

Biochemie

**Entwicklung von zellspezifischen und regulierbaren Expressionssystemen  
zur Anwendung in der Gentherapie**

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

vorgelegt von  
*Nadja Schikorra*  
aus Castrop-Rauxel

-2004-

Dekan: Prof. Dr. J. Leker  
Erster Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Klempnauer  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Liese

Termin der mündlichen Prüfung: 26.03.2004

Tag der Promotion: 26.03.2004

*Meiner Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen und Definitionen .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Somatische Gentherapie .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellspezifität der Genexpression.....</b>	<b>13</b>
3.2.1	Das hämatopoietische System .....	13
3.2.2	Die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren .....	15
3.2.3	Das <i>mim-1</i> Gen.....	15
<b>3.3</b>	<b>Regulierbarkeit der Genexpression .....</b>	<b>16</b>
3.3.1	Das Tet-Off System .....	16
3.3.2	Autoregulation.....	17
<b>3.4</b>	<b>Translationsinitiation.....</b>	<b>18</b>
3.4.1	Cap-abhängige Translation bei Eukaryonten .....	18
3.4.2	Cap-unabhängige Translation durch interne Initiation .....	20
3.4.3	Cap-unabhängige Translation durch Reinitiation.....	21
<b>3.5</b>	<b>Retrovirale Vektoren .....</b>	<b>22</b>
3.5.1	Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren .....	22
3.5.2	Retroviraler Gentransfer .....	23
3.5.3	Konstruktion retroviraler Vektoren für die zellspezifische Genexpression .....	24
<b>4</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>27</b>
5.1.1	Chemikalien .....	27
5.1.2	Enzyme .....	28
5.1.3	Kits.....	28
5.1.4	Antikörper .....	28
5.1.5	Zellkulturbedarf .....	29
5.1.6	Zubehör .....	29
5.1.7	Geräte .....	29
5.1.8	Standardpuffer .....	30

5.1.9	Bakterienstamm .....	31
5.1.10	Primer.....	31
5.1.11	Plasmide.....	32
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>37</b>
5.2.1	Transformation von <i>E.coli</i> .....	37
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen .....	38
5.2.3	Enzymatische Modifikation, Klonierung, Amplifikation und Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	40
5.2.4	Präparation von [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP markierten Sonden.....	45
5.2.5	Southern-Blot [72].....	45
5.2.6	Northern-Blot .....	48
<b>5.3</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>51</b>
5.3.1	Zelllinien.....	51
5.3.2	Medien .....	51
5.3.3	Zellpassage .....	51
5.3.4	Lagerung von Zellen .....	52
5.3.5	Zellzahlbestimmung .....	52
5.3.6	Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation [74] .....	52
5.3.7	Transfektion durch Elektroporation [76].....	53
5.3.8	Transiente Transfektion .....	54
5.3.9	Stabile Transfektion .....	54
5.3.10	Zellernte der adhärennten Zellen.....	54
5.3.11	Zellernte der Suspensionszellen.....	55
<b>5.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>55</b>
5.4.1	Reportergenassays.....	55
5.4.2	Western-Blot .....	57
<b>5.5</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Rekombinante <i>mim-1</i> Promotoren für die Genexpression in myelomonozytären Zellen .....</b>	<b>60</b>
6.1.1	Konstruktion der rekombinanten <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte.....	60
6.1.2	Untersuchung der Zellspezifität der <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte.....	62
<b>6.2</b>	<b>Regulierbarkeit der Promotoren durch die Faktoren C/EBP<math>\beta</math>/ER und tTA .....</b>	<b>65</b>
6.2.1	Untersuchung der Regulierbarkeit der rekombinanten <i>mim-1</i> Promotoren durch den Faktor C/EBP $\beta$ /ER .....	65

6.2.2	Untersuchung der Regulierbarkeit der <i>mim-1</i> Promotoren durch den Faktor tTA .....	68
<b>6.3</b>	<b>Monocistronische <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte für die autoregulative Expression des Faktors C/EBP<math>\beta</math>/ER.....</b>	<b>70</b>
6.3.1	Konstruktion der monocistronischen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme.....	70
6.3.2	Untersuchung der autoregulativen Expression der Faktoren C/EBP $\beta$ und C/EBP $\beta$ /ER durch monocistronische <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte .....	72
<b>6.4</b>	<b>Konstruktion der bicistronischen Expressionssysteme .....</b>	<b>74</b>
<b>6.5</b>	<b>Zeitlicher Verlauf der Reporterexpression der bicistronischen Expressionssysteme in transienten Transfektionen .....</b>	<b>75</b>
6.5.1	Untersuchung der Regulator- und Reporterexpression eines bicistronischen Vektors in Abhängigkeit von der Zeit .....	76
<b>6.6</b>	<b>Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration .....</b>	<b>77</b>
6.6.1	Untersuchung der Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration.....	78
<b>6.7</b>	<b>Bicistronische C/EBP<math>\beta</math>/ER-Expressionssysteme.....</b>	<b>79</b>
6.7.1	Expressionsstudien der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Nicht-Zielzellen.....	79
6.7.2	Expressionsstudien der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Zielzellen .....	82
6.7.3	Vergleich der Expression der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen.....	85
<b>6.8</b>	<b>Die bicistronischen tTA-Expressionssysteme .....</b>	<b>87</b>
6.8.1	Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in Nicht-Zielzellen .....	87
6.8.2	Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in Zielzellen .....	90
6.8.3	Vergleich der Expression der tTA-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen.....	92
<b>6.9</b>	<b>Die bicistronischen <math>\Delta</math>C/EBP<math>\beta</math>/ER-Expressionssysteme .....</b>	<b>93</b>
6.9.1	Untersuchung der Inhibierung des <i>mim-1</i> Promotors durch den Faktor C/EBP $\beta\Delta$ 110 .....	94
6.9.2	Konstruktion der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme.....	96
6.9.3	Expressionsstudien der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Nicht-Zielzellen.....	97
6.9.4	Expressionsstudien der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Zielzellen .....	98
6.9.5	Vergleich der Expression der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen .....	99

<b>6.10 Vergleich der Expressionssysteme nach stabiler Integration in Ziel- und Nicht-Zielzellen.....</b>	<b>101</b>
<b>6.11 EGFP-Expression der tTA-GFP-Konstrukte nach transienter Transfektion in QT6<sub>2-1</sub> Zellen .....</b>	<b>104</b>
6.11.1 Transiente Transfektion der tTA-eGFP-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	104
6.11.2 Stabile Transfektion der tTA-eGFP Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	106
<b>7 Diskussion.....</b>	<b>108</b>
<b>7.1 Strategien bei der Konstruktion der Expressionssysteme .....</b>	<b>109</b>
7.1.1 Der <i>mim-1</i> Promotor integriert in die U3 Region der SFFV LTR als „Double Copy“ Vektor .....	109
7.1.2 SFFV- oder M1 Enhancer.....	109
7.1.3 Ligandenabhängige Regulatorproteine tTA oder C/EBP $\beta$ /ER .....	110
7.1.4 Autoregulative Expression von tTA und C/EBP $\beta$ /ER.....	110
7.1.5 Bicistronische Anordnung von Regulator- und reguliertem Gen über Polio Virus IRES oder Intercistron .....	111
7.1.6 Luciferase oder eGFP als Reporter gen .....	112
<b>7.2 Funktionalität der konstruierten Expressionssysteme .....</b>	<b>112</b>
7.2.1 Die Expression durch die rekombinanten <i>mim-1</i> Promotoren erfolgt zellspezifisch.....	112
7.2.2 Problematik der Zellspezifität.....	114
7.2.3 Das Prinzip der Autoregulation funktioniert .....	115
7.2.4 Die Induktion des <i>mim</i> (TRE)-1 Promotors durch C/EBP $\beta$ /ER und tTA ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Liganden .....	115
7.2.5 Verminderung der Toxizität des Transaktivators tTA durch Autoregulation.....	116
7.2.6 Autoregulierbarkeit führt zu Hochregulation der Expression auch in Nicht-Zielzellen .....	117
7.2.7 Induktion der C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme durch endogene Faktoren führt zum Verlust der Regulierbarkeit.....	118
7.2.8 Durch autoregulative Expression des Repressors C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110/ER limitiert sich das Expressionssystem selbst.....	118
7.2.9 Niedrige Expression des 3' Cistrons durch Reinitiation und interne Initiation .....	119
7.2.10 Erhöhung der Zellspezifität und Verminderung der Regulierbarkeit nach stabiler Integration in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen .....	122

---

7.2.11	Bicistronische eGFP Expressionssysteme für die schnelle Selektion stabiler Zellen .....	123
7.2.12	Mögliche Anwendungen der entwickelten Expressionssysteme im Rahmen einer Gentherapie.....	124
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>



## 1 Abkürzungen und Definitionen

$\alpha$	anti- (Antikörper gegen)
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADA	Adenosin Deaminase
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrom</i>
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenositriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
ca.	Circa
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CGD	<i>Chronic Granulomatous Disease</i>
CMV	<i>Cyto Megalo Virus</i>
CTP	Cytosintriphosphat
$\Delta$	Deletion
Dox	Doxycyclin
DMEM	Dulbelcos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
eGFP	enhanced green fluorescene protein
env	<i>Envelope Gene</i>
Es	$\beta$ -Estradiol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
FKS	fötales Kälberserum
FLP	Flip Rekombinase
FRT	<i>FLP Recognition Target</i>
G418	Aminoglycoside-2'-deoxystreptine
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Hühnerserum
IMDM	Iscoves modified Eagle Medium
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalctopyranosid
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
l	Liter
M	mol/l
min	Minuten
mRNA	messenger-RNA
MLV	<i>Molony Murine Leukemia Virus</i>
MOPS	Morpholinsulfonsäure
OD $\lambda$	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda$
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
$\Psi$	retrovirales Verpackungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PV	<i>Polio Virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rel.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SIN	<i>Self Inactivating</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TK	Thymidine Kinase
TPB	Trypton-Phosphate Broth
TRE	<i>Tet Response Element</i>

Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Units
U3	unique 3'RNA Sequenz
U5	unique 5'RNA Sequenz
ÜN	über Nacht
VE	Volumeneinheit
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumenprozent, bezogen auf Gesamtvolumen
(w/v)	Massenprozent, bezogen auf Gesamtmasse
WT	Wildtyp
Tab.	Tabelle
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
wt	wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

## 2 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung von Expressionssystemen für eine auf myelomonozytäre Zellen des hämatopoietischen Systems begrenzte und Liganden regulierbare Genexpression. Nach Integration in einen retroviralen Vektor könnte ein solches System Anwendung im Bereich der Gentherapie myelomonozytärer Zellen finden.

Durch Expressionssysteme, die beide Bedingungen –Zellspezifität und Regulierbarkeit– in sich vereinen, könnte ein signifikanter Beitrag zur Aufklärung von Genregulationsmechanismen, als auch zur Erhöhung der Sicherheit des Gentransfers im Rahmen einer Gentherapie geleistet werden.

Im Hinblick auf die spätere Integration der konstruierten Expressionssysteme in einen retroviralen Vektor, wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Promotor des ausschließlich in myelomonozytären Zellen exprimierten *mim-1* Gens in die 5'LTR des SFF („*Spleen Focus Forming*“) Virus integriert. Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor auch nach Integration in die LTR zellspezifisch bleibt, und die Zellspezifität durch flankierende Enhancersequenzen des SFF Virus bzw. des *mim-1* Gens zusätzlich gesteigert werden kann (Faktor 3).

