

1. Denaturierung der DNA	95°C	15min
2. Denaturierung der DNA	94°C	1min
3. Annealing des Primers	60,6°C	1min (annealing temperature)
4. Elongation der DNA	72,0°C	1min
→ Wiederholung ab Schritt 2 : repeat 35x		
5.	72°C	20min
6.	halten bei 4°C	

2.2.13 DNA-Sequenzanalyse

Für die Analyse der Regulationseffizienz der verschiedenen Expressionssysteme war es notwendig das DT-A-Fragment in die Responsevektoren zu klonieren. Dazu wurden die Fragmente über die EcoRI-Schnittstelle in die multiple cloning site der Plasmide eingebracht. Da es sich hierbei um eine ungerichtete Klonierung handelt und eine Überprüfung durch verschiedene Restriktionsverdauung nicht möglich war, wurde die Orientierung des DT-A-Fragments mittels Sequenzierung des Vektors bestimmt.

Durchführung

Der Premix hatte folgende Zusammensetzung:

3,6µl Puffer (5x)
1,0µl Primer (2pmol Ausgangskonzentration)
25-125fmol (130ng/kb = 200fmol)
ad 8µl H ₂ O (steril aus dem Kit)
~~~~~
dazu geben:
~~~~~
0,5µl DNA-Polymerase (5U/µl Ausgangskonzentration)

Terminationsmix

Je 1µl ddNTP aus Sequi Therm EXCEL II Long Read Termination Mix A, C, G, T.

PCR-Zyklen

5min 95°C
30sec 95°C
15sec 50°C
1min 70°C
~~~~~
Zyklenanzahl 30x
~~~~~
Abkühlen bei 4°C

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1,4µl Stop/Loading Puffer zugesetzt und jeder Ansatz im Cyclyer 5min bei 70°C erhitzt. Die Auswertung wurde am *Li-Cor*®-Sequenziergerät Modell 4000 (MWG Biotech) durchgeführt. Das verwendete Sequagel

XR-Gel wurde von der Firma Biozym mit einer Dicke von 0,2mm und einer Länge von 41cm bezogen.

2.3 Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Proteinen

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

Proteine lassen sich nach der von Laemmli beschriebenen Methode (1970) aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen. Dabei werden die Proteine im SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufgetrennt. Durch die Anlagerung von Glycin erhalten die Proteine eine negative Gesamtladung und wandern im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung nur des spezifischen Molekulargewichts entsprechend von der Kathode zur Anode. Die Auflösung der Proteine hängt von der Laufstrecke und der Porengröße bzw. Dichte des Gels ab. Größere Proteine werden von dem dichten Netzwerk des Gels stärker zurückgehalten und wandern somit langsamer als kleinere Proteine. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine verwendet man hochprozentige Gele (12%) für die Auftrennung kleinerer Proteine (8-30kD), niedrigprozentige Gele (8%) für größere Proteine (ca. 100-200kD). Das Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert und im Trenngel gleichmäßig getrennt.

Durchführung

Lösungen

Acrylamid-Stammlösung

30% Acrylamid (w/v)

0.8% Bisacrylamid (w/v)

in H₂O lösen und filtrieren

Laufpuffer

50mM Tris
380mM Glycin
0.1% (w/v) SDS

pH8.3

SDS-Page-Probenpuffer

130mM Tris
10% (w/v) SDS
20% Glycerol
0,06% (w/v) Bromphenolblau
10% 2- Mercaptoethanol

pH6.8

APS

10% (w/v); aliquotiert, bei -20°C

Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 4,5% und das Trenngel von 12,5%. Die Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und der Tank mit frisch angesetztem Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit SDS-Probenauftragspuffer versetzt und 5min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde mit 100V gestartet. Nachdem die Proteine vom Sammelgel ins Trenngel übergegangen waren, wurde die Spannung auf 250V erhöht. Sobald die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte, wurde die Auftrennung abgebrochen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G250 (Fairbanks et al., 1971) detektiert oder das Gel für einen Western Blot weiterverwendet. Als Marker diente der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker RPN 800 (Amersham).

2.3.2 Coomassie Brilliant Blue G250-Färbung

Der organische Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet im sauren Milieu durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Imino- und Aminogruppen von Proteinen und lässt sich daher für eine Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen verwenden.

Durchführung

Lösungen

Coomassie Färbelösung

0,5g Coomassie Brilliant Blue R 250

20ml Essigsäure (96%) (v/v)

90ml Methanol p.a.

90ml H₂O bidest.

2h rühren lassen und anschließend durch einen Faltenfilter
filtrieren

Entfärber

7,5% Essigsäure

30% Ethanol

Zur Färbung wurden die Gele 30min unter leichtem Schütteln im Färbebad inkubiert. Anschließend wurden sie kurz mit Wasser gespült und in der Entfärberlösung so lange geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren und die Hintergrundfärbung vollständig verschwunden war. Schließlich wurden die Gele fotografiert und getrocknet.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 bindet spezifisch an Proteine und verschiebt das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm. Die Proteinkonzentrationen können bei geeigneter Probenverdünnung unter Anwendung des Lambert-Berrschen Gesetzes photometrisch gemessen werden.

Durchführung

Proteinreagenz

0,01% Coomassie Brilliant Blau G250

8,5% Phosphorsäure

4,7% Ethanol

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden definierte Mengen an BSA (1, 2, 4, 6, 8, 9, 10µg) in 0.1ml Wasser gelöst und mit 1ml Proteinreagenz vermischt. Die gemischte Lösung wurde nach 5min in Küvetten überführt und die Absorption bei 595nm gegenüber einem Nullwert gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden gegen die entsprechenden Proteinmengen aufgetragen, so dass eine Ausgleichsgrade bestimmt werden konnte, die zugleich die Standardkurve darstellte. Zur Bestimmung der Proteinmenge einer Probe, wurde ein bestimmtes Probenvolumen mit Wasser auf 0.1ml aufgefüllt und mit 1ml Proteinreagenz vermenget. Die ermittelten Absorptionswerte wurden anhand der Standardkurve der entsprechenden Referenzmenge BSA zugeordnet.

2.3.4 Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse können Proteine spezifisch durch Bindung von Antikörpern nachgewiesen werden. Nach der Auftrennung im SDS-Acrylamid-Gel werden die Proteine auf eine Membran übertragen, immobilisiert, an Antikörper gebunden und über eine Farbreaktion nachgewiesen. Das hier verwendete „Semi-Dry“-Blotting Verfahren wurde von Kyshe und Anderson entwickelt (Kyshe und Anderson, 1984). Dabei befindet sich der Gel-Membran-Sandwich zum Transfer der Proteine zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden.

Durchführung

Lösungen

Transferpuffer

25mM Tris
192mM Glycin
20% Methanol

Nach der Auftrennung im 12,5%-igen SDS-Gel erfolgte der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran. Es wurden 6 Whatman-Papiere in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und wie auch das Gel selbst mit dem Transferpuffer getränkt. Im Anschluss daran wurde ein Sandwich bestehend aus Whatmanpapier (3x), Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Porengröße 0,2 μ m, Amersham Pharmacia, Freiburg), SDS-Gel, Whatmanpapier (3x) in der genannten Reihenfolge zusammengefügt. Um Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu entfernen, wurde eine Pasteurpipette mehrmals über das „Sandwich“ gerollt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einer Semidry-Blotting-Apparatur (BioRad) für 1h bei 10V und 1mA/cm² Membranfläche. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran mit Ponceau-S gefärbt und die Markerbanden der Referenzproteine mit einem Bleistift markiert.

2.3.5 Ponceau-S-Färbung

Der saure Azofarbstoff Ponceau-S färbt Proteinmengen bis zu 50ng/Bande. Die Anfärbung dient der visuellen Kontrolle des Proteintransfers und zur Markierung der Markerbanden und hat den Vorteil, dass sie reversibel ist und nachfolgende Immunreaktionen nicht stört.

Durchführung

Lösungen

Ponceau-S-Färbelösung

2g Ponceau-S (0,2%)
30g Trichloressigsäure (TCA) (3%)
ad 1000ml H₂O bidest

Im Anschluss an den Blotvorgang wurde die Membran 1-2min bei Raumtemperatur in Ponceau-S gefärbt. Die Membran wurde mit Wasser gespült, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Membran wurde bei -20°C eingefroren oder direkt für die Immunreaktion verwendet.

2.3.6 Immunreaktion

Mit Hilfe primärer und sekundärer Antikörper lassen sich die immobilisierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachweisen. Der immunologische Nachweis erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet ein primärer, unmarkierter Antikörper an das Epitop des auf der Membran immobilisierten Antigens. Anschließend bindet ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper an den primären Antigen-Antikörper-Komplex. Die Peroxidase wurde durch Chemilumineszenz (ECL-System) nachgewiesen. Das Luminophor Luminol wird bei der Peroxidase katalysierten Umsetzung von H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen über mehrere Zwischenstufen und der Abspaltung von N_2 zu dem kurzlebigen und energiereichen zyklischen Peroxid oxidiert. Unter Aufspaltung der Peroxidasebindung zerfällt es in ein 3-Aminophthalat-Diacetat. Die dabei freiwerdende Energie führt zur Anregung einer der beiden entstehenden Carboxylbindungen. Die Peroxidaseaktivität wurde durch die Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran und der anschließenden Entwicklung des Films nachgewiesen.

Durchführung

Lösungen

Waschlösung

0,1% Tween 20 (v/v)

in 1x PBS

Blocking Lösung

5% Magermilchpulver (w/v)

0,1% Tween 20 (v/v)

in 1x PBS

Antikörper

Primärantikörper: Anti-beta-Galaktosidase IgG, monoklonaler Antikörper (Promega, USA), Verdünnung 1:5000

Sekundärantikörper: Anti-mouse IgG (Goat) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Verdünnung 1:50000

Es wurden weiterhin 10x PBS (Gibco, BRL) und ECL (Western blotting detection reagents) der Firma Amersham Life Science, Braunschweig verwendet.

Im Anschluss an die Ponceau S Färbung wurde der Blot eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchlösung zum Blockieren geschüttelt. Dieses führt zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen und verhindert somit unspezifische Reaktionen. Dann wurde der Blot eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper in 5% Magermilchlösung inkubiert. Anschließend wurde der Blot eine Stunde mit PBS/Tween gewaschen und die Waschlösung insgesamt 4x gewechselt. Darauf folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 30min bei Raumtemperatur. Wieder wurde der Blot eine Stunde mit PBS/Tween gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch die Behandlung des Blots mit der ECL-Lösung für 1min. Der Blot wurde dann in Folie gewickelt und in der Röntgenfilmkassette fixiert. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte sofort nach der Entwicklung für 30sec bis 2min, je nach Intensität der Signale.

2.3.7 Präparation von Zelllysaten für die Proteinanalyse

Zur Analyse der Proteinexpression transfizierter Zellen wurden konfluent bewachsene Zellkulturschalen (10cm²) verwendet. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Kulturoberfläche abgeerntet. Nach der Überführung in ein Eppendorfgefäß wurden die Zellen mit dem Eppi-Homogenisator homogenisiert und somifiziert (5 x 3 Stöße, 50% Intensität). Die Suspension wurde bei 1500xg, 15min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und sofort für weitere Untersuchungen eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

2.4 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen in der Zellkultur

2.4.1 Eingesetzte Zelllinie

C6-Zelllinie (ATCC-Nummer: CCL-107)

Die C6-Rattenglioblastomzelllinie wurde von Brenda und Schmidek 1968 durch die wiederholte Gabe von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff in Ratten (*Rattus norvegicus*) etabliert. Tiere, die nach einiger Zeit neurologische Ausfälle zeigten, wurden getötet und die Tumore in Kultur genommen. Die etablierte Zelllinie wurde als C6 bezeichnet.

2.4.2 Zellkultivierung

Die verwendeten Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die eingesetzten Medien und Zusätze wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.4.3 Trypsinieren von Zellen

Die Anheftung adhärenter Zellen an die Oberfläche einer Zellkulturschale sowie der interzelluläre Kontakt, wird über Oberflächenproteine vermittelt. Proteolytisch wirkende Enzyme (z.B. Trypsin) spalten Proteine innerhalb bestimmter Aminosäurereste im Peptid und führen somit zur Aufhebung dieser Bindungen. Trypsin wird häufig in der Kombination mit EDTA eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Chelatbildner und bindet somit zweiwertige Ionen wie z.B. Ca²⁺. Die Anheftung der Adhäsionsproteine an das Substrat wird häufig durch Calcium und Magnesium-Ionen unterstützt. Werden diese Ionen jedoch vom EDTA gebunden, stehen sie den Proteinen nicht mehr zur Verfügung, und die Zell-Zell bzw. Zell-Oberfläche-Bindungen werden aufgehoben.

Durchführung

Zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C für ca. 3-5min inkubiert. Durch leichtes Schütteln der Flasche und anschließendem Abspülen mit Medium wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Durch die Zugabe des Mediums wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins und das Abfangen der zweiwertigen Ionen gestoppt. Mittels der Neubauer-Zählkammer wurde die

Zellzahl bestimmt und je nach Bedarf eine entsprechende Menge an Zellen ausgesät und weiterkultiviert.

2.4.4 Präparation eines Tiefkühlaliquots (*freeze stock*)

Eukaryotische Zellen lassen sich in flüssigem Stickstoff (-196°C) über viele Jahre lagern. Es werden nur Zellen eingefroren, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Durchführung

Die Zellen wurden trypsiniert, mit Medium versetzt und in der Megafuge bei 1700xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3-5ml Medium resuspendiert. Dem Zellgemisch wurde zusätzlich noch 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt. Es handelt sich hierbei um eine Gefrierschutzsubstanz, die die Funktion hat, den Wassergehalt der Zellen zu reduzieren. DMSO lagert sich als kleines, fettlösliches Molekül in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran an und verhindert die Ausbildung von Eiskristallen, welche die Membran der Zelle zerstören und zum Zelltod führen würden.

2.4.5 Auftauen und Revitalisieren von Tiefkühlaliquots

Oft verhalten sich Zellen nach längerer Kultivierungszeit anders als zu Beginn. Daher ist es von Vorteil mit jungen Passagen von Zellen zu arbeiten und solche jüngere Passagen vorrätig gelagert zu haben.

Durchführung

Sobald man die Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen hatte, sollten die Zellen so schnell wie möglich bei 37°C erwärmt werden. Um die Bestandteile des Einfriermediums von den Zellen abzutrennen, wurden die Zellen mit 5ml Medium versetzt und bei 150-200xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und auf 75cm² Zellkulturflaschen überführt. Nach ca. 2h hafteten die Zellen an der Oberfläche, und das Medium wurde erneut gewechselt, um tote Zellen und Rückstände vom DMSO zu entfernen.

2.4.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz sowie der Expression des transformierten Gens, wurden Säugerzellen zuerst transient transfiziert.

Durchführung

1×10^5 Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf 6 cm^2 Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2x PBS gewaschen und mit 1,6ml Medium versetzt. Die Transfektion erfolgte unter Einsatz des Transfektionsreagenz Effectene™ von Qiagen.

Ein typischer Ansatz für eine 6 cm^2 Schale setzte sich wie folgt zusammen:

0,4µg DNA
3,2µl Enhancer
ad 100µl Reaktionspuffer

Es folgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor folgende Substanzen zu dem Ansatz gegeben wurden:

10µl Effectene
600µl Medium

Nachdem Medium und Effectene zum Gemisch hinzugefügt worden sind, wurde wieder 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexe wurden mit der Pipette vorsichtig auf die Zellen gegeben und für 24-48h, je nach Versuchsfragestellung, im Brutschrank bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert.

Es folgten Analysen der Transfektionseffizienz mittels Luciferasetest, MTT-Assay, β -Galaktosidase-Assay oder auch LDH-Bestimmung.

2.4.7 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei stabilen Transfektionen wird das DNA-Konstrukt stabil ins Genom der Wirtszelle integriert. Je nach Resistenzgen wurden folgende Antibiotika verwendet:

Antibiotikum (Konzentration)	Regulationssystem
Hygromycin (400µg/ml)	GeneSwitch™-System, Dimerizer-System
G 418 (250µg/ml)	Dimerizer-System, Tet-Systeme, Ecdysone™-System
Zeozin (250µg/ml)	GeneSwitch™-System, Tet-Systeme, Ecdysone™-System

Durchführung

Bei stabilen Transfektionen wurden 24h nach der Transfektion das Medium von den Zellen abgenommen und die Platten einmal mit 1x PBS gewaschen. Es wurde 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Vertiefungen gegeben, die Zellen anschließend auf 10cm²-Schalen umgesetzt und mit Medium versetzt. Nach weiteren 24h erfolgte dann die Zugabe von den jeweiligen Antibiotika haltigen Selektionsmedien. Die Selektion wurde solange durchgeführt bis sich Klone auf den Platten zeigten und alle Zellen, die nicht transfiziert worden sind, abgestorben waren. Diese Klone wurde dann mittels Selektionszylindern von den Schalen gepickt oder in Trypsin/EDTA getränkten Whatman-Filtern von der Zellkulturschale abgelöst. Die Klone wurden in 5ml Medium aufgenommen, gründlich gemischt und somit eine Einzelsuspension hergestellt. Mit einer 0,5-10µl Eppendorfpipette wurde dann jeweils 1 Tropfen in die Vertiefungen einer 96-well Schale gegeben und mit Medium gefüllt. Im Mikroskop wurde geprüft, welche der wells nun wirklich nur eine Zelle enthielt und markiert. Die Zellen wurden dann im Brutschrank solange wachsen gelassen bis sie auf größere Schalen umgesetzt werden konnten und schließlich in weiteren Experimenten charakterisiert wurden.

2.4.8 Subklonierung stabiler Klone

Häufig zeigen die stabilen Klone ein heterogenes rekombinantes Expressionsmuster. Und es zeigen sich häufig große Schwankungen im Expressionsmuster innerhalb eines stabilen Klons. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass beim Picken der Klone eventuell doch Zellen mit aufgenommen wurden, die zu einem anderen Klon gehörten oder auch überhaupt keine Eigenschaft eines Klons aufweisen. Daher ist die Subklonierung eines Primärklons unerlässlich.

Durchführung

Dazu wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 5 Zellen/ml verdünnt. Die verdünnte Zellsuspension wurde auf eine 96-well Schale verteilt und ca. 1 Woche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Subklone wurden wieder expandiert und auf ihre Eigenschaften und Expressionsmuster untersucht.

2.5 Biochemische Methoden zur Charakterisierung eukaryotischer Zellen in der Zellkultur

2.5.1 Luciferase Test

Mit dem Luciferase Test System lässt sich Reporterprotein Luciferase in Zellen nachweisen. Es handelt sich hierbei um ein monomeres Protein von 61kD, das keine posttranslationale Modifikation für seine Aktivität erfordert. Somit ist die Reporter Aktivität unmittelbar nach der Translation verwendbar. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von D-Luciferin unter der Verwendung des Cosubstrates ATP/Mg²⁺. Als Nebenprodukt dieser Chemilumineszenz Reaktion entsteht ein Photon, das freigesetzt wird. Die Photonen werden in Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/sec= Relative Light Units/second) gemessen. Die Luciferaseaktivität verhält sich proportional zu den gemessenen Lichteinheiten. Daher lässt sich der Luciferase Test auch zur quantitativen Bestimmung von Promotorstärken heranziehen. In dieser Arbeit wurde der Test nicht nur zur Bestimmung von Promotoreigenschaften gewählt, sondern auch zur indirekten Bestimmung des Zelltods eingesetzt. Die Zellen wurden in den transienten Transfektionen in Trippeltransfektionen mit dem jeweiligen Regulator-, dem Response- und dem Reporterplasmid pSVluc transfiziert.

Durchführung

Lösungen (Luciferase Assay System Kit; Promega)

Luciferase Assay Substrat

Luciferase Assay Puffer

Lysisreagenz

24h nach der Transfektion wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und in Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 10.000xg für 5min in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Proben bis zur Messung der Luciferase Aktivität auf Eis inkubiert. 20µl des Zelllysats wurden in ein Röhrchen gegeben, das dann in den Luminometer zur Messung gesteckt wurde. Das Substrat D-Luciferin (0.5mM D-Luciferin in 100mM Phosphatpuffer pH7.0-8.0) wurde automatisch (jeweils 200µl) in die Röhrchen eingespritzt. Das Luminometer-Messgerät gab die Luciferaseaktivität der einzelnen Proben in **Relative Light Units (RLU)** pro 10sec Messzeit an.

2.5.2 Cytotoxizitätstest (LDH-Test)

Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Zelltod mit enzymatischen Tests zu bestimmen. Der Tod einer Zelle lässt sich unter anderem durch den Schaden in der Zellmembran quantifizieren. So unterscheiden sich die Nachweismethoden, die auf eine Aufnahme von Vitalfarbstoffen wie z.B. Trypanblau, Eosin Y oder auch Ethidumbromid basieren von dem Nachweis eingebauter radioaktiver Isotope, wie z.B. ^{51}Cr , ^3H -Prolin oder ähnlichen Stoffen in vormarkierten Zellen oder der Bestimmung von zytoplasmatischen Enzymaktivitäten. Ein recht schneller und sicherer Nachweis ist die Detektion des Laktatdehydrogenase-Enzyms (LDH). Dabei handelt es sich um ein im Zytoplasma lokalisiertes sehr stabiles Protein, dass nach einem Zellmembranschaden im Überstand nachweisbar ist.

Durchführung

Lösungen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

250µl Solution 1 werden mit 11,25ml Solution 2 gemischt.

Die Zellen wurden auf 96-well-Schalen ausplattiert und mit dem entsprechenden Induktor induziert. Nach definierten Zeitpunkten wurde der Test gestoppt und die Zellen mit dem LDH-Test untersucht. Dazu wurden 100µl des Mediumüberstandes aus jedem well in ein korrespondierendes well einer Nunc™-Titerplatte gegeben und mit 100µl LDH-Testlösung vermengt. Der Ansatz wurde dann 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und anschließend im ELISA-Reader bei 492nm (Referenzfilter 620nm) gemessen.

2.5.3 Zell-Proliferationstest bzw. Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

(MTT-Test nach Holst-Hansen und Brünner; Cell Biology: A laboratory Handbook. Second Edition Vol.1)

Für zahlreiche biologische Fragestellungen ist die Bestimmung der Zellzahl *in vitro* notwendig. Bei dem MTT-Proliferationstest handelt es sich um einen kolorimetrischen Test zur Bestimmung der Vitalität, Proliferation und Cytotoxizität in der Zellkultur (Mosmann, 1983, Denizot und Lang, 1986, Twentyman und Luscombe, 1987). Der Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazolium Salzes MTT, welches in Wasser unlösliche, dunkel-blaue Formazan Kristalle bildet. Die Spaltung findet nur in lebenden Zellen statt, die über das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase verfügen (Slater et al., 1963). Das Wasser-unlösliche Formazan lässt sich mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol lösen. Die optische Dichte des gelösten Materials lässt sich spektrophotometrisch messen. Die Höhe der Absorption des gelösten Farbstoffs korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur (Mosmann, 1983, Heeg et al., 1985, Carmichael et al., 1987).

Durchführung

Lösungen

MTT Stock Solution (5mg/ml)

50mg MTT (3-(4,5-Dimethyl-Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
ad 10ml PBS (1x) gelöst
aliquotiert bei -20°C gelagert

MTT Solution (0,5mg/ml)

1ml MTT Stock Solution (5mg/ml)

mit 9ml DMEM (+10% FCS) Medium mischen

Isopropanol

Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen 24h vor der Auswertung auf 96-well-Microtiter Platten ausplattiert und mit dem entsprechenden Induktor induziert. Am folgenden Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 200µl MTT-Lösung (0,5mg/ml) ersetzt. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Dann wurde die MTT-Lösung von den Zellen abgenommen und die entstandenen Formazan Kristalle durch die Zugabe von 200µl Isopropanol gelöst. Mittels des ELISA-Readers wurde die Farbintensität bei 570nm (Referenzfilter 690nm) gemessen.

2.5.4 β-Galaktosidaseaktivitäts-Bestimmung (Galacto-Light Assay (Tropix, USA))

Das bakterielle β-Galaktosidase-Gen ist als Reporter Gen in *in vitro* und *in vivo* Versuchen weit verbreitet und wird häufig verwendet. So werden häufig lacZ kodierende Vektoren als Positivkontrolle für die Transfektionseffizienz eingesetzt. In dieser Arbeit wurden lacZ kodierende Vektoren, die unter der Kontrolle der jeweiligen Expressionssysteme funktionierten, eingesetzt um die Effizienz der entsprechenden Regulatoren zu überprüfen und zu definieren.

Durchführung**Lösungen (Tropix, USA)**

Lysispuffer

Reaktionspuffer (Galactonsubstrat 1: 100 Reaktionspufferlösung)

Accerelator-Lösung

Eine definierte Menge an Zellen wurde auf 6-well oder 24-well Schalen ausplattiert. Nach 3h wurde das Medium erneuert und die Induktion mit dem entsprechenden Inducermolekül

durchgeführt. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysispuffer inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschale abgekratzt. Das Lysat wurde 2min bei 13.000xg abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. 20µl des Zellextraktes wurden mit 200µl Reaktionspuffer für 30-60min im Dunkeln inkubiert. Nach Überführen der Proben in das Luminometer-Messgerät und der Zugabe von 300µl raumtemperiertem Accelerator folgte die Messung.

2.5.5 Analyse der Expression von β -Galaktosidase *in vitro* (X-Gal-Test)

Die β -Galaktosidase Expression stabil lacZ-Gen transfizierter Zellen wurden 48h nach Induktion der Expression mittels histochemischer Färbung untersucht.

Lösungen

Fixierlösung

4% Paraformaldehyd in 1x PBS-Puffer

Färbelösung

5mM Kaliumferrocyanid

5mM Kaliumferricyanid

2mM MgCl₂

1mg/ml X-Gal

in 1x PBS-Puffer

Die Zellen wurden auf Chamber-Slides ausgesät und nach weiteren 3h mit dem jeweiligen Induktor für 48h induziert. Kurz vor der Färbung wurden die Zellen 2x mit PBS-Puffer gewaschen und für 10min mit einer Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS-Puffer gewaschen und dann über Nacht mit der Färbelösung inkubiert. Es wurden jeweils induzierte, nicht induzierte und nicht transfizierte Zellen zur Kontrolle unspezifischer Artefakte untersucht. Die Versuchsauswertung erfolgte am Mikroskop Olympus Axiovert IX 50.

2.5.6 Analyse des Bystander-Effektes

Zur Untersuchung eines eventuell vorhandenen Bystander Effekts der C6switch-DT-A Zellen, wurden C6-SP-GFP Zellen mit C6switch-DT-A Zellen kokultiviert. Im Kontrollversuch erfolgte die Kokultivierung mit C6switch-lacZ Zellen. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen von jeder Zelllinie eingesetzt. 24h nach der Ausplattierung erfolgte die Induktion mit RU486 bzw. Gabe der Trägersubstanz ohne RU486. Das Verhalten der Zellen wurde täglich zu einem bestimmten Zeitpunkt mikroskopisch betrachtet und fotografiert.

2.6 *In vivo* Versuche

2.6.1 Intracraniale Implantation von stabil transfizierten C6 Zellen in Nacktmäuse

Für die *in vivo* Versuche wurden weibliche Nacktmäuse des Stammes CD1 nu/nu (Charles River, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 22-24g eingesetzt. Diese Tiere bieten aufgrund ihres Immunverhaltens die Grundlage dafür, die eingesetzten C6-Ratten-Gliomzellen ohne Abstoßungsreaktion als Wirt anzunehmen. Die Mäuse wurden mindestens eine Woche nach Anlieferung der Firma Charles-River auf gesundheitliche Auffälligkeiten beobachtet, wobei ausschließlich gesunde Tiere für den Versuchsansatz verwendet worden sind.

Die eingesetzten Zellen wurden von einer konfluenten Zellkulturschale geerntet, indem sie 1x mit PBS gewaschen wurden und mit einer Trypsin/EDTA Lösung für 3min inkubiert wurden. Die Zellen wurden nach dem Ablösen zentrifugiert und auf eine Konzentration von 2×10^4 Zellen/ μ l DMEM +10% FCS gebracht. Diese Suspension wurde maximal 3h auf Eis gelagert. Die Suspension wurde vor jeder neuen OP mehrmals durch vorsichtiges Schwenken des Suspensionsröhrchens gemischt. Die Zellsuspension wurde in einer Hamilton-Spritze aufgezogen, die an einem Stereotaxiegerät befestigt wurde und die Nadelöffnung nach lateral zeigte.

Die Implantation erfolgte nach einer intraperitonealen Narkose mit einem Gemisch aus den Narkotika Ketamin und Rompun in einer 0,9% NaCl-Lösung. Sobald die Mäuse keinen Reflex mehr zeigten, also in tiefer Narkose lagen, wurden sie in dem Spanner fixiert, indem sie mit zwei Ohrstiften und einem Schneidezahnhalter gehalten wurden (siehe Abbildung 2.1). Die desinfizierte Kopfhaut wurde mit einem Skalpell geöffnet. Nachdem

1mm hinter der Sutura coronalis und 2mm rechts der Sutura sagittalis mit einer Kanüle ein kleines Loch in die Kalotte gebohrt wurde, erfolgte die Applikation von $2\mu\text{l}$ ($2 \times 10^4/\mu\text{l}$) Zellen mittels der Hamiltonspritze ins Gehirn. Es wurden maximal $2\mu\text{l}$ Lösung in einem Zeitraum von 3min verabreicht. Die Operationskoordinaten wurden dabei so gewählt, dass die Tumorzellen in die rechten Stammganglien appliziert wurden. Zum Abschluss erfolgte ein Wundverschluss der Kopfhaut mit dem Histoacryl-Wundkleber. Es handelt sich dabei um einen Gewebekleber aus Enbucrilat, der auf die Wundränder gegeben wird und zum Schließen der Wunde führt. Die Mäuse wachten unter Rotlicht wieder auf. Je nach Versuchsansatz wurden die Tiere hinsichtlich der Verabreichung des Induktionsmoleküls Mifepristone unterschiedlich behandelt.

2.6.1.1 Versuchsgruppe: C6switch-lacZ5

Je nach Versuchsansatz (induziert/reprimiert) erfolgte 1 Woche nach der Operation die tägliche Injektion des Induktors Mifepristone (2,5mg RU486 bzw. $50\mu\text{l}$ der gelösten Substanz) bzw. der reinen Trägersubstanz ($50\mu\text{l}/\text{Tier}$) ohne das Mifepristone.

2.6.1.2 Versuchsgruppe: C6switch-DT-A

Die Tiere dieser Versuchsgruppe wurden bereits 2 Tage vor der Implantation der Tumorzellen mit dem Induktor behandelt bzw. mit der Kontrolllösung gespritzt. Im Anschluss folgte die tägliche Gabe der Lösungen, bis zu dem Zeitpunkt an dem die Tiere getötet wurden.

Nach definierten Zeitpunkten wurden die Tiere nach Betäubung mit Äther durch zervikale Dislokation getötet. Zur Entnahme des Gehirns wurde das Fell über dem Schädel median mit dem Skalpell eröffnet und das Periost zur Seite geschoben. Anschließend wurde die Ossa parietalia con occipital schrittweise entfernt, die Dura vom Tentorium cerebelli eröffnet und das Gehirn freigelegt. Mittels eines Mikrowagenspatels wurde das Gehirn aus der Schädelbasis gehoben und je nach Versuchsansatz entweder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (lacZ-Gehirne) oder in 4% Formaldehydlösung fixiert (DT-A-Gehirne).

Narkotikumzusammensetzung

2,5ml 10% Ketamin

2,0ml 2% Rompun

9,5ml 0,9% NaCl

Jedes Tier erhielt (je nach Gewicht) von dem Gemisch 150-175 μ l i.p. verabreicht.

Die Operationskoordinaten vom intrauralem Nullpunkt aus

5mm vor, 3mm rechts, 3mm tief

Das Inducermolekül Mifepristone und die Trägersubstanz

Mifepristone (RU486)

50mg RU486 werden in 1ml Trägersubstanz (0,25% (v/v) Carboxymethyl Cellulose und 0,5% (v/v) Tween 80 gelöst.

Trägersubstanz

0,25% (v/v) Carboxymethyl Cellulose und 0,5% (v/v) Tween80 in sterilem Wasser gelöst.

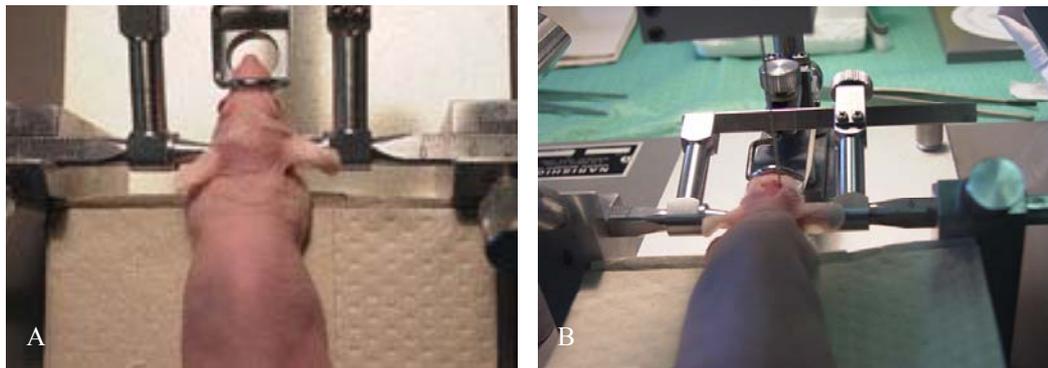


Abbildung 2.1: Darstellung der intracranialen Implantationstechnik

A) Versuchstier in stereotaktischen Rahmen und B) Platzierung der Injektionsnadel im Mausgehirn

2.6.2 Auswertung der *in vivo* Versuche

2.6.2.1 Versuch: C6switch-lacZ5 *in vivo*

Sofort nach der Entnahme wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Auswertung der β -Galaktosidase Expression der Tumorzellen im Gehirn, wurden mit dem Schlittenmikrotom 10 μ m-dicke Serien-Gefrierschnitte angefertigt, die anschließend

mit einer X-Gal Lösung (vergl. Kap. 2.6.2.2) über 6h inkubiert wurden. Außerdem wurden einige Schnitte mittels Hämatoxylin/Eosin-Lösung (vergl. Kap. 2.6.2.4). Das Hämatoxylin färbt den Zellkern, während Eosin das Zytoplasma der Zelle anfärbt. Mittels dieser Färbung lassen sich Areale dichter Zellmasse (in der Regel Tumorgewebe) deutlich vom lockeren Zellverband (Normalgewebe) unterscheiden.

2.6.2.2 X-Gal Färbung von Gewebeschnitten

Durchführung

Lösungen

Fixierlösung (0.5% (v/v) Glutaraldehyd/PBS)

2ml 25% Glutaraldehyd

ad 100ml 1x PBS

Assay-Mix (X-Gal)

5ml $K_3[Fe(CN)_6]$ -Stammlösung (5mM Endkonzentration)
5ml $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ -Stammlösung (5mM Endkonzentration)
200 μ l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -Stammlösung (2mM Endkonzentration)

ad 100 ml 1xPBS, pH 7.4 mit 1M HCL

Stammlösungen

100mM $K_3[Fe(CN)_6]$, rotes Blutlaugensalz: 3.29g ad 100ml Aqua dest.

100mM $K_4[Fe(CN)_6]$ -, gelbes Blutlaugensalz: 4.22 g ad 100ml Aqua dest.

1m $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 20,3 g ad 100ml Aqua dest.

X-Gal-Stammlösung

4% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid, aliquotieren und lichtgeschützt bei $-20^\circ C$ lagern

Mit Hilfe des Mikrotoms wurden von den Gehirnen 10 μ m dicke Serienschnitte angefertigt, die maximal 3min bei RT in 0.5%-igen Glutaraldehyd fixiert wurden. Anschließend

wurden die Schnitte vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 37°C durch Lagerung im Assay-Mix. Die Küvette war mit Parafilm abgedeckt um vor Verdunstung zu schützen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit Eosin gegengefärbt.

2.6.2.3 Versuch: C6switch-DT-A *in vivo*

Sofort nach der Entnahme wurden die Gehirne in 4% Paraformaldehyd-Lösung eingelegt und so ca. 20h fixiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte im Einbettungsautomaten Tissue-Tek VIP der Firma Vogel. Anschließend wurden von den Gehirnen 2µm dicke Serienschnitte am Schlittenmikrotom hergestellt und auf Super Frost Objektträger aufgenommen. Jeder 8. Objektträger wurde für eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung (siehe 2.6.2.4) eingesetzt.

2.6.2.4 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur spezifischen Anfärbung von Zellen in Geweben wurde die Hämatoxylin/Eosin-Färbung eingesetzt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch Hämatoxylin, die Gegenfärbung wurde mit Eosin durchgeführt (Zellkerne sind blau gefärbt; Zellplasma rot).

Durchführung

Lösungen

Farbstoffe

Saures Hämalaun nach Mayer

1g Hämatoxylin

0,2g Natriumjodatin

50g Kalialaun

ad 1l H₂O bidest

~~~~~  
dazu geben:

~~~~~  
50g Chloralhydrat

1g kristalline Zitronensäure

~~~~~  
vor Gebrauch filtrieren

---

## Eosinlösung

1% wässriges Eosin G

## Versuchsablauf

- 3x 10 min entparaffinieren in 2x Xylol
- 5 min 99 % Isopropanol
- 5 min 96 % Isopropanol
- 5 min 70 % Isopropanol
- 5 min Aqua dest
- 5 min Hämalaun nach Mayer
- kurz in Leitungswasser spülen
- 15 min bläuen in fließendem Leitungswasser
- 3 min 1 % Eosin
- kurz (ca. 10 sek.) in aqua dest auswaschen
- 5 sek 70 % Isopropanol
- 5 sek 96 % Isopropanol
- 2x 5 min 99 % Isopropanol
- 3 min Xylol
- eindecken in Eukitt

### **2.6.2.5 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten**

Differenzierte Zellen exprimieren Zell-spezifische Proteine und erlauben so eine Charakterisierung mittels Immunhistochemie. Intermediärfilamente (IF) sind ubiquitäre Proteine mit Cytoskelett-Funktion. Das Glialfilament-Protein (GFAP) ist ein IF bestimmter Gliazellen, wie z.B. Astrozyten, aber auch Schann`scher Zellen.

## Durchführung

Im Anschluss an die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte die Markierung mit dem GFAP-Antikörper mit Hilfe des DAKO ChemMate Detection Kit für DAKO TechMate™ Geräte, die eine automatische Immunfärbung von Gewebeschnitten ermöglichen. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

### 3. Ergebnisse

Die Suizid-Gentherapie stellt eine Möglichkeit der experimentellen und klinischen Gentherapie von Tumoren dar. In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, ein direktes Toxingen unter die Kontrolle eines stringenten genetischen Schalters zu stellen, um so die Expression des transferierten Toxingens möglichst komplett zu supprimieren, andererseits jedoch zum gewünschten Zeitpunkt soweit zu aktivieren, dass es zum Zelltod der transduzierten Tumorzelle kommt. Die Expression von heterologen Genen in Säugerzellen zu therapeutischen Zwecken erfordert häufig, insbesondere bei toxischen Genprodukten, eine absolute Kontrolle der transgenen Expression. Prinzipiell stehen eine Reihe von Transkriptionskontrollsystemen zur Verfügung, die die Expression eines Transgens "von außen" steuern können. Das optimale System erfüllt folgende Kriterien: keine Hintergrundaktivität im inaktiven (reprimierten) Zustand, hohe Genexpression im aktivierten Zustand, regulierbare Expression über einen längeren Zeitraum, multiples Schalten zwischen aktiviertem und inaktiviertem Zustand und Fehlen unspezifischer (pleiotroper) Effekte der induzierenden bzw. reprimierenden Substanz.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Regulationssysteme zunächst in transienten Versuchen hinsichtlich ihrer stringenten Regulationseigenschaften eines Toxingens untersucht. Bei dem eingesetzten Toxingen handelte es sich um das Gen der Diphtherietoxin-A-Kette (DT-A). Die Systeme mit den besten Regulationskapazitäten wurden dann nach stabilen Transfektionen auf ihre Eignung der stringenten Regulationsfähigkeit in den etablierten Zelllinien getestet. Das GeneSwitch™-System, mit dem es gelang, optimal regulierbare, stabil transfizierte Zelllinien zu konstruieren, wurde schließlich in verschiedenen biochemischen Tests bezüglich seiner Regulationseigenschaften sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* analysiert.

Der Verlauf dieser Arbeit ist auf den folgenden Seiten in Form von Fließdiagrammen dargestellt.

***In vitro* Versuche I: transiente Transfektionen**

Transiente Transfektionen: Testen der Regulationskapazität und  
Vergleichen von verschiedenen Regulationssystemen

Regulationssysteme

Tet-off Tet-on Tet-on-ptet-tTS Tet-on-Krab Tet-on-M2 Ecdysone™ Dimerizer GeneSwitch™

Klonierung des DT-A-Fragments in jedes Responseplasmid

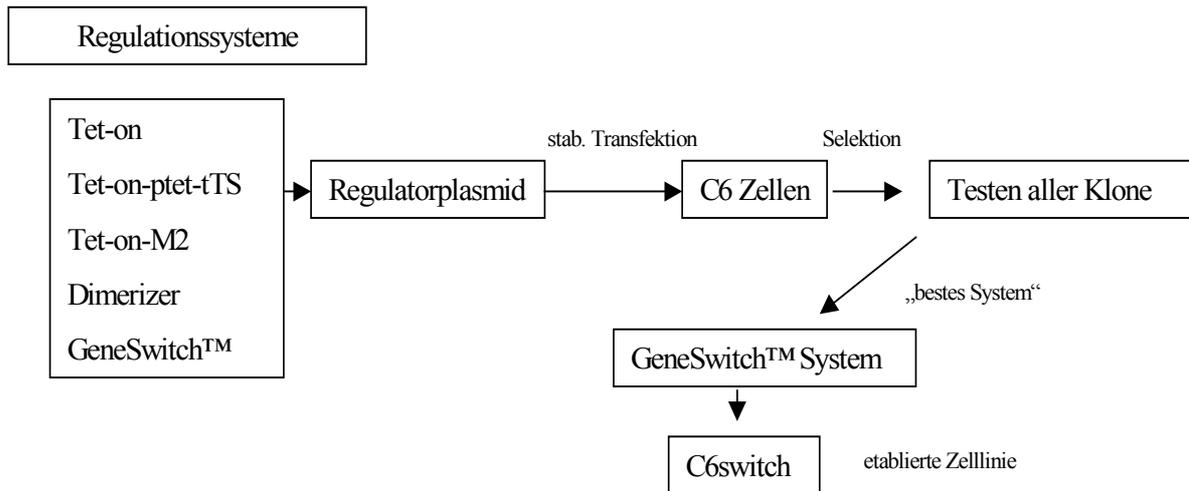
Sequenzierung zur Überprüfung der Orientierung des Gens

Transiente Transfektion jedes Systems in C6 Zellen

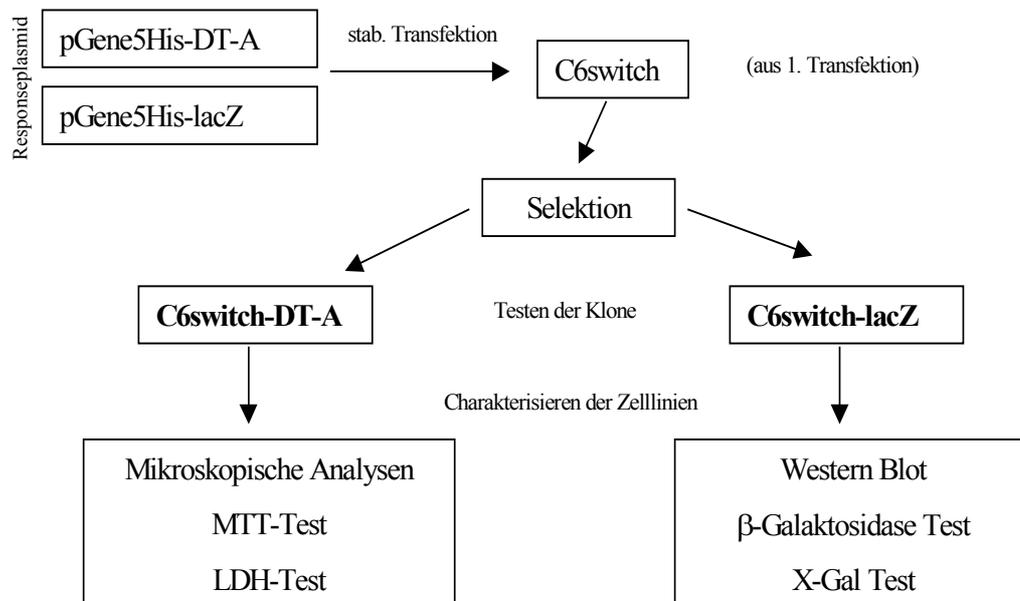
Messen der Expressionswerte des Reportergens als indirektes Maß für die DT-A-  
Expression und Vergleichen der induzierten und reprimierten Bedingungen

## In vitro Versuche II: stabile Transfektionen

### 1. Stabile Transfektion: Etablierung einer Regulatorplasmid-transfizierten C6 Zelllinie

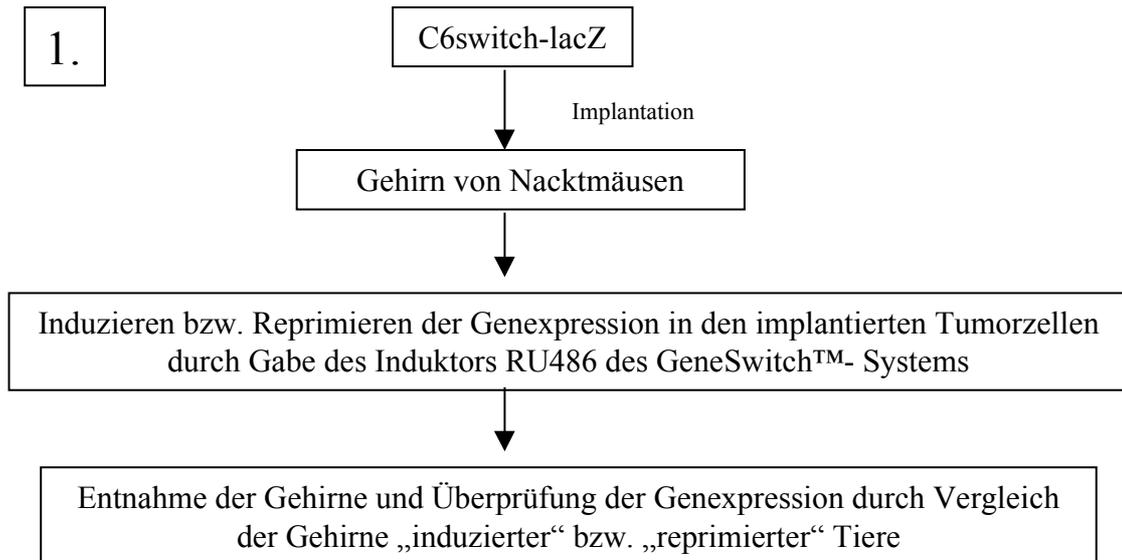


### 2. Stabile Transfektion: Etablierung einer Responseplasmid-transfizierten C6 Zelllinie

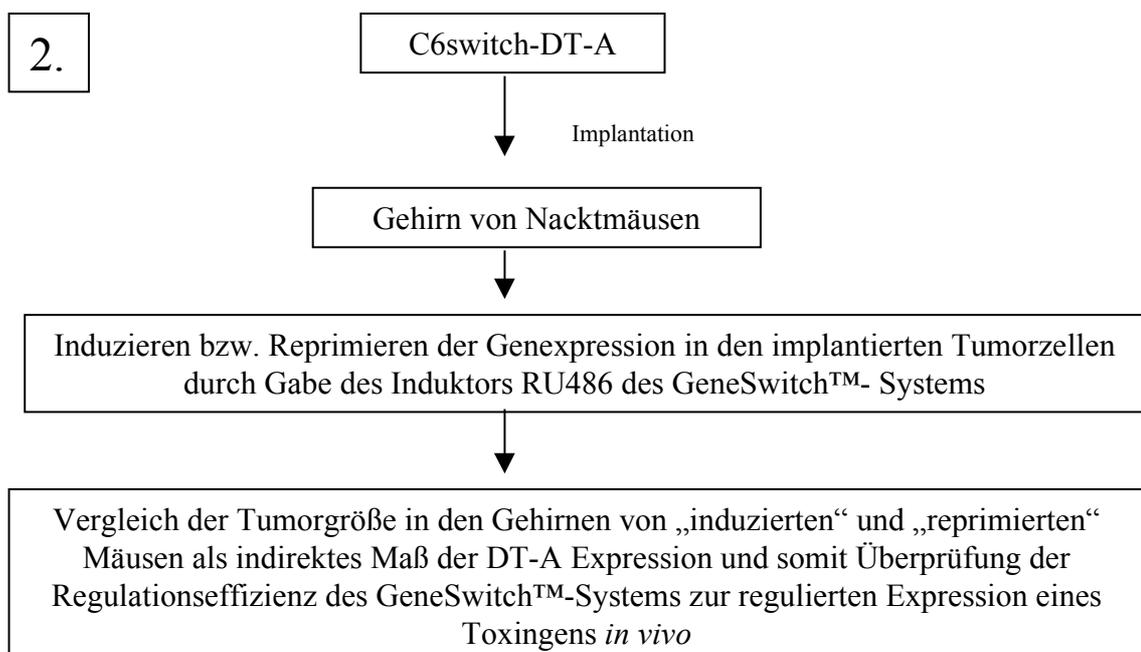


***In vivo* Versuche****Implantation der etablierten C6switch-DT-A und C6switch-lacZ Zellen**

1.



2.



### 3.1 Die Regulationssysteme

Jedes der in dieser Arbeit verwendeten Regulationssysteme basiert auf zwei unabhängigen Vektoren, wobei ein Vektor das Transaktivator-Gen (Regulatorplasmid) und der andere Vektor das zu regulierende Zielgen (Responseplasmid) kodieren. In transienten Transfektionen wurden beide Vektoren zusammen mit einem Reporterplasmid, das für Luciferase kodiert, in Kotransfektionen in die Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultiviert. Über den Nachweis der Luciferaseexpression der transfizierten Zellen, wurde indirekt die Expression und somit auch die Regulation des Diphtherietoxins bestimmt. Je niedriger der Luciferasewert war, desto mehr Zellen waren aufgrund der DT-A-Gen-Expression gestorben. Die Konstruktion stabiler Zelllinien erforderte die aufeinanderfolgende Transfektion von Regulatorplasmid und Responseplasmid und die jeweilige Selektion und Charakterisierung von stabilen Klonen.

#### 3.1.1 Konstruktion der Responseplasmide

Um die Expression des Toxins kontrolliert zu exprimieren und mit den verschiedenen Regulationssystemen untersuchen zu können, war es notwendig, das DT-A-Gen in den jeweiligen Responsevektor zu klonieren.

##### *Klonierung des DT-A-Gens*

Als Donorplasmid fungierte das pUHD-DT-A (Responseplasmid der Tet-Systeme), welches das Gen in der Polylinker-Region über eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt hatte. In jedes der anderen Systeme wurde zunächst das DT-A-Gen über geeignete Schnittstellen in den Polylinker der Responsevektoren inkloniert. Aufgrund sich häufig wiederholender Schnittstellen im Zielgen, war eine Überprüfung der Orientierung des Gens im Responsevektor mittels Restriktionsverdau nicht möglich. Daher wurde die Orientierung des DT-A-Gens in den Vektoren durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenz des klonierten Gens wurde nach der Sequenzierung durch den Vergleich mit der Wildtypsequenz überprüft.

### 3.1.2 Konstruktion des Reporter-Responsevektors des Dimerizersystems pZ<sub>12</sub>I-lacZ-2

Mit Ausnahme des Dimerizer-Systems standen alle Response-Kontroll-Plasmide zur Verfügung. Sie dienten zur Überprüfung der Regulationseigenschaften stabil transfizierter Klone, die das Regulatorplasmid aufgenommen haben. Insbesondere interessierte die Frage, ob das jeweilige System „dicht“ reguliert, d.h. keine Basaltranskription des gewünschten Gens im reprimierten Zustand detektierbar ist.

Zur Konstruktion des Response-Kontrollplasmids wurde ein lacZ-Gen in die Polylinker-Region des Responseplasmids eingefügt. Zu diesem Zweck wurde das lacZ-Gen aus dem Vektor pIND-lacZ (Ecdysone™-System) eingesetzt. Das Gen wurde durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII aus dem Donorvektor isoliert und in die multiple Klonierungsstelle des Zielvektors pZ<sub>12</sub>I-PL-2 - ebenfalls über die oben genannten Schnittstellen - eingefügt. Der generierte Vektor wurde als pZ<sub>12</sub>I-lacZ-2 bezeichnet.

### 3.2 Transiente Transfektionen der C6 Zellen mit den verschiedenen Systemen

Um die Regulationskapazitäten der verschiedenen Systeme untersuchen und vergleichen zu können, wurden zunächst mit jedem System transiente Transfektionen durchgeführt. Dazu wurden C6 Gliomzellen mit dem jeweiligen Regulatorplasmid, dem Responseplasmid und einem Reporterplasmid (pSVluc) transient transfiziert und unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultiviert. Das Reporterplasmid pSVluc kodiert für Luciferase, dessen Aktivität in Luciferase-Assays ermittelt wurde (Einheit: RLU/sec = Relative Light Units pro Sekunde). Die Messung der Luciferase ermöglicht den indirekten quantitativen Nachweis der Expressions- und Regulationskapazität der einzelnen Systeme bezüglich des Toxins. Sobald das Diphtherietoxin in einer Zelle exprimiert wird, kommt es zu einer irreversiblen Blockierung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod. Luciferase wird von den sterbenden bzw. toten Zellen nicht exprimiert, während eine lebende Zelle Luciferase produzieren kann. Demzufolge sind die messbaren Luciferasewerte je nach Zellüberleben hoch oder niedrig.

### **3.2.1 Die Regulationseffizienz der verschiedenen Tet-Systeme in C6 Zellen unter transienten Transfektionsbedingungen**

Das Tet-System wurde von Gossen und Bujard (1992) entwickelt und basiert auf der Regulation durch Tetrazyklin (tet). Es gibt inzwischen verschiedene Varianten des Systems - das Tet-off, das Tet-on und die modifizierten Formen des Tet-on-Systems. Sie basieren auf zwei Plasmiden, wobei das Regulatorplasmid das Transaktivatorgen und das Responseplasmid den durch den Transaktivator regulierbaren Promotor und nachgestellte Zielgen kodieren. Durch die Zugabe des Tetrazyklins wird der Transaktivator (tTA) im Tet-off-System inaktiviert. Im Tet-on-System und deren modifizierten Formen hingegen führt die Gabe von Tetrazyklin bzw. dessen Derivat Doxyzyklin zur Aktivierung des Transaktivators (rtTA) (vergl. Kap. 1.7.1). Sowohl die beiden Systeme, als auch die neuen Varianten des Tet-on-Systems wurden zunächst in transienten Versuchen in ihrer stringenten Regulationskapazität untersucht. In allen durchgeführten Versuchen mit dem Tet-System wurde das von Clontech erhältliche „Tet system approved fetal bovine serum“ eingesetzt, um eventuelle unerwünschte Effekte durch Tetrazyklin kontaminiertes Serum auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden.

#### **3.2.1.1 Die Regulationskapazität des Tet-off-Systems in transienten Transfektionen**

C6 Zellen wurden transient mit dem Tet-off-Plasmid (pUHD-15.1) und dem Responseplasmid, das für DT-A kodiert (pUHD-DT-A), im Verhältnis 1:100 transfiziert. Als Reporterplasmid diente pSVluc; die eingesetzte DNA-Menge betrug bei allen transienten Transfektionen  $\frac{1}{4}$  der Gesamt-DNA Menge. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolltransfektion durchgeführt, in der C6 Zellen mit dem Transaktivator (pUHD-15.1) und dem Responseplasmid ohne das DT-A-Insert (pUHD-10.3) transfiziert wurden. 3h nach der Transfektion erfolgte die Induktion bzw. hier die Repression durch Zugabe des Induktors Tetrazyklin. Nach weiteren 24h wurde der Luciferasetest durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Tet | RF  | molares<br>Verhältnis | Plasmide             |
|-----|---------|-----|-----|-----------------------|----------------------|
| 1   | 22175   | +   | 2,4 | 1:100                 | pUHD-DT-A: pUHD-15.1 |
| 2   | 9289    | -   |     | 1:100                 | pUHD-DT-A: pUHD-15.1 |
| 3   | 1195851 | +   | 1,2 | 1:100                 | pUHD-10.3: pUHD-15.1 |
| 4   | 974947  | -   |     | 1:100                 | pUHD-10.3: pUHD-15.1 |

**Tabelle 3.1:** Expressions- und Regulationskapazität des Tet-off-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionswerte des Reporterplasmids pSVluc in der Kontrolltransfektion (Nr. 3 und 4) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1 und 2) im induzierten (-) und reprimierten (+) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Tet= Tetrazyklin).

Die Ergebnisse zeigen eine geringe Eignung des Tet-off-Systems zur kontrollierten Expression des Diphtherietoxins.

Die Expressionswerte der Luciferase lagen im reprimierten Zustand (Tetrazyklin-Zugabe) mit  $2,2 \times 10^4$  gegenüber  $0,9 \times 10^4$  RLU/sec im induzierten Zustand (keine Tetrazyklin-Zugabe) um den Faktor 2,4 höher. Vergleicht man die RLU-Werte der Negativkontrolle (3+4) mit den Werten der mit dem DT-A-Gen transfizierten Zellen (1+2), so lässt sich eine große Differenz sowohl des induzierten als auch des reprimierten Zustandes erkennen. Das bedeutet, dass die Toxizität praktisch nicht reguliert werden kann. Die Ergebnisse zeigen im transienten Ansatz eine sehr geringe Regulabilität der DT-A-Toxizität des Tet-off-Systems und daher für die Fragestellung nicht geeignet ist.

### 3.2.1.2 Die Regulationskapazität des Tet-on-Systems in transienten Transfektionen

C6 Gliomzellen wurden mit dem Regulatorplasmid pUHD17.1 (kodiert das Transaktivator-Gen des Tet-on-Systems) und dem Responseplasmid pUHD-DT-A (kodiert das Diphtherie A-Kette-Gen) transient kotransfiziert. Als Reporterplasmid wurde wie zuvor das Plasmid pSVluc eingesetzt. Wie in allen Experimenten korreliert die Höhe des gemessenen RLU-Wertes mit dem Überleben der Zellen, d.h. je mehr Zellen durch die Induktion des Systems und die Expression des Diphtherietoxins sterben, desto geringer ist der gemessene RLU-Wert. Die Auswirkung der Expression des Diphtherietoxins auf die Luciferaseexpression

wurde jeweils nach 24h Induktion mit und ohne Doxyzyklin gemessen. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Dox | RF  | molares<br>Verhältnis | Plasmide             |
|-----|---------|-----|-----|-----------------------|----------------------|
| 1   | 1279    | +   | 1,8 | 1:100                 | pUHD-DT-A: pUHD-17.1 |
| 2   | 2423    | -   |     | 1:100                 | pUHD-DT-A: pUHD-17.1 |
| 3   | 19962   | +   | 1,0 | 1:100                 | pUHD-10.3: pUHD-17.1 |
| 4   | 21033   | -   |     | 1:100                 | pUHD-10.3: pUHD-17.1 |

**Tabelle 3.2:** Expressions- und Regulationskapazität des Tet-on-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionswerte des Reporterplasmids pSVluc in der Kontrolltransfektion (Nr. 3 und 4) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1 und 2) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox=Doxyzyklin).

Gemessen wurde die Luciferaseexpression von  $1,3 \times 10^3$  RLU/sec im induzierten Zustand gegenüber einem Wert von  $2,4 \times 10^3$  RLU/sec im reprimierten Ansatz. Dieses entspricht einem Regulationsfaktor von 1,8. Dieser Faktor ist sehr gering und für die Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien, die ein Toxigen kodieren und es reguliert exprimieren sollen, nicht ausreichend. Darüber hinaus ging die Repression der Expression des Toxins nicht annähernd auf die Werte der Kontrolle zurück ( $2,4 \times 10^3$  RLU/sec gegenüber  $2,1 \times 10^4$  RLU/sec). Aber gerade diese Voraussetzung muss ein Regulationssystem erfüllen können, wenn es für die stringente Regulation eines Toxings im Rahmen einer Gentherapie eingesetzt werden soll.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass auch dieses System zumindest unter transienten Transfektionsbedingungen eine sehr schlechte Regulation der Transgenvermittelten Toxizität zeigt, da insbesondere die Basaltranskription ( $2,4 \times 10^3$  RLU/sec) im Vergleich zur Negativkontrolle ( $2,1 \times 10^4$  RLU/sec) außerordentlich hoch ist. Das Tet-on-System ist in transienten Transfektionen für die Regulation eines Toxings ungeeignet. Da die Ergebnisse aus transienten Transfektionen nicht unmittelbar auf stabile Transfektionen übertragen werden können, wurde das Tet-on-System dennoch für stabile Transfektionen eingesetzt. Die niedrige Regulationskapazität der Zellen nach transienten Transfektionen ist unter anderem auf die fehlende Chromatinrepression und die Heterogenität der einzelnen Zellen zurückzuführen (vergl. Kap. 4.2). Es wäre also möglich,

dass in stabilen Transfektionen mit diesem System doch regulierbare Zelllinien etabliert werden könnten. Desweiteren wurden modifizierte Tet-on-System-Varianten untersucht, die eine höhere Repression aufweisen sollen.

### **3.2.1.3 Die Regulationskapazität des Tet-on-Systems im kombinierten Einsatz mit dem Silencerplasmid pTet-tTS**

Wie anhand der Ergebnisse aus den ersten Versuchen (Tet-on und Tet-off) zu erkennen ist, scheitern beide Regulationssysteme aufgrund unerwünschter Basalexpressionen und geringer Regulationskapazitäten. Um insbesondere die Basalexpressionen zu verhindern, wurde ein sogenanntes „Silencerplasmid“ pTet-tTS konstruiert (Clontech/Freundlieb et al., 1999). Dieses Plasmid soll eine integrationsunabhängige Kontrolle der Genexpression in transienten und stabilen Transfektionen ermöglichen (vergl. Kap. 1.7.1.3.1). Um die Basaltranskription in Transfektionen mit dem Tet-on-System reduzieren zu können, wurde das Plasmid pTet-tTS in dieser Arbeit in Kotransfektionen eingesetzt. In diesem Versuch wurden C6 Zellen transient mit dem Regulatorplasmid pUHD-17.1 und dem Responseplasmid pUHD-DT-A transfiziert. Zusätzlich wurde das pTet-tTS kotransfiziert, das für die Verwendung des Tet-on-Genexpressionssystems konstruiert wurde, um die reprimierte Genexpression weiter zu reduzieren. Die Plasmide wurden in einem molaren Verhältnis von 1 (pUHD-DT-A) zu 100 (pUHD-17.1) zu 50 (pTet-tTS) eingesetzt. Dies entsprach den Empfehlungen der Firma Clontech. Wie zuvor in den anderen Versuchen wurde auch hier das Plasmid pSVluc als Reporterplasmid verwendet.

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der transienten Transfektion dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Dox | RF  | molare Verhältnisse | Plasmide                       |
|-----|---------|-----|-----|---------------------|--------------------------------|
| 1   | 23678   | +   | 15  | 1:100:50            | pUHD-DT-A: pUHD-17.1: pTet-tTS |
| 2   | 375769  | -   |     | 1:100:50            | pUHD-DT-A: pUHD-17.1: pTet-tTS |
| 3   | 305507  | +   | 1,2 | 1:100:50            | pUHD-10.3: pUHD-17.1: pTet-tTS |
| 4   | 383455  | -   |     | 1:100:50            | pUHD-10.3: pUHD-17.1: pTet-tTS |

**Tabelle 3.3:** Expressions- und Regulationskapazität des kombinierten Tet-on/ptetTS-Silencerplasmids in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionswerte des Reporterplasmids pSVluc in der Kontrolltransfektion (Nr. 3 und 4) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1 und 2) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox=Doxyzyklin).

Die Verwendung des Silencerplasmids pTet-tTS verbesserte die Regulationskapazität des Tet-on-Systems von 1,8 (vergl. Kap. 3.2.1.2) auf einen Regulationsfaktor von 15.

Außerdem zeigt der Vergleich mit den zuvor beschriebenen Experimenten des Tet-off- und Tet-on-Systems, die außerordentliche Repressionsfähigkeit des Silencerplasmids im reprimierten Zustand ( $3,75 \times 10^5$  RLU/sec gegenüber  $3,83 \times 10^5$  RLU/sec), die nahe denen der Negativkontrolle liegen. Der Einsatz des pTet-tTS führt zu einer guten Toxin-Repressionsfähigkeit des modifizierten Tet-on-Systems. Zusammengefasst zeigt der Einsatz des Tet-Silencer-Systems im transienten Ansatz eine gute Regulationskapazität, insbesondere aufgrund der niedrigen Basalexpression. Aus diesem Grund ist dieses modifizierte Tet-on-System für die untersuchte Fragestellung stabiler Transfektionen potentiell interessant.

#### 3.2.1.4 Die Regulationskapazität des tet-Transaktivators prtTA2S-M2 in transienten Transfektionen (modifiziertes Tet-on-M2 System)

Eine weitere modifizierte Form des Tet-on-Systems stellt das Plasmid prtTA2S-M2 dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird das Plasmid prtTA2S-M2 in dieser Arbeit als pTet-on-M2 bezeichnet. Durch gezielte Mutagenisierungsversuche wurde das Regulatorplasmid des Tet-on-Systems verändert, was zu Vektoren mit anderen

Eigenschaften führte (Urlinger et al., 2000). Der konstruierte Vektor pTet-on-M2 zeigte eine höhere Affinität zu dem Induktormolekül, höherer Stabilität in den Zellen und stringendere Regulationswerte. Aus diesem Grund wurde das Plasmid auch im Rahmen dieser Arbeit auf seine Regulationseffizienz analysiert.

C6 Zellen wurden in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen der Plasmide pTet-on-M2 und pUHD-DTA transient transfiziert. Zusätzlich wurden Kontrolltransfektionen durchgeführt, indem das pTet-on-M2 und das Responseplasmid ohne das DT-A Insert (pUHD-10.3) kotransfiziert wurden. Der regulierte Zelltod ist wieder durch den Nachweis der Luciferaseaktivität des kotransfizierten Reporterplasmids pSVluc bestimmt worden. Die Expressionswerte dieser Transfektionen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Dox | RF  | molares Verhältnis | Plasmide              |
|-----|---------|-----|-----|--------------------|-----------------------|
| 1   | 2796    | +   | 6,6 | 1:1                | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 2   | 18675   | -   |     | 1:1                | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 3   | 4237    | +   | 3,9 | 20:1               | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 4   | 16605   | -   |     | 20:1               | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 5   | 5012    | +   | 3,6 | 50:1               | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 6   | 18507   | -   |     | 50:1               | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 7   | 14048   | +   | 2,2 | 100:1              | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 8   | 41684   | -   |     | 100:1              | pTet-on-M2: pUHD-DT-A |
| 9   | 50100   | +   | 1,9 | 1:1                | pTet-on-M2: pUHD-10.3 |
| 10  | 96889   | -   |     | 1:1                | pTet-on-M2: pUHD-10.3 |

**Tabelle 3.4:** Expressions- und Regulationskapazität des Tet-on-M2-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionswerte des Reporterplasmids pSVluc in der Kontrolltransfektion (Nr. 9 und 10) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1-8) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox=Doxyzyklin).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass das Tet-on-M2-System eine gewisse Regulation in jedem Ansatz aufweist. So beträgt der Regulationsfaktor im Ansatz Nr. 1 (induziert) und 2 (reprimiert) ca. 6,6 bei äquimolar eingesetzten DNA-Mengen der beiden Plasmide. Im Vergleich zur Negativkontrolle (9 und 10) weichen die Werte der reprimierten Zustände aller Ansätze (2, 4, 6, 8) jedoch weit ab. So beträgt der gemessene RLU-Wert des reprimierten Versuchsansatzes 1 nur  $1,9 \times 10^4$  RLU/sec gegenüber der Negativkontrolle  $9,7 \times 10^4$  RLU/sec bei gleichen molaren Konzentrationsverhältnissen der eingesetzten Plasmide. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass mit sinkender Responseplasmid-Menge (pUHD-DT-A) die Toxizität in den Zellen abnimmt, die gemessenen RLU-Werte ansteigen, während der Regulationsfaktor allerdings niedrig bleibt.

Auch wenn die erhaltenen Daten dieser transienten Transfektionen nicht den erwünschten Effekt einer nicht detektierbaren Basaltranskription zeigen, übertrifft die Regulation der Toxizität die der regulären Tet-on- und Tet-off-Systeme. Aus diesem Grund wurde das pTet-on-M2 Regulatorplasmid in der stabilen Transfektion in C6 Zellen weiter untersucht (vergl. Kap.3.4.3).

### 3.2.1.5 Die Regulationseffizienz des Tet-regulierten Transaktivator- und Repressor-Systems (Tet-on-Krab) in transienten Transfektionen

Eine weitere modifizierte Variante des Tet-on-Regulatorplasmids stellt das Plasmid pCMV-Krab-rTA dar (Forster et al., 1999). Das Plasmid kodiert zusätzlich eine Krab-Repressor-Domäne, die als chimäres tet-Repressorfusionprotein exprimiert wird (vergl. Kap. 1.7.1.3.3). Bindet die Krab-Domäne in der Nähe der DNA, so wird die transkriptionelle Aktivität eukaryotischer Promoter effizient reprimiert. Sowohl der Transaktivator als auch der Repressor werden durch Tetrazyklin reguliert. In Abwesenheit bindet das Repressorprotein an die Tet-Operator Sequenz, während in Anwesenheit des Induktors der Transaktivator an die Sequenz bindet und so die Expression des zu regulierenden Gens aktiviert.

Zunächst wurden C6 Zellen transient mit dem Regulatorplasmid pCMV-Krab-rTA (pCMV Krab), dem Responseplasmid pUHD-DT-A und pSVluc (Reporterplasmid) transfiziert. Es wurden zwei verschiedene molare Verhältnisse ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Dox | RF  | molares Verhältnis | Plasmide             |
|-----|---------|-----|-----|--------------------|----------------------|
| 1   | 16755   | +   | 2,8 | 1:20               | pUHD-DT-A: pCMV-Krab |
| 2   | 48234   | -   |     | 1:20               | pUHD-DT-A: pCMV-Krab |
| 3   | 19191   | +   | 4,7 | 1:100              | pUHD-DT-A: pCMV-Krab |
| 4   | 91613   | -   |     | 1:100              | pUHD-DT-A: pCMV-Krab |
| 5   | 299674  | +   | 1,1 | 1:100              | pcDNA 3.1:pCMV-Krab  |
| 6   | 320509  | -   |     | 1:100              | pcDNA 3.1:pCMV-Krab  |

**Tabelle 3.5:** Expressions- und Regulationskapazität des modifizierten Tet-on-Systems pCMV-Krab-rTA in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionswerte des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr. 5 und 6) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1-4) im induzierten und reprimierten Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox= Doxyzyklin).

Die Ergebnisse zeigen, dass dieses System nicht den erwarteten Effekt der niedrigen bzw. nicht detektierbaren Basaltranskription zeigt. Vergleicht man die Werte der nicht induzierten (d.h. reprimierten) Ansätze miteinander, so fällt auf, dass diejenigen der

Versuche (Nr. 2 und 4 mit Werten von  $4,8 \times 10^4$  bzw.  $9,1 \times 10^4$ ) nicht annähernd denjenigen der Negativkontrolle entsprechen (Nr. 6 mit einem Wert von  $3,2 \times 10^5$  RLU). Mit Regulationsfaktoren von 2,8 und 4,7 je nach molaren Verhältnissen liegt dieses System unter den Erwartungen, die ein gutes Regulationsystem zur effizienten Regulation eines Toxingens erfüllen muß. Das durch die Zugabe von Doxyzyklin regulierbare Transaktivator- und Repressor-System (pCMV-Krab-rTA) scheint für die regulierte Expression eines Toxingens nicht geeignet zu sein. Aus diesem Grund wurde auf weitere Experimente in stabilen Transfektionen verzichtet.

### **3.2.2 Die Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems in transienten Transfektionen**

Das GeneSwitch™-System basiert auf einem chimären Transaktivator, der aus mehreren Domänen verschiedenen Ursprungs besteht, wie der DNA-Bindungsdomäne des aus der Hefe stammenden GAL4-Proteins, der Ligandenbindungsdomäne des mutierten humanen Progesteron-Rezeptors und der Aktivierungsdomäne des humanen NFκB-Proteins. In Gegenwart des Antiprogestérons Mifepristone bzw. RU486 (bindet an die mutierte Form des Progesteronrezeptors) wird der chimäre Transaktivator aktiviert an eine spezifische DNA Sequenz im Responsevektor zu binden und so die Expression des gewünschten Gens zu aktivieren. C6 Zellen wurden transient mit den Plasmiden des GeneSwitch™-Systems und dem Reporterplasmid pSVluc transfiziert. In den Transfektionen wurden die molaren Verhältnisse des Transaktivator (pSwitch)- und Responsegens (pGene5-DT-A) kodierenden Vektors variiert (die unterschiedlichen molaren Verhältnisse entsprachen den Empfehlungen der Firma Invitrogen). In der Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | RU486 | RF  | molares Verhältnis | Plasmide               |
|-----|---------|-------|-----|--------------------|------------------------|
| 1   | 2300    | +     | 3,7 | 3:1                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 2   | 8710    | -     |     | 3:1                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 3   | 3021    | +     | 3,8 | 1:1                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 4   | 11709   | -     |     | 1:1                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 5   | 6285    | +     | 3,6 | 1:4                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 6   | 23200   | -     | -   | 1:4                | pSwitch : pGene5-DT-A  |
| 7   | 24320   | +     | 1,0 | 1:4                | pSwitch : pGene5-His-A |
| 8   | 23563   | -     |     | 1:4                | pSwitch : pGene5-His-A |

**Tabelle 3.6:** Expressions- und Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr. 7 und 8) und in Abhängigkeit der DT-A-Genexpression (Nr. 1 - 6) im induzierten und reprimierten Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, RU 486= Mifepristone).

Vergleicht man die gemessenen RLU-Werte der reprimierten Versuchsansätze (Nr. 2, 4, 6) miteinander, so fällt auf, dass der Wert des Versuchsansatzes 5 und 6 (molares Verhältnis 1:4 Überschuss des Responseplasmids) den höchsten Betrag zeigt. Erwarten würde man a priori, dass die RLU-Werte mit steigender DT-A-Plasmid-Menge sinken. Dieser Umstand resultiert aus der Eigenschaft des GeneSwitch™-Modells, dass der pSwitch-Vektor seine eigene Expression heraufreguliert (positives Feedback, vergl. Kap. 1.7.3). Je mehr pSwitch-Protein vorhanden ist, desto mehr Protein des Responseplasmids wird gebildet. Daraus folgt, dass in den ersten beiden Ansätzen die Luciferasewerte geringer sind als im letzten Test. Vergleicht man alle reprimierten Werte (Nr. 2, 4, 6) miteinander, so wird diese These weiter unterstützt. Je geringer der molare Anteil an Transaktivatorplasmid, desto geringer die Expression des Toxins, und desto mehr Zellen überleben und exprimieren das Reporterprotein Luciferase. Der reprimierte Versuchsansatz 6 (RLU/sec: 23200) zeigt darüberhinaus, dass das GeneSwitch™-System in der Lage ist, die Expression des Toxins zu reprimieren. Die erhaltenen Werte korrelierten mit den Werten der Negativkontrolle (RLU/sec: 22563). Die in diesem Versuch erhaltenen Daten deuteten auf eine mögliche Eignung des Systems für die Fragestellung. Insbesondere durch die niedrige Basaltranskription erfüllte das System die Voraussetzungen für die induzierte Expression

von Toxingenen. Daher wurden C6 Zellen stabil mit den Plasmiden des GeneSwitch™-System transfiziert.

### 3.2.3 Die Regulationskapazität des Dimerizer-System in transienten Transfektionen

Rivera et al. (1996) konstruierten dieses System, das auf der transkriptionellen Kontrolle von Rapamycin bzw. eines Derivats (AP 1510) beruht. Das System basiert auf einem chimären Transkriptionsfaktor, der durch die Zugabe des Induktors aktiviert wird, an eine Zielsequenz im Responseplasmid zu binden und dadurch die Expression des gewünschten Gens zu aktivieren (vergl. Kap.1.7.4). C6 Zellen wurden mit dem Transaktivatorplasmid pC<sub>4</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF3ZF, dem Responseplasmid pZ<sub>12</sub>I-DT-A-2 und dem Reporterplasmid pSVluc transient transfiziert. Es wurden sowohl verschiedene molare Konzentrationen der Plasmide, als auch verschieden hohe Konzentrationen des Induktormoleküls (AP1510) ausgetestet (nach Anweisung der Firma Ariad, USA). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.7 a, b, c zusammengefasst.