Im Anschluss wurden eine Reihe von bicistronischen Expressionssystemen konstruiert, in denen der rekombinante *mim-1*/SFFV Promotor, die simultane Expression eines Regulatorproteins im ersten Cistron und eines Reportergens im zweiten Cistron kontrolliert. Um eine Transkriptionskontrolle beider Gene vom selben Promotor zu ermöglichen, wurden die kodierenden Regionen entweder über eine kurze intercistronische Sequenz oder eine *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) aus dem Polio Virus miteinander verbunden. Das Regulatorprotein übernimmt dabei die Funktion eines Liganden-regulierbaren Schalters, das den Promotor nach initialer zellspezifischer Induktion in Abhängigkeit des jeweiligen Liganden regulieren soll. Hierzu wurde eine mit der Hormonbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors und somit  $\beta$ -Estradiol induzierbare Variante des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$ , oder der Doxycylin regulierbare Transaktivator tTA („Tet-Off“) eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Transaktivatoren C/EBP $\beta$ /ER und tTA die Aktivität des *mim-1*/SFFV- bzw. des *mim-1*TRE/SFFV-Promotors (TRE: DNA Bindungsmotiv des Faktors tTA) durch Autoregulation Liganden-abhängig regulieren können. Untersuchungen in Ziel- und Nichtzielzellen offenbarten jedoch mehrere Defizite der konstruierten Expressionssysteme. So führt die autoregulative Expression der Transaktivatoren auch in Nicht-Zielzellen zur einer Aktivierung des Promotors und so zur Verringerung der Zellspezifität. Bei den C/EBP $\beta$ /ER Systemen zeigte sich zudem, dass die Aktivität des in den Zielzellen bereits induzierten Promotors durch Rückkopplung von C/EBP $\beta$ /ER (+ $\beta$ -Estradiol) nicht mehr gesteigert werden kann, wodurch ein Verlust der Regulierbarkeit resultiert. Aus diesem Grunde wurden alternative

C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme entwickelt in denen die Regulation der Expression des *mim-1* Promotors durch den  $\beta$ -Estradiol induzierbaren Repressor C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER erfolgt. Nachteil dieser Systeme ist jedoch, dass die Regulationskapazität durch die autoregulative Expression des Repressors stark imitiert wird.

Als weiteres generelles Problem aller Konstrukte erwies sich die niedrige Expression des 3'Cistrons. Sowohl die Cap-unabhängige Translation durch Reininitiation an dem Intercistron, als auch die interne Initiation an der Polio IRES sind wesentlich ineffizienter als die Cap-abhängige Translation des ersten Cistrons. Aus diesem Grund kann die Aktivität des Promotors nur zu einem Bruchteil auf die Expression des 3'Cistrons übertragen werden, wodurch eine zusätzliche Verringerung der Zellspezifität und Regulierbarkeit resultiert.

Aufgrund der nachgewiesenen Korrelation zwischen der Expressionsstärke des Transaktivator- und Reportergens, konnten nach stabiler Transfektion bicistronischer tTA-eGFP („*enhanced Green Fluorescence Protein*“) Expressionssysteme, Zellklone mit guter Regulierbarkeit des Transaktivators tTA einfach und schnell anhand des fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren eGFP Proteins detektiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es in dieser Arbeit gelungen ist Expressionssysteme zu entwickeln, die die geforderten Kriterien der Zellspezifität und Regulierbarkeit in sich vereinen. Zwar ist für eine Anwendung im Rahmen einer Gentherapie eine weitere Optimierung der Systeme notwendig, das tTA-eGFP Expressionssystem kann jedoch den Prozess der Regulation tTA-abhängiger Gene wesentlich vereinfachen.

### 3 Einleitung

Bei der Untersuchung von Genregulationsmechanismen sowie für Anwendungen in der Gentherapie, ist die regulierbare und auf Zielzellen begrenzte Genexpression von großer Bedeutung. Geeignete Vektoren sollten sich neben den Grundeigenschaften der Zellspezifität und Regulierbarkeit durch einen effektiven Transfer des zu exprimierenden Transgens in die Empfängerzelle auszeichnen. Besonders geeignet hierzu sind retrovirale Vektoren, da sie in der Lage sind eine Vielzahl von Zellen stabil zu transduzieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Konstruktion von Vektoren für die regulierbare und auf myelomonozytäre Zellen des hämatopoietischen Systems begrenzte Genexpression. An dieser Stelle soll zuerst ein Überblick über die Ziele und Möglichkeiten der Gentherapie gegeben werden. Nach einer kurzen Einführung in die Transkription, wird das hämatopoietische System sowie die für die spezifische und regulierbare Genexpression notwendigen Elemente vorgestellt. Es folgt ein Abschnitt über ein weiteres zentrales Thema dieser Arbeit, die Translationsinitiation. Zum besseren Verständnis der Konstruktion retroviraler Vektoren werden schließlich wichtige Aspekte des retroviralen Lebenszyklus und Gentransfers beleuchtet.

#### 3.1 Somatische Gentherapie

Als somatische Gentherapie bezeichnet man den Transfer von neuem genetischen Material in die Zellen eines Individuums zu therapeutischen Zwecken“ [1].

Gentherapien werden sowohl genutzt um fehlende oder gestörte Genfunktionen zu korrigieren (Substitutionstherapie), pathologische Genaktivitäten zu unterdrücken (Suppressionstherapie), oder vorhandene physiologische Prozesse zu verstärken (Additionstherapie). Neben der Heilung und Linderung genetischer Defekte (bisher sind etwa 6600 genetische Erbkrankheiten bekannt) stellt die Gentherapie daher auch eine hoffnungsvolle Methode bei der Behandlung einer Vielzahl erworbener Krankheiten ein. Die Tabelle 1.1 gibt einige Beispiele für Krankheiten, die für eine gentherapeutische Behandlung in Frage kommen [2].

Krankheit	Defekt	Häufigkeit	Zielzellen
vererbt			
Schwere kombinierte Immunodefizienz (SCID/ADA)	Adenosindesaminase (ADA) in 25% der SCID-Patienten	selten	Knochenmarkszellen oder T-Lymphozyten
Hämophilie A Hämophilie B	Faktor VIII Defizienz Faktor IX Defizienz	1:10.000 Männer 1:30.000 Männer	Leber-, Muskel-, Fibroblasten-,
Familiäre Hypercholerstolämie	Defizienz an "low-density"-Lipoprotein (LDL)-Rezeptor	1:10.000	Leberzellen
Cystische Fibrose	defekter Transport von Salzen im Lungenepithel; Verlust des CFTR Genes	1:3.000 Kaukasier	Atemwege der Lunge
erworben			
Krebs	Vielzahl von Ursachen, darunter genetische Prädisposition und Umwelt	1 Million/Jahr (USA)	Vielzahl an Krebszell-Typen: Gehirn, Brust, Niere, Pankreas, u.a.
Neurologische Erkrankungen	Parkinson Alzheimer	1 Million Parkinson und 4 Millionen Alzheimer Patienten in den USA	direkte Injektion in das Gehirn: Nerven-, Glia- und Schwammzellen
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Arteriosklerose	13 Millionen in den USA	Arterien, vaskuläre Endothelzellen
Infektionskrankheiten	AIDS, Hepatitis B	steigende Anzahl	T-Zellen, Leberzellen, Makrophagen

Tab. 1.1.: Beispiele für Krankheiten, die sich für gentherapeutische Ansätze eignen.

Bereits im Jahr 1990 wurde der erste Versuch unternommen einen Patienten mit einem Defekt des Adenosindesaminase (ADA)-Gens gentherapeutisch zu behandeln [1]. Seitdem wurden bisher schätzungsweise 3500 Patienten in gentherapeutische Behandlungen eingebunden [3]. In der Entwicklung befinden sich zur Zeit zahlreiche gentherapeutische Ansätze zur Behandlung verschiedener Krebsformen, der Bluterkrankheit, Erkrankungen des Zentralnerven- und Herz-Kreislauf-Systems und viraler Infekte, wie Hepatitis B und AIDS. Diese Ansätze beschäftigen sich z.B. mit der Eliminierung von Tumorzellen durch gezielte Expression von Toxinen (*suicide gene transfer*, [4]), oder der Stimulation der Immunantwort infizierter Zellen durch Expression bestimmter Antigene [5].

Über die Wirksamkeit der Gentherapien sind noch keine zuverlässigen Aussagen möglich, da bis heute in klinischen Studien noch keine andauernde Heilung einer Krankheit erzielt wurde. Zudem ist trotz des breiten Spektrums gentherapeutisch behandelbarer Krankheiten und der intensiven Forschung auf diesem Gebiet, die Zahl der klinischen Anwendungen bisher gering. Eine erfolgreiche Gentherapie setzt nicht nur die Identifizierung eines geeigneten therapeutischen Gens voraus, sondern auch den effizienten und sicheren Transfer des korrigierenden Gens in die gewünschten Zielzellen.

Da die Effektivität des Gentransfers in den letzten Jahren durch die Entwicklung zahlreicher viraler (Retroviren, Adenoviren, AAV) und nicht-viraler (kationische Liposome, Polysin-DNA-

Komplexe) Vektorssysteme erheblich verbessert werden konnte, scheitert die praktische Anwendung einer Gentherapie häufig an der Sicherheit der eingesetzten Vektoren. Anforderungen an einen sicheren Vektor sind neben der Nicht-immunisierenden Wirkung, die Zellspezifität und Regulierbarkeit der Expression. Durch die Zellspezifität können mögliche Nebeneffekte, die auf unerwünschter Expression der Genprodukte in Nicht-Zielzellen basieren, minimiert werden. Die Regulierbarkeit impliziert eine gewisse Reversibilität der genterapeutischen Maßnahme und eröffnet die Möglichkeit die Expressionsstärke der gewünschten Genprodukte zeitlich und quantitativ zu steuern und so individuell auf einen physiologisch relevanten Wert einzujustieren.

## 3.2 Zellspezifität der Genexpression

Die Expression der in der DNA in Form von Genen gespeicherten Information umfasst zwei Prozesse: 1. Das Umschreiben (Transkription) der DNA-Sequenz in mRNA. 2. Die Übersetzung (Translation) der Nucleinsäuresequenz der mRNA in eine Proteinsequenz (Kap. 3.4).

In welchem Gewebe, zu welchem Zeitpunkt der Differenzierung einer Zelle und natürlich in welchem Maße ein bestimmtes Gen exprimiert wird, unterliegt dabei einem strengen Kontrollsystem. Auf Ebene der Transkription sind hierzu neben der basalen Transkriptionmaschinerie (Polymerase II + basale Proteine) sowie dem basalen Promotor (TATA-Box + Startkodon) eine Reihe weiterer regulatorischer Elemente notwendig.

Dazu gehören kurze DNA-Sequenzabschnitte an die spezifische Proteine binden und auf diese Weise mit dem basalen Transkriptionsapparat wechselwirken. Diese als *cis*-regulatorische Elemente bezeichneten Sequenzabschnitte können in der Promotorregion eines Gens enthalten sein, unter Umständen aber auch mehrere Kilobasenpaare vom eigentlichen Promotor entfernt stromauf oder stromabwärts liegen. Verstärkt ein *cis*-regulatorisches Element die Transkription eines zugehörigen Gens, bezeichnet man es als „*Enhancer*“, hemmt es die Transkription, spricht man von einem „*Silencer*“. Die Proteine, die an die spezifische Sequenzmotive binden und zur Regulation der Expression eines Gens beitragen, bezeichnet man als Transkriptionsfaktoren, oder auch *trans*-regulatorische Faktoren.

### 3.2.1 Das hämatopoietische System

Nach heutigem Wissen gehen alle Zellreihen des hämatopoietischen (blutbildenden) Systems (Abb. 3.2.1) aus einer Population pluripotenter Stammzellen hervor. Diese Zellen besitzen einerseits die Fähigkeit zur Proliferation (Selbsterneuerung), andererseits können sie



unterschiedliche Differenzierungsprogramme durchlaufen, an dessen Ende die ausdifferenzierten auf unterschiedliche Funktionen spezialisierten Blutzellen stehen [6]. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung muss sehr fein abgestimmt sein, um das System auf Dauer im Gleichgewicht zu halten. Ist dies nicht der Fall, besteht die Gefahr, daß der Organismus an einer Leukämie erkrankt. Die Steuerung von Proliferation und Differenzierung im hämatopoietischen System unterliegt daher einem komplexen Kontrollsystem, in dem zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie die Faktoren der C/EBP-Familie (Kap. 3.2.2), eine Rolle spielen.

Die pluripotenten Stammzellen stellen ein geeignetes Ziel bei der gentherapeutischen Behandlung von Defekten hämatopoietischer Zellen dar. Durch den stabilen Gentransfer in die Stammzellen kann sichergestellt werden, dass das Transgen sowohl für einen langen Zeitraum im Pool der Vorläuferzellen erhalten bleibt, als auch an die Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien weitergegeben wird.

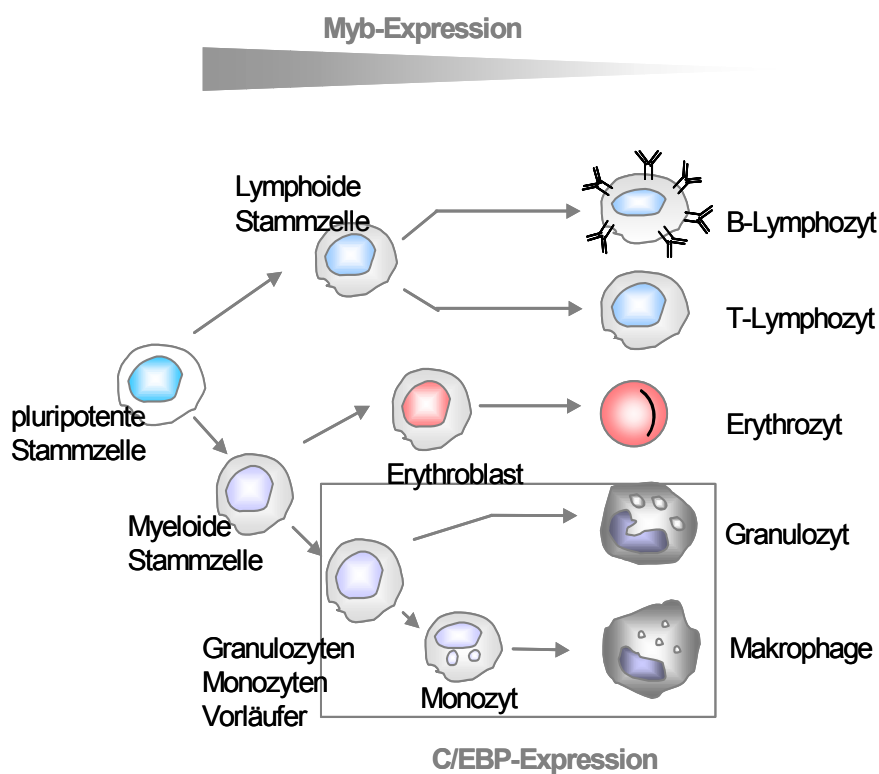


Abb. 3.2.1: Das hämatopoietische System (vereinfacht) [7]. Gekennzeichnet sind die Bereiche in denen eine Expression der Transkriptionsfaktoren Myb (Kap. 3.2.3) und C/EBP (Kap. 3.2.2) stattfindet.

### 3.2.2 Die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren

Die Mitglieder der Familie der C/EBP Proteine („CCAAT-box/enhancer binding proteins“) bilden eine Gruppe strukturell verwandter Transkriptionsfaktoren, die neben einer Aktivierungsdomäne, eine basische DNA-Bindungsdomäne und eine leuzinreiche Dimerisierungsdomäne (Leuzin-Zipper) besitzen [8]. Über diese in den bekannten Subtypen des Proteins (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  [9, 10]) hochkonservierte Dimerisierungsdomäne, bilden sie Homo- und Heterodimere, die nach heutigem Wissen eine wichtige Rolle bei der Genaktivierung im Laufe der Differenzierung bestimmter Zelltypen, insbesondere von Leber- und Fettzellen und den myelomonozytären Zellen des hämatopoietischen Systems spielen [11-13].

Die Bedeutung der C/EBP Faktoren für die zellspezifische Genexpression in myelomonozytären Zellen wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass durch die ektopische Expression von Mitgliedern der C/EBP-Familie verschiedene myelomonozyten-spezifische Gene in nicht-hämatopoietischen Zellen angeschaltet werden können [11]. Da während des Differenzierungsprozesses myelomonozytärer Zellen mindestens vier verschiedene Mitglieder der C/EBP-Familie nach einem genauen zeitlichen Muster, auf hohem Niveau exprimiert werden, wird jedem dieser Faktoren eine essentielle Rolle im Entwicklungsprogramm der Zelle zugeschrieben [14]. Während C/EBP $\alpha$  als Hauptregulator bei der Differenzierung von Myeloblasten zu Granulozyten [15-17] identifiziert wurde, ist C/EBP $\beta$  ein essentieller Faktor bei der Makrophagen Entwicklung [18] (Abb. 3.2.1).

Die differenzierungsspezifische Induktion bestimmter Gene durch C/EBP erfolgt wahrscheinlich durch Kooperation mit unterschiedlichen akzessorischen Faktoren; im Falle des ausschließlich in myelomonozytären Zellen exprimierten *mim-1* Gens (Kap. 3.2.3) scheint diese Rolle der Transkriptionsfaktor Myb zu übernehmen.

### 3.2.3 Das *mim-1* Gen

Das ausschließlich in myelomonozytären Zellen des hämatopoietischen Systems exprimierte *mim-1* Gen stellt ein Zielgen des Transkriptionsfaktors c-Myb dar (*mim* = *myb induced myeloid*). C-Myb wird in unreifen, proliferierenden Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems auf hohem Niveau exprimiert und im Verlaufe der Differenzierung herunterreguliert [19] (Abb. 3.2.1). Der Faktor ist nicht nur in das Selbsterneuerungsprogramm hämatopoietischer Zellen involviert, sondern spielt, wie im Falle des *mim-1* Gens, ebenfalls eine wichtige Rolle bei Aktivierung von Genen der Differenzierung.

Neben Myb haben auch die Faktoren der C/EBP-Familie einen entscheidenden Anteil an der zellspezifischen Expression des *mim-1* Gens. So konnte in DNA- Bindungs- und

Expressionsexperimenten gezeigt werden, dass die Faktoren Myb und C/EBP durch mehrere Bindungsstellen in der Promotorregion des *mim-1* Gens eine synergistische Aktivierung des Promotors bewirken [11, 20] (Abb. 3.2.3).

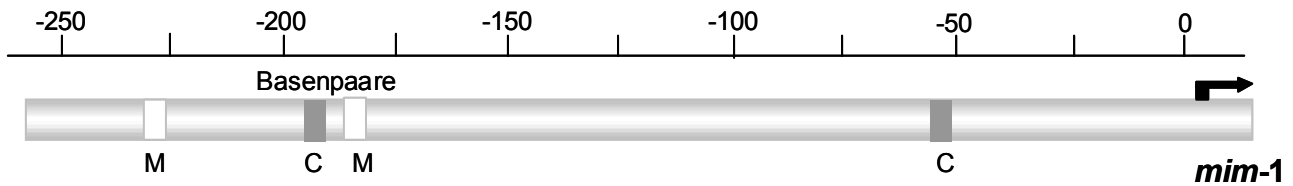


Abb. 3.2.3: Schematische Darstellung der Promotorregion des *mim-1* Gens. Angegeben sind die Myb (M) und C/EBP (C) Bindungsstellen [20].

### 3.3 Regulierbarkeit der Genexpression

Die regulierbare Expression von Transgenen ist in vielen Bereichen der Forschung von großem Interesse. Sie ist z.B. Voraussetzung für die Erforschung der Genregulation und Genfunktion während der Entwicklung, für die Analyse der Funktion spezifischer Gene in biologischen Prozessen, für die Expression von Genprodukten, die toxisch oder wachstumshemmend wirken, sowie für die sichere und kontrollierte Administration in der Gentherapie.

Ein regulierbares System sollte drei Charakteristika besitzen. 1. Effektivität, d.h. es sollte niedrige Basis-Expressionslevel im reprimierten Zustand und hohe im induzierten Zustand aufweisen. 2. Dosis-Abhängigkeit, d.h. die Expressionsstärke sollte modulierbar sein. 3.) Spezifität, d.h. das Expressionssystem sollte nicht mit endogenen regulatorischen Elementen oder zellulären Reaktionswegen interferieren. 3. Reversibilität, d.h. die Expressionszustände sollte jederzeit reversibel sein [21].

#### 3.3.1 Das Tet-Off System

Ein Beispiel für ein regulierbares Expressionssystem ist das 1992 von Gossen und Bujard [22] entwickelte Tet-Off System. Das ursprüngliche System besteht aus zwei Komponenten, einem Tetracyclin (Tet)-regulierbarem Transaktivator und einem Transaktivator-abhängigem Promotor. Der Promotor besteht aus mehreren Kopien des Tet-Repressor DNA-Bindungsmotivs (TRE) aus *E.coli*, fusioniert mit dem minimalen CMV Promotor. Der Transaktivator tTA ist ein chimäres Protein aus der Tetracyclin-Repressor-Domäne (tetR) aus *E.coli* und der potenten viralen Transaktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex Virus.

In Abb. 3.3.1 ist die Funktionsweise des Tet-Off Systems dargestellt. Die Expression des Faktors tTA erfolgt konstitutiv durch den starken CMV Promotor. In Abwesenheit von Tet

bindet tTA an die TRE-Sequenz und transaktiviert  $CMV_{min}$ . In Gegenwart von Tet findet eine Konformationsänderung der tetR-Domäne statt, tTA bindet nicht an TRE,  $CMV_{min}$  besitzt nur eine niedrige, basale Aktivität. Der Übergang von dem induzierten in reprimierten Zustand durch Zugabe oder Wegnahme von Tet ist reversibel.

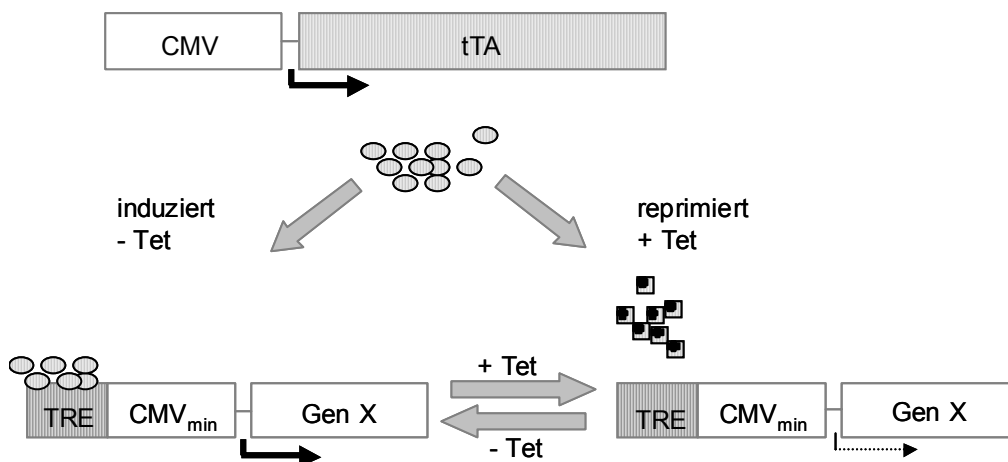


Abb. 3.3.1: Das Tet-Off System [22]

### 3.3.2 Autoregulation

Autoregulation ist ein weit verbreitetes Phänomen das bei zahlreichen Transkriptionsfaktorgenen gefunden wurde. Autoregulation findet statt, wenn der Promotor eines Transkriptionsfaktorgens durch das eigene Genprodukt reguliert werden kann (z.B. beim C/EBP $\beta$ -Gen (Kap. 3.2.2); [23]. Man unterscheidet zwischen positiver, d.h. verstärkender, und negativer, d.h. reprimierender Autoregulation. Autoregulation spielt immer dann eine Rolle, wenn die Expression eines bestimmten Gens nach erstmaliger Induktion Aufrechterhalten werden soll (positive Rückkopplung), oder nach Erreichen eines gewissen Grenzwertes wieder gesenkt werden soll (negative Rückkopplung).

Das Prinzip der Autoregulation kann jedoch auch bei der regulierten Expression von Transgenen von Nutzen sein, z.B. wenn die konstitutive Expression eines regulatorischen Faktors vermieden werden soll.

Ein Beispiel hierfür ist das Tet-Off System (Kap. 3.3.1). Trotz der guten Regulierbarkeit der Expression ist die Anwendbarkeit des Systems limitiert. Hauptursache hierfür ist die Toxizität des Transaktivators tTA durch das sogenannte „Squelching“ [24] [25], d.h. dem Abfangen endogener Transkriptionsfaktoren. Da viele Zelltypen eine konstitutive Expression des Faktors tTA nicht tolerieren [21, 26-29], entwickelten Shockett et al. [26] ein autoreguliertes Tet-System. Bei diesem System steht der Transaktivator selbst unter der Kontrolle des tTA-

regulierten Promotors. Im induzierten Status führt die Bindung des Transaktivators an den Promotor zur Aktivierung seiner eigenen und der Expression des Transgens. Im reprimierten Zustand verhindert die Konformationsänderung der tTA-DNA-Bindungsdomäne die weitere Aktivierung des Promotors mit der Konsequenz, dass sowohl die Transgenkonzentration, als auch die Transaktivatorkonzentration in der Zelle sinkt. Auf die Weise bleiben hohe Konzentrationen des Transaktivators auf die Phase der Induktion beschränkt.