| Nr. | RLU/sec | AP1510<br>(mol. Konz) | RF  | molares<br>Verhältnis | Plasmide                                                                             |
|-----|---------|-----------------------|-----|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 39      | + 10nM                | 3,3 | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 2   | 131     | -                     |     | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 3   | 33      | + 10nM                | 9,2 | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 4   | 307     | -                     |     | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 5   | 63      | + 10nM                | 6,1 | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 6   | 394     | -                     |     | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 7   | 272     | + 10 nM               | 1,2 | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2   |
| 8   | 334     | -                     |     | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2.  |

**Tabelle 3.7a:** Expressions- und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zelle. Der Induktor AP1510 wurde in einer molaren Konzentration von 10nM eingesetzt. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr. 7 und 8) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1- 6) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde).

| Nr. | RLU/sec | AP1510<br>(mol. Konz) | RF  | molares<br>Verhältnis | Plasmide                                                                             |
|-----|---------|-----------------------|-----|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 9   | 52      | + 5nM                 | 2,7 | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 10  | 146     | -                     |     | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 11  | 76      | + 5nM                 | 4,6 | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 12  | 352     | -                     |     | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 13  | 127     | + 5nM                 | 3,4 | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 14  | 436     | -                     |     | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 15  | 436     | + 5 nM                | 0,9 | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2   |
| 16  | 412     | -                     |     | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2   |

**Tabelle 3.7b:** Expressions- und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Der Induktor AP1510 wurde in einer molaren Konzentration von 5nM eingesetzt. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr. 15 und 16) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 9- 14) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde).

| Nr. | RLU/sec | AP1510<br>(mol. Konz) | RF   | molares<br>Verhältnis | Plasmide                                                                             |
|-----|---------|-----------------------|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 17  | 42      | + 1nM                 | 4,4  | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 18  | 183     | -                     |      | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 19  | 46      | + 1nM                 | 3,9  | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 20  | 179     | -                     |      | 2:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 21  | 81      | +1nM                  | 6,7  | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 22  | 546     | -                     |      | 5:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-DT-A-2 |
| 23  | 404     | + 1nM                 | 0,96 | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2   |
| 24  | 390     | -                     |      | 1:1                   | pC <sub>4</sub> N <sub>2</sub> -R <sub>H</sub> S3H/ZF3ZF : pZ <sub>12</sub> I-PL-2   |

**Tabelle 3.7c:** Expressions- und Regulationskapazität des Dimerizer-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Der Induktor AP1510 wurde in einer molaren Konzentration von 1nM eingesetzt. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr.23 und 24) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 17 - 22) im induzierten (+) und reprimierten (-) Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde).

Neben den verschiedenen hoch eingesetzten molaren Konzentrationen der Plasmide wurde auch die Konzentrationen des Induktormoleküls AP1510 variiert. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Konzentrationen des Induktors keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression des Luciferaseproteins zeigen. Die gemessenen Luciferasewerte, sowohl im induzierten als auch im reprimierten Zustand, stimmten bei allen Konzentrationen ungefähr überein (z.B. Nr. 1, 9, 17). Die molaren Verhältnisse der Plasmide jedoch beeinflussten die Höhe der Messwerte der reprimierten Messwerte. Je höher die DNA-Menge des Regulatorplasmids gegenüber dem Responsevektor konzentriert war, desto höher war der meßbare Luciferaseexpressionswert der Zellen im reprimierten Zustand der einzelnen Versuche. So stiegen z.B. die gemessenen Werte der Ansätze in den Versuchen 1-6 mit zunehmender Konzentration des Regulatorplasmids von 131 RLU auf 394 RLU und im aktivierten Zustand von 39 RLU auf 63 RLU.

Das System zeigt eine gewisse Regulierbarkeit und erreicht Induktionsfaktoren bis zu einem Wert von 9,2 (Tabelle 3.7a, Nr. 3 und 4). Jedoch ließ sich eine geringe, aber messbare Basalexpression in jedem Ansatz nachweisen. Vergleicht man die reprimierten Werte z.B. des Versuchs Nr. 1 und 2 mit einem Wert von 131 RLU/sec und der entsprechenden Negativkontrolle Nr. 7 und 8 mit einem Wert von 334 RLU/sec, wird der Unterschied deutlich. Die hier nachgewiesene, aber dennoch geringe basale Expression des Reportergens könnte in einer stabilen Zelllinie wahrscheinlich ganz verhindert werden. Aus diesem Grund sind C6 Zellen stabil mit dem Dimerizer-Regulatorplasmid transfiziert und selektioniert worden (vergl. Kap.3.4.4).

### **3.2.4 Die Regulationskapazität des Ecdysone<sup>TM</sup>-Systems in transienten Transfektionen**

Das Ecdysone<sup>TM</sup>-Modell lässt sich als Regulationssystem in Säugerzellen einsetzen und basiert auf der Verwendung des Insektenhormons Ecdysone (vergl. Kap. 1.7.2). Dieses System soll aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften das optimalste, spezifisch induzierbare Regulationssystem für die Anwendung *in vitro* und *in vivo* sein (No et al., 1996). C6 Zellen wurden mit dem Transaktivatorplasmid (pVGRXR), dem Responseplasmid (pInd-DT-A) und dem Reporterplasmid (pSVluc) transient transfiziert und analysiert. Desweiteren wurden Negativkontrolltransfektionen durchgeführt, indem das Responseplasmid pIND ohne das Insert DT-A eingesetzt wurde. Den Empfehlungen

des Herstellers folgend, wurden verschiedene molare Konzentrationen der Plasmide ausgetestet (Invitrogen, Instruction Manual). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

| Nr. | RLU/sec | Ponasterone<br>A | RF  | molares<br>Verhältnis | Plasmide           |
|-----|---------|------------------|-----|-----------------------|--------------------|
| 1   | 201     | +                | 2,4 | 1:1                   | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 2   | 502     | -                |     | 1:1                   | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 3   | 525     | +                | 0,7 | 1:20                  | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 4   | 737     | -                |     | 1: 20                 | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 5   | 4079    | +                | 1,4 | 1:50                  | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 6   | 5811    | -                |     | 1:50                  | pIND-DT-A : pVGRXR |
| 7   | 43393   | +                | 1,1 | 1:1                   | pIND – pVGRXR      |
| 8   | 50127   | -                |     | 1:1                   | pIND– pVGRXR       |

**Tabelle 3.8:** Expressions- und Regulationskapazität des Ecdysone™-Systems in transient transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pSVluc der Kontrolltransfektion (Nr. 7 und 8) und in Abhängigkeit der regulierten DT-A-Genexpression (Nr. 1-6) im induzierten und reprimierten Zustand. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde).

Mit Regulationsfaktoren von 0,7 bis 2,4 je nach molaren Verhältnissen der Regulator- und Responseplasmide, zeigte dieses System in der transienten Transfektion nur wenig Regulationskapazität. Erwartungsgemäß stieg der RLU-Wert mit abnehmender Konzentration des pIND-DT-A-Plasmids. Die Regulationsfaktoren blieben jedoch in allen Transfektionsansätzen sehr gering. Die reprimierten Werte (Nr. 2, 4, 6) mit Werten von  $0,5 \times 10^3$  bis  $5,8 \times 10^3$  RLU/sec erreichten nicht annähernd die Werte der Negativkontrolle mit einer Luciferaseexpression von  $50 \times 10^3$  RLU/sec (Nr. 8). Aufgrund der geringen Regulationskapazität und der hohen Backgroundexpression war dieses System für die Fragestellung nicht geeignet. Daher wurde auf eine stabile Transfektion verzichtet.

### **3.3 Abschließende Bewertung der Regulationskapazitäten der einzelnen Systeme und der sich daraus ergebenden Konsequenz zur Etablierung stabil transfizierter C6 Zelllinien**

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Expressions- und Regulationskapazitäten von verschiedenen Regulationssystemen in transienten Transfektionen untersucht. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen der verschiedenen Regulationssysteme zeigten, dass nicht jedes System geeignet ist, ein toxisches Gen reguliert und stringent zu exprimieren. Besonders die verschiedenen Tet-Systeme zeigten sehr schlechte Regulationswerte. So erreichten das Tet-Off-System nur einen RF von 2,4 und das Tet-On-System nur einen RF von 1,8 und zeigten zudem hohe Basalexpressionen. Die Verwendung der beiden modifizierten Tet-on-Systeme-M2 und Tet-on-Krab verbesserten die Effizienz, aber dennoch nicht soweit, dass sie optimale Regulationsmöglichkeiten bieten könnten. Die Regulationskapazität des modifizierten Tet-on-M2-System erreichten Regulationsfaktoren von 2,2 bis 6,6 (vergl. 3.2.1.4). Das modifizierte Tet-on-Krab-System erreichte einen maximalen Regulationsfaktor von 4,7, zeigte eine viel zu hohe Basalexpression und wurde daher nicht weiter verwendet.

Der Einsatz des Silencerplasmids pTet-tTS zur Steigerung der Repressionsfähigkeit erhöhte die Regulationskapazität immerhin von 1,8 (Tet-on-Systems allein, Tab. 3.2) auf einen Wert von 15 (vergl. Tabelle 3.3). Zudem wurden Repressionswerte erreicht, die im Bereich der Negativkontrolle liegen (vergl. Tabelle 3.3). Dieses System erfüllte die Voraussetzungen eines für die Fragestellung geeigneten Regulationssystems und wurde aus diesem Grund auch in stabilen Transfektionen zur Etablierung einer induzierbaren Zelllinie eingesetzt. Das Ecdysone<sup>TM</sup>-Modell scheiterte für die Wahl weiterer Experimente, da hier keine Regulation erreicht werden konnte (vergl. Kap. 3.2.4). Zwei weitere Systeme zeigten in den transienten Versuchen gute Regulationseigenschaften und deuteten auf eine mögliche Eignung auch in stabilen Transfektionen hin. Das Dimerizer-System zeigte eine gewisse Regulationskapazität und niedrige basale Expressionswerte. Daher wurde auch dieses System in weiteren Experimenten zur Etablierung einer regulierbaren C6 Zelllinie verwendet.

Das GeneSwitch<sup>TM</sup>-System war besonders interessant aufgrund seiner extrem niedrigen Basaltranskriptionswerte und wurde daher in stabilen Transfektionen in C6 Zellen transfiziert.

### 3.4 Konstruktion von regulierbaren stabilen C6 Zelllinien mit den verschiedenen Regulationssystemen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer doppelt stabil transfizierten, regulierbaren C6 Gliomzelllinie (mit Regulatorgen und induzierbarem Toxigen), die im reprimierten Zustand des Toxins überleben, im aktivierten Zustand jedoch absterben. Nach der Selektion einer solchen Zelllinie sollten ihre Regulationseigenschaften *in vitro* sowie *in vivo* bestimmt und untersucht werden.

Nachdem in transienten Versuchen die Eignung der verschiedenen Regulationssysteme bereits untersucht wurde und es sich herausstellte, dass das modifizierte Tet-on-pTet-tTS, das Tet-on-M2 und das Dimerizer-System sowie das GeneSwitch™-System als besonders geeignet schienen, wurden mit diesen Systemen stabile Transfektionen durchgeführt. Auch das Tet-on-System wurde für die Etablierung einer stabilen Zelllinie eingesetzt.

Es wurden C6 Zellen mit dem jeweiligen Regulatorplasmid (und später gegebenenfalls mit dem DT-A-Responseplasmid) stabil transfiziert und selektioniert. Die mit dem Regulatorplasmid stabil transfizierten Klone wurden zunächst in transienten Transfektionen auf ihre Regulierbarkeit untersucht, indem sie mit einem Reporterplasmid (Luciferase-Gen oder lacZ-Gen unter Kontrolle des Regulators) transfiziert, induziert und analysiert wurden. Die Ergebnisse der induzierten und reprimierten Ansätze wurden mit denen der Negativkontrollen (Expressionswerte nicht transfizierter C6 Zellen) verglichen. Die Klone, die eine effektive Regulation zeigten und deren reprimierte Werte nahe der Kontrollwerte lagen, wurden für weitere Versuche eingesetzt.

### 3.4.1 Etablierung einer Tet-on-System stabil, transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz

C6 Zellen wurden mit dem Tet-on-Regulatorplasmid (pUHD-17.1) und dem Neomycin-Resistenzgen kodierenden Plasmid pcDNA3.1neo stabil transfiziert. Das molare Verhältnis entsprach 4:1 Überschuss des Regulatorplasmids pUHD-17.1. Diese Kotransfektion war erforderlich, da das Plasmid pUHD17.1 selbst kein Resistenzgen zur Selektion trägt. Nach ca. vier Wochen konnten die ersten Klone selektioniert und zur Anzucht größerer Zellmengen jedes Zellklons kultiviert werden. In einer transienten Transfektion mit einem Reportergen kodierenden Tet-Responseplasmid (pUHD13.3) wurde die Regulationsfähigkeit jedes Klons untersucht. In diesem Vektor steht die Expression des Reportergens luc unter der Kontrolle des tTA-abhängigen Promotors. 48 Stunden nach Induktion erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. In der Tabelle 3.9 sind die Regulationswerte der selektionierten Klone dargestellt.

| Klon | RLU/sec | Dox | RF  |
|------|---------|-----|-----|
| 1    | 33718   | +   | 2,0 |
| 1    | 11922   | -   |     |
| 2    | 120429  | +   | 2,0 |
| 2    | 58833   | -   |     |
| 3    | 72523   | +   | 2,1 |
| 3    | 36231   | -   |     |

**Tabelle 3.9:** Regulationskapazität der stabilen Tet-on-Regulatorplasmid transfizierten C6 Zellen. Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pUHD 13-3 unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultivierter Klone. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox= Doxyzyklin).

Von jeweils 25 erhaltenen Klonen zeigten nur 3 Klone eine messbare, aber sehr geringe Regulation (Tabelle 3.9). Die übrigen 22 Klone waren zwar gegen Neomycin resistent, was auf eine erfolgreiche Transfektion mit dem Resistenzplasmid zurückzuführen ist, aber sie zeigten keine Regulation des Reportergens (Daten nicht gezeigt). Die ermittelten Regulationsfaktoren des Tet-on-Systems mit einem Maximalwert von 2,1 sind sehr gering. Basierend auf den geringen Regulationswerten scheint das Tet-on-System nicht geeignet zu sein ein Gen optimal zu regulieren. Da auch in der Literatur nur geringe

Regulationsfaktoren und zudem hohe Basalexpressionen für das Tet-on-System beschrieben worden sind, wurde auf den weiteren Einsatz des Systems in dieser Arbeit verzichtet (Forster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Urlinger et al., 2000; Zheng et al., 2000).

#### **3.4.2 Etablierung einer Tet-on und pTet-tTS stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz**

Aufgrund der Regulationsergebnisse aus den transienten Transfektionen mit dem kombinierten Tet-on-System und dem Silencerplasmid pTet-TS (vergl. Kap. 3.2.1.3) wurden C6 Zellen in einer stabilen Transfektion mit den Plasmiden pUHD-17.1, pTet-tTS und pcDNA3.1neo transfiziert. Die Tripeltransfektion war aus zwei Gründen erforderlich:

1. Den Hersteller-Empfehlungen folgend wurde das Silencerplasmid stets mit dem Tet-on-Plasmid kotransfiziert
2. Das dritte Plasmid (pcDNA3.1 neo) ermöglichte die Selektion stabiler Klone

Aus diesem Versuch gingen nur 7 stabile Klone hervor, von denen aber nicht ein einziger Klon in transienten Kontrolltransfektionen mit dem Reporterplasmid pUHD 13-3 Luciferase exprimierte. Dieser Versuch der stabilen Transfektion wurde wiederholt, aber ohne Erfolg. Es gab keinen Hinweis darauf, dass diese Klone das Regulatorplasmid aufgenommen hatten und daher wurde mit diesem System nicht weiter gearbeitet.

#### **3.4.3 Etablierung einer prtTA2S-M2 stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz**

In diesem Versuch wurden C6 Zellen stabil mit dem prtTA2S-M2-Plasmid und einem Resistenz-Plasmid (pcDNA 3.1 neo) transfiziert. Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden über Neomycin selektioniert. Die Ermittlung der Regulationsfaktoren der stabilen Klone erfolgte durch die transiente Transfektion der Zellen mit dem Tet-on-Reporterplasmid pUHD-13.3. In Tabelle 3.10 sind die Ergebnisse von drei der getesteten Klone aufgelistet.

| Nr. | Klon       | Dox | RLU/sec                                       | RF  |
|-----|------------|-----|-----------------------------------------------|-----|
| 1   | 1          | +   | 63447                                         | 9,6 |
| 2   | 1          | -   | 6594                                          |     |
| 3   | 2          | +   | 331073                                        | 6,3 |
| 4   | 2          | -   | 5 2094                                        |     |
| 5   | 3          | +   | 588835                                        | 9,5 |
| 6   | 3          | -   | 61760                                         |     |
| 7   | 3          | +   | 20 (nicht transfiziert mit dem Reporter gen ) | 1,7 |
| 8   | 3          | -   | 12 (nicht transfiziert mit dem Reporter gen)  |     |
| 9   | C6 (neg K) | +   | 70270                                         | 1,1 |
| 10  | C6 (neg K) | -   | 61915                                         |     |
| 11  | C6 (neg K) | +   | 12 (nicht transfiziert mit dem Reporter gen)  | 1,1 |
| 12  | C6 (neg K) | -   | 11 (nicht transfiziert mit dem Reporter gen)  |     |

**Tabelle 3.10:** Regulationskapazitäten von drei ausgewählten stabilen Tet-on-M2-Klonen (1-8). Luciferase-Expressionen des Reporterplasmids pUHD-13-3 unter induzierten (+) und reprimierten (-) Bedingungen kultivierter Klone (1-6). Zusätzlich wurde die Hintergrundaktivität in einer Transfektion von C6 Zellen ermittelt (9,10). Zudem wurde überprüft, ob sich Luciferase auch in nicht transfizierten Klonen und in Kontrollzellen nachweisen lässt (7, 8 und 11, 12). Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, Dox= Doxyzyklin).

Vergleicht man die Daten der Klone mit denen der Negativkontrolle, so zeigt sich, dass die Werte der reprimierten Zustände im Bereich der Werte der Negativkontrolle liegen (z.B. Nr. 6 und Nr. 10). Subtrahiert man die RLU-Werte der Negativkontrolle als Basisexpression der C6 Zellen von denen der Klone ab, so zeigen alle drei Klone eine außerordentliche Regulationsfähigkeit. In diesem Versuchsansatz wurden zur Kontrolle auch nicht stabil transfizierte C6 Zellen mit dem Reporterplasmid transfiziert (Nr. 9 und 10). Die RLU-Werte zeigen im Vergleich zum nicht transfizierten Ansatz (Nr. 11 und 12) sehr hohe Werte. Da der Transaktivator des Tet-on-M2 Systems in diesen Zellen nicht vorlag, durfte keine Aktivierung der Luciferase-Genexpression stattfinden. Dieses

Ergebnis deutete auf eine endogene Aktivierung des Reporter-Responseplasmids in C6 Zellen hin. Dieses legt den Schluss nahe, dass das System für diese Zellen nur bedingt geeignet ist. Zellen, die nicht mit dem Reporterplasmid transfiziert worden sind, zeigten erwartungsgemäß keine Expression der Luciferase (7, 8 und 11, 12).

Im nächsten Versuchsschritt sollten Zellen eines dieser Klone (Klon Nr. 3) mit dem DT-A-Gen kodierenden Responseplasmid und dem Resistenzplasmid pcDNA3.1zeo (kodiert für Zeozin-Resistenz) stabil transfiziert werden und daraus entstehende stabile Klone weiter getestet werden. Es wurden 12 stabile Klone isoliert, die aber nach Zugabe des Induktors Doxyzyklin keine veränderte Vitalität zeigten, verglichen mit Kontrollzellen (Zellen des gleichen Klons, ohne Zugabe des Induktors kultiviert). Obwohl der tet-Transaktivator prtTa2S-M2 nach stabiler Transfektion die Expression eines transient transfizierten Reportergens gut reprimierte und für das Versuchsziel vorteilhaft schien, ließ sich kein pUHD-DT-A stabil transfizierter Zellklon isolieren. Auf weitere Versuche mit diesem System wurde daraufhin verzichtet.

#### **3.4.4 Etablierung einer pC<sub>4</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF3ZF stabil transfizierten C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz (Dimerizer-System)**

Die Ergebnisse der Regulationsfähigkeit des Dimerizer-Systems in C6 Zellen in transienten Transfektionen, deuteten auf eine Eignung Zelllinien konstruieren zu können, die optimal regulierbar sein könnten. Daher wurden in stabilen Transfektionen C6 Zellen mit dem Regulatorplasmid pC<sub>4</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF3ZF und einem Resistenz-Plasmid (pcDNA3.1 neo) im molaren Verhältnis von 4:1 transfiziert und anschließend unter selektiven Bedingungen gehalten. Die Kotransfektion war erforderlich, da das Regulatorplasmid kein Resistenzgen kodierte. Nach ca. vier Wochen wurden die ersten stabilen Klone gepickt, herangezogen und auf ihre Regulierbarkeit untersucht. Dazu wurden die Klone mit dem Dimerizer-Reporterplasmid pZ<sub>12</sub>I-lacZ-2 transient transfiziert und mit dem Induktor induziert bzw. nicht induziert (vergl. Kap. 3.2.3). Dieses Plasmid kodiert das lacZ-Gen. Über dessen Expressionshöhe, in Abhängigkeit des Regulatorplasmids und des Induktors AP 1510, lassen sich Aussagen über die Regulationsfähigkeit der stabilen Klone treffen. Darüber hinaus wurden zwei Negativkontrollen mit untersucht: zum einen wurden die lacZ-Werte nicht transfizierter Klone, zum anderen die Werte nicht transfizierter C6 Zellen gemessen.

Bei dieser Untersuchung zeigten sich folgende Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 3.11.

| Nr. | Klon | RLU/sec | AP 1510 | RF  | Reporterplasmid           |
|-----|------|---------|---------|-----|---------------------------|
| 1   | 1    | 26863   | +       | 379 | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 2   | 1    | 70      | -       |     | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 3   | 1    | 61      | +       |     | -----                     |
| 4   | 1    | 66      | -       |     | -----                     |
| 5   | 2    | 32646   | +       | 313 | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 6   | 2    | 104     | -       |     | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 7   | 2    | 74      | +       |     | -----                     |
| 8   | 2    | 96      | -       |     | -----                     |
| 9   | 3    | 1748    | +       | 75  | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 10  | 3    | 23      | -       |     | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 11  | 3    | 22      | +       |     | -----                     |
| 12  | 3    | 24      | -       |     | -----                     |
| 13  | 4    | 70328   | +       | 605 | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 14  | 4    | 116     | -       |     | pZ <sub>12</sub> I-lacZ-2 |
| 15  | 4    | 100     | +       |     | -----                     |
| 16  | 4    | 147     | -       |     | -----                     |

**Tabelle 3.11:** Regulationskapazitäten von vier ausgewählten pC<sub>4</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF3ZF stabil transfizierten C6-Klonen (Dimerizer-System). Expressionswerte des Reporterplasmids pZ<sub>12</sub>I-lacZ-2 in Abhängigkeit der Zugabe des Induktors AP1510 in transienten Transfektionen zur Ermittlung der Regulationseffizienz stabil transfizierter Dimerizer-Klone. Zusätzlich wurden die RLU-Werte nicht transfizierter Zellen ermittelt (3,4; 7,8; 11,12; 15,16) um so die Hintergrundaktivität reprimierter, Reporterplasmid transfizierter Klone bestimmen zu können (2, 6, 10, 14). Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, AP1510= Induktor).

Insgesamt wurden 44 stabile Klone selektioniert, von denen 8 Klone sofort getestet wurden. 6 der 8 getesteten Klone wiesen Expressionswerte von über  $1,7 \times 10^3$  RLU/sec im induzierten Zustand auf. Die anderen zwei Klone konnten durch die Zugabe des Induktormoleküls AP1510 nicht induziert werden und erreichten nur Werte von 1,0 und 2,2 (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Tabelle 3.11 zeigen die Ergebnisse von vier Klonen, die die besten Regulationskapazitäten aufwiesen.

Auffällig war die Varianz in der Expressions- und Regulationsstärke der 8 untersuchten Klone. Es ließen sich Zellklone mit Regulationswerten von 24 bis 605 (Klon 4) isolieren.

Die Höhe der Expression variierte sehr stark von Klon zu Klon. Dieser Unterschied in der Expressionsregulation hängt unter anderem vom Integrationsort des zu regulierenden Gens ab und kann durch endogene Faktoren beeinflusst werden. Beispielsweise können in der Nähe lokalisierte Enhancerelemente eine Expression stimulieren, Repressorelemente jedoch reduzieren, oder sie verhindern die Expression eines nahe gelegenen Gens (vergl. Kap. 4.2). Vergleicht man die Expressionswerte der transfizierten Zellen (z.B. Klon 3: Nr. 9- 10) mit den Daten der nicht transfizierten Zellen des gleichen Klons (Nr. 11 und 12), so lässt sich keine Basaltranskription detektieren. Die  $\beta$ -Galaktosidase Expression sinkt auf den Basiswert ab und es kommt demnach zu einer vollständigen Repression des Zielgens. Demnach ist das System „dicht“ und für die Fragestellung hervorragend geeignet. Klon Nr. 3 wurde für weitere Transfektionen eingesetzt und mit dem DT-A- kodierenden Responseplasmid und einem Resistenzplasmid pcDNA3.1zeo (kodiert das Zeozin vermittelte Resistenzgen) transfiziert. Nach der Selektion wurden 17 Klone erhalten, die jedoch nach Zugabe des Induktors keine Veränderung im Wachstumsverhalten bzw. Anzeichen von toxischen Reaktionen zeigten. Es besteht die Möglichkeit, dass das zu regulierende DT-A-Gen in die Nähe eines Enhancers gelangt und eine Expression des Toxins unabhängig vom Induktor und Transaktivator des Systems ausgelöst wurde und die entsprechenden Zellen vor Abschluß der Selektion gestorben sind. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Gen in die Nähe eines endogenen Repressors integrierte und die Expression verhindert wurde, oder die Transfektion war fehlerhaft. Da es ein weiteres System mit optimalen Eigenschaften zu testen galt, wurde vorerst auf einen Einsatz des Dimerizer-Systems zur Etablierung einer DT-A stabil transfizierten Zelllinie verzichtet.

### 3.4.5 Etablierung einer pSwitch stabil transfizierten, regulierbaren C6 Zelllinie und deren Regulationseffizienz (GeneSwitch™-System)

In diesem Versuch wurden C6 Zellen stabil mit dem Transaktivator gen kodierenden Regulatorplasmid des GeneSwitch™-Modells transfiziert. Darüber hinaus vermittelt das Plasmid eine Hygromycin-Resistenz. Insgesamt sind 48 Klone nach der Selektion etabliert worden. 23 Klone wurde sofort auf ihre Regulationskapazität getestet, die anderen sind bis zur weiteren Verwendung in Stickstoff gelagert worden. Die getesteten Klone wurden mit dem Reporterplasmid pGene/V5-His/lacZ transient transfiziert, induziert bzw. reprimiert kultiviert und nach 48h analysiert. In der nachfolgenden Tabelle 3.12 sind nur die Werte der Klone mit den besten Regulationseigenschaften gezeigt.

| Nr. | Klon | RLU/sec | RU486 | RF   | Reporterplasmid   |
|-----|------|---------|-------|------|-------------------|
| 1   | 1    | 833971  | +     | 278  | pGene/V5-His/lacZ |
| 2   | 1    | 2996    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 3   | 2    | 94134   | +     | 27   | pGene/V5-His/lacZ |
| 4   | 2    | 3470    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 5   | 3    | 672828  | +     | 291  | pGene/V5-His/lacZ |
| 6   | 3    | 2310    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 7   | 4    | 367805  | +     | 274  | pGene/V5-His/lacZ |
| 8   | 4    | 1337    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 9   | 5    | 14406   | +     | 4,5  | pGene/V5-His/lacZ |
| 10  | 5    | 3230    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 11  | 6    | 263632  | +     | 79,8 | pGene/V5-His/lacZ |
| 12  | 6    | 3308    | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |
| 13  | C6   | 424     | +     | 1,0  | pGene/V5-His/lacZ |
| 14  | C6   | 422     | -     |      | pGene/V5-His/lacZ |

**Tabelle 3.12:** Regulationskapazitäten von sechs ausgewählten pSwitch stabil transfizierten C6 Zellen (GeneSwitch™-System). Expressionswerte des Reporterplasmids pGene/V5-His/lacZ in transienten Transfektionen zur Ermittlung der Regulationseffizienz stabil transfizierter C6switch-Klone in Abhängigkeit der Zugabe des Induktors RU486. Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde, RU 486= Induktor)

Insgesamt wurden 36 Klone selektioniert, von denen 23 sofort auf ihre Regulationseigenschaft getestet worden sind. In vier Klonen ließ sich keine Expression

nachweisen, obwohl alle getesteten Zellklone eine Hygromycin-Resistenz aufwiesen. 19 der 23 untersuchten Zellklone zeigten im induzierten Zustand eine  $\beta$ -Galaktosidaseexpression von mehr als  $1 \times 10^4$  RLU/sec. Alle 19 Klone zeigten vorhandene Regulationskapazitäten, die sich jedoch in ihren Expressionswerten stark voneinander unterscheiden (Daten nicht gezeigt). In der Tabelle 3.12 sind die Regulationsfaktoren von 6 ausgewählten Klonen dargestellt. In 4 Zellklonen zeigte die Regulation der Expression Induktionsfaktoren von über 67 und erreichte mit dem Faktor 291 den Maximalwert (Klon 3). Es gab jedoch auch Zellklone, die sich wenig regulieren ließen, wie z.B. Klon 18 mit einem Regulationsfaktor von 3,5 (Daten nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Regulationsfaktoren lassen sich auf den Einfluss der umgebenden chromosomalen Sequenzen des Integrationsortes zurückführen (vergl. Kap. 4.2). Auch die Höhe der Induktionsfaktoren variierte beträchtlich zwischen den einzelnen Klonen. Das Expressionsmuster war in den verschiedenen Klonen nicht homogen und resultierte aus der unterschiedlichen Integrationsstelle der transfizierten Plasmid-DNA ins Zellgenom.

Um die Stabilität der regulierten Expression über einen längeren Zeitraum zu kontrollieren, wurden die drei Klone mit den besten und höchsten Regulationsfaktoren über 10 Passagen in Hygromycin-haltigem Medium kultiviert und dann die Expression im induzierten und reprimierten Zustand erneut gemessen. Das Ergebnis dieses Versuches zeigte, dass die drei getesteten Klone auch über einen längeren Zeitraum eine stabile Induktion aufweisen. Darüberhinaus wurden diese Klone in Stickstoff gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen. Auch die revitalisierten Klone zeigten eine stabile Expression und Regulation, die vergleichbar mit den Anfangswerten unmittelbar nach der Selektion waren. Klon Nr. 3 wurde für weitere Versuche eingesetzt (vergl. Tab. 3.12, Nr. 5,6).

### 3.5 Zusammenfassung der stabilen Transfektionen der Regulatorplasmide der einzelnen Regulationssysteme

Die verschiedenen eingesetzten Systeme zur Etablierung einer induzierbaren C6 Zelllinie zeigen eine große Varianz in der Regulationskapazität, sowohl unter den verschiedenen Systemen als auch innerhalb eines Systems selbst. So erreichte das Tet-on-System einen maximalen Regulationsfaktor von 2,1. Dieser Wert war für die weiteren Experimente nicht ausreichend, und daher wurde mit den erhaltenen Klonen nicht weitergearbeitet.

Aus der stabilen Tripeltransfektion und der Verwendung des modifizierten Tet-on-pTet-tTS-Systems ließen sich keine regulierbaren Zellklone isolieren.

Das Tet-on-M2-System zeigte eine große Varianz in der Höhe der Induktionsfaktoren der verschiedenen Klone und wurde in weiteren Experimenten mit dem DT-A kodierenden Responseplasmid stabil transfiziert. Dieser Versuch erbrachte allerdings keine induzierbaren Zellklone hervor.

Zelllinien, die mit den Regulatorplasmiden des Dimerizer- und des GeneSwitch™-Systems etabliert worden sind, zeigten dagegen relativ gute Regulationseigenschaften. Zum Teil ließen sich Zellklone mit sehr hohen Regulationsfaktoren isolieren. Unter der Verwendung des GeneSwitch™-Systems wurde ein Zellklon isoliert, der einen Regulatorsfaktor von 291 zeigte, und mit diesem Klon wurden die weiteren Experimente durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen wurde die zweite stabile Transfektion mit den Zielgen kodierenden Responseplasmiden des GeneSwitch™-Systems durchgeführt.

Es ist davon auszugehen, dass auch das Dimerizer-System für die Regulierung eines Toxingens geeignet ist, da die isolierten Klone sehr hohe Induktionsfaktoren aufwiesen. So gab es einen Dimerizer-Klon, der einen Regulationsfaktor von 605 zeigte. In der durchgeführten stabilen Transfektion konnten allerdings keine stabilen DT-A transfizierten Klone selektioniert werden.

Zunächst wurde noch das GeneSwitch™-System für die Etablierung der Zelllinien verwendet.

### 3.6 Die Etablierung stabil transfizierter Zielgen regulierbarer C6 Zellen

Nachdem das Regulatorplasmid des GeneSwitch™-Systems erfolgreich in C6 Zellen transfiziert wurde und Klone mit guten Regulationskapazitäten etabliert werden konnten, folgte die Konstruktion von doppelt stabil transfizierten C6 Zellen. In dieser zweiten stabilen Transfektion sollte nun das GeneSwitch™-Responseplasmid in die Zellen transfiziert werden. Für die weiteren Versuche wurde der in Versuch 3.4.5 beschriebene Klon Nr. 3 verwendet und als C6switch bezeichnet. In zwei unabhängigen Transfektionen wurde zum einen das lacZ kodierende Responseplasmid pGene/V5-His/lacZ und zum anderen das DT-A kodierende Responseplasmid pGene/V5-His/DT-A des GeneSwitch™-Systems in die Zellen dieses Klons transfiziert und selektioniert.

#### 3.6.1 Die Etablierung einer stabil lacZ-Gen regulierbaren C6 Zelllinie (C6switch-lacZ)

In einer weiteren stabilen Transfektion sollte der Vektor pGene/V5-His/lacZ in das Genom des Klons C6switch stabil integriert werden. Diese Zelllinie sollte zeigen, ob das GeneSwitch™-Transkriptionsregulations-System *in vitro* (und später auch *in vivo*) zur Kontrolle der Genexpression von Genen geeignet ist. Erst nach erfolgreicher stringenter Regulation des Reportergens, sollte die Regulationseffizienz des GeneSwitch™-Systems zur regulierten Expression des Diphtherietoxins untersucht werden. Von 32 erhaltenen Klonen wurden zunächst 20 Klone ausgetestet. Dazu wurden sie unter induzierten und reprimierten Bedingungen 48h kultiviert und die Expression des Responsegens lacZ gemessen. Es regulierten 17 das lacZ-Gen in  $\beta$ -Galaktosidaseassays sehr effizient. In der Tabelle 3.13 sind die Regulationswerte ausgewählter Klone dargestellt.

| Nr. | Klon | RLU/sec | RF   | RU486 |
|-----|------|---------|------|-------|
| 1   | 1    | 130756  | 1608 | +     |
| 2   | 1    | 81      |      | -     |
| 3   | 2    | 1485646 | 55   | +     |
| 4   | 2    | 26702   |      | -     |
| 5   | 3    | 712234  | 390  | +     |
| 6   | 3    | 1823    |      | -     |
| 7   | 4    | 1575731 | 111  | +     |
| 8   | 4    | 14220   |      | -     |
| 9   | 5    | 697882  | 420  | +     |
| 10  | 5    | 1658    |      | -     |
| 11  | 6    | 491683  | 1101 | +     |
| 12  | 6    | 446     |      | -     |
| 13  | C6   | 363     | 6,8  | +     |
| 14  | C6   | 53      |      | -     |

**Tabelle 3.13:** Regulationskapazitäten von 6 ausgewählten C6switch-lacZ Klonen.

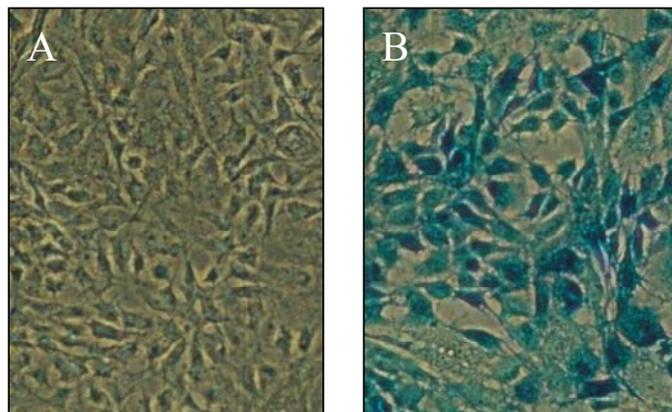
Expressionswerte des Responseplasmids pGene/V5-His/lacZ in stabilen Transfektionen zur Ermittlung der Regulationseffizienz stabil transfizierter C6switch-lacZ-Klone in Abhängigkeit der Zugabe des Induktors RU486 (Nr. 1- 12). Als Negativkontrolle dienten transient transfizierte C6 Zellen. (Nr. 13, 14). Die Regulationsfaktoren werden durch die Division der induzierten durch die reprimierten Expressionen berechnet. Die angegebenen Expressionswerte ergeben sich aus drei unabhängig durchgeführten Messungen. (RF= Regulationsfaktor, RLU/sec= Relative Light Units gemessen pro Sekunde).

Die getesteten Klone zeigen eine sehr große Regulationsvarianz (RF von 55-1608). So erreichten zwei Klone (1 und 6) Regulationsfaktoren von mehr als 1101 bis zu einem Faktor von 1608. Zur weiteren Charakterisierung wurden die drei Klone mit den besten Regulationswerten ausgewählt (Klone 1, 5 und 6). Nach ca. 7 Passagen veränderte sich die Vitalität der Klone 1 und 6, die eine besonders gute Regulationskapazität aufwiesen. Sie starben innerhalb eines Zeitraumes von einer Woche nach der Induktion ab. Da das  $\beta$ -Galaktosidaseprotein eigentlich nicht toxisch auf Zellen wirkt, lassen sich über dieses Verhalten nur Vermutungen anstellen. So könnte es bei diesen hohen Induktions- und Expressionswerten doch zu toxischen Reaktionen in der Zelle kommen und es werden Gene in der Nähe des Inserts aktiviert, die aufgrund stärkerer Expression toxisch wirken, oder das Gleichgewicht in der Zelle wird verändert, indem die natürlich vorliegende

Menge eines Proteins vielleicht auch reduziert, oder überproportional hoch synthetisiert wird und dadurch wichtige zellbiologische Prozesse verhindert bzw. negativ beeinflusst werden. Da die beiden oben genannten Klone (1 und 6) nicht das gewünschte Regulations- und Vitalitätsverhalten zeigten, wurde mit Klon Nr.5 weiter gearbeitet (RF 420). In den weiteren Beschreibungen werden diese Zellen als C6switch-lacZ-5 bezeichnet. Die Regulationskapazität des Klons 5 war im Vergleich zu den beiden anderen Klonen 1 und 6 zwar niedriger, aber die Zellen zeigten sowohl im induzierten als auch im reprimierten Zustand keine Anzeichen toxischer Reaktionen.

### 3.6.1.1 Die Charakterisierung der Regulationskapazität der C6switch-lacZ Zelllinie (X-Gal-Test und Western Blot)

Um auch in *in vivo* Experimenten einsetzbar zu sein, mußte die Basisexpression im reprimierten Zustand überprüft werden. Dazu erfolgte der  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis in einer histologischen Untersuchung mit dem Substrat X-Gal. Zu diesem Zweck wurden die Zellen des Klons jeweils unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultiviert. 48h nach der Induktion wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit der X-Gal Lösung über Nacht inkubiert. Die folgenden Fotos (Abb. 3.1) zeigen die Ergebnisse des Versuches.



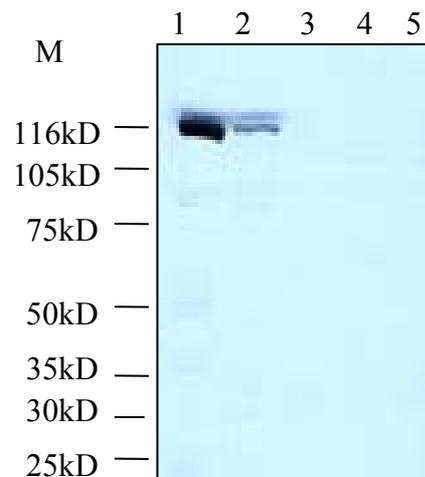
**Abbildung 3.1:** Regulation der lacZ-Genexpression in Zellen des Klons C6switch-lacZ5. Die Zellen wurden 48h nach Induktion (B) bzw. Repression (A) fixiert und mit X-Gal Lösung inkubiert. 100x vergrößert

Die Ergebnisse zeigen die lacZ-Genexpression in induzierten C6switch-lacZ-5 Zellen. Die induzierten Zellen sind blau gefärbt und zeigen somit die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Zellen des nicht induzierten Ansatzes zeigen keine Blaufärbung nach der Inkubation mit der X-Gal Lösung. Die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase lässt sich demzufolge nur in Zellen nachweisen, die durch die Zugabe des Induktors RU486 zur Expression des

Zielgens aktiviert worden sind. Wie man der Abbildung 3.1B entnehmen kann, zeigen die einzelnen Zellen Unterschiede in der Intensität der Färbung. Diese Unterschiede resultieren aus der Tatsache, dass sich Zellen einer Population durchaus im Zellzyklus unterscheiden und nicht unbedingt synchrone Lebensstadien aufweisen. So besteht die Möglichkeit, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befanden und dementsprechend unterschiedliche Genexpressionsmuster aufweisen. Aus diesem Grund war die detektierte geringe Heterogenität innerhalb des Klons durchaus natürlich und tolerierbar.

Die Ergebnisse belegen die stringente transkriptionelle Regulation des Reportergens und keine nachweisbare Basalexpression. Zur Quantifizierung dieses Ergebnisses, wurde der proteinbiochemische Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase von induzierten und reprimierten C6switch-lacZ-5 Zellen im Western Blot untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen wieder unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultiviert. 48h nach Induktion wurden die Zellen für die Gewinnung der Gesamtzellextrakte für den Western Blot geerntet und wie beschrieben (vergl. Kap. 2.3.7) präpariert. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte C6 Zellen eingesetzt, die ebenfalls mit und ohne dem Induktor RU486 kultiviert worden sind. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes  $\beta$ -Galaktosidase Referenzprotein (Biorad, München) aufgetragen. Nach der Bradford Proteinbestimmung wurden jeweils 50 $\mu$ g Gesamtprotein auf ein 12,5%-iges SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im „Semidry“ Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Schleicher&Schnell, Dassel) transferiert. Das  $\beta$ -Galaktosidaseprotein wurde mit einem monoklonale Maus-anti beta-Galaktosidase IgG Antikörper (Promega, USA), einem sekundären Ziegen-anti-Maus-IgG-Peroxidase gekoppelten Antikörper (Sigma Aldrich) und dem Substrat ECL (Amersham Life Science) auf einem Röntgenfilm (Kodak) nachgewiesen.

In der nächsten Abbildung 3.2 ist das Ergebnis der Western Blot Analyse dargestellt.



**Abbildung 3.2:** Western Blot Analyse zum biochemischen Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase von induzierten und reprimierten C6switch-lacZ5 Zellen und C6-Zellen (Negativkontrolle). 1=  $\beta$ -Galaktosidase-Referenzprotein, 2= induzierte C6switch-lacZ5 Zellen, 3= reprimierte C6switch-lacZ5 Zellen, 4= induzierte C6 Zellen, 5= reprimierte C6 Zellen, M= Rainbow, MG Standard-Marker. 1. AK: monoklonaler Maus-anti- $\beta$ -Gal IgG (Verd.1: 5000), 2. AK: sekundärer Ziegen-Anti-Maus-IgG Peroxidase gekoppelt (Verd. 1: 50000); Expositionszeit 30 sec

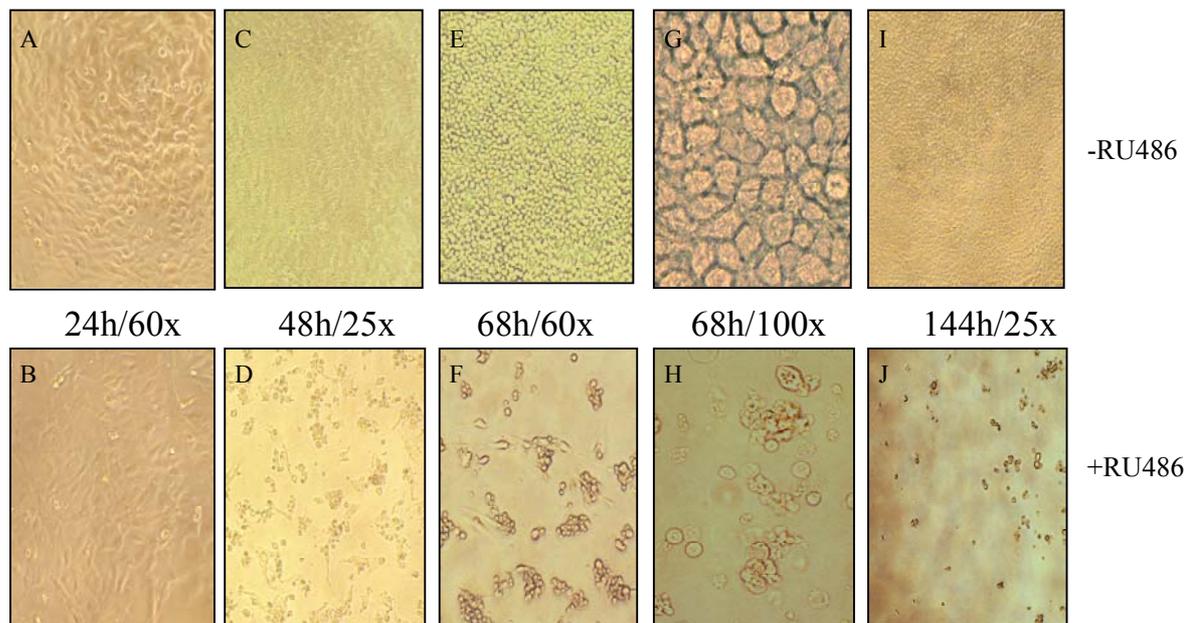
Die Western Blot Analyse zeigt, dass das lacZ-Gen in den induzierten und stabil transfizierten C6switch-lacZ Zellen exprimiert wird. Wie zu erkennen ist, zeigen die Spuren 1 und 2 jeweils eine Bande bei 116kD. Diese Bande entspricht der molekularen Größe des  $\beta$ -Galaktosidaseproteins. Das  $\beta$ -Galaktosidaseprotein ließ sich nur in den induzierten Zellen des C6switch-lacZ (Spur 2) und in der Spur der Positivkontrolle (Spur 1) nachweisen. Nicht induzierte, sowie die Negativkontrollen exprimierten nachweislich kein lacZ-Gen (Spuren 3, 4). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die etablierte Zelllinie C6switch-lacZ stringent regulierbar und für die folgenden *in vivo* Analysen geeignet war. Der hier untersuchte C6switch-lacZ-K5 Klon zeichnete sich neben guten Regulationseigenschaften auch durch die hohe Expressions- und Induktionsstabilität aus. Daher wurde er auch für die weiteren *in vivo* Experimente eingesetzt. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse deutlich, dass das GeneSwitch™-System für die regulierte Gen-Expression in *in vitro* Versuchen geeignet ist. Da in den durchgeführten Versuchen keine Basaltranskription nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass das GeneSwitch™-System auch für die regulierte Expression des Diphtherietoxins geeignet ist.

### **3.6.2 Die Etablierung einer DT-A-Gen stabil transfizierten, regulierbaren C6switch Zelllinie**

Im nächsten Schritt wurde der mit dem GeneSwitch™-Regulatorplasmid stabil transfizierte Klon mit der besten Repression (vergl. 3.4.5/ Klon3) in einer stabilen Transfektion mit dem DT-A-Gen kodierenden Responseplasmid transfiziert und auf stabile Klone selektioniert. Dabei handelte es sich um den Zellklon, der auch im zuvor beschriebenen Versuch eingesetzt worden ist (vergl. Kap. 3.6.1). Es wurden ca. 30 stabil transfizierte Klone erhalten, von denen 4 (Klone 1, 19, 20, 24) optimale Regulationseigenschaften zeigten. Sie ließen sich durch die Zugabe des Induktors RU486 induzieren, exprimierten daraufhin das Diphtherietoxin und starben. Im nicht aktivierten (reprimierten) Zustand überlebten die Zellen und zeigten keine Unterschiede in Bezug auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie gegenüber der Negativkontrolle (nicht transfizierte C6 Zellen). Die 26 anderen Klone zeigten kein homogenes Expressionsmuster, so ließen sich nicht alle Zellen induzieren, bzw. einige Zellen starben nach der Zugabe des RU486 nicht ab. Dieses Ergebnis lässt zwei Rückschlüsse zu. Es besteht die Möglichkeit, dass nicht alle untersuchten Klone „sauber“ isoliert wurden, und es sich um eine heterogene Zellmischung aus verschiedenen stabilen Primärklonen handelt. Um diese Möglichkeit jedoch weitgehend ausschließen zu können, wurden die Klone subkultiviert (vergl. Kap. 2.4.8).

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass sich die Zellen innerhalb eines Klons im Expressionsmuster unterscheiden und durch Mutation die Expression eines eingefügten Genabschnittes verändern bzw. komplett einstellen.

Zunächst wurden bei den 4 Zellklonen die morphologischen Unterschiede zwischen induzierten und reprimierten Versuchsansätzen durch die visuelle Kontrolle mit Hilfe des Mikroskops (Interferenzkontrast) bestimmt. Als Negativkontrollzellen dienten C6 Zellen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert worden sind (Daten nicht gezeigt). In der Abbildung 3.3 ist das Vitalitätsverhalten von induzierten und reprimierten C6switch-DT-A Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Vitalitätsverhalten von C6switch-DT-A Zellen unter induzierten (+RU486) und reprimierten (-RU486) Bedingungen. Abbildungen A, C, E, G, und I zeigen Zellen, die in ohne RU486 kultiviert wurden. Abbildungen B, D, F, H, und J zeigen Zellen, die mit RU486 kultiviert wurden. Die Veränderung der Zellmorphologie bzw. das Absterben der Zellen wurde nach definierten Zeitpunkten mikroskopisch fotografiert.

Der Einfluss des Induktors RU486 auf das Überleben der Zellen wird auf den Fotos deutlich. 24h nach der Induktion zeigten die Zellen noch keinen deutlichen, morphologischen Unterschied zu den nicht induzierten Zellen. Nach 44h erkennt man deutliche Veränderungen der Zellstruktur. Die induzierten Zellen deformierten in blasig strukturierte Zellkörper und viele Zellen haben sich bereits vom Untergrund abgelöst. Wurden die vier Klone unter induzierten Bedingungen kultiviert, ließen sich nach 144 Stunden keine lebenden Zellen mehr detektieren. Die Zellen unter nicht aktivierten Bedingungen zeigten keine auffälligen morphologischen Merkmale und unterschieden sich nicht von nicht transfizierten C6 Zellen (Negativkontrolle). Darüber hinaus zeigten die Zellen der Negativkontrolle sowohl im induzierten als auch im nicht aktivierten Zustand morphologisch keine Unterschiede. Die nicht induzierten C6switch-DT-A Zellen allerdings bedeckten bereits die gesamte Fläche der Zellkulturschale unterschieden sich nicht von „normalen“ nicht transfizierten C6 Zellen. Die Fotos zeigen deutlich, dass es gelungen ist, eine stringent regulierbare Diphtherietoxin exprimierende Gliomzelllinie zu etablieren. Zur Unterstützung dieser Daten wurden zwei weitere biochemische Methoden zur Quantifizierung des Zelltods und der Zellproliferation durchgeführt. Die Vitalität und Absterberate der vier Klone im induzierten bzw. nicht induzierten Zustand wurden mit verschiedenen Methoden (MTT-Vitalitätstest und LDH-Cytotoxizitätstest) analysiert.

### **3.6.3 Die Charakterisierung der Regulationskapazitäten der C6switch-DT-A Klone mit biochemischen Methoden**

Um die Regulationskapazitäten der vier stabil transfizierten C6switch-DT-A Klone zu charakterisieren, wurden Analysen des Vitalitäts- und des Cytotoxizitätsverhaltens nach Induktion bzw. Repression durchgeführt. Das Ziel war, einen Klon mit optimalen Regulationseigenschaften zu finden, der eine hohe Absterberate durch die Expression des Toxins im induzierten Zustand zeigt, jedoch zelltypisches Wachstumsverhalten und charakteristische Überlebensraten von C6 Zellen im reprimierten Zustand aufweist.

#### **3.6.3.1 Charakterisierung der Proliferationseigenschaften der vier C6switch-DT-A Klone mit dem Vitalitätstest (MTT-Test)**

Der MTT-Test zeigt die Zahl metabolisch aktiver, lebender Zellen in der Kultur. Dieser Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses MTT, das in Wasser unlösliche blaue Formazankristalle bildet, die durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase gespalten werden können. Dieses Enzym ist allerdings nur in vitalen Zellen zu finden und somit findet die Spaltung nur in lebenden Zellen statt (Slater et al., 1963). Das Formazan kann mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol gelöst werden und die optische Dichte lässt sich dann spektrometrisch messen. Die gemessene Absorption korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der untersuchten Kultur (Mosmann, 1983, Heeg et al., 1985, Carmichael et al., 1987). Die gemessenen Absorptionswerte der induzierten Klone sollten in dieser Messung gegenüber den Werten der nicht aktivierten Zellen sehr gering sein. Die Werte der nicht induzierten Zustände sollten im optimalen Fall nahe denen der Negativkontrolle liegen, um zu zeigen, dass das System keine Basaltranskription aufweist.

Für diesen Versuch wurden Zellen der C6switch-DT-A Klone 1, 19, 20, 24 unter induzierten und reprimierten Bedingungen auf 96well-Microtiter Platten kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde das Medium durch die Zugabe der MTT-Lösung ersetzt und der Test wie beschrieben durchgeführt (vergl. Kap. 2.5.3). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion wurden die Versuche gestoppt, um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die meisten Zellen absterben und die Expression des Diphtherietoxingens zum Zelltod führt. Die gewählten Zeitpunkte entsprachen denen im Versuch zuvor (vergl. Kap. 3.6.2). Dazu wurde die MTT-Lösung abgenommen und die entstandenen Formazan-Kristalle durch die Zugabe von Isopropanol gelöst. Die Messung

der Farbtintensität erfolgt im ELISA Reader bei 570nm (Referenzfilter 690nm). In der nachfolgenden Tabelle 3.14 sind die Ergebnisse der verschiedenen Klone und die der Negativkontrolle zu verschiedenen Zeiten nach Induktion bzw. Repression dargestellt.

|             | Klon 1       |              | Klon 19      |              | Klon 20      |              | Klon 24      |              | Neg. Kontrolle |              |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
|             | +RU486       | -RU486       | +RU486       | -RU486       | +RU486       | -RU486       | +RU486       | -RU486       | +RU486         | -RU486       |
| <b>20h</b>  | <b>0.884</b> | <b>0.543</b> | <b>0.460</b> | <b>0.484</b> | <b>0.438</b> | <b>0.532</b> | <b>0.628</b> | <b>0.845</b> | <b>0.622</b>   | <b>0.808</b> |
|             | ±0.106       | ±0.122       | ±0.011       | ±0.020       | ±0.034       | ±0.100       | ±0.016       | ±0.051       | ±0.071         | ±0.147       |
| <b>44h</b>  | <b>0.569</b> | <b>1,788</b> | <b>0.531</b> | <b>1.001</b> | <b>0.552</b> | <b>0.901</b> | <b>0.563</b> | <b>1.329</b> | <b>1.593</b>   | <b>1.443</b> |
|             | ±0.036       | ±0.165       | ±0.059       | ±0.096       | ±0.054       | ±0.208       | ±0.049       | ±0.192       | ±0.200         | ±0.250       |
| <b>68h</b>  | <b>0.253</b> | <b>1.654</b> | <b>0.302</b> | <b>1.365</b> | <b>0.383</b> | <b>2.020</b> | <b>0.425</b> | <b>2.341</b> | <b>1.391</b>   | <b>1.402</b> |
|             | ±0.040       | ±0.412       | ±0.030       | ±0.095       | ±0.040       | ±0.123       | ±0.049       | ±0.281       | ±0.038         | ±0.166       |
| <b>140h</b> | <b>0.306</b> | <b>1.626</b> | <b>0.358</b> | <b>1.669</b> | <b>0.485</b> | <b>1.343</b> | <b>0.634</b> | <b>2.262</b> | -              | -            |
|             | ±0.054       | ±0.320       | ±0.077       | ±0.380       | ±0.018       | ±0.335       | ±0.021       | ±0.925       |                |              |

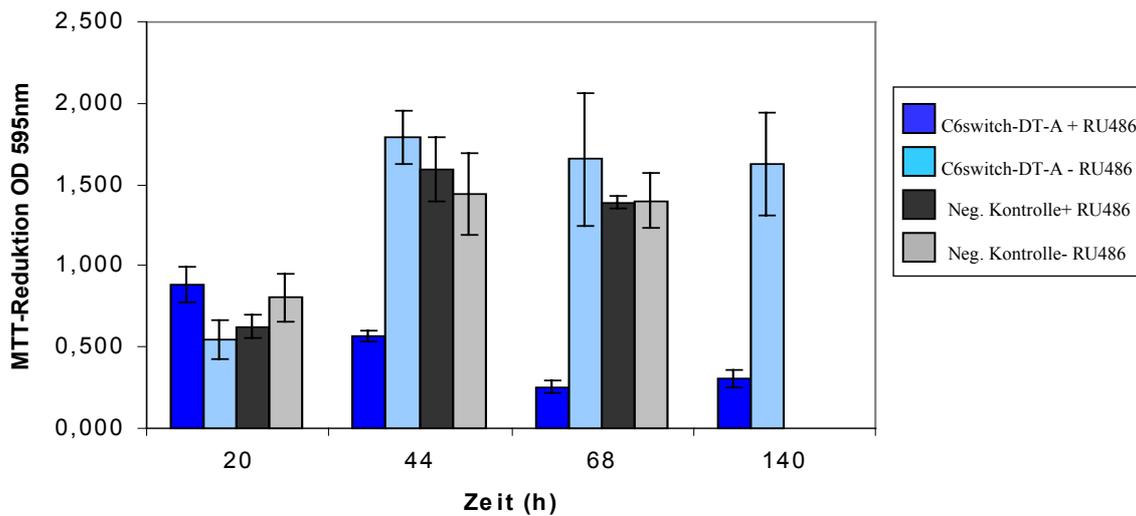
**Tabelle 3.14:** Proliferationstest zur Bestimmung der Vitalität von C6switch-DT-A Klone. Die Vitalität wurde in Abhängigkeit der Zeit und der induzierten Diphtherietoxinexpression mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Getestet wurden vier Klone (1, 19, 20, 24) unter induzierten (+RU486) und reprimierten (-RU486) Bedingungen. Es wurden vier Zeitpunkte (20h, 44h, 68h, 140h) zur Bestimmung der MTT-Konzentration gewählt. Die angegebenen Werte und die Standardabweichung ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Neben den verschiedenen getesteten Zeitpunkten wurde auch der Einfluss der ausgesäten Zellzahl untersucht. Die Tests wurden parallel angesetzt und durchgeführt. So wurden zu Versuchsbeginn vier verschiedene Zellzahlen ausgesät, um einen schädlichen Einfluss auf die Zellen durch überkonfluente Zellschalen auszuschließen. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden bei einer ausgesäten Zellzahl von  $2,5 \times 10^4$  erhalten und sind mit den Ergebnissen der anderen Zellzahlen vergleichbar. Die gewählten Zellzahlen waren außerdem noch:  $5 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^4$ ,  $0,6 \times 10^4$  (Daten nicht gezeigt).

20 Stunden nach Induktion ließen sich nur geringe Unterschiede in den Absorptionswerten zwischen induziertem und reprimiertem Zustand feststellen. Die Klone 19 und 20 zeigten nur geringfügige Unterschiede. Klon 1 verhielt sich mit einem höher gemessenen Wert im induzierten Zustand nicht erwartungsgemäß. Dieses traf auch für die Negativkontrolle zu, die keinen signifikanten Unterschied zwischen Zugabe bzw. Abwesenheit des RU486 zeigen durfte. Die Werte des Klons 24 ähnelten denen der Negativkontrolle. Bei diesen beiden untersuchten Zelllinien war der gemessene Wert im reprimierten Zustand größer. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Klone und der Negativkontrolle sind auf den Stress des Umsetzens auf die Zellen zurückzuführen. So vertragen einige Zellen die Prozedur des Ablösens von der Zellkulturschale nicht und sterben unmittelbar nach dem

Umsetzen auf einen neue Kulturschale. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inkubation mit RU486 nach 20h zu keinem signifikanten Unterschied in der Vitalität der Zellen führt.

Andere Ergebnisse ergaben sich bei den weiteren gewählten Zeitpunkten. Die Daten zeigen, dass die MTT-Werte aller induzierten Klone sehr viel geringer sind als die Werte im nicht induzierten Zustand. So sanken die Werte 44h nach der Zugabe von RU486 bei jedem Klon auf etwa die Hälfte. Bei Klon 1 ließ sich so ein 3-fach höherer Absorptionwert im reprimierten verglichen mit dem induziertem Ansatz finden. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch bei den anderen drei getesteten Klonen. Nach 68h Inkubationszeit zeigten alle Klone die größten Unterschiede im Überleben der Zellen je nach induzierten oder reprimierten Bedingungen. Die Werte der Negativkontrolle (C6) differierten nicht zwischen induziertem und nicht induziertem Zustand. Dieses Ergebnis belegt auch, dass der Induktor (RU 486) dieses Systems in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch auf die Zellen wirkte. Der Zelltod der induzierten Klone (belegt durch die Reduzierung der MTT-Werte) ist auf die induzierte Expression des Toxins zurückzuführen. Auch 140h nach Induktion lassen sich die Auswirkungen der Toxinexpression erkennen. Die MTT-Konzentration in der Negativkontrolle konnte nicht mehr bestimmt werden, da sich alle Zellen aufgrund des beengten Lebensraums abgelöst hatten und somit eine Auswertung nicht mehr stattfinden konnte. In der nachfolgenden Abbildung 3. sind exemplarisch die Ergebnisse des Klon 1 und der Negativkontrolle zur Verdeutlichung graphisch dargestellt. Die Ergebnisse des Klon1 wurden hier ausführlicher beschrieben, da dieser Klon auch für die nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen eingesetzt worden ist.



**Abbildung 3.4:** Graphische Darstellung der MTT-Testergebnisse des Klon 1 und der Negativkontrolle. Die Reduktion der MTT-Konzentration in Abhängigkeit der induzierten und reprimierten Toxinexpression wurde nach vier Zeitpunkten (20h, 44h, 68h, 140h) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten C6 Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden sind. Die angegebenen Werte und die Standardabweichung ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die Unterschiede zwischen induzierten und reprimierten C6switch-DT-A Zellen sind deutlich zu erkennen: Die MTT-Werte der „induzierten“ Zellen sind sehr viel geringer als die der „reprimierten“ Zellen und der Negativkontrolle.

Die erhaltenen Ergebnisse des MTT-Tests demonstrieren, wie die zuvor gezeigten Fotos (vergl. Abb. 3.3), die regulierte Toxinexpression einer konstruierten, stabilen Zelllinie.

### 3.6.3.2 Charakterisierung der DT-A vermittelten Cytotoxizität der vier C6switch-DT-A Klone mit dem Cytotoxizitätstest (LDH-Test)

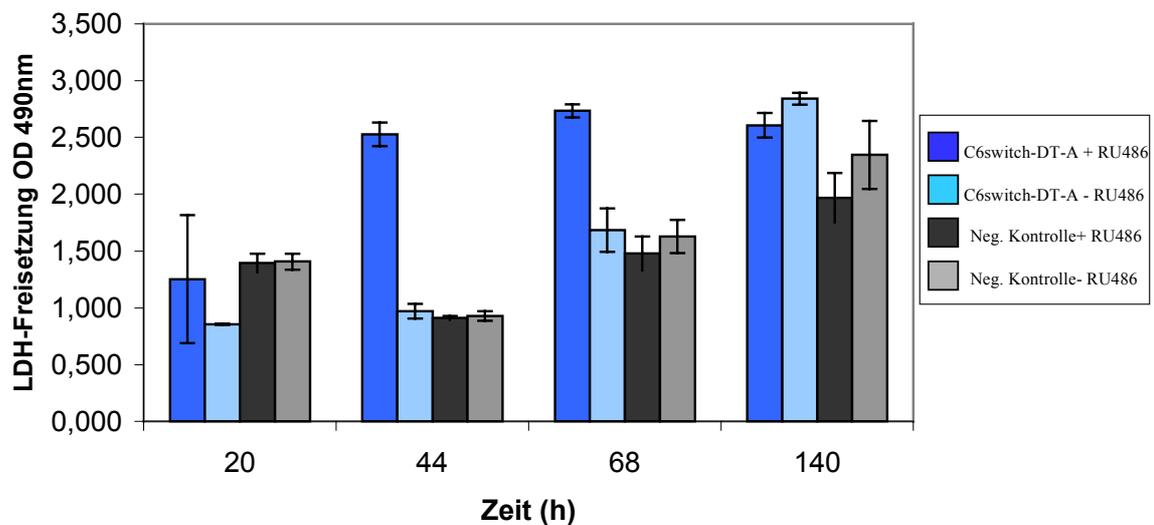
Der LDH-Test wird als Cytotoxizitätsnachweis eingesetzt. Dieser Test misst die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH). Hierbei handelt es sich um ein sehr stabiles Protein, das in vitalen Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach einem Zellmembranschaden und dem Absterben von Zellen wird es ins Zellmedium freigesetzt und kann dann nachgewiesen werden. Ein Anstieg toter Zellen resultiert in einer messbaren Zunahme der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie der zuvor beschriebene MTT-Test. Zur Quantifizierung der LHD-Konzentration im Überstand des Zellkulturmediums wurden 100µl Mediumüberstand mit 100µl LDH-Testlösung gemischt und nach 30-minütiger

Inkubation im Dunkeln im ELISA Reader bei 492nm (Referenzfilter 620nm) gemessen. In der Tabelle 3.15 sind die Ergebnisse des Cytotoxizitäts-Test dargestellt.

|      | Klon 1          |                 | Klon 19         |                 | Klon 20         |                 | Klon 24         |                 | Neg. Kontrolle  |                 |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|      | +RU486          | -RU486          |
| 20h  | 1.252<br>±0.564 | 0.856<br>±0.005 | 1.344<br>±0.038 | 1.291<br>±0.105 | 0.891<br>±0.011 | 0.914<br>±0.018 | 1.046<br>±0.090 | 0.980<br>±0.088 | 1.396<br>±0.083 | 1.407<br>±0.070 |
| 44h  | 2.527<br>±0.103 | 0.970<br>±0.065 | 1.245<br>±0.029 | 1.002<br>±0.090 | 1.940<br>±0.049 | 0.838<br>±0.019 | 2.183<br>±0.155 | 0.906<br>±0.053 | 0.912<br>±0.016 | 0.927<br>±0.042 |
| 68h  | 2.733<br>±0.058 | 1.685<br>±0.190 | 2.726<br>±0.215 | 1.438<br>±0.078 | 2.894<br>±0.144 | 1.243<br>±0.051 | 2.837<br>±0.052 | 1.936<br>±0.093 | 1.481<br>±0.148 | 1.630<br>±0.146 |
| 140h | 2.607<br>±0.108 | 2.841<br>±0.053 | 2.594<br>±0.084 | 2.807<br>±0.031 | 2.950<br>±0.088 | 2.898<br>±0.049 | 2.813<br>±0.088 | 2.947<br>±0.053 | 1.970<br>±0.218 | 2,345<br>±0.300 |

**Tabelle 3.15:** Cytotoxizitätstest von induzierten und reprimierten C6switch-DT-A Klonen. Der indirekte Nachweis des Zelltods wurde über die Konzentrationsbestimmung des freigesetzten LDH-Proteins bestimmt. Die Absorptionswerte wurden jeweils in Abhängigkeit der induzierten und reprimierten Toxinexpression nach vier Zeitpunkten (20h, 44h, 68h, 140h) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten C6 Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden sind. Die angegebenen Werte und die Standardabweichung ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Wie bereits im MTT-Test beschrieben (vergl. Kap. 3.6.3.1), ließ sich der Einfluss des exprimierten Toxins auch im LDH-Test erst nach 44h beobachten. Nach 20h Inkubationszeit konnte kein verstärkter Zelltod in der Gruppe der „induzierten“ Zellen im Vergleich zu zur „reprimierten“ Gruppe gefunden werden. Die erhaltenen Daten zeigten nach 44h deutlich höhere Absorptionswerte der induzierten Ansätze aller vier stabil transfizierten Klone gegenüber den nicht induzierten Werten und der Negativkontrolle. So übertrafen die gemessenen Werte bei einer ursprünglich ausgesäten Zellzahl von  $2,5 \times 10^4$ , im induzierten Zustand den Wert reprimierten Versuchsansätze um mehr als das Doppelte. Als Beispiel sei hier Klon 1 genannt. Die LDH-Aktivität im nicht aktivierten Zustand lag dagegen im Bereich der Werte der Negativkontrolle (C6 Zellen). Das zeigt, dass die Expression des DT-A-Gens durch Zugabe des Induktors RU486 aktiviert wurde und die Zellen abstarben. Im nicht aktivierten Zustand jedoch überlebten die Zellen der transfizierten Klone in einer vergleichbaren Weise wie die Zellen der nicht transfizierten C6 Zellen. Diese Daten belegen, dass das System auch toxische Gene stringent regulieren kann und dementsprechend "dicht" ist. In der nachfolgenden Abbildung 3.5 sind exemplarisch die Ergebnisse des Klon 1 und der Negativkontrolle zur Verdeutlichung graphisch dargestellt.



**Abbildung 3.5:** Graphische Darstellung der LDH-Testergebnisse des Klon1 und der Negativkontrolle. Die Zunahme der LDH-Konzentration in Abhängigkeit der induzierten und reprimierten Toxinexpression wurde nach vier Zeitpunkten (20h, 44h, 68h, 140h) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten C6 Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden sind. Die angegebenen Werte und die Standardabweichung ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt deutlich den Einfluss der Toxinexpression in den induzierten C6switch-DT-A Zellen, was zu einem Anstieg der LDH-Konzentration führt. Die Werte der reprimiert kultivierten C6switch-DT-A Zellen dagegen liegen im Bereich der Werte der Negativkontrolle, die keinen Unterschied zwischen induzierten und reprimierten Bedingungen aufweist. Nach 140h Inkubation liegen die gemessenen Werte aller Versuchsansätze in einem Bereich. Die hohen LDH-Werte der reprimierten Zellen und auch der Negativkontrolle ist auf den Zelltod zurückzuführen, der aufgrund der schlechten Lebensbedingungen nach dieser Zeit auftritt.

Die Resultate der Vitalitäts- und Zytotoxizitäts-Tests und der histologischen Untersuchungen zeigen, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Zelllinie mit stringent regulierbarer Toxizität etabliert werden konnte, die die Anforderungen erfüllte und für weiterführende *in vivo* Versuche eingesetzt werden konnte. Für die weiteren Experimente zur Evaluierung der Regulationskapazität *in vivo* wurde der C6switch-DT-A1 Zellklon eingesetzt.