### 3.4 Translationsinitiation

In der Molekularbiologie bezeichnet der Begriff Translation die Übersetzung der in der DNA kodierten genetischen Information aus der „Nukleinsäure-Sprache“ in die „Protein-Sprache“, die Protein-Biosynthese.

Bei der Translation unterscheidet man drei verschiedene Phasen, die Initiation, die Elongation und die Termination. An dieser Stelle soll der Prozess der eukaryontischen und viralen Translationsinitiation genauer durchleuchtet werden.

#### 3.4.1 Cap-abhängige Translation bei Eukaryonten

Die Initiation der Translation in Eukaryonten ist ein sehr komplexer Prozess in dem mindestens ein Dutzend Translationsfaktoren beteiligt sind (siehe Tabelle 3.4.1).

Die Bildung des Initiationskomplexes am AUG-Start-Kodon erfolgt mit Hilfe der 7-Methylguanosinium-Kappe („Cap“) der prozessierten mRNA, dabei werden nach [30] verschiedene Stationen durchlaufen:

##### 1. Bereitstellung einer aktiven 40S-Ribosomen-Untereinheit

Die ribosomale 40S-Untereinheit wird mit Hilfe der Faktoren eIF-3A/eIF-6 von der 60S-Untereinheit getrennt und durch Bindung des Faktors eIF-1A und des großen Proteins eIF-3 aktiviert.

##### 2. Bildung des 43S-Prä-Initiationskomplexes

Der ternären Komplexes aus Met-tRNA und eIF-2/GTP bindet an die vorbereitete 40S-Untereinheit.

##### 3. Vorbereitung der mRNA

Das Protein eIF-4F („*cap recognition complex*“) bindet ATP-abhängig an die 7-Methylguanosinium-Kappe. Die Bindung wird vermittelt durch die  $\alpha$ -Untereinheit (eIF-4E). Die  $\beta$ -Untereinheit (eIF-4A) entfernt als RNA-Helikase unter ATP-Verbrauch Haarnadelschleifen in der 5'-nichtkodierenden Region der mRNA. Die  $\gamma$ -Einheit (eIF-4G) stabilisiert den eIF-4F-Komplex.

##### 4. Bildung des 48S-Prä-Initiationskomplexes

Die  $\gamma$ -Einheit des Faktors eIF-4F (eIF-4G) rekrutiert den ternären Komplex (Met-RNA/eIF-2/GTP) und die aktivierte 40S-Ribosomen Untereinheit.

#### 5. Bildung des Initiationkomplexes am AUG-Start-Kodon

Unter Verbrauch von ATP fährt die Ribosomen-Untereinheit entlang der 5'-nichtkodierenden Region bis sie ein AUG-Kodon entdeckt. Dort kommt es nach GTP-Spaltung zur Freisetzung von eIF-2/GDP und weiteren Initiationsfaktoren auf der 40S-Untereinheit, und schließlich zur Zusammenlagerung mit der 60S-Ribosomen-Untereinheit zum vollständigen Ribosom.

Bezeichnung	Untereinheiten	Funktion
eIF-1	-	fördert Bildung des 43S-Prä-Initiations-Komplexes
eIF-1A	-	Dissoziation des Ribosoms in die Untereinheiten
eIF-2	$\alpha$ $\beta$ $\gamma$	GTP-abhängige Bindung von Met-tRNA an die 40S-Ribosomen-Untereinheit
eIF-2A	-	Bindung von Met-tRNA an die 40S-Ribosomen-Untereinheit
eIF-2B	5	Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor GEF; Regeneration von eIF2/GDP
eIF-2C	-	stabilisiert den ternären Komplex aus Met-tRNA/eIF2/GTP
eIF-3	8	fördert Bildung des Prä-Initiations-Komplexes
eIF-3A	-	Trennung des Ribosoms in die 40S- und die 60S-Untereinheit
eIF-4F	$\alpha$ (eIF-4E) $\beta$ (eIF-4A) $\gamma$ (eIF-4G)	Bindung an die 7-Methylguanosinium-Kappe ( <i>cap binding protein</i> ) RNA-Helikase hält den eIF-4F-Komplex zusammen
eIF-5	-	fördert die Bindung der 60S-Ribosomen-Untereinheit
eIF-5A	-	fördert die Bildung der ersten Peptid-Bindung

Tab. 3.4.1: Eukaryotische Translationsfaktoren [31].  
Alternative Bezeichnungen sind in Klammern angegeben.

Die Bindung des Ribosoms an die mRNA wird neben der 7-Methylguanosin-Kappe durch weitere Strukturmerkmale beeinflusst. So zeigte sich, dass die Translationseffizienz besonders hoch ist, wenn das AUG-Startkodon eine Sequenzumgebung mit folgender Konsensussequenz besitzt: CCRCCAUGG (R = Adenin- oder Guanin-Baustein). Der sogenannten Kozak-Sequenz [32]. Auch das poly(A)-Ende spielt bei der Einleitung der Translation eine Rolle, durch Bindung des PAB („poly (A) binding“) Proteins wechselwirkt es mit der zentralen  $\gamma$ -Einheit des Faktors eIF-4F, eIF-4G (Abb. 1.4.1). Denkbar ist, dass es so den gesamten Komplex aus mRNA, Ribosomen und Initiationsfaktoren stabilisiert, oder den Weg der Ribosomen vom 3'-Ende zum 5'-Ende verkürzt, und somit die Wiederverwendung der Ribosomen durch die gleiche mRNA erhöht [33].

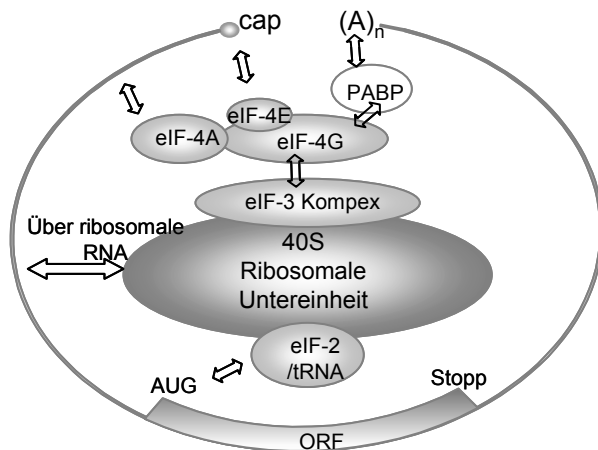


Abb. 3.4.1: Mechanismus der Cap-abhängigen Ribosomen Rekrutierung zur mRNA (vereinfacht) [34]. Dargestellt ist die Wechselwirkung der unterschiedlichen Komponenten des Initiationskomplexes vor Erreichen des AUG-Startkodons.

### 3.4.2 Cap-unabhängige Translation durch interne Initiation

Bei Polio Viren und anderen Viren dieser Art (Picorna-Viren), kann das RNA-Genom direkt nach der Infektion als mRNA für die Protein-Synthese eingesetzt werden [35-37]. Das ist überraschend, da Polio-Virus RNA keine Kappe besitzt und zudem der „cap recognition complex“ (Faktor eIF-4F, siehe Kap. 3.4.1) im Laufe der Infektion zerstört wird, so dass die Translation zellulärer mRNA zum Erliegen kommt [38, 39].

Die Translation der viralen RNA erfolgt Cap-unabhängig an internen Ribosomen Eintrittsstellen (IRES, „Internal Ribosomal Entry Site“) [40, 41]. IRES-Elemente liegen in der langen 5'-nichtkodierenden Region der mRNA. Sie umfassen einige hundert Nukleotide, die stabile Haarnadelschleifen-Strukturen ausbilden, und enthalten als typisches Kennzeichen eine pyrimidinreiche Region in unmittelbarer Nähe zum AUG-Startkodon (Abb. 3.4.2). Da Teile dieser pyrimidinreichen Region komplementär zum 3'-Ende der 18S rRNA sind, vermutete man, dass hier eine Wechselwirkung erfolgt die den Ereignissen an der Ribosomen-Bindestelle von bakteriellen mRNAs entspricht (Stichwort: „Shine-Dalgarno sequence“) [42, 43]. Essentiell für die Funktionalität der IRES scheinen neben der Sekundärstruktur [44, 45], auch eine Reihe von zellulären Proteinen zu sein. Diese als ITAFs („IRES trans-acting factors“) bezeichneten Proteine binden an die Haarnadelschleifen und die pyrimidinreiche Region der mRNA und rekrutieren die Proteine eIF-4A und eIF-4G, die auch nach Proteolyse des Faktors eIF-4F als funktionierende Untereinheiten erhalten bleiben [46-49]. Diese Initiationsfaktoren übernehmen dann wahrscheinlich ähnliche Funktionen wie bei der Cap-abhängigen Translation; sie entwinden unter ATP-Verbrauch die Haarnadelschleifen und ermöglichen den Eintritt der 40S-Ribosomenuntereinheit.

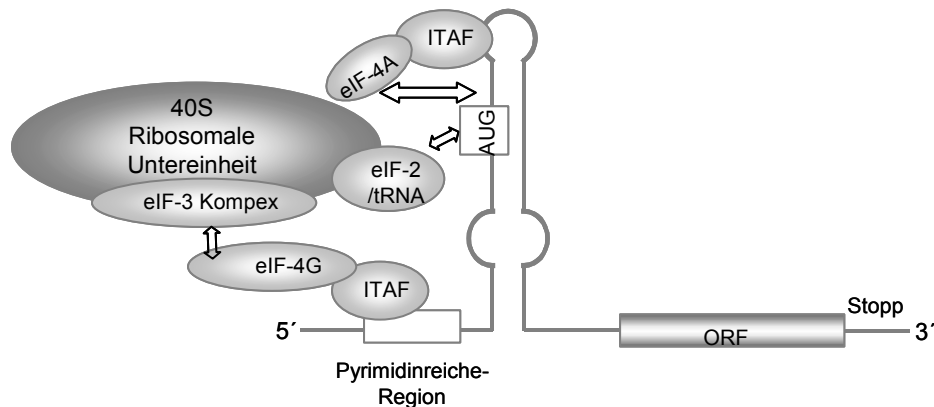


Abb. 3.4.2: Mechanismus der Cap-unabhängigen Ribosomen Rekrutierung zur mRNA durch die Polio Virus IRES. Dargestellt ist nur ein Ausschnitt aus der komplexen Haarnadelschleifen-Struktur der IRES Sequenz.

Im Gegensatz zur Cap-abhängigen Translation ermöglichen IRES-Sequenzen so die Translation mehrerer ORFs („*open reading frames*“) von einem einzigen polycistronischem mRNA Transkript [50].

### 3.4.3 Cap-unabhängige Translation durch Reinitiation

In Eukaryonten erfolgt die Translation eines ORFs normalerweise Cap-abhängig (Kap. 3.4.1), sie beginnt am ersten 5'-AUG-Kodon (Initiation) und endet am ersten in 3'-Richtung liegenden Stoppkodon des Leserasters (Termination). Gemäß dem Ribosomen-Scanning-Modell von Kozak [32] tastet jedoch die 40S-Ribosomenuntereinheit nach Erreichen des ersten Stoppkodons zusammen mit verschiedenen Elongationsfaktoren weiter die RNA entlang und kann an einem stromabwärts liegenden Startkodon erneut einen Initiationskomplex ausbilden. Diesen Prozess nennt man Reinitiation. Der genaue Mechanismus und die Funktion der Reinitiation ist noch nicht geklärt. Die Effektivität der Translation des stromabwärts liegenden Cistrons ist abhängig von der Länge des 5'-ORFs [51] sowie von der Struktur und Länge der intercistronischen Sequenz [52]. Reinitiation findet sowohl an kurzen (15 bp) als auch relativ langen (150 bp) Intercistrons statt [32] [53], vorausgesetzt die Sequenz ist frei von weiteren AUGs und bildet keine stabilen Sekundärstrukturen aus.