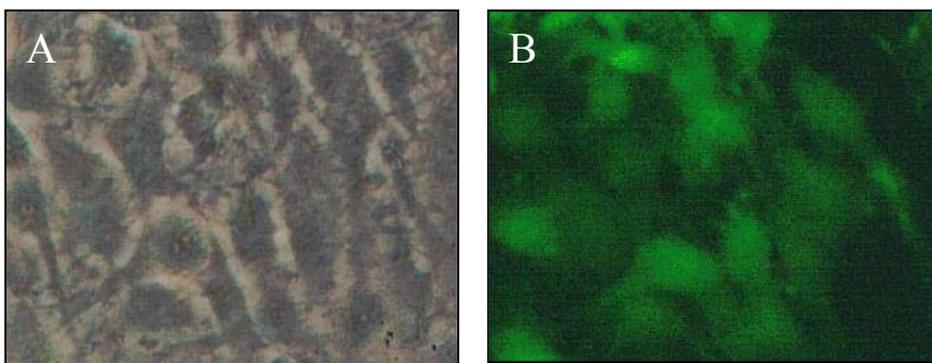
### **3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der stabil, Zielgen regulierbaren C6switch Zelllinien (C6switch-lacZ und C6switch-DT-A)**

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Ergebnisse der Expressions- und Regulationskapazitäten der etablierten Zelllinien C6switch-lacZ und C6switch-DT-A beschrieben. Es wurden jeweils verschiedene biochemische Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien eingesetzt. So konnte die stringente Regulationsfähigkeit der C6switch-lacZ Zelllinie mit Hilfe eines  $\beta$ -Galaktosidase Test (vergl. Tab. 3.13), eines Western Blots (vergl. Abb. 3.2) und einer histochemischen Methode (X-Gal-Test) bestimmt werden (vergl. Abb. 3.1). Die so charakterisierte Zelllinie C6switch-lacZ wurde dann in den nachfolgend beschriebenen *in vivo* Experimenten (vergl. Kap. 3.9) eingesetzt. Im Rahmen dieses Experimentes sollte die *in vitro* gezeigte stringente Regulation im lebenden System geprüft werden. In gleicher Weise wurde auch die zweite generierte Toxin-exprimierende Zelllinie untersucht. *In vitro* konnten zwei biochemische Methoden, der MTT-Proliferationstest (vergl. Kap. 3.6.3.1) und der LDH-Cytotoxizitätstest (vergl. Kap. 3.6.3.2), die zuvor mikroskopisch erhaltenen Daten (vergl. Kap. 3.6.2, Abb. 3.3) der stringenten Regulationsfähigkeit und Induzierbarkeit der Zelllinie C6switch-DT-A bestätigen. Die Zelllinie C6switch-DT-A wurde ebenfalls in *in vivo* Experimenten (vergl. Kap. 3.9) auf ihre Regulationsfähigkeit unter physiologischen Bedingungen analysiert.

### 3.8 Untersuchung des Bystander Effektes in Kokulturen von C6-SP-GFP und C6switch-DT-A Zellen

Der „Bystander Effekt“ wurde erstmals bei einem gentherapeutischen Ansatz unter der Verwendung des Herpes-Simplex-Thymidinkinase-Gens (HSV-TK-Gen) beobachtet und beschrieben (Kolberg, 1992; Culver et al., 1992). In einem Suizidgen-Gentherapieansatz zur Behandlung maligner Gliome wurden retrovirale Vektoren, die das HSV-TK-Gen kodierten, in die Tumorzellen eingebracht. Die infizierten Tumorzellen exprimierten dann das Enzym und wurden so empfindlich für das Medikament Ganciclovir (GCV), das intrazellulär zu einer toxischen Substanz (GCV-Triphosphat) umgewandelt wird. Um jede Zelle eines Tumors abzutöten, wurde ursprünglich angenommen, dass alle Zellen mit dem Selbstmordgen HSV-TK transfiziert sein müssen und das Gen so exprimieren. Die derzeitigen Gentransfermethoden erreichen allerdings keine 100% Transfektionseffizienz. In der Regel ist nur ein begrenzter und kleiner Anteil der Zellen mit dem Gen transfiziert sind. Glücklicherweise resultiert die HSV-TK/GCV Strategie jedoch nicht nur im Tod der Empfänger Zellen (HSV-TK<sup>+</sup>), sondern auch im Tod von den in der Umgebung lokalisierten, nicht transduzierten Tumorzellen (HSV-TK<sup>-</sup>). Dieses Phänomen wird als Bystander Effekt bezeichnet und kompensiert die niedrige Transduktionseffizienz der Vektoren (Viren oder Liposomen) (Kolberg, 1992). Es ist bekannt, dass der Transfer von toxischen Metaboliten (phosphorylierte Ganciclovirmoleküle) durch die „gap junctions“ einen entscheidenden Einfluss auf den Bystander Effekt ausüben (Yamasaki et al., 1988). Es ist auch bekannt, daß C6 Zellen nur wenig gap junctions ausbilden, da sie das verantwortliche Protein Connexin nur in sehr geringen Konzentrationen bilden (Zhu et al., 1991, Zhang et al., 1999). Aus diesem Grund war davon auszugehen, dass der sogenannte Bystander Effekt in Experimenten mit C6switch-DT-A Zellen nicht zu beobachten ist. Um dennoch die Frage beantworten zu können, ob sich ein Bystander Effekt bei den etablierten C6switch-DT-A exprimierenden Zellen und nicht transfizierten C6 Zellen nachweisen ließ, wurden C6switch-DT-A Zellen mit einer GFP-Gen stabil exprimierenden C6 Zelllinie unter induzierten und reprimierten Bedingungen kokultiviert. In unserem Arbeitskreis wird unter anderem das Migrationsverhalten von Gliomzellen untersucht. Für die Untersuchung migrierender C6 Zellen in *in vivo* Experimenten, war es von Vorteil eine Zelllinie zu besitzen, die sich durch die Expression des grün fluoreszierenden Proteins auch im lebenden Zustand ohne aufwendige biochemische Nachweismethoden von anderen Zellen unterscheiden lässt. Es stellte sich jedoch unter der Verwendung, der derzeitiger kommerziell erhältlicher GFP-Expressionsplasmide (Invitrogen, Stratagene) als

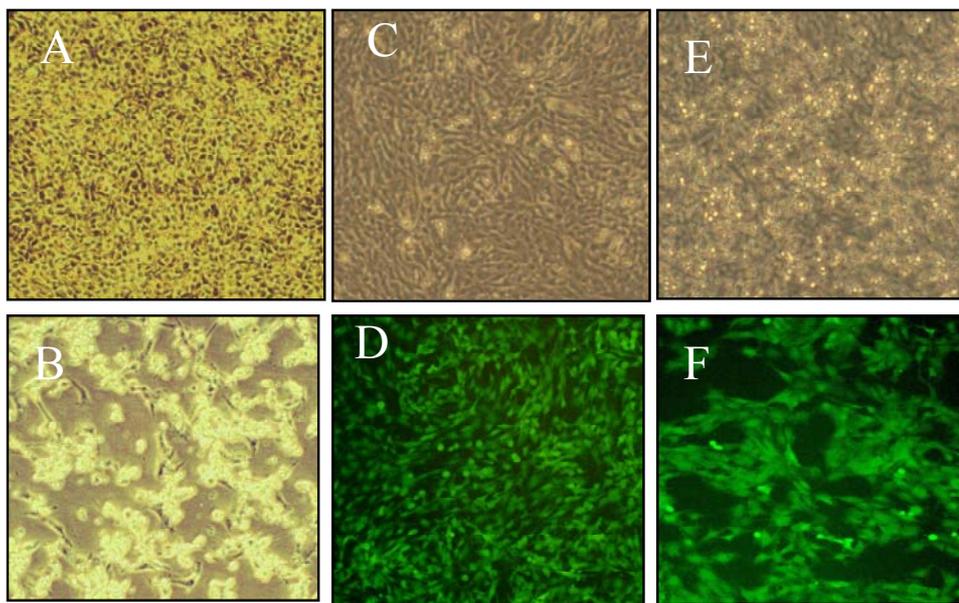
schwierig heraus, eine stabile Zelllinie zu etablieren, die das Protein über einen längeren Zeitraum exprimieren kann. So wurden zunächst C6 Zellen mit den oben genannten Plasmidkonstrukten transfiziert, isoliert und ihre Expression untersucht. Die selektionierten Klone zeigten mit zunehmender Passagenanzahl schwächere GFP-Expressionsleistungen, bis sie nach einigen Passagen kein GFP-Protein mehr bildeten (Daten nicht gezeigt). Es wurde immer wieder von toxischen Nebenwirkungen durch die zu hohe Expression des GFP-Gens berichtet. Unter anderem dafür verantwortlich war auch der starke Promotor CMV, der für eine konstitutive Genexpression verantwortlich ist. Dieses führt zu nicht physiologischen Zuständen in der Zelle und kann zum Zelltod führen. In der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Pohlmann, Institut für Pathobiochemie, UKM Münster, wurde ein Vektor (pMPSGGGFP) konstruiert, der durch den Austausch des Promotors CMV gegen einen Promotor aus des *Myeloproliferativen Sarcoma Virus* (MPSV) für eine Langzeitexpression des GFP-Proteins geeignet ist und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Durch den Einsatz dieses Plasmids wurde im Rahmen dieser Arbeit eine C6 Zelllinie etabliert, die das GFP-Gen stabil ins Genom integriert hat und diese Stabilität auch über viele Passagen beibehalten hat. Die etablierte Zelllinie wurde als C6-SP-GFP bezeichnet, wobei die Abkürzungen SP für den Konstrukteur (Sylvia Püttmann) und GFP für „green fluorescent protein“ stehen. Die Zelllinie C6-SP-GFP wird im Institut für Physiologie (Prof. Speckmann, UKM Münster) oder im eigenen Institut eingesetzt und zeigt eine konstante GFP-Aktivität über viele Passagen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, hinaus. Da diese Zelllinie ohne großen Arbeitsaufwand und biochemischer Tests von anderen Zellen schnell und einfach mikroskopisch unterscheidbar ist, wurde diese Zelllinie auch zur Klärung des Bystander Effektes von C6switch-DT-A Zellen eingesetzt. Auf dem Foto 3.6 sind kultivierte C6-SP-GFP Zellen unter Fluoreszenzanregung (B) und im Durchlicht (A) abgebildet.



**Abbildung 3.6:** C6-SP-GFP Zellen

(A) Durchlicht; (B): Fluoreszenzaufnahme; Anregung durch blaues Licht (488nm), 400x vergrößert

In diesem Versuch sollte der Bystander Effekt in einer Kokultivierung von C6switch-DT-A Zellen und C6-SP-GFP Zellen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden C6-SP-GFP Zellen, in gleicher Zellzahl mit C6switch-DT-A Zellen alleine und in einem Kontrollansatz mit der C6switch-lacZ Kontrollzelllinie kokultiviert (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden jeweils unter induzierten und reprimierten Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse wurden durch tägliche mikroskopische Fotoaufnahmen dokumentiert. 48h nach Induktion wurden die kokultivierten Zellen der einzelnen Versuchansätze fotografiert. Die Abbildung 3.7 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen.



**Abbildung 3.7:** Bystander-Effekt-Untersuchung. A) C6switch DT-A reprimiert, B) C6switch DT-A induziert, C) C6-SP-GFP, D) C6-SP-GFP, E) C6switch-DT-A und C6-SP-GFP kokultiviert induziert, F) C6switch-DT-A und C6-SP-GFP kokultiviert induziert  
A,B, C, E: Durchlicht / D, F: Fluoreszenzanregung mit blauem Licht (488nm)  
A-E: 25x vergrößert/ F: 50x vergrößert

In den Abbildungen 3.7 A und B sind C6switch-DT-A Zellen unter reprimierten (A) und induzierten (B) Bedingungen kultiviert worden. Die Abbildungen 3.7 C und D zeigen C6-SP-GFP Zellen unter reprimierten (C) und induzierten (D) Lebensbedingungen. In den Abbildungen 3.7 E und F sind beide Zelllinien unter induzierten Bedingungen kokultiviert worden. In der Abbildung 3.6B erkennt man C6switch-DT-A Zellen die erwartungsgemäß nach Induktion mit RU486 von Zellkulturboden abgelöst sind und sterben. Im reprimierten Zustand (Abb. 3.7 A) überleben sie wie bereits beschrieben (vergl. Kap. 3.6.2/ Abb. 3.3). C6-SP-GFP Zellen zeigen allein kultiviert ebenfalls das zuvor beschriebene Verhalten und reagieren auch nicht auf die Zugabe von RU486 (Abb. 3.7 C-F). Auch in den Bystander-Versuchsansätzen, in denen beide Zelllinien zusammen kultiviert wurden (Abb. 3.7 E,F),

zeigen die Zellen jeweils ihr charakteristisches Verhalten. Im induzierten Ansatz erkennt man im Durchlicht deutlich abgerundete und tote Zellen im Vordergrund (Abb. 3.7 E), die auf die Expression des Toxins zurück zu führen sind und tote C6switch-DT-A Zellen darstellen. Unter der Anregung mit blauem Licht (488nm) jedoch lassen sich wieder die GFP-exprimierenden Zellen detektieren, die ihre typische Zellform zeigen (Abb. 3.7 F). Sowohl in den reprimierten, als auch in den induzierten Ansätzen zeigten C6-SP-GFP Zellen die typische Fluoreszenz durch die Expression des GFP-Gens. Es ließ sich keine Reduktion der Fluoreszenz der kokultivierten, nicht Toxin-exprimierenden Zellen feststellen. Zusammenfassend zeigen die Aufnahmen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der GFP-Gen exprimierenden C6-SP-GFP Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen. Der induzierte Zelltod der Toxin exprimierenden Zellen C6switch-DT-A scheint keinen negativen Einfluss auf das Wachstums- und GFP-Expressionsverhalten der kokultivierten C6-SP-GFP Zellen auszuüben. Somit lässt sich der Bystander Effekt in diesem Versuch nicht nachweisen.

### **3.9 Die Regulationsfähigkeit der Zellklone C6switch-lacZ und C6switch-DT-A in *in vivo* Untersuchungen**

Im Anschluss an die Charakterisierung der beiden etablierten Zelllinien (C6switch-DT-A und C6switch-lacZ) in *in vitro* Versuchen, sollte die Regulationsfähigkeit in *in vivo* Versuchen getestet werden. Dazu wurden die beiden regulierbaren C6 Gliomzelllinien in jeweils unabhängigen Versuchen in das Gehirn von Nacktmäusen transplantiert. Die Nacktmäuse wurden als Modelltier verwendet, da sie aufgrund fehlender bzw. nur geringer Immunkompetenz die implantierten Tumorzellen nicht abstoßen können und eine Beurteilung der entstehenden Tumoren zulassen (Peroulis et al., 2002).

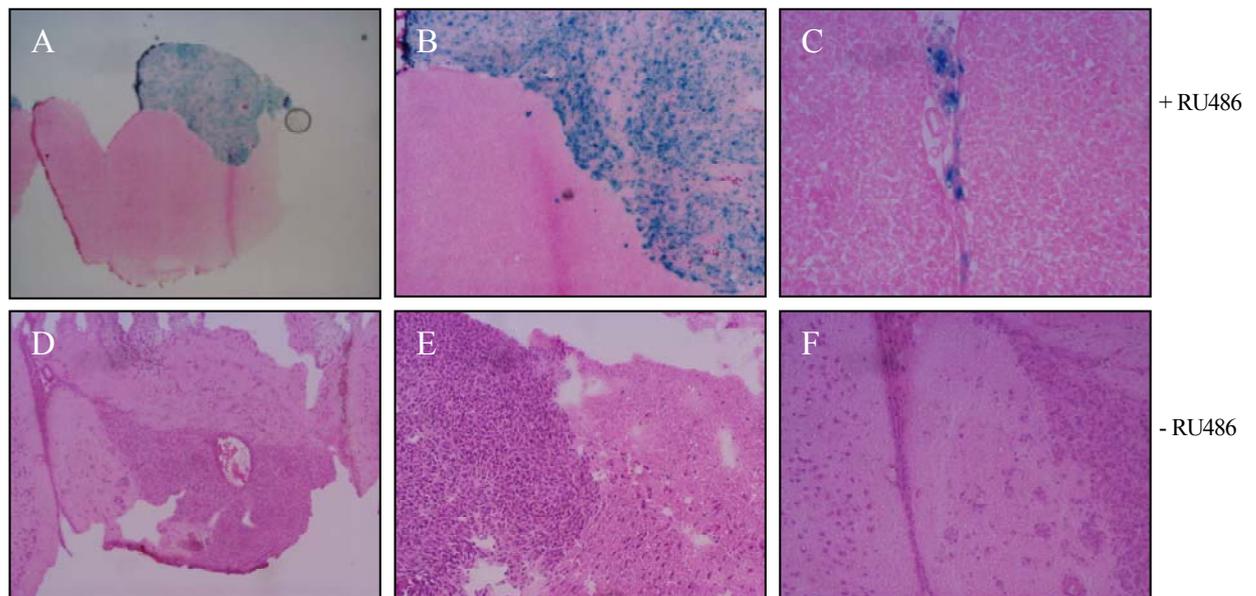
#### **3.9.1 *In vivo* Analyse der kontrollierten Expression des lacZ-Gens in transplantierten C6switch-lacZ Zellen**

Zunächst wurde die konstruierte Kontrollzelllinie in das Striatum von Nacktmäusen implantiert um so die Frage zu klären, ob das GeneSwitch<sup>TM</sup>-Transkriptionssystem auch *in vivo* zur Kontrolle der Genexpression von exprimierenden Zielgenen geeignet ist (vergl. Kap. 2.6). In den zuvor durchgeführten *in vitro* Untersuchungen konnte an dieser Zelllinie

die Eignung des Systems für die kontrollierte und stringente Expression des Reportergens lacZ-Gens nachgewiesen werden. Für den Versuch wurden  $2 \times 10^4/\mu\text{l}$  C6switch-lacZ Gliomzellen in das Gehirn von Nacktmäusen implantiert (vergl. Kap. 2.6). Es wurden zwei Untersuchungsgruppen von jeweils 8 Tieren gebildet. Jedes Tier der ersten Gruppe erhielt eine Woche nach der Operation täglich die intraperitoneale Gabe des Induktionswirkstoffes (2,5mg RU486 in 50 $\mu\text{l}$  Trägerlösung) des GeneSwitch™-Systems. Die Tiere der zweiten Gruppe dienten der Kontrolle und wurden parallel zur Gruppe 1 mit 50 $\mu\text{l}$  der Trägerlösung (Carboxymethylcellulose und Tween 80 in Wasser) ohne den Wirkstoff behandelt.

Zwei Tage nach der ersten Gabe von RU486 wurden jeweils 3 Tiere getötet, um die Frage zu klären, ob die Konzentration des Induktors bereits nach zwei Tagen zu einer nachweisbaren Expression des lacZ-Gens führt und ob das RU486 die Blut-Hirn-Schranke innerhalb dieses Zeitraums passieren kann. Dieses wurde indirekt über den Nachweis der lacZ-Genexpression in den Tumorzellen im Gehirn der getöteten Mäuse bestimmt. Außerdem sollte ein eventuell vorhandener Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich Medikamentenverträglichkeit, Tumorgröße und Allgemeinzustand untersucht werden. Die Gehirne wurden präpariert und die Expression in den Tumorzellen mikroskopisch analysiert (vergl. Kap. 2.6.2).

In der Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.



**Abbildung 3.8:**  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in implantierten C6switch-lacZ Tumorzellen in Maus-Gehirnen. A-C zeigen die H/E-gefärbten Gewebeschnitte einer „induzierten“ Maus nach Inkubation mit X-Gal. D-F zeigen die H/E-gefärbten Gewebeschnitte einer „reprimierten“ Maus nach Inkubation mit X-Gal. A/D: 12,5x vergrößert; B/E: 100x vergrößert; C/F: 200x vergrößert.

Die C6switch-lacZ Tumorzellen im Gehirn unbehandelter Tiere (Abb. 3.8 D-F) zeigen nachweislich keine  $\beta$ -Galaktosidaseexpression, während die C6switch-lacZ Tumoren von RU486 behandelten Tieren (Abb. 3.8 A-C) blau gefärbte Tumorzellen aufweisen. Der Vergleich der Gehirne der induzierten Gruppe mit denen der reprimierten Gruppe zeigt, dass auch im *in vivo* Versuch das System keine Basaltranskription aufweist und somit dicht ist. Zudem zeigte dieser Versuch, dass das RU486 als Inducer dieses Systems zum einen Blut-Hirn-Schranken-gängig ist, zum anderen bereits nach zwei Tagen im Gehirn nachweisbar ist und eine Konzentration erreicht, die zur Aktivierung der Targetgenexpression des Systems ausreicht. Die Abbildungen 3.8 B und C zeigen einen deutlichen  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis in C6switch-lacZ Tumorzellen, die sich vom Primärtumorzentrum entfernt haben und entlang den Meningen in andere Bereiche des Gehirns einwandern. Das Migrationsverhalten ist eine charakteristische Eigenschaft von Gliomzellen und es ist im Rahmen einer Gentherapie notwendig, dass auch die wandernden Zellen erfasst werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Induktionsmolekül RU486 nicht nur C6switch-lacZ Tumorzellen im Bereich einer gestörten Blut-Hirn-Schranke erreicht, sondern auch migrierende, diffus im Hirngewebe verteilt Tumorzellen.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse dieses Versuches, dass die C6switch-lacZ Tumorzellen auch *in vivo* stringent regulierbar sind und die Verwendung des GeneSwitch™-Systems eine regulierte Expression von exogenen Genen unter physiologischen Bedingungen erlaubt.

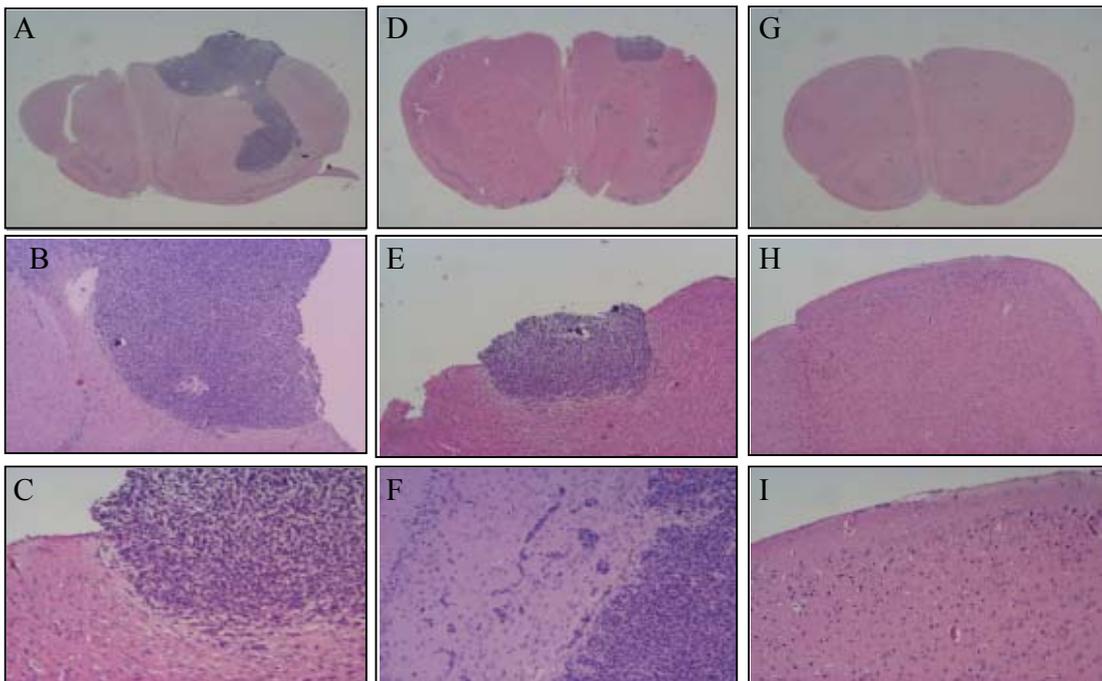
### **3.9.2 Implantation der C6switch-DT-A Zellen in das Gehirn von Nacktmäusen und die Analyse des veränderten Tumorwachstums *in vivo***

In diesem Versuch wurde die Induktions- und die Repressionsfähigkeit der Toxin-exprimierenden C6switchDT-A Zellen *in vivo* untersucht.

Es wurden 22 Tiere eingesetzt und bereits eine Woche vor dem Implantationstermin in zwei Gruppen geteilt. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten täglich den Wirkstoff RU486 (2,5mg/d in 50ml Trägerlösung) und Tiere der Gruppe zwei die reine Trägerlösung (50µl) ohne Wirkstoff. Dann wurden  $2 \times 10^4 / \mu\text{l}$  C6switch-DT-A Gliomzellen in das Gehirn implantiert (vergl. Kap. 2.6).

7 Tage nach der Operation wurden aus jeder Gruppe 4 Tiere getötet und die Gehirne entnommen. Die anderen Tiere wurden 9 Tage nach der Implantation getötet. Die Gehirne wurden sofort in Paraformaldehyd fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt (vergl. Kap. 2.6.2.3). Jeder 8. Schnitt wurde für eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) eingesetzt (vergl. Kap. 2.6.2.4).

In der Abbildung 3.9 sind die H/E-gefärbten Hirngewebsschnitte einer RU486-behandelten Maus (Abb. 3.9 G-H) und die Schnitte von zwei unbehandelten Mäusen gezeigt (Abb. 3.9 A-C und D-F). In den unbehandelten Tieren lassen sich Tumoren nachweisen, während in dem behandelten Tier keine Tumorbildung oder auch einzelne Tumorzellen nachgewiesen werden können.



**Abbildung 3.9:** Tumorentwicklung in Nacktmaus-Gehirnen in Abhängigkeit der Induktorgabe. Die Abbildungen A-C zeigen Gewebeschnitte eines Gehirns einer nicht behandelten RU486<sup>-</sup>-Maus. Die Abbildungen D-F zeigen ebenfalls Gewebeschnitte einer RU486<sup>-</sup>-Maus. Die Abbildungen G-I zeigen Schnitte eines Gehirns einer behandelten RU486<sup>+</sup>-Maus. A, D, G: 12,5x vergrößert; B, E, H: 40x vergrößert; C, F, I 100x vergrößert. Alle Gewebeschnitte sind H/E gefärbt.

In der Abbildung 3.9 sind die Hirnschnitte der Versuchstiere dargestellt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin/ Eosin gefärbt. Tier 1 (Abb. 3.9 A-C) und Tier 2 (Abb. 3.9 D-F) wurden ausschließlich mit der Trägersubstanz ohne den Induktor RU486 behandelt. Beide Tiere entwickelten einen Tumor. Der Tumor des Tieres 2 ist kleiner als der des Tieres 1. Das kann an der unterschiedlichen Überlebenszeit liegen, da Tier 2 bereits nach 7 Tagen, Tier 1 erst 9 Tage nach der Implantation getötet worden ist, und es bekannt ist, dass C6 Zellen ein sehr schnelles Wachstum *in vivo* zeigen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Unterschiede in der Individualität der Tiere liegen. Das Tier 3 (Abb. 3.9 G-I) wurde mit dem Induktor RU486 täglich behandelt und entwickelte keinen Tumor. Es wurde stellvertretend für die anderen Tiere dieser Versuchsgruppe, in der keine Maus einen Tumor bildete, gezeigt (vergl. Tabelle 3.16).

In der Abbildung 3.9 F läßt sich darüber hinaus das typische Verhalten von Gliomzellen demonstrieren. Einige Zellen und Zellhaufen haben sich von der primären Tumormasse abgelöst und infiltrieren das Gehirn.

Die Tumorengröße wurde mikroskopisch vermessen und das Tumolvolumen wie folgt berechnet:

$$a^2 \text{ (Breite)} \times b \text{ (Länge)} \times 0,5$$

Diese Berechnung wird generell für die Bestimmung des Tumolvolumens angewendet (Auguste et al., 2001, Dang et al., 2001). In den Tabellen 3.16 a,b sind die Ergebnisse der Tumorentwicklung in den Gehirnen der Versuchstiere in Abhängigkeit der Gabe des Induktors dargestellt.

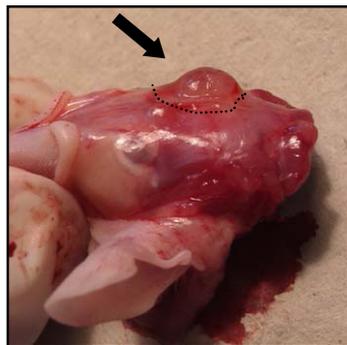
| Tier | Tumor | Überleben nach OP in Tagen | Volumen in mm <sup>3</sup> |
|------|-------|----------------------------|----------------------------|
| 1    | -     | 9                          | -                          |
| 2    | -     | 9                          | -                          |
| 3    | -     | 9                          | -                          |
| 4    | -     | 9                          | -                          |
| 5    | -     | 9                          | -                          |
| 6    | -     | 9                          | -                          |
| 7    | -     | 7                          | -                          |
| 8    | -     | 7                          | -                          |
| 9    | -     | 7                          | -                          |
| 10   | -     | 7                          | -                          |
| 11   | -     | 7                          | -                          |

**Tabelle 3.16 a:** Tumorentwicklung in RU486<sup>+</sup> behandelten Mäusen. Es wurden 11 Mäusen für den Versuch eingesetzt und standen für die Auswertung zur Verfügung. In keinem Tier ließ sich ein Tumor nachweisen.

| Tier | Tumor | Überleben nach OP in Tagen | Volumen in mm <sup>3</sup>                     |
|------|-------|----------------------------|------------------------------------------------|
| 1    | -     | 7                          | -                                              |
| 2    | -     | 7                          | -                                              |
| 3    | -     | 7                          | -                                              |
| 4    | +     | 7                          | 0,7                                            |
| 5    | -     | 7                          | -                                              |
| 6    | +     | 9                          | 1,8                                            |
| 7    | +     | 9                          | 2,4                                            |
| 8    | ----  | ----                       | -                                              |
| 9    | +     | 9                          | 1,1                                            |
| 10   | +     | 9                          | Tumor stand zur Vermessung nicht zur Verfügung |
| 11   | +     | 9                          | 1,1                                            |

**Tabelle 3.16 b:** Tumorentwicklung in RU486<sup>-</sup> unbehandelten Mäusen. Es wurden 11 Mäuse für den Versuch eingesetzt und 10 standen für die Auswertung zur Verfügung. Tier Nr.8 ist vorzeitig verstorben. In 6 von 10 auswertbaren Tieren konnte ein Tumor nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in der Tabelle 3.16 a zeigen, dass nicht ein einziges Tier der ersten (behandelten) Gruppe einen Tumor entwickelte. 6 von 10 auswertbaren Tieren der

unbehandelten Gruppe wiesen einen großen Tumor auf, der sowohl intracranial als auch extracranial vorlag. In Abbildung 3.9 ist der extracraniale, makroskopisch sichtbare Tumor nach der Tötung des Tieres Nr. 10 gezeigt. Dieser Tumor war mit der Schädelkalotte verwachsen und konnte nicht präpariert werden, um dann der Bestimmung des Tumolvolumens zur Verfügung zu stehen. Das Tier Nr. 8 ist vorzeitig verstorben und stand für die Auswertung nicht zur Verfügung.



**Abbildung 3.10:** Makroskopisch sichtbarer, extracranialer Tumor eines Versuchstieres

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass die induzierten C6switch-DT-A Tumorzellen absterben und keinen Tumor im Gehirn der Nacktmäuse bilden können. 100% der behandelten Mäuse zeigten keinen Tumor. 60% der unbehandelten Mäuse dagegen entwickelten große nachweisbare interne und externe Tumoren. Nach dem 4-Felder-Test bzw. dem  $\chi^2$ -Test ergibt das eine Signifikanz von  $p < 0,01$ .

### **3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der stringenten Regulationsfähigkeit der etablierten Zelllinien in *in vivo* Experimenten**

Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente zeigen, dass es möglich ist mit Hilfe des GeneSwitch™-Systems, potente Toxine, wie das Diphtherietoxin, auch unter physiologischen Bedingungen reguliert zu exprimieren.

## 4. Diskussion

### 4.1 Regulierbare Genexpressionssysteme in gentherapeutischen Anwendungen

Eine mögliche Strategie der experimentellen und klinischen Gentherapie von Tumoren ist die Übertragung von Genen, die indirekt oder direkt für Toxine kodieren (Chase et al., 1998; Bansal und Engelhard, 2000).

Die bisher am häufigsten verwendeten Systeme basieren auf dem Einsatz des Thymidinkinase-Gens (TK) aus dem Herpes Simplex Virus (Moolten, 1986; Vincent et al., 1996; Rainov, 2000; Nanda et al., 2001). Nach der Applikation von Nukleosid-Analoga wie Ganciclovir werden diese dann durch TK phosphoryliert und wirken bei der DNA-Synthese als kompetitive Inhibitoren endogener Nukleotide, was schließlich zum Zelltod führt. Nachteile dieser Methode und anderer Techniken, die indirekte Toxine ("prodrugs") verwenden, ist die Notwendigkeit der DNA-Synthese (nicht proliferierende Tumorzellen werden nicht geschädigt) und die Toxizität von Ganciclovir.

Der Einsatz eines direkten Toxingens umgeht diese Schwierigkeiten, erfordert aber die stringente Regulation des Gens, um in den experimentellen und klinischen Anwendungen eingesetzt werden zu können. Um das Gen in die Tumorzellen einschleusen zu können, werden Verpackungs- und Producerzelllinien eingesetzt. Daher ist es notwendig, das Gen erst nach genügender Infektion der Tumorzellen aktivieren zu können, so dass der Zelltod der Tumorzellen erreicht wird.

Prinzipiell stehen eine Reihe von Transkriptionskontrollsystemen zur Verfügung, die die Expression eines Transgens "von außen" steuern können. Das optimale Regulationssystem erfüllt folgende Kriterien: keine Hintergrundaktivität im inaktiven (reprimierten) Zustand, hohe Genexpression im aktivierten Zustand, regulierbare Expression über einen längeren Zeitraum, multiples Schalten zwischen aktiviertem und inaktiviertem Zustand und Fehlen unspezifischer (pleiotroper) Effekte der induzierenden bzw. reprimierenden Substanz (Clackson, 1997; Saez et al., 1997; Rossi und Blau, 1998; Clackson, 2000). Der Einsatz von Toxingenen in gentherapeutischen Anwendungen erfordert insbesondere eine komplette Repressionsmöglichkeit. Für diese Art der Gentherapie eignen sich bakterielle und pflanzliche Toxine, als besonders effektive Agentien, Tumorzellen zu töten (Kramm et al., 1995). Ein Toxigen, das bereits für diese Zwecke eingesetzt wurde, stellt das Diphtherietoxin aus dem *Corynebakterium diphtheriae* dar. Dieser Ansatz wurde bereits vor einigen Jahren erstmals *in vitro* verfolgt, indem das Diphtherie-Kette-A-Toxin-Gen (DT-A) unter die transkriptionelle Kontrolle von zwei verschiedenen Regulationssystemen

kloniert und reguliert exprimiert wurde (Paulus et al., 1997). Bei den Systemen handelte es sich um das Lac-Regulationssystem und das Tet-off-System. Eine stringente Repression der Toxizität war mit diesen Systemen in transienten Transfektionen allerdings nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zur Zeit verfügbaren Transkriptionsregulations-Systeme und die Möglichkeit ihres Einsatzes zur kontrollierten Expression der Diphtherie-A-Kette in Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es handelte sich dabei um das Tet-System (Tet-off, Tet-on und dessen modifizierten Varianten), das Ecdysone<sup>TM</sup>-System, das Dimerizer-System und das GeneSwitch<sup>TM</sup>-System.

Zunächst wurden alle Systeme in transienten Transfektionen in C6 Zellen transfiziert und die Regulationskapazitäten der einzelnen Systeme miteinander verglichen. Die Systeme, die besonders gute Expressions- und Regulationseigenschaften zeigten, wurden dann in stabilen Transfektionen in C6 Zellen eingebracht und erneut auf ihre Regulationskapazitäten untersucht. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der transienten Transfektionen nicht unmittelbar auf die der stabilen Transfektionen übertragbar sind. Die oft niedrigeren Regulationswerte in den transienten Transfektionen sind auf die Aufnahme vieler Kopien des Reporterplasmids, die nicht ins Genom integriert wurden, der Heterogenität der individuellen Zellen und der fehlenden Chromatinrepression zurückzuführen (Freundlieb et al., 1997; Freundlieb et al., 1999; Paulus et al., 2000; Senner et al., 2001). Daher sind die erhaltenen Ergebnisse aus den transienten Versuchen als Tendenz für die erwartete Regulationskapazität der einzelnen Systeme nach stabilen Transfektionen zu werten.

## **4.2 Regulierbare Expressionssysteme zur kontrollierten Expression des Diphtherietoxins**

### **4.2.1 Regulationskapazitäten der Tet-Systeme bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins**

Eines der häufigsten und intensivsten untersuchten Regulationssysteme ist das Tet-System (Gossen und Bujard, 1992). Das Tet-System wurde in dieser Arbeit aus verschiedenen Gründen eingesetzt. So findet es breite Verwendung in unterschiedlichen Zelllinien (Paulus et al., 1996; Paulus et al., 1997; Keyvani et al., 1999; Senner et al., 2001) aber auch in Pflanzen (Weimann et al., 1994), Hefen (Gari et al., 1997), *Drosophila*

*melanogaster* (Girard et al., 1998; Bieschke et al., 1998; Stebbins et al., 2001) und auch in höheren Säugetieren wie Mäusen (Kistner et al., 1996; Efrat et al., 1995; Mayford et al., 1996; Ewald, 1996) und Ratten (Fishman et al., 1994; Harding et al., 1998).

Das System ist durch die vielen Anwendungen verschiedenster Experimente sehr gut charakterisiert und zeigt für die Anwendung im Menschen optimale pharmakologische Eigenschaften, wie z.B. Plazenta- und Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit (Mansuy und Bujard, 2000). Auch die relativ niedrige Toxizität des Tetrazyklins und seiner Derivate lassen das Tet-System zu einem optimalen Regulationssystem in der Humanmedizin werden (Gingrich und Roder, 1998).

Das Tet-off-System wurde bereits für die induzierte Expression des Diphtherietoxins in humanen Gliomzelllinien eingesetzt (Paulus et al., 1997). In der zitierten Arbeit wurde die Regulationskapazität bezüglich der Toxinexpression des Tet-Systems mit der des Lac-Systems verglichen. Dabei zeigte das Tet-System bessere Regulationswerte als das Lac-System (120-facher versus 3-facher Induktion) (Paulus et al., 1997). Zwar führte die Verwendung beider Systeme im induzierten Zustand zum gewünschten Zelltod, die Toxizität konnte im reprimierten Zustand jedoch nicht komplett unterdrückt werden. Auch im reprimierten Zustand starben ca. 50% der Tumorzellen (Paulus et al., 1997). Daraufhin wurden im gleichen Labor Experimente mit einer Diphtherietoxinmutante (H21A) mit abgeschwächter Toxizität durchgeführt (Keyvani et al., 1999). Es wurde angenommen, dass die ungenügende Suppression auf der extremen Toxizität des Diphtherietoxin-Wildtyps beruhte, die die Repressionsfähigkeit des Tet-off-Regulationssystem überschritt. Aber auch die Reduktion der Toxizität des Diphtherietoxins im Tet-off-System erbrachte keine stringente Regulation (Keyvani et al., 1999).

Die Ergebnisse der transienten Transfektionen (vergl. Kap. 3.2.1) zeigten, dass weder das Tet-off noch das Tet-on-System für die Regulation eines Toxingens in transienten Transfektionen geeignet sind und bestätigen die bereits von Paulus und Keyvani vorgestellten Daten (Paulus et al., 1997; Keyvani et al., 1999). Die Effizienz der Tet-Systeme wird durch die hohen Basaltranskriptionswerte im reprimierten Zustand limitiert. Dieses Problem ist auch aus anderen Arbeiten mit anderen eingesetzten Zielgenen bekannt (Gossen et al., 1995; Yin et al., 1996; Bohl et al., 1997; Johansen et al., 2002). In transienten Transfektionen werden die Plasmide nicht in das Wirtschromosom integriert und eine Basalaktivität lässt sich dann in unterschiedlicher Höhe je nach Zelltyp und Transfektionsbedingungen dedektieren (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1993; Freundlieb et al., 1997). Einer der Hauptgründe für die Basalexpression ist die fehlende

Chromatinrepression und die hohe Anzahl an Plasmidkopien in der Zelle (Freundlieb et al., 1997; Freundlieb et al., 1999; Paulus et al., 2000; Senner et al., 2001). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass sich einige Zelllinien sehr unterschiedlich in der Tetrazyklin abhängigen Regulation verhalten (Ackland-Berglund und Leib, 1995; Howe et al., 1995). Diese Unterschiede reflektieren die eventuell variable vorhandene Komposition an endogenen Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Zelltypen (Freundlieb et al., 1999). Es konnten aber auch große regulatorische Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen einer Zelllinie nach stabilen Transfektionen demonstriert werden (Yin et al., 1996; Paulus et al., 2000).

Da sich die Regulationseigenschaften stabil transfizierter Zelllinien deutlich von den transienten Versuchen unterscheiden können, wurde das Tet-on-System in C6 Zellen stabil transfiziert. Jedoch zeigten die erhaltenen Klone nur sehr geringe Regulationswerte von maximalen Werten bis zu 2,3. Zudem wurde in der Literatur mehrfach von hohen Basalaktivitäten bei der Verwendung des Tet-on-Systems auch in stabilen Transfektionen berichtet (Forster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Urlinger et al., 2000; Zheng et al., 2000). Daher wurde auf eine weitere Verwendung verzichtet. Auf eine stabile Transfektion des Tet-off-Systems wurde ganz verzichtet, da die ständige Gabe eines Medikaments zur Repression der Zielgenexpression für eine gentherapeutische Anwendung nicht optimal ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass höhere Konzentrationen des Tet-off-Transaktivators negative Auswirkungen auf die Zellen haben (Gossen et al., 1993). So wurde wiederholt von toxischen Nebenwirkungen des Transaktivators auf Zellen berichtet, wenn dieser in hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegt (Sadowski et al., 1988; Triezenberg et al., 1988a; Baron et al., 1997). Die Nebenwirkungen sind auf das sogenannte „Squelching“ zurückzuführen; dabei handelt es sich um das Abfangen endogener Transkriptionsfaktoren, was zu einer veränderten endogenen Transkription führt und so die Zelle schädigt. Bei der Verwendung eines bidirektionalen Promotors besteht die Möglichkeit neben dem eigentlichen gewünschten Gen auch die Expression des Transaktivators zu kontrollieren, indem das Gen auch unter die Kontrolle des tTA-abhängigen Promotors gestellt wird. So würde die Expression des Transaktivators auf die Aktivierungsphase beschränkt bleiben und die Toxizität durch Squelching minimiert werden. Für die Fragestellung in dieser Arbeit ist dieser bidirektionale Vektor allerdings nicht geeignet gewesen, da durch die Expression des DT-A-Gens die Expression des Transaktivators verhindert würde.

Zur Reduktion der unspezifischen Expression der Zielgene und zur Verbesserung der Regulationskapazität des Tet-on-Systems, wurden zusätzliche Repressorkomponenten, und zur feineren Regulierung des Transaktivators modifizierte Transaktivatoren eingesetzt (Deuschle et al., 1995; Freundlieb et al., 1999; Forster et al., 1999; Urlinger et al., 2000). So konstruierten Freundlieb und Kollegen ein modifiziertes Tet-on-System, das zusätzlich die Information eines „Silencers“ exprimiert (Freundlieb et al., 1999). In diesem System wird in Abwesenheit des Induktors Doxyzyklin die Transgenexpression durch die Bindung eines Silencerproteins (tTS) unterdrückt und somit eine Basalexpression verhindert. Der zusätzliche Einsatz des Silencerplasmids zeigte auch in dieser Arbeit verbesserte Regulationseigenschaften gegenüber dem einfachen Einsatz des Tet-on-Systems. So konnte der Induktionsfaktor von 1,8 auf 15 gesteigert werden. Darüber hinaus ließ sich keine basale Expression im reprimierten Zustand feststellen (vergl. Kap. 3.2.1.3). Diese Ergebnisse zeigten, dass dieses kombinierte, aktivierende und reprimierende System für die regulierte Expression des Diphtherietoxins geeignet ist. In den stabilen Transfektionen wurden in dieser Arbeit allerdings keine Klone isoliert, die eine Regulationsfähigkeit aufwiesen. Das Scheitern der Etablierung stabil transfizierter Zelllinien könnte eventuell durch die Klonierung eines Resistenzgens in den Vektor pUHD.17.1 bzw. durch die Verwendung des von Clontech vertriebenen pTet-On Vektors (kodiert eine Neomycinresistenz) behoben werden. So müssten zur Etablierung einer stabil transfizierten Tet-On-pTet-tTS Zelllinie nur zwei Plasmide kotransfiziert werden. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da keine stabile Zelllinie etabliert werden konnte. Andere Autoren wie Johansen und Kollegen konnten zeigen, dass Zellen, die stabil pTet-tTS exprimieren, nachweislich keine nicht induzierte Basalexpression aufweisen (Johansen et al., 2002). Die kombinierte Anwendung des Tet-on- und des pTet-tTS-Systems konnte ebenfalls erfolgreich in transgenen Mäusen getestet werden (Zhu et al., 2001).

Es wurden zwei weitere modifizierte Tet-on-Systeme mit reduzierter Basalexpression untersucht. So wurde das von Urlinger und Kollegen konstruierte modifizierte Tet-on Plasmid prtTA2-M2 eingesetzt (Urlinger et al., 2000). Dieses modifizierte Tet-on-System sollte bereits in geringeren Konzentrationen mit dem Induktor interagieren, stabiler in der Zelle vorliegen und keine Basalexpression aufweisen.

In dieser Arbeit zeigte die Verwendung des prtTA2-M2 eine Steigerung der Regulationseffizienz, resultierend in der Zunahme der Regulationsfaktoren, verglichen mit

dem Tet-on-System. So wurde ein Regulationsfaktor von 6,6 gegenüber 1,8 (Tet-on-System) erreicht, die Basaltranskription war jedoch zu hoch, um die Toxizität des Diphtherietoxins im reprimierten Zustand regulieren zu können (vergl. Kap. 3.2.1.2 und 3.2.1.4). Aufgrund der sehr guten Regulationseigenschaften, die in der Veröffentlichung Urlinger et al., 2000, beschrieben worden sind, wurden dennoch stabile Transfektionen von C6-Zellen mit dieser modifizierten Form des Tet-on-Systems durchgeführt. Nach der Selektion stabiler Klone konnten drei Klone mit sehr guter Regulationskapazität isoliert werden (vergl. Kap. 3.4.3 und Tab. 3.10). In der anschließenden Doppeltransfektion des Toxingens kodierenden Responseplasmids pUHD-DT-A und eines Resistenzplasmids pcDNA3.1zeo (kodiert ein Zeozin-Resistenzgen) wurden allerdings keine Klone erhalten, die nach Zugabe des Induktors Doxyzyklin erwartungsgemäß abgestorben wären. Dieses Ergebnis kann zwei Ursachen haben. So besteht die Möglichkeit, dass das Plasmid pUHD-DT-A nicht in das Wirtsgenom integriert wurde, oder in die Nähe eines endogenen Repressors gelangte, der die Expression des Gens verhinderte. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass Klone, die das Gen im Genom integriert hatten, eventuell doch eine geringe Basalexpression des Toxins aufwiesen und so bereits vor Abschluss der Selektion durch die Toxinbildung starben. Möglich wäre auch, dass das Gen in die unmittelbare Nähe eines endogenen Enhancers gelangte und so eine Genaktivierung stattfand, die dann zum Tod der Zelle führte. Aber gerade bei der regulierten Expression eines Toxingens ist die Basalexpression entscheidend. Selbst wenn nur eine sehr geringe Basalexpression vorhanden ist, würde es bei der Expression des DT-A zum Zelltod führen, da bereits ein Molekül des Toxins ausreicht, die Wirtszelle zu töten (Yamaizumi et al., 1978).

Es wird derzeit durch weitere Modifikationen versucht, effizientere und „dichtere“ Tet-On Regulationssysteme zu entwickeln. So wurde von Go und Ho der Vektor prtTA-M2 weiter modifiziert und das konstruierte Plasmid als prtTAM2.2 bezeichnet (Go und Ho, 2002). Nach den Angaben der Veröffentlichung, soll die Verwendung dieses Plasmids stringente Regulationsergebnisse liefern. Ob die Repressionsfähigkeit dieses Systems für die regulierte Expression eines Toxingens ausreicht, ist nicht geklärt, da es in dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt worden ist.

Das andere modifizierte Tet-on-System, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist von Forster und Kollegen konstruiert worden (Forster et al., 1999). Durch die zusätzliche Expression eines Repressorproteins (Krab) wird die transkriptionelle Aktivität des Promotors in der Abwesenheit des Induktors unterdrückt (vergl. Kap. 1.7.1.3.3). Aber auch der Einsatz dieses System zeigte keine stringente Kontrolle der Toxizität im reprimierten

Zustand. So wurden nur Regulationsfaktoren von maximal 4.7 erreicht, und die Basalexpression im reprimierten Zustand war relativ hoch (vergl. Kap.3.2.1.5 und Tab. 3.5). Aufgrund der unzureichenden Regulationsergebnisse wurde auf weitere Versuche mit diesem System verzichtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutliche Schwächen der getesteten Tet-Systeme in der regulierten Expression des Diphtherietoxingens. Da jedoch ständig neue modifizierte und verbesserte Varianten des Systems etabliert werden, könnte es in Zukunft durchaus möglich sein, potente Toxine mit einer modifizierten Form des Tet-Systems reguliert exprimieren zu können.

#### **4.2.2 Die Regulationsfähigkeit des Ecdysone<sup>TM</sup>-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins**

Ein weiteres untersuchtes System stellt das Ecdysone<sup>TM</sup>-System dar, das bereits in vielen anderen Experimenten Verwendung gefunden hat. So wurde die Expression von Genen untersucht, die eine Funktion, wie im Rahmen der Apoptose (Li und Sun, 1998; Syken et al., 1999; Danila et al., 1999; Imaizumi et al., 1999; Pastorino et al., 1998), der Entstehung von Krebs und im Zellzyklus (Kakar, 1998; Eliopoupos et al., 1999; Stewart et al., 1999; Guo et al., 2000) übernehmen. Es wurden mit Hilfe dieses Systems auch Gene reguliert exprimiert, die in der embryonalen Entwicklung (Cooper et al., 1998; Sawicki et al., 1998), der Signal Transduktion (Topham et al., 1998; Lin et al., 1999; Gazzola et al., 1999), des Lipid-Metabolismus (Pai et al., 1998) und neuronalen Entwicklungsschritten (Zhang et al., 1998; Dunlop et al., 1999; Johns et al., 1999) von entscheidender Bedeutung sind. Aufgrund der breiten Anwendungsbasis wurde das System auch in dieser Arbeit getestet. In den transienten Transfektionen zeigte sich allerdings nur eine sehr geringe Regulationskapazität mit maximalen Regulationsfaktoren von 2,4 und darüber hinaus noch sehr hohe Basaltranskriptionswerte (vergl. Kap. 3.2.4 und Tab. 3.8). Obwohl den Herstellerangaben entsprechend verschiedene molare Konzentrationen der Regulator- und Responseplasmide eingesetzt wurden, erreichte die Basalexpression in keinem Fall die der Negativkontrolle (vergl. Tab. 3.8). Das Ecdysone<sup>TM</sup>-Modell scheiterte für die Wahl weiterer Experimente, da hier keine Regulation erreicht werden konnte. Die Ergebnisse von No und Kollegen, die in Vergleichstudien mit dem Tet System eine 10fach effektivere Regulationseffizienz des Ecdysone<sup>TM</sup>-Systems zeigen konnten, ließen sich hier nicht bestätigen (No et al., 1996). Darüber hinaus wurden von unerwünschten Nebenwirkungen des System-Induktors berichtet, die zu einem verlangsamten Wachstum von Zellen führen

(Stolarov et al., 2001). Jedoch ist gerade der unbedenkliche Einsatz des Induktors ein wichtiger Aspekt eines optimalen Systems für gentherapeutische Anwendungen. Aus diesem Grund und den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen wurde auf eine weitere Verwendung des Ecdysone<sup>TM</sup>-Systems verzichtet.

#### **4.2.3 Die Regulationskapazität des Dimerizer-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins**

Das Dimerizer-Regulationssystem stellt ein weiteres verwendetes Expressionssystem dar. Auch dieses System wurde bereits mehrfach für die regulierte Expression von heterologen Genen eingesetzt, und es wurden Vorteile wie sehr niedrige Basalexpressionsraten und hohe Induktionsraten beschrieben (Belshaw et al., 1996; Ho et al., 1996; Rivera et al., 1996; Senner et al., 2001). Darüber hinaus wurde es bereits *in vivo* in Mäusen und Primaten untersucht (Magari et al., 1997; Rivera et al., 1999; Ye et al., 1999). Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob es für die regulierte Expression des Diphtherietoxins geeignet ist. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen bestätigten die Angaben der Literatur der niedrigen Basalexpressionswerte (vergl. Kap. 3.2.3). Die Induktionsfaktoren erreichten einen Wert von 9,2 und verglichen mit den bisher getesteten Systemen zeigte dieses Ergebnis die Überlegenheit des Dimerizer-Systems für die regulierte Expression eines Toxins. Aus der stabilen Transfektion konnten Klone selektioniert werden, die sehr gute Regulationskapazitäten zeigten und Regulationsfaktoren von über 600 aufwiesen (vergl. Kap. 3.4.4). Zudem ließ sich keine basale Transkriptionsaktivität nachweisen. Aus diesem Grund war das Dimerizer-System den transienten Transfektionen folgend das optimalste System für die hier untersuchte Fragestellung.

Go und Ho zeigten in Vergleichsstudien zur Effizienz des Dimerizer-Systems und einer modifizierten Form des Tet-on-M2 Systems, dass die Verwendung des Dimerizer-Systems keine nachweisbare Basaltranskription aufweist im Gegensatz zum Tet-on-M2 (Go und Ho, 2002). Höhere Induktionsraten dagegen wurden mit dem Tet-on-M2 erreicht. Senner verglich in transienten Transfektionen die Regulationskapazitäten des Tet-Off-, des Ecdysone<sup>TM</sup>- und des Dimerizer-Systems und konnte die Repressionsfähigkeit des Dimerizer-Systems demonstrieren (Senner et al., 2001). Mit der Verwendung des Ecdysone<sup>TM</sup>-Systems wurden hohe Induktionsraten erreicht, während das Tet-off-System die anderen beiden Systeme in der Regulation über einen längeren Zeitraum übertraf (Senner et al., 2001). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass das Dimerizer-System

niedrige Basaltranskriptionswerte aufwies. Für die Fragestellung dieser Arbeit stand vor allem die niedrige Basisexpression im Vordergrund; die Expressionshöhe ist nicht so bedeutend. Denn bereits ein Molekül des Diphtherietoxins ist ausreichend, eine Zelle abzutöten, daher reicht bereits eine geringe Expressionsrate aus, um den Zelltod auszulösen (Yamaizumi et al., 1978). Aus diesem Grund schien das Dimerizer-Modell für die Etablierung einer stabilen DT-A kodierenden Zelllinie, mit niedrigen Basisexpressionwerten als besonders interessant. Nach der stabilen Transfektion mit dem DT-A kodierenden Responseplasmid und einem Resistenzplasmid (pcDNA 3.1 zeo) wurden 17 Klone selektioniert, die aber nach der Induktion keine veränderte Vitalität zu den nicht induzierten Zellen zeigten. Es besteht die Möglichkeit, dass das Responseplasmid nicht ins Genom integriert worden ist oder die Expression nicht aktiviert werden konnte. Dieses könnte durch die Integration in die Nähe eines endogenen Repressors verursacht worden sein. Möglich ist auch, dass Zellen, die das DT-A-Gen ins Genom integriert haben, doch eine geringe Basalaktivität aufwiesen und so bereits vor Abschluss der Selektion gestorben sind. In Anbetracht der geringen Anzahl an selektionierten Klonen, müsste diese stabile Transfektion wiederholt werden und eine größere Anzahl an Klonen getestet werden. Auf diesen Schritt wurde vorerst verzichtet, da ein weiteres System (GeneSwitch™-System) zur Austestung zur Verfügung stand. Eine mögliche Einschränkung in der Verwendung des Dimerizer-Systems stellt die Voraussetzung der simultanen Expression von zwei Proteinen dar, die über den „Dimerizer“ (Induktor des Systems) zu einem bipartitellen Transkriptionsfaktor verbunden werden. Im übrigen besteht das gleiche Problem in der Verwendung des Ecdysone™-Systems, das auch die Anwesenheit von drei einzelnen Komponenten benötigt, um die Transkription des Ziel-Gens zu aktivieren. Bislang haben diese beiden Systeme weitaus weniger Aufmerksamkeit erhalten als das Tet-System. Dies mag zum einen daran liegen, dass das Tet-System das älteste System ist, aber auch, weil die beiden Systeme für ihre Funktion drei Komponenten benötigen und zudem die pharmakologischen Eigenschaften der jeweiligen Induktormoleküle im Menschen nicht untersucht sind (Agha-Mohammadi und Lotze, 2000; Senner et al., 2001). Je mehr Komponenten für die Funktion eines Systems erforderlich sind, desto Fehler behafteter und störungsanfälliger ist das System. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst noch die Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems untersucht.

#### 4.2.4 Die Regulationskapazität des GeneSwitch™-Systems bezüglich der regulierten Expression des Diphtherietoxins

Das GeneSwitch™-System - auch als das Mifepristone (Mfp) induzierbares System bezeichnet - findet sowohl in transgenen als auch in somatischen Gentherapie- Modellen breite Anwendung (Ngan et al., 2002). Die zentrale Komponente des „first-generation“ Mfp-induzierbaren Systems ist der chimäre Transaktivator GLVP. Dieses Fusionsprotein besteht aus der VP16-Transaktivierungsdomäne und der DNA-bindenden Domäne des Gal4-Proteins (Gal4DBD) und einer modifizierten Form der humanen Progesteron Rezeptor (PR)- und Ligandenbindungsdomäne (LBD), bezeichnet als PRLBD-891. Durch eine Mutation unterscheidet sich das Protein von der normalen Progesteron Liganden-Bindungsdomäne, was dazu führt, dass PRLBD-891 nun Antiprogestosterone wie Mfp binden kann, aber nicht mehr endogenes Progesteron. Fusioniert an die Transkriptions aktivierenden Domänen VP16 und Gal4 DBD in der GLVP-Domäne kann nun PRLBD-891, sobald es Mfp gebunden hat und in den Zellkern transloziert ist, die spezifischen Sequenzen vor dem Ziel-Gen binden. Hier interagiert die Gal4 DBD mit den Gal4 „upstream activation sequences“ (UAS) im Promotor des Zielgens. Dadurch gelangt die VP16-Domäne in eine Position, um die Transkription des Target-Gens zu aktivieren. Die Induktion der Zielgentranskription lässt sich nur durch die Gabe des Mfp steuern, endogenes Progesteron hat keinen Einfluss (Wang et al., 1997). Die zweite Generation des Mfp-induzierbaren Genregulationssystems funktioniert in gleicher Weise, wie das zuvor beschriebene System, unterscheidete sich jedoch durch den Austausch der VP16-Domäne durch die Transaktivierungsdomäne p65 des NFκB Faktors aus dem RelA Transkription Faktor Komplex. Zudem wurde das Mifepristone „responsive“ Element PRLBD891 ausgetauscht gegen PRLBD 914. Diese mutierte Form des humanen Progesteron Rezeptors weist eine Deletion von 19 C-terminalen Aminosäuren auf. Der Austausch führt zu einer verstärkten Transgenaktivierung durch das Mfp - also einer gesteigerten Affinität zum Mfp, so dass bereits geringere Gaben des Induktors zur Aktivierung des Systems führen. Durch diese Modifikationen zeigt GLp65 niedrigere Basalexpressionslevel in der Abwesenheit von Mfp und gesteigerte Expressionswerte des Transgens nach Mfp Administration (DeMayo und Tsai, 2001; Burcin et al., 1999). Diese Variante des GeneSwitch™-Systems wurde auch in dieser Arbeit eingesetzt. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen deuteten auf eine Eignung des Systems für die Etablierung einer regulierbaren DT-A exprimierenden C6 Zelllinie. So wurden unter reprimierten Bedingungen Basalexpressionswerte erreicht, die im Bereich der Negativkontrolle lagen

und somit zeigten, dass das System die Toxizität des Diphtherietoxins stringent regulieren kann (vergl. Kap. 3.2.2). Da das System bereits in vielen anderen Untersuchungen eingesetzt wurde und aufgrund der guten Ergebnisse der transienten Transfektionen dieser Arbeit, ist das GeneSwitch™-Regulatorplasmid stabil in C6 Zellen transfiziert worden. Nach der Selektion konnten 40 Klone erhalten werden, von denen 23 getestet wurden. Die Klone wiesen eine sehr große Variabilität in ihren Regulationskapazitäten auf. So wurden Klone mit Regulationsfaktoren von 3,5 bis 291 gefunden (vergl. Kap. 3.4.5). Diese Erscheinung ist bereits im Zusammenhang mit anderen Regulationssystemen beschrieben worden und ist auf den Einfluss endogener Sequenzen und Enhancer auf die integrierte Plasmide zurückzuführen. Die unterschiedlichen Regulationsfaktoren lassen sich auf den Einfluss der umgebenden chromosomalen Sequenzen des Integrationsortes zurückführen. Diese integrationsabhängige Varianz in der Regulation der Expression wird als „position effect variegation“ (PEV) bezeichnet (Hoeben et al., 1991; Robbins et al., 1997; Zentilin et al., 2000; Paulus et al., 2000) Auch die Höhe der Induktionsfaktoren variierte beträchtlich zwischen den einzelnen Klonen. Das Expressionsmuster war in den verschiedenen Klonen nicht homogen und resultierte aus den unterschiedlichen Integrationsstellen der transfizierten Plasmid-DNA ins Zellgenom.

Bevor eine DT-A stabil transfizierte Zelllinie konstruiert wurde, sollte das Regulationsverhalten der etablierten C6switch-Zelllinie (vergl. Tab.3.12) durch die stabile Transfektion mit einem regulierbaren Reporter gen (*lacZ*) überprüft werden. Nach erfolgter Selektion konnten doppelt stabil transfizierte Klone erhalten werden, die neben dem Regulatorplasmid auch das Reporter gen kodierende Responseplasmid pGene/V5-His/*lacZ* des GeneSwitch™-Systems ins Genom integriert hatten. Auch hier zeigten die getesteten Klone eine enorme Regulations- und Expressionsvarianz (vergl. Kap. 3.6.1).

Es wurden die drei Klone mit den besten Regulationseigenschaften (RF von 420, 1101, 1608) weiter untersucht und die Expressionseigenschaften nach einigen Passagen erneut durch Induktion bzw. Repression überprüft. Dabei zeigten zwei Klone - und zwar die beiden mit den höchsten Expressions- und Induktionswerten - toxische Reaktionen im induzierten Zustand. Die induzierten Zellen lösten sich vom Untergrund und starben, während die reprimierten Zellen keine Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle zeigten. Der Grund für diese Reaktion ist nicht eindeutig zu klären, daher können nur Vermutungen geäußert werden. Das eingesetzte Reporterprotein  $\beta$ -Galaktosidase wirkt in der Regel nicht toxisch auf Zellen. Es könnte jedoch aufgrund der hohen Expressionsraten doch zu toxischen Auswirkungen durch die hohe Konzentration dieses Proteins in der Zelle

gekommen sein. Das biologische Gleichgewicht einer Zelle basiert auf physiologischen Gleichgewichtsreaktionen. Bereits geringe Veränderungen im Gleichgewicht des biologischen Systems können zu entscheidenden Veränderungen der Vitalität führen. Wird so z.B. im Rahmen gentechnischer Versuche ein exogenes Gen in die Zelle transfiziert, das unter natürlichen Bedingungen nicht in der Zelle existiert und zudem noch in hohen Konzentrationen exprimiert wird, können physiologische Prozesse gestört und die Vitalität der Zelle negativ beeinflusst werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung endogener Gene, die in der Nähe der Inserts lokalisiert waren und so das physiologische Gleichgewicht in der Zelle ungünstig beeinflusst wurde.

Einer der drei Klone jedoch, bezeichnet als C6switch-lacZ5, zeigte konstante Regulationseigenschaften über mehrere Passagen und wurde durch weitere Tests hinsichtlich der Regulationseigenschaften des GeneSwitch™-Systems analysiert. Im Vordergrund stand die Überprüfung der Basalexpression. Dazu wurden Western Blot- und histologische Untersuchungen durchgeführt (vergl. Kap. 3.6.1, Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigte deutlich, dass C6switch-lacZ-5 Zellen das Reportergen lacZ nur nachweislich exprimierten, wenn sie unter induzierten Bedingungen (+RU486) kultiviert worden sind (vergl. Abb. 3.2). In den histologischen Untersuchungen wurden C6switch-lacZ-5 Zellen unter induzierten (+RU486) und reprimierten (-RU486) Bedingungen in der Zellkultur kultiviert. Zellen, die induziert kultiviert worden sind, zeigten nach der Inkubation mit einer X-Gal Lösung, blau gefärbte Zellen. Da die X-Gal - Lösung in einer spezifischen Reaktion mit dem  $\beta$ -Galaktosidase Protein zu einer Blaufärbung führt, konnte der Nachweis der regulierten lacZ Genexpression gezeigt werden. Weder reprimierte C6switch-lacZ5 Zellen noch die Kontrollzellen (induziert und reprimiert) zeigten blau gefärbte Zellen nach der Inkubation mit der X-Gal Lösung. Das Auftreten unterschiedlich stark gefärbter, induzierter C6switch-lacZ5 Zellen lässt sich auf die Individualität der exprimierenden Zellen bezüglich ihres Genexpressionsmusters zurückführen. Auch die Zellen eines Klons befinden sich in unterschiedlichen Zellzyklusstadien, und somit unterscheiden sie sich auch in der Expression der Gene. Die Heterogenität ist demnach durchaus natürlich und tolerierbar gewesen (vergl. Abb. 3.1).

Zusammenfassend zeigten weder der Western Blot, noch der  $\beta$ -Galaktosidase-Test als auch die histologische Analyse eine basale Transkription des lacZ-Gens in Abwesenheit des Induktors RU486 - also im reprimierten Zustand.

Die erhaltenen Ergebnisse deuteten auf die Fähigkeit des Systems auch toxische Gene ohne jegliche Basalexpression reguliert exprimieren zu können, hin. Das sollte die Konstruktion

einer stabilen Zelllinie ermöglichen, die neben dem Regulatorplasmid auch das DT-A-Gen kodierende Responseplasmid im Genom integriert vorliegen hat und eine regulierte Expression des Gens erlauben sollte. Um dieses zu überprüfen, wurde der mit dem Regulatorplasmid stabil transfizierte Zellklon C6switch in einer stabilen Transfektion mit dem DT-A kodierenden Responseplasmid pGene/V5-His/DT-A transfiziert. Nach der Selektion konnten von insgesamt 30 Klonen, 4 Klone isoliert werden, die eine regulierte Expression des DT-A-Gens erlaubten. In einem Vitalitätstest (MTT-Test) und einem Cytotoxizitätstest (LDH-Test) wurden die Klone charakterisiert (vergl. Kap. 3.6.3.2 und 3.6.3.2).

Das Proliferations- und Cytotoxizitätsverhalten wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion überprüft.

Nur Klon 1 zeigte bereits nach 20h größere Unterschiede im Vitalitätsverhalten. Mit einem Wert von 1252 (induziert) gegenüber 856 (reprimiert) war die Cytotoxizität aufgrund der induzierten DT-A Expression nachweisbar. Nach 44h ließen sich massive Unterschiede in der LDH-Konzentration in allen Klonen bis auf der Kontrollzellen nachweisen. Dieses Ergebnis zeigte deutlich den durch die induzierte Expression des Toxins ausgelösten Zelltod. Die Werte, die nach 68h gemessen wurden, bestätigten die nach 44h erhaltenen Daten. Nach 140 Stunden zeigten sowohl die induzierten als auch die reprimierten Zellen hohe LHD-Konzentrationen. Diese hohen Werte waren auf die schlechten Lebensbedingungen der Zellen nach diesem Zeitraum (140h) zurückzuführen, die sich aufgrund der Zelldichte und der damit verbundenen Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe ergab.

Die Ergebnisse des MTT-Test bestätigten die des LDH-Tests. Auch hier unterschieden sich die Vitalitätswerte zu Beginn mit Ausnahme des Klons 1 nur geringfügig von den induzierten und reprimierten Ansätzen. Nach 44h jedoch zeigten sich große Vitalitätsunterschiede zwischen induzierten und reprimiert kultivierten Zellen aller Klone. Die gemessenen MTT-Werte des Klon 1 wiesen wieder die größten Unterschiede (568 induziert gegenüber 1788 reprimiert) auf. Die gemessenen Werte der induziert und reprimiert kultivierten Negativkontrolle (C6 Zellen) unterschieden sich nicht. Dieses Ergebnis zeigte auch, dass die Gabe des Induktors RU 486 nicht toxisch auf Zellen wirkte.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen treffen:

Alle Klone zeigten im reprimierten Zustand Überlebenswerte, die belegten, dass kein Toxin exprimiert wurde. Dieses Ergebnis zeigte deutlich die Eignung des GeneSwitch™-

Systems und die Überlegenheit gegenüber den anderen getesteten Systemen zur regulierten Expression eines Toxins in stabilen Zelllinien.

Im Anschluss an die Charakterisierung der Klone *in vitro* sollte nun auch die Eignung des Systems *in vivo* untersucht werden.

Zunächst sollte überprüft werden, ob das GeneSwitch™-System in der Lage ist, das Reporter-gen lacZ *in vivo* stringent zu regulieren. Erst im Anschluss an diese Überprüfung sollte die Regulation des Toxins unter physiologischen Bedingungen getestet werden. Dazu wurden C6switch-lacZ Zellen in das Gehirn von Nacktmäusen implantiert und die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten täglich den Induktor RU486, während die Tiere der Gruppe 2 nur die reine Trägerlösung ohne das RU486 appliziert bekamen. Nach 2 Tagen wurden aus jeder Gruppe 3 Tiere getötet, die Gehirne entnommen und wie beschrieben präpariert (vergl. Kap.3.9.1). In den entstandenen Tumoren der „induzierten“ Tiere, konnte eine Aktivierung der Genexpression des lacZ-Gens in den Tumorzellen nachgewiesen werden. „Reprimierte“ Tiere zeigten keine Aktivität in den implantierten C6switch-lacZ Tumorzellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass RU486 nach intraperitonealer Gabe die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und die Genexpression im GeneSwitch™-System innerhalb von 2 Tagen induzieren kann, wie es auch bereits von Kellendonk und Kollegen beschrieben wurde (Kellendonk et al., 1999). Außerdem zeigte dieses Versuchsergebnis, dass bereits zwei Tage nach der ersten intraperitonealen Gabe genügend Induktormolekül im Gehirn vorhanden war, um die Expression des lacZ-Gens zu aktivieren. Diese Resultate zeigen deutlich, dass das GeneSwitch™-System auch für die regulierte Gen-Expression *in vivo* geeignet ist. Daher wurde im Anschluss die induzierte Regulation des Diphtherietoxins *in vivo* überprüft. Die DT-A-Gen stabil transfizierten Tumorzellen wurden in das Gehirn von Nacktmäusen implantiert. Für diesen Zweck wurde der C6switch-DT-A Klon1 verwendet, da er die besten Regulationseigenschaften zeigte (vergl. MTT und LDH-Test, Kap. 3.6.3.1 und Kap. 3.6.3.2). In den Gehirnen von „induzierten“ Tieren konnten nach Abschluss des Versuches keine Tumoren detektiert werden (vergl. Kap. 3.9.2). Von 11 RU486 behandelten Tieren zeigte keine Maus die Bildung eines Tumors im Gehirn. In den Gehirnen der unbehandelten Mäuse jedoch entwickelten 6 von 10 auswertbaren Tieren einen Tumor. Das bedeutet, 60% der „reprimierten“ Tiere wiesen einen großen Tumor auf, und dieses entspricht nach dem  $\chi^2$ -Test einer Signifikanz von  $p < 0,01$ . In diesem Tierversuch konnte die Effizienz zur regulierten Expression des Diphtherietoxin-Gens *in vivo* gezeigt werden. In Tieren, in denen die Expression des Toxins nach Gabe des Induktormoleküls induziert

worden ist, wurde das Tumorwachstum signifikant inhibiert (Signifikanz von  $p < 0,01$ ). Der Grund, warum 4 der unbehandelten Tiere keinen Tumor ausbildeten, ist ungeklärt. Es wurde beschrieben, dass auch in syngenetischen Tieren nach Implantation der Tumorzellen nicht immer eine Tumorentwicklung stattfindet (Nitta et al., 1994). Es ist zu beachten, dass es sich bei den Tieren um komplexe, lebende Systeme handelt und sie manchmal andere Reaktionen und Ergebnisse zeigen, als erwartet. Es handelt sich bei den Tieren stets um ein zu optimierendes Modellsystem.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Regulationseffizienz und Überlegenheit des GeneSwitch™-Systems gegenüber den anderen getesteten Transkriptionssystemen zur Kontrolle der stringenten Regulation des Diphtherietoxins unter *in vitro* und *in vivo* (physiologischen) Bedingungen.

#### **4.2.5 Die Bedeutung des GeneSwitch™-Systems zur Regulation von Genen (in der Literatur)**

Das GeneSwitch™-System wurde auch zur regulierten Expression anderer Gene in transgenen Mäusen eingesetzt. Wang et al. (1997), zeigten als erste Arbeitsgruppe die Verwendung in transgenen Tieren und demonstrierten das enorme Potential dieses Systems. Sie verwendeten das GeneSwitch™-System, um eine Leber-spezifische Mfp-induzierbare Transgenexpression in Säugetiermodellen zu zeigen. Andere Arbeitsgruppen konstruierten bitransgene Mäuse (Pierson et al., 2000; Ngan et al., 2002).