Ähnlich wie die viralen IRES Sequenzen können somit auch geeignete intercistronische Sequenzen die Cap-unabhängige Translation eines ORFs von einem polycistronischen Transkript vermitteln. Im Gegensatz zur internen Initiation kann Reinitiation jedoch nur nach Rekrutierung der Translationsmaschinerie durch eine Cap-abhängige Translation erfolgen.



In Abb. 3.4.3 ist die Translation einer bicistronischen mRNA durch interne Initiation und Reinitiation im Vergleich dargestellt.

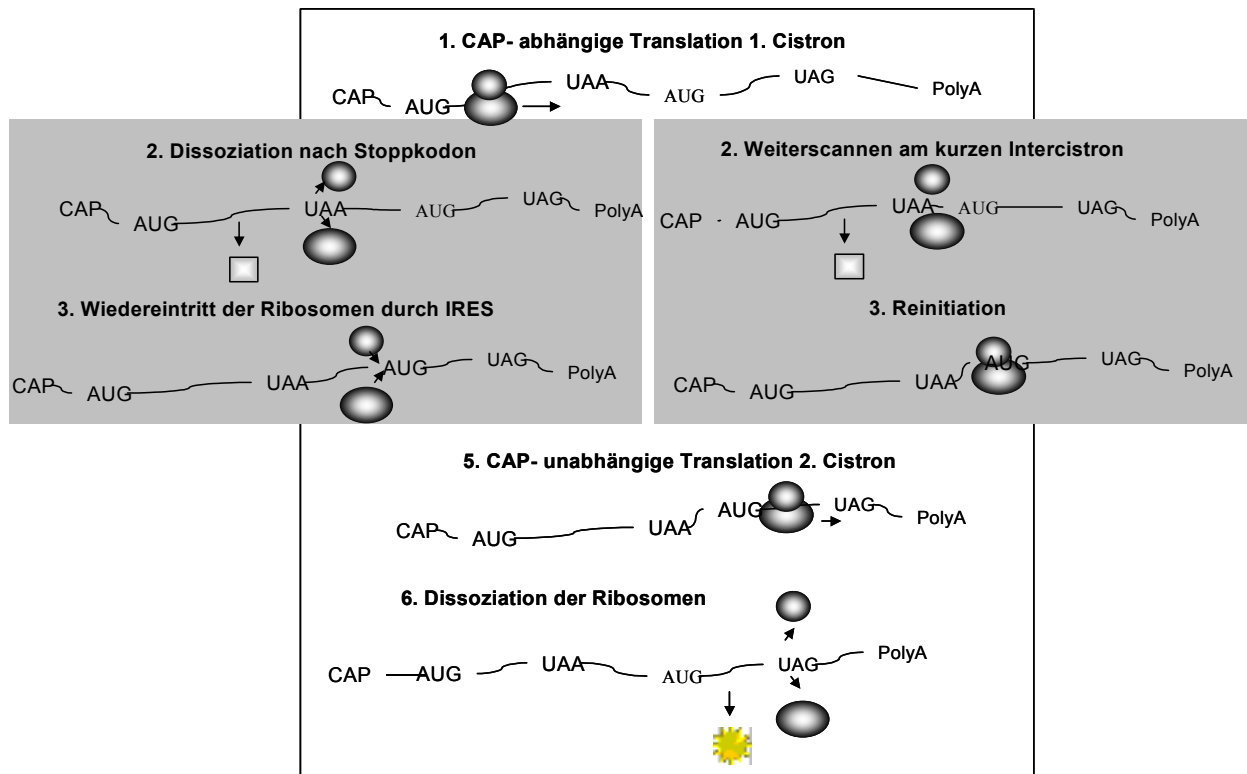


Abb. 3.4.3: Translation einer bicistronischen mRNA durch IRES-vermittelte interne Initiation, oder durch Reinitiation an einem Intercistron.

### 3.5 Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren werden seit Anfang der 80er Jahre für den Transfer von Fremdgenen in verschiedene Zielzellen eingesetzt. Der Vorteil von Retroviren ist, dass sie eine Vielzahl unterschiedlicher proliferierender Zelllinien effizient und stabil transduzieren können [54-57]. Im Gegensatz zu anderen viralen Systemen, wie Adeno- oder Herpes Simplex Viren, stellen retrovirale Vektoren somit geeignete Werkzeuge für den Gentransfer in Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems und Tumorzellen im Rahmen einer Gentherapie dar.

Da die Integration an einer zufälligen Stelle in das Genom der transduzierten Zelle erfolgt, ist der Haupteinwand gegen den Gentransfer durch Retroviren das Risiko der Insertionsmutagenese. Diese kann zur Zerstörung zellulärer Gene, oder zur Aktivierung von zellulären Onkogenen führen.

#### 3.5.1 Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren

Retroviren besitzen ein diploides, einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität. Die beiden identischen RNA-Moleküle sind von einem ikosaedrischen Kapsid und einer

Membranhülle umgeben. Sie besitzen einen Durchmesser von 80 bis 130 nm. Die RNA-Moleküle haben die Struktur einer mRNA mit methylierter Kappe (Cap) und poly(A)-Schwanz [58]. Die dimerisierten Stränge sind mit einer zellulären tRNA und zwei essentiellen Enzymen, der Reversen Transkriptase (RT) und einer Integrase, assoziiert. Dieser RNA/Protein Komplex wird geschützt durch die Nucleocapsid-Proteine. Die Anordnung der Gene, die für Strukturproteine kodieren, ist stets gag-pol-env. Die Kapsid-Proteine werden von dem gag-Gen (gruppenspezifische Antigene) kodiert. Das pol-Gen kodiert die viralen Enzyme, und das env-Gen die spezifischen in die Membranhülle eingelagerten Virusproteine. Diese werden von Zelloberflächenrezeptoren erkannt und bestimmen so die Wirtsspezifität des Virus.

Im retroviralen Lebenszyklus unterscheidet man zwischen der frühen und späten Phase [59]. Zu Beginn der frühen Phase bindet das Virus an den zellulären Rezeptor der Wirtszelle. Nach Fusion viraler und zellulärer Membranen und Eintritt des Kapsids in das Zytoplasma, erfolgt die Reverse Transkription der viralen RNA. In einer komplexen Folge von Syntheseschritten entsteht dabei eine lineare Doppelstrang-DNA mit redundanten Enden von ca. 600 bp, den sogenannten LTRs („*long terminal repeats*“) [31].

Die lineare DNA, die virale Integrase und Kapsidproteine werden als Nukleoproteinkomplex in den Zellkern transportiert [60]. Dort wird die DNA auf spezifische Weise von der viralen Integrase ins Zellgenom integriert [61]. Der entstehende Provirus ist von den LTRs begrenzt. Die späte Phase umfasst alle Schritte die letztendlich zur Freisetzung der reifen Viren führen. Zunächst erfolgt die Transkription der proviralen DNA. Das Transkript beginnt in der 5'LTR und endet im der 3'LTR. Die Steuersignale (Enhancer, Promotor und Polyadenylierungssignal) für die Transkription durch die zelluläre RNA Polymerase II befinden sich in den LTRs [58]. Die entstehende RNA mit Cap und Poly(A)-Schwanz wird partiell gespleißt und die Gag-Pol- und Env-Proteine exprimiert. Die ungespleißte RNA stellt gleichzeitig die genomische RNA dar. Sie besitzt nahe ihres 5'-Endes die sogenannte Verpackungssequenz ( $\psi$ ), die eine spezifische Verpackung der viralen RNA in Viruspartikel bewirkt [62]. Genomische RNA, Gag- und Pol-Polyproteine assoziieren und werden durch Umhüllen mit einer Membran, die Env-Protein enthält, freigesetzt. Die freigesetzten Partikel können nach Infektion von Zellen mit entsprechendem Rezeptor einen neuen Replikationszyklus initiieren.

### 3.5.2 Retroviraler Gentransfer

Bei der Konstruktion eines retroviralen Vektors wird die *trans*-wirkende gag-pol-env Region im einfachsten Fall (siehe auch Kap. 3.5.3) gegen das zu transfizierende Fremdgen und einen zusätzlichen Selektionsmarker ausgetauscht. Die *cis*-agierenden Elemente wie LTRs und  $\psi$  verbleiben in funktionaler Anordnung und gewährleisten die Verpackung der

rekombinanten RNA in Viruspartikel. Die für die Verpackung notwendigen Virusproteine werden von einer sogenannten Verpackungszelle zur Verfügung gestellt (Abb. 3.5.2). Durch Trennung der viralen *trans*- und *cis*-Sequenzen ist nur ein Replikationszyklus möglich, da die infizierten Zellen keine Virusproteine produzieren.

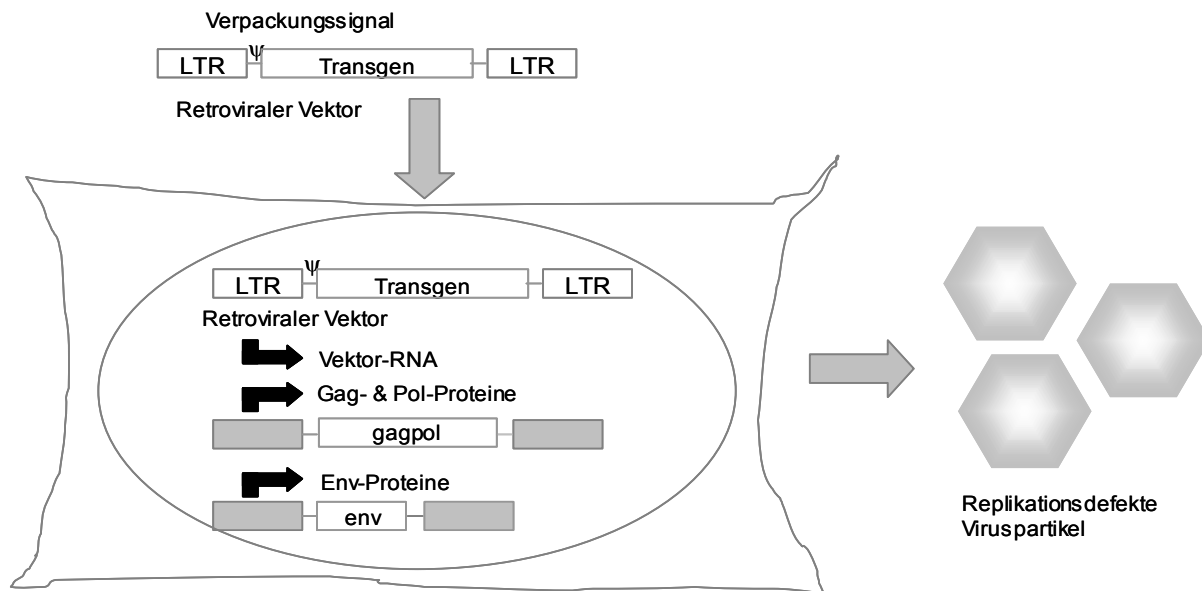


Abb. 3.5.2: Herstellung rekombinanter Retroviren mit Hilfe von Verpackungszelllinien.

Ein weiteres Sicherheitsrisiko neben der Insertionsmutagenese stellen mögliche Rekombinationsereignisse zwischen homologen Sequenzen des retroviralen Vektors und den endogenen *trans*-Sequenzen in der Verpackungszelllinie dar. Bei diesem Prozess können replikationskompetente Retroviren (RCRs) entstehen [63] [64], deren Ausbreitung nicht kontrolliert werden kann.

### 3.5.3 Konstruktion retroviraler Vektoren für die zellspezifische Genexpression

Wie bereits unter 3.5.1 erwähnt sind die retroviralen LTRs essentiell für die Integration und Replikation des retroviralen Vektors. Da sie regulatorische Elemente, wie Enhancer und starke, meist unspezifische Promotoren enthalten, können bei der Kombination einer retroviralen LTR mit einem zellspezifischen Promotor Promotorinterferenzen auftreten [65] oder die Zellspezifität des Promotors vermindert werden. Aus diesem Grund muss bei der Konstruktion von retroviralen Vektoren für die zellspezifische Genexpression die promotoraktive Region der 3'LTR inaktiviert werden. Hierbei können zwei unterschiedliche Strategien angewandt werden.

Zum einen kann der zellspezifische Promotor als interner Promotor in einem SIN („*self inactivating*“)-Vektorsystem verwendet werden. Hierbei werden die Promotor- und

Enhancerregion in der U3 (unique) Region der 3'LTR gezielt deletiert [66](Abb. 3.5.4A).

Zum anderen kann der zellspezifische Promotor nach Deletion der Promotorregion direkt in die retrovirale LTR inkorporiert werden („*Double-copy*“-Vektor, [67] [68]) (Abb. 3.5.4B).

Aufgrund der intakten 5'LTR wird die rekombinante DNA in beiden Fällen nach der Transfektion des Vektors revers transkribiert, dabei überträgt sich die Veränderung in der 3'LTR auf die 5'LTR. Nach einem Replikationszyklus sollte so die Expressionskontrolle ausschließlich durch den zellspezifischen Promotor erfolgen.

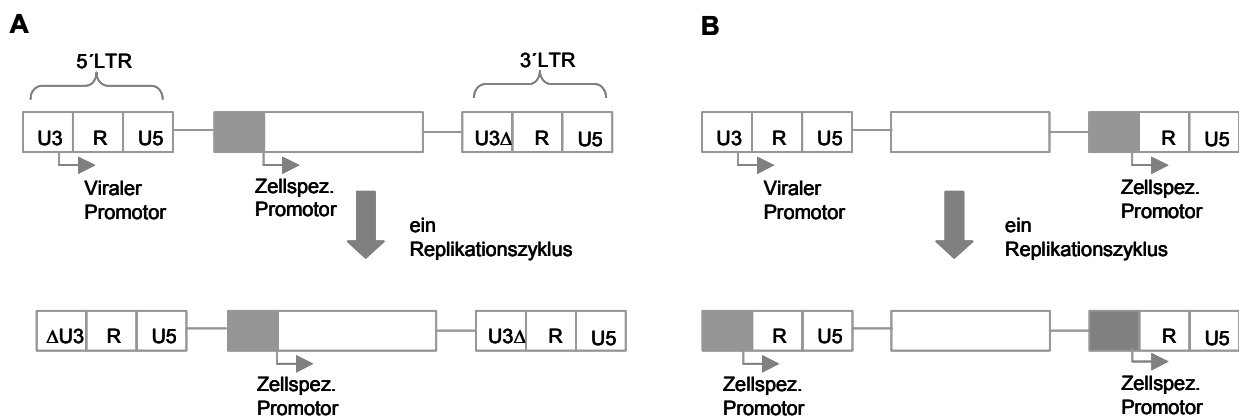


Abb. 3.5.4: Konstruktion retroviraler Vektoren für die zellspezifische Genexpression.

In dem unmodifizierten Vektor befinden sich die viralen Promotorsequenzen in der U3 Region. A) SIN-Vektor mit internem zellspezifischem Promotor. B) Double-Copy-Vektor mit LTR-inkorporiertem zellspezifischem Promotor.

## 4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Expressionssystem, das sowohl eine auf myelomonozytäre Zellen begrenzte, als auch Liganden-regulierbare Expression eines Transgens ermöglicht. Eine weitere Voraussetzung ist, dass das Expressionssystem auch nach Integration in einen retroviralen Vektor die oben genannten Eigenschaften beibehält. Hierzu soll der Promotor des *mim-1* Gens entsprechend der in Abb. 3.5.4B dargestellten Strategie in die 5'LTR des SFF („*Spleen Focus Forming*“) Virus integriert werden. Durch Beibehaltung der SFFV-Enhancerregion, bzw. durch Kombination mit einem für myelomonozytäre Zellen spezifischen Enhancer soll dabei versucht werden die Zellspezifität des Promotors zu erhöhen.

Der rekombinante Promotor soll dann in den in Abb. 4.1 dargestellten Expressionssystemen eingesetzt werden. Grundlegende Strategie beider Systeme ist, dass der Promotor neben der Expression eines Regulatorproteins, die Expression eines über eine Polio IRES oder ein Intercistron verbundenen Reporter gen kontrolliert. Als Regulator soll entweder eine Estradiol-induzierbare Variante des Transkriptionfaktors C/EBP $\beta$ , C/EBP $\beta$ /ER (ER = Hormonbindungsdomäne des menschlichen Östrogenrezeptors) oder der Doxycyclin-inhibierbare Transaktivator tTA fungieren. Nach zellspezifischer Induktion des Promotors soll so in Gegenwart bzw. Abwesenheit des jeweiligen Liganden eine Rückkopplung des Regulators auf den Promotor (bei tTA muss der Promotor hierzu noch durch das tTA-DNA-Bindungsmotiv, TRE, modifiziert werden) erfolgen.

Nach der Konstruktion der unterschiedlichen Expressionssysteme, soll durch Transfektionsxperimente in Ziel und Nichtzielzellen überprüft werden, ob die Expressionssysteme tatsächlich die erfordernten Kriterien erfüllen.

**A**



**B**

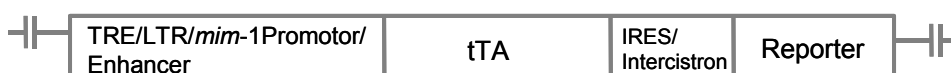


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der zu konstruierenden bicistronischen Expressionssysteme. A) C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssystem. B) tTA- Expressionssystem.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen *Acros Organics*, New Jersey, USA; *Baker*, Deventer, NL; *Difco Laboratories*, Detroit, USA; *Merck AG*, Darmstadt sowie *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim verwendet.

Spezialchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid 2K 30 %	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP	<i>Amersham pharmacia biotech</i> , Buckinghamshire, England
Rapid-Gel Acrylamid 40 %	<i>USB</i> , Cleveland, USA
Agarose	<i>Gibco BRL Life Technologies</i> , Eggenstein
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
APS	<i>Merck AG</i> , Darmstadt
CAT-Lysis-Puffer	<i>Roche</i> , Mannheim
D-Luciferin	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
DNA-SmartLadder	<i>Eurogentec</i> , Liege, Belgien
DTT	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
ECL-Lösungen	<i>Amersham pharmacia biotech</i> , Buckinghamshire, England
EDTA	<i>Biomol Feinchemikalien GmbH</i> , Hamburg
Emerald Enhancer	<i>Perkin Elmer</i> , Weiterstadt
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Ficoll	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Galacton	<i>Perkin Elmer</i> , Weiterstadt
Hefeextrakt	<i>Gibco BRL Life Technologies</i> , Eggenstein
HEPES	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
IPTG	<i>Biomol Feinchemikalien GmbH</i> , Hamburg
Lysozym	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Magermilchpulver	<i>Merck AG</i> , Darmstadt
dNTPs	<i>Roche</i> , Mannheim
Orange G	<i>Merck AG</i> , Darmstadt

Prestained SDS Molekular Weight Marker	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
TEMED	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Triton X-100	<i>BioRad, Hercules, USA</i>
Tween-20	<i>ICN Biomedical, Ohio, USA</i>
X-Gal	<i>Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg</i>

### 5.1.2 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma *New England Biolabs*, Schwalbach, bezogen.

DNaseI	<i>Roche, Mannheim</i>
Klenow-Polymerase	<i>Roche, Mannheim</i>
Proteinase K	<i>Roche, Mannheim</i>
Shrimp Alkalische Phosphatase	<i>Roche, Mannheim</i>
Taq-DNA-Polymerase	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>

### 5.1.3 Kits

DYEnamic Direct cycle sequencing Kit	<i>Amersham</i>
GENECLEAN-Gelextraktion	<i>Bio 101, Vista, USA</i>
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
Rapid-DNA-Ligation Kit	<i>Roche, Mannheim</i>
TOPO TA cloning-Kit	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>

### 5.1.4 Antikörper

$\alpha$ -chCCR	Kaninchen anti C/EBP $\beta$ -Immunoglobulin [23]
$\alpha$ -VP16 (1-21)	monoklonaler Antikörper aus Maus, <i>Santa Cruz, Californien, USA</i>
$\alpha$ -mouse HRP	<i>Dako-Diagnostika GmbH, Hamburg</i>
$\alpha$ -rabbit HRP	<i>Dako-Diagnostika GmbH, Hamburg</i>

### 5.1.5 Zellkulturbedarf

DMSO	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
Doxycylin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Elektroporationsküvette (0,4 cm)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
HS	<i>PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich</i>
IMDM	<i>Bichrom KG, Berlin</i>
FKS	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
L-Glutamim	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
$\beta$ -Estradiol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
PBS	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
RPMI 1640	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
Tamoxifen	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Trypsin/EDTA-Lösung	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
Zählkammer, Neubauer	<i>Merck AG, Darmstadt</i>
T75-Zellkulturflaschen	<i>Greiner Labortechnik, Solingen</i>
Zellkulturschalen	<i>Greiner Labortechnik, Solingen</i>

### 5.1.6 Zubehör

Filme	XOMAT AR Scientific Imaging	<i>Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA</i>
Filmentwickler	Agfa Curix60	<i>Agfa AG, Leverkusen</i>
Nitrozellulose-Membran	Protran	<i>Schleicher &amp; Schuell, Dassel</i>
Nylon-Membran	Gene Screen Plus	<i>Perkin Elmer, Boston, USA</i>
Whatmanpapier	GB 002	<i>Schleicher und Schuell, Dassel</i>

### 5.1.7 Geräte

Blotapparatur	Trans-Blot Cell	<i>Biorad, München</i>
Elektroporator	Easyjekt Plus	<i>Peqlab, Erlangen</i>
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM IRB	<i>Leica, Heerbrugg, Schweiz</i>
Luminometer	Auto Lumat LB953	<i>EG &amp; G Berthold, Bad Wildbach</i>
PCR-Gerät	Mastercycler gradient	<i>Eppendorf, Hamburg</i>



Phosphoimager	BAS-1800II	<i>FUJIFILM</i> , Düsseldorf
Sequenzierer	Gen Read IR4200	<i>LI-COR</i> , USA
UV-Spektrometer	Gene Quant II	<i>Pharmacia</i> , Freiburg
Videodokumentations- system	Duo-Store	<i>INTAS</i> , Göttingen
Zentrifuge	AV-J30I	<i>Beckmann</i> , München
Zentrifuge	IL-21	<i>Beckmann</i> , München

### 5.1.8 Standardpuffer

Blotpuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris-Base
	20 %	Methanol
DNA-Fällungspuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	1 mM	EDTA
	300 mM	NaCl
DNA-Ladepuffer	20 % (v/v)	Ficoll-400
	0,25 % (w/v)	Orange G
	in 10x TBE-Puffer	
PBS-Puffer (10x)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau-S-Lösung	1 % (v/v)	Essigsäure
	0,5 % (w/v)	Ponceau-S
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	250 mM	Tris-Base
	1,92 M	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
Stammlösung Sequenzgel	336 g	Harnstoff
	80 ml	TBE long run –Puffer (10x)
	448 ml	H <sub>2</sub> O
SSC-Puffer (20x)	3 M	NaCl

	0,3 M	Na-Citrat-Dihydrat
SSPE-Puffer (20x)	3 M	NaCl
	0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,02 M	EDTA
TBE long-run-Puffer (10x)	1,34 M	Tris Base
	0,45 M	Borsäure
	25 mM	EDTA
TBE-Puffer (10x)	0,9 M	Tris Base
	0,9 M	Borsäure
	20 mM	EDTA
TAE-Puffer (50x)	1 M	Eisessig
	50 mM	EDTA
	2 M	Tris/HCl
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA

### 5.1.9 Bakterienstamm

Top10F' F{<sup>q</sup>lacI<sup>q</sup>, Tn10(Tet<sup>R</sup>)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80  
 lacZΔm15 ΔlacX74 deoR recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697  
 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