So wurde z.B. das humane Wachstumshormon (hGH) unter die Kontrolle des GeneSwitch™-Systems in der Kombination mit einem Leberzellen-spezifischen Promotor Transthyretin (TTR) in Leberzellen exprimiert (Ngan et al., 2002). In Abwesenheit des Induktors wurden nur geringe Expressionswerte des hGH beobachtet, nach der Gabe jedoch eine 5800-33000-fache Zunahme des hGH im Serum. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion auch nach drei Wochen in den Tieren wiederholbar war und die Proteinkonzentrationen des hGH von der Dosis des gegebenen Mfp abhängig war (Ngan et al., 2002). In diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass die hGH Genexpression einen Maximalwert erreichte 12h nach der Gabe und innerhalb von 100h zurück auf die Basisexpressionwerte ging. Neben Wang und Kollegen, zeigten auch Pierson und Mitarbeiter in bitransgenen Mäusen eine Leberzellen-spezifische, Mfp induzierbare Expression des Inhibin A in einer Dosis-Abhängigkeit des Induktors (Wang et al., 1997 a; Pierson et al., 2000).

Zhao und Kollegen zeigten eine weitere Anwendungsmöglichkeit des Systems in einem transgenen Mausmodell. Sie testeten die physiologische Wirkung eines überexprimierten Gens in der Lunge von adulten Mäusen. Die histologischen Unterschiede des Lungengewebes zwischen „induzierten und reprimierten Mäusen“ verschwanden vollständig, wenn Mfp über einen Zeitraum von zwei Wochen nicht gegeben wurde, konnte aber durch die wiederholte Gabe des Mfp erneut aktiviert werden (Zhao et al., 2001).

#### **4.2.6 Der Einsatz des GeneSwitch™-System in experimentellen Gentherapieansätzen und in verschiedenen Gentransfermöglichkeiten**

Aber nicht nur für die regulierte Expression bestimmter Gene in transgenen Tieren eignet sich das System, sondern auch für gentherapeutische Ansätze mit unterschiedlichen Methoden der Genübertragung.

Die Anwendung der Gentherapie zu therapeutischen Zwecken in der Humanmedizin zeigt, dass therapeutisch relevante Therapien eine zeitlich kontrollierte Expression des therapeutischen Gens und einen definierten Level der Expression erfordern. Das RU486-induzierbare System liefert die Möglichkeit und ist einer der versprechendsten Kandidaten für diesen Zweck (Tsai et al., 2000). Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften und die geringen Nebenwirkungen des RU486 zeigen die Überlegenheit dieses System für eine gentherapeutische Anwendung.

Burcin und Mitarbeiter konstruierten einen „helper-dependent“ Adenoviralen Vektor (HD-Ad-Vektor), der sowohl Expressionsequenzen für GeneSwitch™-Systems als auch für das Gen des humanen Wachstumsfaktors (hGH) kodierte (Burcin et al., 1999). Über die Schwanzvene wurde Mäusen dieser Vektor appliziert, und es konnte eine effiziente Induktion der hGH Expression nach RU486-Gabe gemessen werden. Außerdem konnte die Expression durch die erneute Gabe des Induktors wiederholt werden und blieb über einen Zeitraum von 1 Jahr stabil (Burcin et al., 1999). Diese Ergebnisse, welche eine konstante und induzierbare Genexpression im Rahmen eines somatischen Gentherapieansatzes demonstrieren, gelten als eines der besten Beispiele des gentherapeutischen Potentials der kombinierten Anwendung eines HD-AD Vektors mit dem Mfp induzierbaren System (Burcin et al., 1999).

Die direkte Injektion und anschließende Elektroporation der Vektoren in den Muskel zeigten ebenfalls eine Anwendungsmöglichkeit des Systems ohne die Verwendung des viralen Gentransfers (Abruzzese et al., 2000). In diesem Experiment wurde das humane SEAP-Gen (sekretierte alkaline Phosphatase) unter die Kontrolle des RU486-induzierbaren Systems gebracht und Abruzzese und Kollegen konnten eine Induktor-abhängige Expression des Proteins in den Mäusen nachweisen (Abruzzese et al., 1999). In weiteren Versuchen wurden auch VEGF (*vasculare endotheliale growth factor*) und EPO (Erythropoietin) in die Muskeln der Hintergliedmaßen von Mäusen gespritzt und nach Zugabe des Induktors nachweislich exprimiert (Abruzzese et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen den Erfolg in Tiermodellssystemen und die Durchführbarkeit der Kombination des Mfp-induzierbaren Systems und nicht viraler Gentransfermethoden wie der

Elektroporation. Auch in anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass unter der Verwendung eines modifizierten Cre-lox-Rekombinationssystems und der Verwendung des RU486-induzierbaren Systems Anwendungen im Herzgewebe und im Gehirn möglich sind (Kellendonk et al., 1999; Kitayama et al., 2001; Minamino et al., 2001).

Zusammengefasst zeigen die verschiedenen induzierbaren transgenen Modelle eine große Anwendungsbreite des Systems, sowohl in der zellspezifischen Expression als auch in der Höhe der Transgenexpression je nach Gabe des RU486.

### 4.3 Die Bedeutung des Bystander Effektes für angewendete Gentherapien

Der direkte Transfer von aktivierbaren Suizidgenen- sogenannten „prodrug activation systems“ in Tumoren zeigt sich als attraktive Methode für die selektive Eliminierung eines Tumors *in vivo*. Ein generelles Problem dabei ist jedoch die geringe Transfektionseffizienz während des *in vivo* Gentransfers (Erbs et al., 2000). Das intensivste untersuchte Suizidgen ist das Herpes Simplex Thymidin Kinase Gen (HSV-TK) (Moolten, 1986; Vincent et al., 1996; Rainov, 2000; Nanda et al., 2001). Die Expression des HSV-TK in Tumorzellen erlaubt die Umwandlung von den Prodrugs wie Ganciclovir (GCV) oder Aciclovir, zwei Guanodin Analoga- in ihre monomeren Formen, welche dann durch zelluläre Kinasen phosphoryliert werden und so die entsprechenden Di- und Triphosphate bilden (Erbs et al., 2000). Die intrazelluläre Akkumulation solcher Triphosphate und ihre Inkorporation in die DNA inhibiert DNA Polymerasen und führt zum Zelltod (Moolten, 1986). Benachbarte Tumorzellen, die das Enzym nicht exprimieren, zeigten in Gegenwart des GCV dennoch toxische Reaktionen und starben (Freeman et al., 1993). Dieses Phänomen wird als „Bystander Effekt“ bezeichnet (Kolberg, 1992). Es wurde gezeigt, dass der Bystander Effekt hauptsächlich auf den Transfer von phosphorylierten Ganciclovirmolekülen von HSV<sup>+</sup>- positiven Zellen auf HSV<sup>-</sup>- negative Zellen durch gap junctions vermittelt wird (Goldberg und Bertram, 1994, Yamasaki und Katoh, 1988). Mesnil zeigte, dass der Bystander Effekt bei der Anwendung der HSV-TK Gentherapie bei Krebszellen durch Connexine vermittelt wird (Mesnil et al., 1996).

Die gap junctions stellen intramembranöse Kanäle dar- auch als Connexon bezeichnet- und bestehen aus den homologen Proteinen der Connexine- einer hoch konservierten multigenen Proteinfamilie (Pitts et al., 1988).

Es ist bekannt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Rattengliomzelllinie C6 nur geringe Mengen dieses Proteins exprimiert und dementsprechend wenige bzw. keine gap

junctions ausbildet, über die mit anderen Zellen kommuniziert werden kann. Dieses wurde durch verschiedene morphologische und funktionelle Studien gezeigt (Brauner et al., 1990; Naus et al., 1991; Tiffany-Castiglioni et al., 1986; Zhu et al., 1991; Lin et al., 2002). Lin und Kollegen (2002) zeigten, dass Wild-Typ C6 Zellen einen sehr lockeren Zellverband bilden, in dem die einzelnen Zellen relativ weit voneinander entfernt in gestreckter Position liegen und nur wenig Zellkontakt haben- verglichen mit Connexin überexprimierenden C6 Zellen (C6 Zellen wurden mit einem Connexin transfigiert).

In der vorliegenden Arbeit konnte der Bystander Effekt zwischen DTA-exprimierenden C6 Zellen und kokultivierten GFP exprimierenden C6 Zellen nicht nachgewiesen werden (vergl. Kap. 3.8). Während DT-A exprimierende C6 Zellen nach Induktion erwartungsgemäß abstarben, zeigten die kokultivierten Zellen keinen vermehrten Zelltod gegenüber den Kontrollansätzen (kokultivierte C6 Zellen und GFP exprimierende C6 Zellen). Es ist davon auszugehen, dass dieses Ergebnis auf das Fehlen von gap junctions zurückzuführen ist. Um dieses Ergebnis allerdings zu bestätigen, müssten Connexin transfigierte und exprimierende C6 Zellen stabil mit dem DT-A kontrollierenden Regulationssystem stabil transfigiert werden und der Versuch wiederholt werden.

Dieser Versuch demonstrierte darüber hinaus die biologische Sicherheit der Verwendung des DT-A-Gens. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei dem Diphtherietoxin um ein sogenanntes „A-B“- Toxin. Die A-Kette vermittelt die enzymatische Reaktion und ist für den Tod der Zelle verantwortlich, während die B-Kette die Bindung und die Aufnahme in die Zelle vermittelt (Falnes und Sandvig, 2000).

Dieser Versuch zeigte, dass nur Zellen, die das DT-A exprimieren, sterben. Auch nach dem Zelltod der DT-A exprimierenden C6switch-DT-A Zellen werden nicht exprimierende (C6-SP-GFP) Zellen in ihrer Vitalität nicht beeinflusst.

Das bedeutet für die therapeutische Anwendung, dass nur Zielzellen, die mit dem Toxigen transfigiert sind, nach Induktion absterben, umgebendes Gewebe jedoch unbeschadet bleibt.

#### 4.4 Die Bedeutung und die bisher durchgeführten gentherapeutischen Ansätze in der Behandlung maligner Gehirntumoren

Die Bekämpfung maligner Erkrankungen im Gehirn stellt eine große Herausforderung für die Forschung dar. So zeigen sich zum Beispiel Gliome - die die häufigsten Primärtumore darstellen - als besonders therapieresistent gegenüber den traditionellen Therapien wie Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie (Forsyth und Roa, 1999; Black und Loeffler, 1997). Die 5-Jahres-Überlebensrate für das Glioblastom (GBM) dem häufigsten malignen Hirntumor beträgt weniger als 5,5%, das mediane Überleben weist weniger als 12 Monate auf (Parker et al., 1999; Roth et al., 1999). Das Versagen der klassischen, aber auch der neueren, experimentellen Therapieansätze sind vielfältig und in den molekularen Grundlagen auch nicht eindeutig verstanden. Ein Grund z.B. für das Scheitern der Chemotherapie, ist die erworbene Resistenz von Glioblastomzellen gegenüber einem breiten Spektrum von zytotoxischen, proapoptotischen Agenzien (Roth et al., 1999). Desweiteren verhindert das invasive Wachstum der Gliomzellen die komplette neurochirurgische Tumorentfernung (Roth et al., 1999; Weller, 2000). Die begrenzte Strahlentoleranz des Gehirns lässt zudem nur eine geringe Strahlendosis zu Therapiezwecken zu. Somit bieten die etablierten Therapiemöglichkeiten keinen optimalen Behandlungsansatz für die Therapie maligner Hirntumoren. Die schlechte Prognose und das Fehlen einer optimalen Behandlung hat zur Exploration zahlreicher innovativer Therapieansätze geführt, zu denen auch der gentherapeutische Ansatz zählt, dem die größten Erfolgsaussichten zugeschrieben werden (Kramm et al., 1995; Wildner, 1999).

Die Suizidgentherapie, die auf der *in vivo* Transduktion der Tumorzellen mit dem viralen Gen der Thymidinkinase und anschließender Behandlung mit dem spezifisch durch die TK aktivierbaren Vorläufersubstanz (prodrug) Ganciclovir basiert, ist die erste und bislang einzige klinisch getestete Gentherapie maligner Gliome (Oldfield et al., 1993; Ram et al., 1997). In dieser Studie wurden von 1996 bis 1998 ca. 300 Patienten in 45 Kliniken Europas und Nordamerikas in einer Kooperation mit dem Pharmakonzern Norvartis mit dem HSV-TK-Ganciclovir-Therapieansatz behandelt. In diesem beschriebenen Therapieansatz wurde die „Schwäche“ und die charakteristische Eigenschaft von Gehirntumorzellen ausgenutzt. Denn neben ihrer aggressiven Art scheinen Gehirntumore jedoch auch eine „Achillessehne“ aufzuweisen, da sie im Gehirn die einzig sich teilende Zellpopulation darstellen (mit Ausnahme einiger weniger Mikrogliazellen) (Lam und Breakefield, 2001). Dieses bietet die Möglichkeit, gezielt mit Hilfe von modifizierten Retroviren nur Tumorzellen zu transfizieren. Die Genübertragung der zitierten Arbeit

erfolgte mit Hilfe von retroviralen Partikeln, die nur sich in Proliferation befindliche Zellen transduzieren. Retrovirale Vektoren finden den häufigsten Einsatz in klinischen Gentherapieprotokollen und weisen eine besondere Eignung für den Einsatz bei der Behandlung von Gehirntumoren auf, da z.B. der Klassiker- das *Moloney murine leukemia virus* nur Gen in sich teilenden Zellen einschleusen kann und somit keine Gefährdung der gesunden Zellen im Gehirn darstellt. Ein Problem, das sich bei dieser *in vivo* Anwendung ergab, war jedoch die geringe Transduktionseffizienz. Migratorische Gliomzellen zeigen auf ihrer Wanderung keinen Zellzyklus und teilen sich nicht. Dadurch werden sie resistent gegenüber Therapien, die teilende Zellen angreifen (Berens und Giese, 1997). Darüber hinaus befindet sich in menschlichen glialen Tumoren ein relativ hoher Prozentsatz der Tumorzellen nicht in aktiver Proliferation und wird somit therapeutisch nicht erfaßt (Reifenberger et al., 1999).

Der Antitumoreffekt dieser Gentherapie hängt auch entscheidend vom sog. „Bystander Effekt“ ab. Der Bystander Effekt beschreibt die Tatsache, dass nicht alle Tumorzellen das Thymidinkinase Gen exprimieren müssen, um durch die Zugabe des Ganciclovirs abgetötet zu werden (Moolten und Wells, 1990). In Zellkulturversuchen ließ sich nachweisen, dass nur 10% der Tumorzellen die Thymidinkinase exprimieren müssen um den Tumor komplett – also 100%-ig abzutöten (Freeman et al., 1993). Der Effekt tritt jedoch nur ein, wenn sich genetisch und nicht genetisch veränderte Tumorzellen während der Ganciclovirtherapie in direkten zellulären Kontakt befinden. Es werden toxische Zellmediatoren (phosphorylierte Ganciclovirmoleküle) über die sogenannten gap junctions ausgetauscht, die dann zur induzierten Apoptose der Zellen führen (Mesnil et al., 1996; Mesnil und Yamasaki, 2000).

Im Tierversuch ließ sich der Bystander Effekt bestätigen (Culver et al., 1992). Leider ließen sich die Ergebnisse aus vorangegangenen Tierversuchen nicht auf den Menschen übertragen und die Versuchsreihe wurde wegen erwiesener Unwirksamkeit zu Beginn des Jahres 1999 ausgesetzt (Simm, 2000). Die beschriebene HSV-TK Therapie wurde in den letzten Jahren jedoch weiter verbessert, so dass bereits erfolgreiche Phasen I und II Studien durchgeführt wurden, die eine neue Therapie bezüglich auffälliger Nebenwirkungen prüfen (Rampling et al., 2000; Trask et al., 2000). Schließlich wurde bereits eine Phase III Studie (testet die eigentliche Wirksamkeit) mit retroviraler- kodierter HSV-TK, aber leider zeigte sie für den Patienten keinen signifikanten Überlebensvorteil (Rainov, 2000). Ein weiteres Problem der effizienten Behandlung von Gehirntumoren ist die fehlende Antigenpräsentation der Tumorzellen, die so innerhalb eines relativ Immunsystem

privilegierten Bereiches für effektive Immuntherapien schwer zu erreichen sind. Das Fehlen einer effektiven Immunreaktion gegen gliale Tumoren im Gehirn ist aufgrund des immun-privilegierten Immunstatus des Gehirns zu suchen- vermittelt durch die Blut-Hirn-Schranke und dem Fehlen der konventionellen Lymphgefäße innerhalb des Zentralen Nervensystems (Miller, 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bislang keine nennenswerten Ergebnisse erzielt wurden, und viele der möglichen und untersuchten Therapien zu Nebenwirkungen wie Fieber, Blutungen, Sepsis und Lähmungen führten (Lam und Breakefield, 2001).

Ein weiteres Problem ist die geringe Übertragbarkeit der in Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse.

Die Gründe der geringen Erfolgsrate, die in den klinischen Studien beobachtet wurde- verglichen mit den Ergebnissen aus Tierversuchen mit Nagern, sind vielfältig. Zuerst unterscheiden sich die Größe der Tumoren und der Gehirne von Mensch und Nager um ein Vielfaches. Zweitens weisen viele der experimentellen Tumoren einen vielfach höheren Satz an teilenden Zellen auf - verglichen mit „natürlichen“ menschlichen Tumoren. Dieses führt zu größeren Transduktionseffizienzen durch virale Vektoren, die selektiv nur teilende Zellen infizieren und auch zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber eingeschleusten Medikamenten führen. Darüber hinaus tendieren Gliome in Nagetieren als Solitär tumor zu wachsen, mit einer sich umgebenden infiltrierenden Zone (Scharf et al., 1994). Humane Gliome dagegen tendieren dazu einzelne, invasive Zellen auszusenden, die große Strecken von der eigentlichen Primärtumormasse zurücklegen (Dalrymple et al., 1994). Außerdem wirken die Tumorzellen häufig antigen - sogar in syngenetischen Tieren, wobei humane Gliome stets mit Immunsuppression einhergehen (Nitta et al., 1994).

Zusammenfassend zeigt sich die Dringlichkeit der Etablierung einer effizienten Therapie zur Behandlung von Gliomen und die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse können die Basis einer neuen Therapie bilden.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des GeneSwitch™-Regulationssystems die stringente Regulation eines potenten Toxins *in vivo* und *in vitro* erlaubt.

In weiterführenden Experimenten sollen retrovirale Vektoren als Gentransfer-Vehikel verwendet werden. In der humanen Gentherapie werden Retroviren als Gentransfer-Vektoren bereits seit über zehn Jahren in klinischen Studien eingesetzt (Miller, 1992; Mulligan, 1993, Cavazzana-Calvo et al., 2000). Modifizierte retrovirale Vektoren eignen sich besonders für die gentherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen des Gehirns, da sie nur Zellen infizieren, die sich teilen und somit nur Tumorzellen befallen, die die mitotisch aktivsten Zellen im Gehirn sind (Miller, 1992). Die Vorteile retroviraler Vektoren liegen in ihrer Eigenschaft, das therapeutische Gen in das Wirtsgenom zu integrieren.

Aus diesem Grunde sollen retrovirale Vektoren mit den Regulationssequenzen des GeneSwitch™-Systems und dem zu regulierenden DT-A-Gen konstruiert werden. Im Anschluss daran werden Verpackungszelllinien mit dem Plasmid transfiziert und selektioniert, so dass stabil Retroviren-produzierende Verpackungszelllinien (Producer-Zelllinien) hergestellt werden. Der Überstand der Producer-Zelllinien enthält die Virionen, die dann in den *in vitro* Versuchen auf die zu transfizierenden Zellen gegeben werden. Zunächst soll die Effizienz dieses retroviralen Gentransfers *in vitro* getestet werden. Zu diesem Zweck werden wieder die Regulationseigenschaften, insbesondere die Fähigkeit der Repression von den transfizierten Zellen, bestimmt.

Verläuft dieser Versuch erfolgreich, sollen in nachfolgenden Untersuchungen dann wieder Experimente *in vivo* durchgeführt werden. Im ersten Schritt dieses Versuches werden Gliomzellen in das Nacktmausgehirn implantiert. Nach ca. 7 Tagen soll dann die ecotrope retrovirale Producer-Zelllinie in die entstandenen Tumoren transplantiert werden. Im Anschluss daran soll die Toxinexpression in den Tumorzellen durch die Gabe des Induktors RU486 aktiviert werden. Der Effekt der *in vivo* Toxin-Induktion auf die Vitalität und die Größe der Tumoren soll morphometrisch und immunhistologisch bestimmt werden.

Das langfristige Ziel ist die Etablierung eines neuen Gentherapieansatzes für Hirntumoren, bei dem transferierte Suizidgene für direkte Toxine „von außen“ durch die Gabe des Induktors funktionell aktiviert werden kann.

## 5. Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen des Gehirns lassen sich auch durch stetige Verbesserungen der etablierten Therapien nur in wenigen Fällen optimal behandeln. Daher ist man ständig bemüht neue Behandlungsmethoden zu finden. Eine davon stellt die Gentherapie mit Suizidgenen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Grundlagen für eine Suizidgentherapie, die in erster Linie die stringente Regulation des Suizidgens erfordert, etabliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Toxigen (Diphtherietoxigen) unter die Kontrolle eines genetischen Schalters zu bringen, der eine Expression des transferierten Toxingens im nicht aktivierten Zustand komplett supprimieren kann, auf der anderen Seite aber zum gewünschten Zeitpunkt soweit aktivieren kann, dass die induzierten Zellen absterben.

Zu diesem Zweck sollten die aktuellen Regulationssysteme (Tet-Systeme und deren modifizierte Systeme, Ecdysone™-System, Dimerizer-System und das GeneSwitch™-System) getestet werden, inwieweit sie sich für die regulierte Expression des Diphtherietoxins eignen. Zusätzlich sollten ihre Eigenschaften analysiert und miteinander verglichen werden.

Zunächst wurden mit jedem System transiente Transfektionen mit der Rattengliomzelllinie C6 durchgeführt. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen zeigten deutliche Schwächen in der Repressionsfähigkeit des Tet-off-, Tet-on- und Ecdysone™-Systems. Besonders gute Regulationseigenschaften zeigten das modifizierte Tet-on-pTet-tTS-, das Tet-on-M2-, das Dimerizer- und das GeneSwitch™-System. Im Anschluss daran erfolgten mit diesen Systemen stabile Transfektionen.

Die aus diesen Versuchen hervorgegangenen Klone wurden auf ihre Regulationseigenschaften getestet. Dabei zeigten sich das GeneSwitch™-System und das Dimerizer-System als besonders geeignet und übertrafen die anderen Systeme in ihren Regulations- und besonders in den Repressionseigenschaften.

Nach der Etablierung regulierbarer C6 Zelllinien (bezeichnet als C6switch) wurde mit dem GeneSwitch™-System weitergearbeitet. Zunächst sollte mittels einer stabilen Transfektion mit dem Reportergen lacZ überprüft werden, ob das GeneSwitch™-System geeignet ist, Gene ohne nachweisbare Basalexpression reguliert exprimieren zu können.

So wurde in der zweiten stabilen Transfektion das zu regulierende lacZ-Gen in die etablierte C6switch Zelllinie transfiziert. Die selektionierten stabilen Klone wurden anschließend mit

verschiedenen biochemischen Tests ( $\beta$ -Galaktosidasetest, X-Gal-Test, Western Blot Analyse) charakterisiert.

Nachdem in diesem Versuch gezeigt werden konnte, dass das GeneSwitch™-System für die stringente Regulation von Genen geeignet ist, wurde nun überprüft, ob es sich auch für die Regulation des Diphtherietoxingens eignet. Zu diesem Zweck wurden erneut stabile Transfektionen mit den C6switch Zellen durchgeführt, und nach erfolgreicher Selektion wurden mehrere stabile Klone erhalten. Die DT-A transfizierten C6switch-DT-A Zellen wurden *in vitro* durch den Cytotoxizitätstest (LDH-Test), den Vitalitätstest (MTT-Test) und mikroskopischen Kontrolluntersuchungen charakterisiert. Es konnten Klone identifiziert werden, die die gewünschte stringente Regulationsfähigkeit aufwiesen.

Im nächsten Schritt sollte die Regulationseffizienz in *in vivo* Versuchen analysiert werden. Dazu wurden zunächst wieder die C6switch-lacZ Zellen in das Gehirn von Nacktmäusen transplantiert und die Genexpression in den entstandenen Tumoren von „induzierten“ und „reprimierten“ Tieren verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass nur „induzierte“ Tiere das  $\beta$ -Galaktosidasegen exprimierten, während in den unbehandelten Tieren keine Expression nachgewiesen werden konnte.

Dieses Ergebnis zeigte die stringente Regulationseffizienz des Systems auch unter physiologischen Bedingungen. Daher wurden im nächsten Schritt die C6switch-DT-A Zellen ebenfalls in das Gehirn von Nacktmäusen transplantiert und die Regulationseffizienz überprüft. „Induzierte“ Tiere zeigten nach Versuchsende keine Tumorenentwicklung, während 60% der unbehandelten Tiere Tumoren im Gehirn entwickelten.

Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass das GeneSwitch™-System für die stringente Regulation eines Toxingens sowohl *in vitro* als auch *in vivo* geeignet ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit der Verwendung eines Regulationssystems (GeneSwitch™-System) ein genetischer Schalter für die stringente Regulation des Diphtherietoxingens gefunden werden. Dieses System erlaubte neben der stringenten Expression *in vitro* auch die Anwendung *in vivo*. Das Ergebnis dieser Arbeit ermöglicht die weitere Etablierung einer Gentherapie auf der Basis eines Suizidgens.

## 6. Literatur

### A

Abruzzese R.V., Godin D., Burcin M, Mehta V., French M., Li Y., O'Malley B.W., Nordstrom J.L. (1999): Ligand-dependent regulation of plasmid-based transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* 10: 1499-507

Abruzzese R.V., Godin D., Mehta V., Perrard J.L., French M., Nelson W., Howell G., Coleman M., O'Malley B.W., Nordstrom J.L. (2000): Ligand-dependent regulation of vascular endothelial growth factor and erythropoietin expression by a plasmid-based autoinducible GeneSwitch system. *Mol. Ther.* 2: 276-87

Ackland-Berglund C.E. und Leib D.A. (1995): Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18:196-200

Agha-Mohammadi S. und Lotze M.T. (2000): Immunomodulation of cancer: potential use of selectively replicating agents. *J. Clin. Invest.* 105: 1173-1176

Anderson F.W. (1995): FDA reform: arguments on both sides. *Hum. Gene Ther.* 6: 275-6

Auguste P., Gürsel D.B., Lemiere S., Reimers D, Cuevas P., Carceller F., Di Santo J., Bikfalvi A. (2001): Inhibition of fibroblast/ fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and –independent mechanisms. *Cancer Res.* 6: 1717-1726

### B

Bansal K. und Engelhard H. (2000) Gene therapy for brain tumors. *Curr. Oncol. Rep.* 2: 463-472

Baim, S.B.; Labow, M.A.; Levine, A.J.; Shenk, T.A. (1991): Chimeric mammalian transactivator based on the lac repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072-5076

Baron U., Gossen M., Bujard H. (1997): Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 25: 2723-9

Berens ME, Giese A. (1999): "...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia* 1: 208-19

Belshaw P.J., Ho S.N., Crabtree G.R., Schreiber S.L. (1996): Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 4604-7

Bieschke E.T., Wheeler J.C., Tower J. (1998): Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila* development and aging. *Mol. Gen. Genet.* 258: 571-579

Black P.M. und Loeffler J. (1997): *Cancer of the nervous system*. Blackwell, Oxford UK

Blaese, R.M.; Culver K.W.; Miller A.D.; Carter C.S.; Fleisher T.; Clerici M.; Shearer G.; Chang L.; Chiang W.; Tolstshev P.; Greenblatt J.J.; Rosenberg S.A.; Klein H.; Berger M.; Mullen C.A.; Ramsey W.J.; Muul L.; Morgan R.A.; Anderson W.F. (1995): T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trials results after 4 years. *Science* 270: 475-480

Bohl D. und Heard J.M. (1997): Modulation of erythropoietin delivery from engineered muscles in mice. *Hum. Gene Ther.* 20: 195-204

Brauner T., Schmid A, Hulser D.F.(1990): Tumor cell invasion and gap junctional communication. Normal and malignant cells confronted in monolayer cultures. *Invasion Metastasis* 10: 18-30

Bridgewater J.A., Springer C.J., Knox R.J., Minton N.P., Michael N.P., Collins M.K. (1995): Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur. J. Cancer* 31: 2362-70

Brogden, R.N.; Goa, K.L.; Faulds, D. (1993): *Drugs* 45: 384-409

Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*. 5: 376-378.

Burcin M.M., Schnieder G., Kochanek S., Tsai S.Y., O'Malley B.W. (1998): Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 355-360

Burcin M.M., Schnieder G., Kochanek S., Tsai, S.Y., O'Malley B.W. (1999): Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 355-360

## C

Carmichel J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchel J.B. (1987): Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bouso P., Deist F.L., Fischer A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-72

Chase M., Chung R.Y., Chiocca E.A. (1998): An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat. Biotechnol* 16: 7444-8

Chester K.A., Mayer A., Bhatia J., Robson L., Spencer D.I., Cooke S.P., Flynn A.A., Sharma S.K., Boxer G., Pedley, R.B., Begent R.H. (2000): Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: 8-12

Clark A.J., Iwobi M., Cui W., Chompton M., Harold G., Hobbs S., Kalamati T., Knox P., Neil C., Yull F., Gusteron, B. (1997): Selective cell ablation in transgenic mice expressing *E.coli* nitroreductase. *Gene Ther.* 4: 101-110

Clackson T. (1997): Controlling mammalian gene expression with small molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:210-8

Clackson T. (2000): Regulated gene expression systems. *Gene Ther.* 7: 120-5

Collier R.J. (1975): Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* 39: 54-85

Cook D.R., Maxwell I.H., Glode L.M., Maxwell F., Stevens J.O.; Purner M.B., Wagner F., Curiel D.T., Curiel T.J. (1994): Gene therapy for B cell lymphoma in a SCID mouse model using an immunoglobulin-regulated diphtheria toxin gene delivered by a novel adenovirus-polylysine conjugate. *Cancer Biother.* 9: 131-141

Cooper, M., Porter, J. , Young, K. & Beachy, P. (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to *Shh* signaling. *Science* 280: 1603-1607

Cress A. und Triezenberg S.J. (1991): Nucleotide and deduced amino acid sequences of the gene encoding virion protein 16 of herpes simplex virus type 2. *Gene* 103: 235-8

Culver K.W., Ram Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E.H., Blaese R.M. (1992): In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-2

## D

Dalrymple S., Parkisi J., Roche, P., Ziesmer S., Scheithauer B., Kelly P. (1994): Changes in proliferating cell nucleus antigen expression in glioblastoma multiforme cells along stereotactic biopsy trajectory. *Neurosurgery* 35: 1036-1044

Dang L.H., Bettegowda C., Huso D.L., Kinzler K.W., Vogelstein B. (2002): Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15155-15160

Danila D.C., Schally A.V., Nagy A., Alexander J.M. (1999): Selective induction of apoptosis by the cytotoxic analog AN-207 in cells expressing recombinant receptor for luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 669-73

Danks M.K., Morton C.L., Pawlik C.A., Potter P.M. (1998): Overexpression of a rabbit liver carboxylesterase sensitizes human tumor cells to CPT-11. *Cancer Res.* 58: 20-2

Danks M.K., Morton C.L., Krull E.J., Cheshire P.J., Richmond L.B., Naeve C.W., Pawlik C.A., Houghton P.J., Potter P.M. (1999): Comparison of activation of CPT-11 by rabbit and human carboxylesterase for use in enzyme/prodrug therapy. *Clin. Cancer Res.* 5: 917-924

DeMayo F.J. und Tsai S.Y. (2001): Targeted gene regulation and gene ablation. *Trends Endocrinol Metab*12: 348-53

Denizot F. und Lang R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277

Deuschle U. (1989): Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400-5404

Deuschle U., Meyer W.K., Thiesen H.J. (1995): Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* 15: 1907-14

Dunlop J., Lou Z., Zhang Y., McIlvain, H. (1999): Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter *Br. J. Pharmacol.* 128: 1485-1490

## E

Efrat S., Fusco DeMane D., Lemberg H., al Emran O., Wang X. (1995): Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3576-3580

Eliopoulos A., Gallagher N., Blake S., Dawson D., Young L. (1999): Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr Virus-encoded latent Membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274: 16085-16096

Erbs P., Regulier E., Kintz J., Leroy P., Poitevin Y., Exinger F., Jund R., Methali M. (2000): In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine desaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* 60: 3813-3822

Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A., Hennighausen, L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273, 1384-6

## F

Falnes, P. und Sandvig, K. (2000): Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 407-413

Fishman G.I., Kaplan M.L., Buttrick P.M. (1994): Tetracycline-regulated cardiac gene expression in vivo. *J. Clin. Invest.* 93: 1864-1868

Florent J.C., Dong X., Gaudel G., Mitaku S., Monneret C., Gesson J.P., Jacquesy J.C., Mondon M., Renoux B., Andrianomenjanahary S., Michel S., Koch M., Tillequin F., Gerken M., Czech J., Straub R., Bosslet K. (1998): Prodrugs of anthracyclines for use in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *J. Med.Chem.* 41: 3572-3581

Forman B.M. und Evans R.M. (1995): Nuclear hormone receptors activate direct, inverted, and everted repeats. *Ann. NY Acad. Sci.* 761: 29-37