### 5.1.10 Primer

Klonierungsprimer

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)
M1(XbaI/AfIII)for	5'-TAC TTA AGG CTA GCG CCA GTG TGC TGG AAT-3'	72,3
M1(NheI/AfIII)rev	5'-TAC TTA AGT CTA GAT GAT TAT CTG AAT-3'	63,3
TRE(AfIII)for	5'-GAT CTT AAG AGG CGT ATC ACG AGG-3'	62,7
Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)
TRE(NheI)for	5'-GAT GCT AGC AGG CGT ATC ACG AGG-3'	66,1

tTA(KpnI)for	5'-AGC GGT ACC GAA TTC ATA TGT CTA GAT TAG-3'	64,2
tTA(NheI)rev	5'-CTA GCT AGC CTA CCC ACC GTA CTC GTC-3'	69,5
IRES(XhoI)for	5'-ACG CTC GAG CTA TAG GGG CGA ATT GGG TAC-3'	70,9
IRES(XhoI)rev	5'-ACG CTC GAG CGT GCA ATC CAT CTT GTT CAA TT-3'	68,2
IRES(HindIII)rev	5'-ACG AAG CTT CGT GCA ATC CAT CTT GTT CAA TT-3'	65,2
eGFPfor	5'-CGG TCG CCA CCA TGG TGA-3'	65,5
eGFP(XbaI)rev	5'-TAT CTA GAG TGG TGG TGG GCG CCT GTA C-3'	69,5

### Fluoreszenzprimer

	Modifikation	Firma	T <sub>m</sub> (°C)
T 7	5'IRD 800	MWG –Biotech, Ebersberg	45,5
M13 Reverse	5'IRD 800	MWG –Biotech, Ebersberg	52,8

### 5.1.11 Plasmide

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
pcDNA3.1+	5,4	-	CMV ( <i>Cyto Megalo Virus</i> )	eukaryontischer Expressionsvektor ( <i>Invitrogen</i> )
pGI3 basic	4,8	Luciferase	-	<i>Promega</i>
pCMVβ	7,2	β-Galaktosidase	CMV	<i>Clontech</i>
pCR 2.1-TOPO	3,9	-	-	Klonierungsvektor ( <i>Stratagene</i> )
pTet-Off	7,4	tTA	CMV	<i>Clontech</i>
pTRE	3,1	-	TRE ( <i>Tet response element</i> ) minimal CMV	<i>Clontech</i>
pTA-M1inv	4,7	-	-	Klonierungsvektor pT-Adv ( <i>Clontech</i> ) mit 800 bp XhoI/XhoI-M1inv (Enhancer des <i>mim-1</i> Gens in inverser Orientierung)
HE14	2,1	-	-	kodiert C-terminale Aminosäuren 282-595 des humanen ER (Östrogen-rezeptors); Kumar et al., 1987

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
pcDNA3-CCR	6,4	Hühner C/EBP $\beta$	CMV	Mink et al., 1999 [23]
pcDNA3-CCR $\Delta$ 110	5,9	C/EBP $\beta$ N-terminal - 110 Aminosäuren	CMV	Mink et al., 1996 [20]
pCRNC-CCR/ER	7,4	C/EBP $\beta$ C-terminal fusioniert mit HBD (Hormon-bindungsdomäne) des humanen ER	CMV	Burk et al., 1993 [11]
pBS/PolioIRES	4,3	-	-	kodiert Polio Virus IRES ( <i>internal ribosomal entry site</i> ), A. Markhoff ZmbE, Münster
pNeo#574	12,6	Neomycin <sup>R</sup>	$\beta$ -Actin	J.-M. Buerstedde, H.Pette-Institut, Hamburg
pCMVluc	5,5	Luciferase	CMV	600 bp NruI/HindIII-Fragment aus pcDNA3 in pGI3 basic (SmaI/HindIII)
pGI3-240mim		Luciferase	<i>mim-1</i> (bp -240 - +150 )	Burk et al., 1993 [11]
psf $\alpha$ Bgl2Pst	5,2	Luciferase	SFFV ( <i>Spleen Focus Forming Virus</i> ) LTR	Burk et al., 1993 [11]
psfmim	5,3	Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> (bp -227 - -22)	200 bp AflII/SacI- <i>mim-1</i> Promotor in psf $\alpha$ Bgl2Pst
psf $\Delta$ mim	5,2	Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	psfmim mit NheI/AflII Deletion in SFFV-LTR
psfmim-M1	6,0	Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1	1. PCR pTA-M1inv mit M1(XbaI/AflII)for und M1rev(NheI/AflII) 2. 850 bp XbaI/AflII-PCR-Fragment in psfmim (NheI/AflII)
psfmim-M1inv	6,0	Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	1. PCR pTA-M1inv mit M1for und M1rev 2. 850 bp NheI/AflII-PCR-Fragment in psfmim (NheI/AflII)
psfmimTRE	5,8	Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	psfmim mit TRE 1. PCR pTRE mit TRE(AflII)for und TRE(AflIII)rev 2. 350 bp AflII/AflIII-PCR-Fragment in psfmim (AflII)

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
psf $\Delta$ mimTRE	5,7	Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	psf $\Delta$ mim mit TRE 1. PCR pTRE mit TRE(NheI)for und TRE(AflIII)rev 2. 350 bp NheI/AflIII-PCR-Fragment in psfmim (NheI/AflIII)
psfmimTRE-M1inv	6,4	Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	350 bp AflIII/AflIII-Fragment aus psfmimTRE in psfmim-M1inv (AflIII)
pcDNA3sfmim-CCR	6,9	C/EBP $\beta$	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	500 bp NheI (aufgefüllt)/KpnI-Fragment aus psfmim in pcDNA3-CCR (NruI/KpnI)
pcDNA3sf $\alpha$ -CCR	6,8	C/EBP $\beta$	SFFV-LTR	400 bp NheI/KpnI-Fragment aus psf $\alpha$ Bgl2Pst in pmim-CCR
pcDNA3sfmim-CCR/ER	8,2	C/EBP $\beta$ /ER	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	1200 bp EcoRI/XbaI-Fragment und 700 bp XbaI-Fragment aus pCRNC-CCR/ER nacheinander in pmim-CCR (EcoRI/XbaI)
pcDNA3sf $\alpha$ -CCR	8,1	C/EBP $\beta$ /ER	SFFV-LTR	1900 bp EcoRI/XbaI (partiell)-Fragment aus pmim-CCR/ER in psf $\alpha$ -CCR (EcoRI/XbaI)
pGI3-CCR/ER	6,8	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	-	1950 bp KpnI/XbaI (partiell)-Fragment aus pmim-CCR/ER in pGI3 basic (KpnI/NheI)
psfmim-CCR/ER	7,3	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	500 bp KpnI-Fragment von psfmim in pGI3-CCR/ER (KpnI)
psf $\Delta$ mim-CCR/ER	7,2	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	400 bp KpnI-Fragment aus psf $\alpha$ Bgl2Pst in pGI3-CCR/ER (KpnI)
psfmim-M1-CCR/ER	8,0	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1	1200 bp KpnI-Fragment aus psfmim-M1 in pGI3-CCR/ER (KpnI)
psfmim-M1inv-CCR/ER	8,0	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	1200 bp KpnI-Fragment aus psfmim-M1inv in pGI3-CCR/ER (KpnI)
pGI3-CCR/ER_PoliolIRES	7,5	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	-	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES 1. PCR pBS/PoliolIRES-Neo mit IRES(XhoI)for und IRES(XhoI)rev 2. 750 bp XhoI-PCR-Fragment in pGI3-CCR/ER (XhoI)

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
psfmim-CCR/ER_PoliolIRES	8	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	500 bp KpnI-Fragment von psfmim in pGI3-CCR/ER_PoliolIRES (KpnI)
psf $\Delta$ mim-CCR/ER_PoliolIRES	7,9	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	400 bp KpnI-Fragment aus psfaBgI2Pst in pGI3-CCR/ER_PoliolIRES (KpnI)
psfmim-M1-CCR/ER_PoliolIRES	8,7	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1	1200 bp KpnI-Fragment aus psfmim-M1 in pGI3-CCR/ER_PoliolIRES (KpnI)
psfmim-M1inv-CCR/ER_PoliolIRES	8,7	C/EBP $\beta$ /ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	1200 bp KpnI-Fragment aus psfmim-M1inv in pGI3-CCR/ER_PoliolIRES (KpnI)
pGI3-Tet/VP16	5,8	tTA und Luciferase	-	1. PCR pTet-Off mit tTA(KpnI)for und tTA(NheI)rev 2. 1000 bp (KpnI/NheI)-PCR-Fragment in pGI3 basic (KpnI/NheI)
psfmimTRE-Tet/VP16	6,7	tTA und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Vektor mit TRE 870 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE in pGI3-Tet/VP16
psf $\Delta$ mimTRE-Tet/VP16	6,6	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Vektor mit TRE 700 bp KpnI-Fragment aus psf $\Delta$ mimTRE in pGI3-Tet/VP16
psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16	7,4	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	Vektor mit TRE 1560 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE-M1inv in pGI3-Tet/VP16
pGI3-Tet/VP16_PoliolIRES	6,5	tTA und Luciferase	-	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES 1. PCR pBS/PoliolIRES-Neo mit IRES(XhoI)for und IRES(HindIII)rev 2. 750 bp XhoI/HindIII-PCR-Fragment in pGI3-Tet/VP16 (XhoI/HindIII)
psfmimTRE-Tet/VP16_PoliolIRES	7,4	tTA und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 870 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE in pGI3-Tet/VP16_PoliolIRES
psf $\Delta$ mimTRE-Tet/VP16_PoliolIRES	7,2	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 700 bp KpnI-Fragment aus psf $\Delta$ mimTRE in pGI3-Tet/VP16_PoliolIRES

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16_PoliolIRES	8,1	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 1560 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE-M1inv in pGI3-Tet/VP16_PoliolIRES
psfmim-CCR $\Delta$ 110/ER_PoliolIRES	7,5	C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110/ER und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Bicistronische Konstrukt mit Polio IRES 500 bp EcoRI/NarI-Fragment aus pcDNA3-CCR $\Delta$ 110 in psfmim-CCR/ER_PoliolIRES (EcoRI/NarI partiell)
psfmim-M1-CCR $\Delta$ 110/ER_PoliolIRES	8,2	C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110/ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES 880 bp MluI/AflII-Fragment psfmim-M1-CCR/ER_PoliolIRES ins psfmim-CCR $\Delta$ 110/ER_PoliolIRES (MluI/AflII)
psfmim-M1inv $\Delta$ 110/ER_PoliolIRES	8,2	C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110/ER und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES 880 bp MluI/AflII-Fragment psfmim-M1inv-CCR/ER_PoliolIRES ins psfmim-CCR $\Delta$ 110/ER_PoliolIRES (MluI/AflII)
pGI3eGFP	4,0	eGFP	-	1. PCR SF $\beta$ 91eGFPwPRE mit eGFPfor und eGFP(XbaI)rev 2. 800 bp NcoI/XbaI-PCR-Fragment in pGI3 basic (NcoI/XbaI)
pCMVeGFP	4,6	eGFP	CMV	600 bp NruI/HindIII-Fragment aus pcDNA3 in pGI3eGFP (SmaI/HindIII)
pGI3-Tet/VP16_eGFP	5,0	tTA und eGFP	-	1000 bp KpnI/NheI-Fragment aus psfmimTRE-Tet/VP16 in pGI3eGFP (KpnI/NheI)
pGI3-Tet/VP16_IRES_eGFP	5,6	tTA und eGFP	-	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES 750 bp XhoI/HindIII-Fragment aus pGI3-Tet/VP16_PoliolIRES in pGI3-Tet/VP16_eGFP (XhoI/HindIII)
psfmimTRE-Tet/VP16_IRES_eGFP	6,5	tTA und Luciferase	SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 870 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE in pGI3-Tet/VP16_IRES_eGFP

Name	kb	Expressionsvektor für	Promotor/Enhancer	Info
psf $\Delta$ mimTRE-Tet/VP16_IRES_eGFP	6,4	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i>	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 700 bp KpnI-Fragment aus psf $\Delta$ mimTRE in pGI3-Tet/VP16_IRES_eGFP
psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16_IRES_eGFP	7,2	tTA und Luciferase	$\Delta$ SFFV-LTR/ <i>mim-1</i> /M1inv	Bicistronisches Konstrukt mit Polio IRES und TRE 1560 bp KpnI-Fragment aus psfmimTRE-M1inv in pGI3-Tet/VP16_IRES_eGFP

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Transformation von *E.coli*

#### 5.2.1.1 Medien und Agarplatten

LB <sub>0</sub> -Medium	1 % (w/v)	NaCl
	1% (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
LB <sub>Amp</sub> -Medium	+ 100 $\mu$ g/ml	Ampicillin
LB <sub>0</sub> -Agarplatten	1 % (w/v)	NaCl
	1% (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1,5 % (w/v)	Agar
LB <sub>Amp</sub> -Agarplatten	+ 100 $\mu$ g/ml	Ampicillin

#### 5.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien [69]

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 50 ml LB-Medium mit dem Bakterienstamm Top10F' angeimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft ( $OD_{650} = 0,1$ ) und bei 37°C bis zu einer  $OD_{650} = 0,7-1,0$  kultiviert. Je 50 ml dieser Bakteriensuspension wurden zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C), das Pellet in 20 ml einer eisgekühlten 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 6.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 20 ml einer



gekühlten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und weitere 25 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C), das Pellet in 2 ml einer kalten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, und mit 550 ml Glycerin versetzt. Je 100 ml Aliquots der Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70 °C gelagert.