Forster K., Helbl V., Lederer T., Urlinger S., Wittenburg N., Hillen W. (1999): Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 27: 708-10

Forsyth P.A. und Roa W.H. (1999): Primary Central Nervous System Tumors in Adults. *Curr. Treat Options Neurol.* 1: 377-394

Freeman S.M., Abboud C.N., Whartenby K.A., Packman C.H., Koeplin D.S., Moolten F.L., Abraham G.N. (1993): The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53: 5274-83.

Freundlieb S., Baron U., Bonin A.L., Gossen M., Bujard H. (1997): Use of tetracycline-controlled gene expression systems to study mammalian cell cycle. *Methods Enzymol.* 283: 159-73

Freundlieb S., Schirra-Müller C., Bujard H. (1999): A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1 :4-12

Friedlos F., Court S., Ford M., Denny W.A., Springer C.J. (1997): Gene-directed enzyme prodrug therapy: quantitative bystander cytotoxicity and DNA damage induced by CB 1954 in cells expressing bacterial nitroreductase. *Gene Ther.* 5: 105-112

Friedmann T. (2000) Medical ethics. Principles for human gene therapy studies. *Science* 287: 2163-5

## G

Gari E., Piedrafita L., Aldea M., Herrero E. (1997): A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 837-848

Gazziola C., Moras M., Ferraro P., Gallinaro L., Verin R., Rampazzo C., Reichard P., Bianchi V. (1999): Induction of human high K (M) 5'-nucleotidase in cultured 293 cells. *Exp. Cell Res.* 253, 474-482

Gill, M. und Pappenheimer, A. (1971): Structure and activity of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 246: 1492-1495

Gingrich J.R. und Roder J. (1998): Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 377-405

Girad F., Bello B., Laemmler U.K., Gehring W.J. (1998): In vivo analysis of scaffold-associated regions in *Drosophila*: a synthetic high affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation. *Embo J.* 17: 2079-2085

- Go W.Y. und Ho S.N. (2002): Optimization and direct comparison of the dimerizer and reverse tet transcriptional control systems. *J. Gene Med.* 4: 258-70
- Goldberg G.S. und Bertram J.S. (1994): Retinoids, gap junctional communication and suppression of epithelial tumors. *In Vivo* 8: 745-54
- Gossen M. und Bujard H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551
- Gossen M., Bonin A.L., Bujard H. (1993): Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.* 18: 471-5
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769
- Gomez-Navarro J., Curiel D.T., Douglas J.T. (2000): Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* 35: 867-885
- Großhans H. (2000): Gene therapy- when a simple concept meets a complex reality. *Funct. Integr. Genomics* 1: 142-145
- Greenfield L., Bjorn M.J., Horn G., Fong D., Buck G.A., Collier R.J., Kapla D.A. (1983): Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage  $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6853-6857
- Grunberg, S.M., Weiss, M.H., Spitz, I.M., Ahmadi, J., Sadun, A., Russel, C.A., Lucci, L., Stevenson, L.L. (1991): Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J. Neurosurg.* 74: 861-866
- Guo Z. und Vishwanatha J.K. (2000): Effect of regulated expression of the fragile histidine triad gene on cell cycle and proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 204: 83-8

**H**

Hanna N.N., Mauceri H.J., Wayne J.D., Hallahan D.E., Kufe D.W., Weichselbaum R.R. (1997): Virally directed cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy enhances radiation response in human cancer xenografts. *Cancer Res.* 57: 4205-9

Harding T.C., Geddes B.J., Murphy D., Knight D., Uney J.B. (1998): Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system. *Nat. Biotechnol.* 16:553-555

Heeg K., Reinmann J., Kabelitz D., Hardt C., Wagner H. (1985): A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J. Immunol. Methods* 77: 237-246

Ho S.N., Biggar S.R., Spencer D.M., Schreiber S.L., Crabtree G.R. (1996): Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature* 382: 822-6

Hoeben R.C., Migchielsen A.A., van der Jagt R.C., van Ormondt H., van der Eb A.J. (1991): Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol.* 65: 904-12

Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. (1968): DT dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 243: 3553-3555

Howe J.R., Skryabin B.V., Belcher S.M., Zerillo S.M., Schmauss C. (1995): The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J. Biol. Chem.* 270: 14168-14174

**I**

Imaizumi K., Morihara T., Mori Y., Katayama T, Tsuda M., Furuyama T., Wanaka A., Takeda M., Tohyama M. (1999): The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid protein *J. Biol. Chem.* 274: 7975-7981,

**J**

Johansen J., Rosenblad C., Andsberg K., Moller A., Lundberg C., Bjorlund A., Johansen T.E. (2002): Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene Ther.* 9:1291-301

Johns D., Marx R, Mains R., O'Rourke B., Marban, E. (1999): Inducible Genetic Suppression of Neuronal Excitability *J. Neurosci.* 19: 1691-1697

**K**

Kakar S. (1998): Inhibition of growth and proliferation of EcRG293 cell line expressing high-affinity gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor under the control of an inducible promoter by GnRH agonist (D-Lys6)GnRH and antagonist (Antide). *Cancer Res.* 58: 4558-4560

Kellendonk C., Tronche F., Casanova E., Anlag K., Opherk C., Schutz G. (1999): Inducible site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.* 285: 175-82

Keyvani K., Baur I, Paulus W. (1999): Tetracycline-controlled expression but not toxicity of an attenuated diphtheria toxin mutant. *Life Sci.* 64: 1719-24

Kitayama K., Abe M., Kakizaki T., Honma D., Natsume R., Fukaya M., Watanabe M., Miyazaki J., Mishina M., Sakimura K. (2001): Purkinje cell-specific and inducible gene recombination system generated from C57BL/6 mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 1134-40

Kokoris M.S., Sabo P., Black M.E. (2000): In vitro evaluation of mutant HSV-1 thymidine kinases for suicide gene therapy. *Anticancer Res.* 20: 959-963

Kolberg R. (1992): Gene therapists test puzzling "bystander effect." *J. Natl. Inst. Health Res.*, 4: 68-74

Kramm C.M., Sena-Esteves M., Barnett F.H., Rainov N.G., Schuback D.E., Yu J.S., Pechan P.A., Paulus W., Chiocca E.A., Breakefield X.O. (1995): Gene therapy for brain tumors. *Brain Pathol.* 1995 5: 345-81.

Krueger K.M. und Barbieri J.T. (1995): The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 37-47

## L

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lafont, R., Girault, J.P., Kerb, U. (1988): Excretion und metabolism of injected ecdysone in the white mouse. *Biochem. Pharmacol.* 37: 1174-1177

Lam P. und Breakefield X. (2001): Potential of gene therapy for brain tumors. *Human. Mol. Genetics* 10: 777-787

Li D. und Sun H. (1998): PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G<sub>1</sub> cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15406-15411

Leppla S., Dorland R.B., Middlebrook J.L. (1980): Inhibition of diphtheria toxin degradation and cytotoxic action by chloroquine. *J. Biol. Chem.* 255: 2247-50

Lee P., Morley G., Huang Q., Fischer A., Seiler S., Horner J., Factor S., Vaidya D., Jalife J., Fishman G. (1998): Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11371-11376

Lin P., Yao Y., Hofmeister R., Tsien R., Farquhar M. (1999) Overexpression of CALNOC (Nucleobindin) Increases Agonist and Thapsigargin Releasable Ca<sup>2+</sup> Storage in the Golgi. *J. Cell Biol.* 145, 279-289

Louis D.N., Pomeroy S.L., Cairncross J.G. (2002): Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 1: 125-128

## **M**

Magari S.R., Rivera V.M., Iuliucci J.D., Gilman M., Cerasoli F. Jr. (1997): Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2865-72

Mangelsdorf, D.J. und Evans, R.M. (1995): The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-850

Mansuy I.M., Bujard H. (2000): Tetracycline –regulated gene expression in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 593-596

Markert J.M., Gillespie G.Y., Weichselbaum R.R, Roizman B., Whitley R.J. (2000): Genetically engineered HSV in the treatment of glioma: a review. *Rev. Med. Virol.* 10: 17-30.

Martin V., Cortes M.L., DeFelipe P., Farsetti A., Calcaterra N.B., Izquierdo M. (2000): Cancer gene therapy by thyroid hormone-mediated expression of toxin genes. *Cancer Res.* 60: 3218-3224

Massuda E.S., Dunphy E.J., Redman R.A., Schreiber J.J., Nauta L.E., Barr F.G., Maxwell I.H., Cripe T.P. (1997): Regulated expression of the diphtheria toxin A chain by tumor-specific chimeric transcription factor results in selective toxicity for alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14701-14706

Maxwell I.H., Glode L.M., Maxwell F. (1992): Expression of diphtheria toxin A-chain in mature B-cells: a potential approach to therapy of B-lymphoid malignancy. *Leukemia and Lymphoma* 7: 457-462

Mayford M., Bach M.E., Huang Y.Y., Wang L., Hawkins R.D., Kandel E.R. (1996): Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274: 1678-1683

- McCormick F. (2001): Cancer gene therapy: Fringe or cutting edge? *Nature reviews* 1: 130-141
- McNeish I.A., Green N.K., Gilligan M.G., Ford M.J., Mautner V., Young L.S., Kerr D.J. (1998): Virus directed enzyme prodrug therapy for ovarian and pancreatic cancer using retrovirally delivered *E. coli* nitroreductase and CB 1954. *Gene Ther.* 5: 1061-1069
- Mesnil M., Piccoli C., Tiraby G., Willecke K., Yamasaki H. (1996): Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1831-5
- Mesnil M. und Yamasaki H. (2000): Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 60: 3989-3999
- Miller A.D. (1992): Human gene therapy comes of ages. *Nature* 357: 455-460
- Miller D.W. (1999): Immunobiology of the blood-brain barrier. *J. Neurovirol.* 5: 570-578
- Mills, A. (2001): Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes and development* 15: 1461-1467
- Minamino T., Gaussin V., DeMayo F.J., Schneider M.D. (2001): Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein. *Circ. Res.* 88: 587-92
- Moolten F.L. und Wells J.M. (1990): Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 297-300.
- Moolten F.L. (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 1986 46: 5276-81
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63

Mullen C.A., Kilstrup M., Blaese R.M. (1992): Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 33-37

Mullen C.A., Coale M.M., Lowe R., Blaese R.M. (1994): Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res.* 54: 1503-1506.

Mulligan R.C. (1994): The basic science of gene therapy. *Science* 260: 962-932

## N

Naglich J.G. und Eidel L. (1990): Isolation of diphtheria toxin- sensitive mouse cells from toxin-resistant population transfected with monkey DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7250-7254

Naglich J.G., Metherall, J.E., Russel D.W., Eidel L. (1992): Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69: 1051-1061

Nanda D., Vogels R., Havenga M., Avezaat C.J., Bout A., Smitt P.S. (2001): Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res.* 61: 8743-50

Naus C.C., Bechberger J.F., Caveney S., Wilson J.X. (1991): Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* 126: 33-6

Nenny W.A. und Wilson W.R. (1998): The design of selectively-activated anti-cancer prodrugs for use in antibody-directed and gene-directed enzyme prodrug therapies. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 387-394

Ngan E.S., Schillinger K., DeMayo F., Tsai S.Y. (2002): The mifepristone-inducible gene regulatory system in mouse models of disease and gene therapy. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13: 143-9

Niculescu-Duvaz I., Spooner R., Marais R., Springer C.J. (1998): Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconju. Chem.* 9: 4-22

Nitta T., Hishii M., Sato K., Okumura K. (1994): Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme. *Brain Res.* 649: 122-8

No, D. (1996): Ecdysone- inducible gene transcription in mammalian cells and transgenic mice (PhD Thesis) San Diego: University of California at San Diego

No, D., Yao, T.P., Evans, R.M. (1996): Ecdysone- inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3346-3351

## **O**

Oldfield E.H., Ram Z., Culver K.W., Blaese R.M., DeVroom H.L., Anderson W.F. (1993): Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.* 4: 39-69

## **P**

Pai J., Guryev O., Brown M., Goldstein J. (1998): Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins *J. Biol. Chem.* 273: 26138-26148

Pang S. (2000): Targeting and eradicating cancer cells by a prostate-specific vector carrying the diphtheria toxin A gene. *Cancer gene therapy* 7: 991-996

Pappenheimer A.M. (1977): Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 69-94

Parker J.N., Gillespie G.Y., Love C.E., Randall S., Whitley R. (1999): Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2008-2213

Pastorino J., Chen S.T., Tafani M., Snyder J., Farber J. (1998): The Overexpression of Bax Produces Cell Death upon Induction of the Mitochondrial Permeability Transition. *J. Biol. Chem* 273: 7770-7775

Paulus W., Baur I., Beutler A.S., Reeves S.A. (1996): Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab. Invest.* 75:819-26

Paulus W., Baur I., Oberer D.M., Breakefield X.O., Reeves S.A. (1997): Regulated expression of the diphtheria toxin A gene in human glioma cells using prokaryotic transcriptional control elements. *J. Neurosurg.* 87: 89-95

Paulus W., Baur I., Keyvani K., Senner V. (2000): Variability of transcriptional regulation after gene transfer with the retroviral tetracycline system. *J. Biotechnol.* 81:159-65

Pedly R.B., Sharma S.K., Boxer G.M., Bode R., Stribbling S.M., Davies L., Springer C.J., Begent H.J. (1999): Enhancement of antibody-directed enzyme prodrug therapy in colorectal xenografts by an antivascular agent. *Cancer Res.* 59: 3998-4003

Peiffer J., Schröder J.M., Paulus W. (2002): *Neuropathologie*, Springer Verlag, 3. Auflage

Pierson T.M., Wang Y., DeMayo F.J., Matzuk M.M., Tsai S.Y., Omalley B.W. (2000): Regulable expression of inhibin A in wild-type and inhibin alpha null mice. *Mol. Endocrinol.* 14: 1075-85

Pitts J. D.; Finbow M. E.; Kam E. (1988): Junctional communication and cellular differentiation. *Br. J. Cancer* 58: 52-57

Ptashne M und Gann A.A. (1990): Activators and targets. *Nature* 346: 329-31

## Q

## R

Rader C. und List B. (2000): Catalytic antibodies as magic bullets. *Chem-Eur. J.* 6: 2091-2095

Ram Z., Culver K.W., Oshiro E.M., Viola J.J., DeVroom H.L., Otto E., Long Z., Chiang Y., McGarrity G.J., Muul L.M., Katz D., Blaese R.M., Oldfield E.H. (1997): Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med.* 3: 1354-1361

Ramplung R., Cruickshank G., Papanastassiou V., Nicoll J., Hadley D., Brennan D., Petty R., MacLean A., Harland J., McKie E., Mabbs R., Brown M. (2000): Toxicity evaluation

of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7: 859-866

Rainov N.G. (2000): A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum. Gene Ther.* 11: 2389-401

Reifenberger G., Weber T., Weber R.G., Wolter M., Brandis A., Kuchelmeister K., Pilz P., Reusche E., Lichter P., Wiestler O.D. (1999): Chordoid glioma of the third ventricle: immunohistochemical and molecular genetic characterization of a novel tumor entity. *Brain Pathol.* 9: 617-26

Rivera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cerasoli F., Holt D.A., Gilman M. (1996): A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Med.* 2: 1028-1032

Rivera V.M., Ye X., Courage L., Sachar J., Cerasoli F., Wilson J., Gilman M. (1999): Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8657-8662

Robbins P.B., Yu X.J., Skelton D.M., Pepper K.A., Wasserman R.M., Zhu L., Kohn D.B. (1997): Increased probability of expression from modified retroviral vectors in embryonal stem cells and embryonal carcinoma cells. *J. Virol.* 71: 9466-74

Rodriguez R., Lim H.Y., Bartkowski L.M., Simons J.W. (1998): Identification of diphtheria toxin via screening as a potent cell cycle and p53-independent cytotoxin for human prostate cancer therapeutics. *Prostate* 43: 259-269

Rossi, F. und Blau, H. (1998): Recent advances in inducible gene expression systems. *Current opinion in biotechnology* 9: 451-456

Roth W., Bähr M., Weller M. (1999): Todesliganden/Todesrezeptoren als Angriffspunkt der somatischen Gentherapie maligner Gliome. *Neuroforum* 3: 87-92

## S

Sadowski I., Ma J., Triezenberg S., Ptashne M. (1988): Gal 4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335: 563-564

Saez, E., No, D., West, A., Evans, R. (1997): Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Current opinion in biotechnology* 8: 608-616

Sawicki J.A., Monks B., Morris R.J. (1998): Cell-specific ecdysone-inducible expression of FLP recombinase in mammalian cells. *Biotechniques* 25: 868-70

Scharf J., Boviatsis E., Fleet C., Breakefield X., Chiocca E. (1994): Genetically modified rat 9L gliosarcoma cells facilitate detection of infiltrating tumor cells in a rat model of brain neoplasms. *Transgenics* 1: 219-224

Schmitz M.L. und Baeuerle P.A. (1991): The p65 subunit is responsible for strong transcription activating potential of the NF-kappa B. *EMBO J.* 10: 3805-3817

Senner V., Sotoodeh A., Paulus W. (2001): Regulated gene expression in glioma cells: a comparison of three inducible systems. *Neurochem. Res.* 5: 521-524

Serguera, C., Bohl, D., Rolland, E., Prevost, P., Heard, J.M. (1999): Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum. Gene Ther.* 10: 375-383

Slater T.F., Sawyer B., Strauli U. (1963): Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biohys. Acta* 77: 383-393

Simm M. (2000): Weltweit größte Studie zur Gentherapie abgebrochen- kein Vorteil für Patienten mit Glioblastom. *Dt. Ärztezeitung online*  
(<http://www.aerztezeitung.de/docs/2000/01/12/003a0203.asp>)

Sorcher, E. J. (1994). Tumor cell bystander killing in colonic carcinoma utilizing the *Escherichia coli* *DeoD* gene to generate toxic purines. *Gene Ther.* 4: 233-238

Springer C.J. und Niculescu-Duvaz I. (2000): Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J. Clin. Investig.* 105: 1161-1167

Stebbins M.J., Urlinger S., Byrne G., Bello B., Hillen W., Yin J.C.P. (2001): Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10775-10780

Stewart Z., Mays D., Pietenpol J. (1999): Defective G<sub>1</sub>-S Cell Cycle Checkpoint Function Sensitizes Cells to Microtubule Inhibitor-induced Apoptosis. *Cancer Res.* 59: 3831-3837

Stolarov J., Chang K., Reiner A., Rodgers L., Hannon G.J., Wigler M.H., Mittal V. (2001): Design of a retroviral-mediated ecdysone-inducible system and its application to the expression profiling of the PTEN tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13043-8

Syken J., De-Medina T., Münger K. (1999): "*TIDI*", a human homolog of the *Drosophila* tumor suppressor *l(2)tid*, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 8499-8504

Syrigos K.N. und Epenetos A.A. (1999): Antibody directed enzyme prodrug therapy(ADEPT): a review of the experiemental and clinical considerations. *Anticancer Res.* 19: 605-613

## T

Tiffany-Castiglioni E., Neck K.F., Caceci T.(1986): Glial culture on artificial capillaries: electron microscopic comparisons of C6 rat glioma cells and rat astroglia. *J. Neurosci. Res.* 16: 387-96

Topham, M., Bunting, M., Zimmerman G., McIntyre T., Blackshear P., Prescott S. (1998) Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase. *Nature* 394: 697-700

Trask T.W., Trask R.P., Aguilar-Cordova E., Shine H.D., Wyde P.R., Goodman J.C., Hamilton W.J., Rojas-Martinez A., Chen S.H., Woo S.L., Grossman R.G. (2000): Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol. Ther.* 1: 195-203.

Treacy E., Childs B., Scriver C.R. (1995): Response to treatment in hereditary metabolic disease: 1993 survey and 10-year comparison. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 359-67

Triezenberg S., Kingsbury R., McKnight S. (1988 a): Functional dissection of VP 16, the transactivator of Herpes simplex immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2: 730-742

Triezenberg S., LaMarco K.L., McKnight S. (1988 b): Evidence of DNA:protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Gene Dev.* 2: 730-742

Trinh Q.T., Austin E.A., Murray D.M., Knick V.C., Huber B.E. (1995): Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 55: 4808-12

Tsai S.Y., Schillinger K., Ye X. (2000): Adenovirus-mediated transfer of regulable gene expression. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2: 515-23

Twentyman P.R. und Luscombe M. (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 56: 279-285

## U

Umesono K. und Evans R.M. (1989): Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57: 1139-1146

Urlinger S., Helbl V., Guthmann J., Pook E., Grimm S., Hillen W. (1999): The p65 domain from NF- $\kappa$ B is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* 247: 103-110

Urlinger S., Baron U., Thellmann M., Hasan M.T., Bujard H., Hillen W. (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 7963-8.

## V

Vallera D., Jin N., Baldrice J., Panoskaltsis-Mortari A., Chen S.Y., Balzar B. (2000): Retroviral immunotoxin gene therapy of acute myelogenous leukemia in mice using cytotoxic T cells transduced with an interleukin 4/ diphtheria toxin gene. *Cancer Res.* 60: 976-984

Vallera D.A., Li C., Jin N., Panoskaltsis-Mortari A., Hall W. (2002): Targeting urokinase-type plasminogen activator receptor on human glioblastoma tumors with diphtheria toxin fusion protein DTAT. *J. Nat. Cancer Institute* 94: 597- 606

Verma I. und Somia N. (1997): Gene therapy- promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242

Vincent A.J., Esandi M.D., van Someren G., Noteboom J.L., Avezaat C.J., Vecht C., Smitt P.A., van Bekkum D.W., Valerio D., Hoogerbrugge P.M., Bout A. (1996): Treatment of leptomeningeal metastases in a rat model using a recombinant adenovirus containing the HSV-tk gene. *J. Neurosurg.* 85: 648-54

## W

Wang, Y., O'Malley B. W. Jr., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. (1994). A regulatory system for Use in Gene Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8180-8184.

Wang Y., DeMayo F.J., Tsai S.Y., O'Malley B.W. (1997a): Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Natl. Biotechnol.* 15: 239-243

Wang Y., Xu J., Pierson T., O'Malley B.W., Tsai S.Y. (1997b): Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther.* 4: 432-441

Waxman D.J., Chen I., Hecht J.E., Jounaidi Y. (1999): Cytochrome p450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab. Rev.* 31: 503-522

Weimann P., Gossen M., Hillen W., Bujard H., Gatz C. (1994): A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J.* 5: 559-569

Weller M. (2000): Chemotherapie maligner Gliome. *Nervenheilkunde* 3: 29-35

Wolfe L.A., Mullin R.J., Laethem R., Blumenkopf T.A., Cory M., Miller J.F., Keith B.R., Humphreys J., Smith G.K. (1999): Antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1: in vitro and in vivo studies with prodrugs of methotrexate and the thymidylate synthase inhibitors GW 1831 and GW 1843. *Bioconjug. Chem.* 10: 38-48

Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., Decruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids. Res.* 17: 3469-3478.

Wildner, O. (1999): In situ use of suicide genes for therapy of brain tumours. *Ann Med.* 1999 31: 421-9

## X

Xu G. und McLeod H.L. (2001): Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 7: 3314-3324

## Y

Yamaizumi M., Mekada E., Uchida T., Okada Y. (1978): One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15: 245-50

Yamasaki H. und Katoh F. (1988): Novel method for selective killing of transformed rodent cells through intercellular communication, with possible therapeutic applications. *Cancer Res.* 48: 3203-3207

Yao T.P., Segraves W.Z., Oro A.E., McKeown M., Cherbas P., Evans, R.m. (1992): *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71: 63-72

Yao T.P., Forman B.M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.-D., McKeown M., Cherbas P., Evans, R.m. (1993): Functional ecdysonse receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature* 366: 476-479

Ye X., Rivera V.M., Zoltick P., Cerasoli F., Jr., Schnell M.A., Gao G., Hughes J.V., Gilman M., Wilson J.M. (1999): Regulated Delivery of Therapeutic Proteins After in Vivo Somatic Cell Gene Transfer. *Science* 283: 88-91

Yin D.X. und Schimke R.T. (1996): Tetracycline-controlled gene expression system achives high-level and quantitative control of gene expression. *Anal. Biochem.* 235: 195-201

## Z

Zentilin L., Qin G., Tafuro S., Dinauer M.C., Baum C., Giacca M. (2000): Variegation of retroviral vector gene expression in myeloid cells. *Gene Ther.* 7: 153-166

Zhang J., Kang D., Xia W., Okochi M., Mori H., Selkoe D., Koo E. (1998): Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells *J. Biol. Chem.* 273, 12436-12442

Zhang W., Couldwell W., Simard M., Song H., Lin J., Nedergaard M. (1999): Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res.* 59: 1994-2003

Zhao B., Chua S.S., Burcin M.M., Reynolds S.D., Stripp B.R., Edwards R.A., Finegold M.J., Tsai S.Y., DeMayo F.J. (2001): Phenotypic consequences of lung-specific inducible expression of FGF-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5898-903

Zheng T., Zhu Z., Wang Z., Homer R., Ma B., Riese R., Chapman C., Shapiro S., Elias J. (2000): Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J. Clin. Invest.* 106: 1081-1093

Zhu D., Caveney S., Kidder G.M., Naus C.C. (1991): Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1883-1887

Zhu Z., Ma B., Homer R.J., Zheng T., Elias J.A. (2001): Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 276: 25222-9

## 7. Lebenslauf

**Name:** Sylvia Christa Püttmann-Cyrus, geb. Püttmann

**geb.:** 19.02.1973 in Marl

**Familienstand:** verheiratet mit Ralf Cyrus

**Name des Vaters:** Helmut Püttmann

**Name der Mutter:** Anita Püttmann, geb. Kösters

**Schulbildung:** Grundschule: Marl-Sickingmühle 1979-1983, Marl

Gymnasium: Gymnasium im Loekamp 1983-1992, Marl

**Hochschulreife (Abitur):** 05.06.1992, Marl

### Studium:

SS1993: Pharmazie, WWU Münster

WS 1993-WS 1999: Diplom Biologie, WWU Münster

SS 1995: Medizin, WWU Münster

**Promotionsstudiengang:** Biologie, WWU Münster

### Prüfungen:

Vordiplom: 15.01.1996, Gesamtnote: sehr gut, WWU Münster

Diplom (Hauptfach: Mikrobiologie) 25.01.1999, Gesamtnote: sehr gut, WWU Münster

### Tätigkeiten:

01.10.1998-01.01.1999: studentische Hilfskraft, Prof. Dr. A. Barnekow,

Institut für Tumorbilogie; Münster

01.04.1999- : wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Neuropathologie,

Prof. Dr. W. Paulus, Universitätsklinikum Münster

**Beginn der Disseration:** 01.03.2000 im Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum

Münster unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Paulus und

Mitbetreuerin Prof. Dr. A. Barnekow, Institut für Experimentelle

Tumorbilogie, Münster

.....  
Unterschrift

## 8. Publikationsliste

### Originalarbeiten

Püttmann S., Hillmann B., Senner V., Barnekow A., Paulus W.: Regulated toxin gene expression in glioma cells: a comparison of several inducible systems. In Vorbereitung

Püttmann S., Hillmann B., Senner V., Barnekow A., Paulus W.: Effective inducible expression of diphtheria toxin A using the GeneSwitch™-System. In Vorbereitung

Thanos S., Püttmann S., Rose K., Langkamp-Flock M., Paulus W.: Deregulation of Pax-2 expression along the neuroaxis of the chick embryo generates anomalous patterns of axonal decussation at the optic chiasm. Eingereicht bei Neuron

Schüller P., Püttmann S., Mücke R., Senner V., Schäfer U., Kisters K., Micke O. (2001): From the radiolysis of water to the role of trace elements in radiobiology and clinical radiation therapy: following a logical chain. Trace elements and electrolytes 18: 186-192

Senner V., Kismann E., Püttmann S., Hoess N., Baur I., Paulus W. (2002): L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. Glia 38: 146-154

Senner V., Schmidpeter S., Braune S., Püttmann S., Bartsch U., Schachner M., Paulus W. (2002): Does loss of AMOG make malignant glioma cells run amok? (submitted for publication)

### Tagungsbeiträge

Püttmann, S.: Effective inducible expression of diphtheria toxin A using the GeneSwitch™-System. (Vortrag) International Society for Cancer Gene Therapy 2002 London Conference, England (2002)

Poster und Abstracts

Püttmann S., Hillmann B., Tatenhorst L., Barnekow A., Senner V., Paulus W. (2002): Effective inducible expression of diphtheria toxin A using the GeneSwitch™-System. (Poster) International Society for Cancer Gene Therapy 2002 London Conference, England (2002)

Püttmann S., Schüller P., Mücke R., Schäfer U., Senner V., Willich N., Paulus W., Mücke O. (2001): Toxicity measurements of Se, Zn, Fe, Mg, Cu, and Mn compounds in cultured human glioma cells (U373). Third meeting of the German working group trace elements and electrolytes in radiation oncology (Akte 1/2001), Münster/Weiden (2001)

Senner V., Kismann E., Püttmann S., Hoess N., Baur I., Paulus W. (2002): L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Acta Neuropathol (Berl)* 102:541 (2001) Abstract

Senner V., Schmidpeter S., Braune S., Püttmann S., Bartsch U., Schachner M., Paulus W. (2002):  $\beta 2$  subunit of Na K-ATP-ase (AMOG) is downregulated in gliomas and inhibits migration (Posterabstract auf der DGNN Jahrestagung 2002 Aachen, wird in *Acta Neuropathologica* erscheinen)

Thanos S. und Püttmann S.: Mechanisms of axonal guidance in the optic chiasm of the chick embryo. (Poster/Abstract) 4<sup>th</sup> meeting of the German Neuroscience Society 2001, 28<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Germany (2001)

## 9. Danksagung

...mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Werner Paulus, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfsbereitschaft. Ich danke ihm darüber hinaus für seine Großzügigkeit und seinen Einsatz, der es mir ermöglichte, auch andere wissenschaftliche Themen kennenzulernen und Kontakte zu anderen Arbeitskreisen zu knüpfen. Das sehr gute Arbeitsklima unseres Arbeitskreises machte zudem das Arbeiten sehr angenehm.

...herzlichen Dank Frau Prof. Dr. Angelika Barnekow, die sich bereit erklärte diese Arbeit im Fachbereich Biologie zu betreuen. Ich danke für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft und dass sie immer Zeit für mich hatte.

...ein großes Dankeschön geht an meine Freundin, Kollegin und Zimmergenossin Beate Hillmann, nicht nur für ihre engagierte Mitarbeit, sondern auch für das tolle Klima, unsere kurzzeitigen Fitnessattacken ☺ und ihre liebevolle Mit-Betreuung der Mäuschen.

...herzlichen Dank an Frau Dr. Ina Bettinger für das Korrekturlesen dieser Arbeit im „fernen“ Lübeck und die vielen Tipps sowohl im Labor als auch am PC.

...vielen Dank auch an Dr. Volker Senner, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

... herzlichen Dank allen anderen Kollegen des Instituts für Neuropathologie für die schöne Zeit und das nette Arbeitsklima

...ich möchte mich auch bei meinen Freunden (Michael Bayer, Dr. David Kimaun, Karin Rose, Karsten Rose, Stefanie Jeske, Silke Stoll) bedanken für ihre Ratschläge, gegenseitige Aufmunterung und Diskussionsfreudigkeit und vieles mehr.

...herzliches Dankeschön meinem Mann Ralf und meiner Familie für die Unterstützung, Hilfe und und und... ☺