### 5.2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen

Zu 100 µl der kompetenten Zellen wurden nach dem Auftauen 1 µg Plasmid-DNA (Retransformation) bzw. 10 µl eines Ligationsansatz gegeben und für 25 min auf Eis inkubiert. Nach 2 minütigem Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad, wurden die Zellen nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Für die phänotypische Expression der Resistenzen wurden anschließend 900 µl LB<sub>0</sub>-Medium zu den Zellen gegeben und diese für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen (1 min, 13.000 rpm, RT), wurden die Zellpellets in ca. 100 ml LB<sub>0</sub>-Medium resuspendiert und auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden 18 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden einzelne *E.coli*-Kolonien sichtbar, die im Weiteren analysiert werden konnten.

## 5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

### 5.2.2.1 Plasmidisolierung nach der TELT-Methode [70]

Diese Präparationsmethode eignet sich besonders zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli*-Stämmen. Die erhaltene DNA ist nicht frei von Protein und RNA, eignet sich aber gut zur Identifikation und Charakterisierung durch Restriktionsschnitte.

Benötigter Puffer:

TELT-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	62,5 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	2,5 M	LiCl
	0,4 % (v/v)	Triton X-100

Die Isolierung der Plasmide erfolgte aus 1,5 ml LB<sub>Amp</sub>-ÜN-Kultur transformierter *E.coli*-Zellen. Durch Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm) wurden die Zellen pelletiert und in 125 µl TELT-Puffer resuspendiert, dem 5-10 mg/ml Lysozym zugesetzt waren. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen nach 3 min bei 90 °C und 5 minütiger Inkubationszeit auf Eis lysiert

und Zelltrümmer sowie chromosomale DNA pelletiert (15 min, 14.000 rpm). Der die Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol (abs.) gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm), wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und je nach weiterer Verwendung in 50 µl H<sub>2</sub>O oder 50 µl TE-Puffer gelöst.

### 5.2.2.2 Plasmidisolierung mit anschließender Säulenaufreinigung

Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde mit Hilfe des QIAprep Spinmini Kits (QIAGEN) aus 3 ml LB<sub>Amp</sub>-ÜN-Kultur isoliert. Größere Mengen Plasmid-DNA (500 µg Maßstab) für Transfektionsexperimente wurden unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Maxi-Kits (QIAGEN) aus 200 ml ÜN-Kultur isoliert. Beide Kits wurden entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Protokolls eingesetzt. Das Prinzip der Plasmid-DNA-Isolierung beider Kits beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, der Fällung von genomischer DNA und Zelltrümmern und der Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule. Die an der Säule gebundene DNA wird mit einem Waschpuffer (pH 7,0) von Proteinverunreinigungen befreit und anschließend beim Maxi-Kit mit einem Elutionspuffer (pH 8,5), beim Mini-Kit mit H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Bei dem Maxi-Kit wurde die eluierte DNA durch Zugabe von Isopropanol nochmals gefällt, und nach anschließender Zentrifugation und Trocknung, in 200 µl TE-Puffer gelöst.

### 5.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA erfolgte mittels UV-Absorptionsspektroskopie. Die Absorptionsmaxima von DNA und RNA liegen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm, das von aromatischen Aminosäuren in Proteinen bei  $\lambda = 280$  nm. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  beträgt bei einer reinen DNA-Lösung ca. 1,8, wobei geringere Werte auf Proteinverunreinigungen, höhere auf Verunreinigungen durch RNA hindeuten. Zur Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA dient als Referenz eine Lösung doppelsträngiger DNA der Konzentration 50 µg/µl mit einer  $OD_{260} = 1$ , zur Konzentrationsbestimmung von RNA eine Lösung einzelsträngiger RNA der Konzentration 40 µg/µl mit einer  $OD_{260} = 1$

### **5.2.3 Enzymatische Modifikation, Klonierung, Amplifikation und Sequenzierung von Plasmid-DNA**

#### **5.2.3.1 DNA-Restriktion**

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindrome DNA-Sequenzen und führen reproduzierbare Doppelstrangspaltungen durch. Bei der Spaltung beider DNA-Stränge an der gleichen Stelle entstehen glatte Enden (*blunt ends*), erfolgt der Schnitt versetzt, entstehen kohäsive Enden (*sticky ends*).

Der Restriktionsverdau wurde unter den vom Hersteller empfohlenen optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurden 1-2 U des Enzyms in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 60-90 min.

#### **5.2.3.2 Auffüllreaktion 5'überstehender Enden mit dem Klenow-Enzym [69]**

DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden können mit Hilfe des Klenow-Enzyms (Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E.coli* mit 5'-3'-Polymeraseaktivität und 3'-5'-Exonukleaseaktivität) aufgefüllt werden. Es entstehen glatte Strangenden, die für eine blunt-end-Ligation eingesetzt werden können.

Unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen, wurden für die Auffüllreaktion von 1 µg DNA-Fragment 1 U Klenow-Enzym, sowie dNTP-Mix (0,5 mM pro Nukleotid) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei 37°C, wurde die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms (10 min bei 70°C) gestoppt.

#### **5.2.3.3 Dephosphorylierung mit Shrimp alkalischer Phosphatase**

Vektoren die nur mit einem einzigen Restriktionsenzym geschnitten wurden, können bei der nachfolgenden Ligation leicht religieren. Um dies zu verhindern, ist es sinnvoll die Phosphatgruppen der freien 5'-Enden der doppelsträngigen DNA durch eine alkalische Phosphatase abzuspalten.

Hierzu wurden 0,5 – 1 µg DNA-Fragment mit 2 U Shrimp Alkalische Phosphatase (*Roche*, Mannheim) im mitgelieferten Puffer (10x) 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65°C vollständig inaktiviert.

#### **5.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente lassen sich gemäß ihrer Größe in einer Agarosematrix durch

Gelelektrophorese auftrennen. Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentgrößen so gewählt, dass eine optimale Trennung erfolgen konnte:

Fragmente < 300 bp	1,5 –2 % in 1 x TAE
Fragmente 300 bp – 2000 bp	1,0 %
Fragmente > 2000 bp	0,7 %

Die Elektrophorese wurde abhängig von der Größe des Gels bei 50-100 V in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard der DNA-Fragmente wurde die DNA-SmartLadder (*Eurogentec*) eingesetzt. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde das Gel 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in 1x TAE) inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Basen der DNA und kann durch Fluoreszenz im UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht werden.

#### 5.2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte standardmäßig mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (*QIAGEN*). Bei DNA-Fragmenten < 300 bp wurde zur Extraktion das GENE CLEAN-Geleextraktionskit (*Bio 101*) eingesetzt. Beide Kits wurden entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll verwendet. Nach dem Ausschneiden der DNA aus dem Agarosegel, und dem Auflösen der Agarose in einem Jodid-haltigen Puffer, erfolgte die Isolierung der DNA durch Anbindung an eine Säulenmatrix (QIAquick Gel Extraktion Kit) oder durch Adsorption an Glasmilch (GENE CLEAN-Geleextraktionskit). Nach mehreren Waschschritten mit ethanolischem Puffer, erfolgte die Elution der DNA von der Säule bzw. der Glasmilch in 30 –50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,5).

#### 5.2.3.6 DNA-Ligation

Für die Ligation von Nicht-PCR-Produkten wurde das Rapid-DNA-Ligation Kit (*Roche*) verwendet. Das Kit beinhaltet die T4-Ligase. Dieses Enzym ist in der Lage unter Energieverbrauch (ATP-Pyrophosphatspaltung) die Enden zweier DNA-Stränge über eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3`-Hydroxy- und der 5`-Phosphatgruppe miteinander zu verknüpfen. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen Ligationsreaktion, die mehrere Stunden dauert, ermöglicht das Rapid-DNA-Ligation Kit eine Ligation innerhalb von 5 min bei RT. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll, wobei das molare Verhältnis zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA 1:3 betrug.

### 5.2.3.7 Polymerase chain reaction (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen, enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an die komplementären Stränge der Template-DNA gebunden sind. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte – Denaturierung der Template-DNA, Anlagerung der Primer (Hybridisierung) und Synthese der komplementären DNA durch eine hitzestabile Polymerase kann der DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert werden.

Für einige in dieser Arbeit durchgeführte Klonierungen wurden die DNA-Fragmente mittels PCR unter Verwendung der unter 5.1.10 aufgelisteten Primer synthetisiert. Durch diese Primer wurden in manchen Fällen neue Restriktionsschnittstellen eingeführt. Die PCR wurde in einem 50 µl-Maßstab unter der Verwendung der Taq-DNA-Polymerase in speziellen PCR-Tubes (*Eppendorf*) durchgeführt.

Pipettierschema für die präparative PCR

10 x PCR Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je Nukleotid 10 mM)	1 µl
5'-Primer (10 µM)	2 µl
3'-Primer (10 µM)	2 µl
Template (30 ng/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Synthesezyklen wurden in einem PCR-Thermocycler (*Eppendorf*) wie folgt durchgeführt:

1 x	5 min	initiale Denaturierung	95°C
40 x	30 sec	Denaturierung	95°C
	40 sec	Primeranlagerung	T <sub>M</sub> – 2°C Primerabhängig
	60 sec	Elongation	72°C
1 x	5 min	finale Elongation	72°C

Die so erhaltenen PCR-Fragmente wurden zur weiteren Analyse in einen TOPO<sup>TM</sup>TA cloning Vektor kloniert (siehe 5.2.3.8).

### 5.2.3.8 Klonierung von PCR-Fragmenten in den TOPO TA cloning-Vektor

Die Taq-DNA-Polymerase hat eine templateunabhängige Transferaseaktivität, durch die an das 3'-Ende frisch amplifizierter PCR-Produkte ein zusätzliches Desoxyadenosin geheftet wird. Komplementär zu diesen A-Überhängen besitzt der linearisierte pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor des TOPO TA cloning-Kits (*Invitrogen*) 3'-Desoxythymidin-Überhänge, die es erlauben, PCR-Fragmente sehr effizient in diesen Vektor einzuklonieren. Zusätzlich ist an die Enden des pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektors eine Topoisomerase gekoppelt, die aufgrund ihrer Ligaseaktivität bewirkt, dass die Ligation von Vektor und PCR-Produkt innerhalb von 5 min bei RT spontan stattfindet.

Der folgende Reaktionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert:

1 µl	frisches PCR-Produkt
0,5 µl	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO-Vektor
3,5 µl	H <sub>2</sub> O

Da der pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor neben der Amp-Resistenz eine Kan-Resistenz trägt, erfolgte nach der Transformation des Ligationsansatz in *E.coli* Top10F' eine Selektion auf LB<sub>Kan</sub>-Platten. Auf diese Weise sollte das Wachstum von Bakterien, die mit dem Template-Plasmid der PCR-Reaktion transformiert wurden, unterdrückt werden. Zusätzlich enthielten die Selektionsplatten 0,01% X-Gal und 1 mM IPTG, um das Auffinden von Klonen mit korrekten Ligationsprodukt durch blau/weiß-Selektion zu erleichtern.

### 5.2.3.9 DNA-Sequenzierung [71]

Bei der DNA-Sequenzierung durch das Kettenabbruch-Verfahren werden DNA-Fragmente der zu untersuchenden Sequenz in einer PCR-Reaktion synthetisiert. Diese DNA-Fragmente besitzen ein durch den Sequenzierprimer definiertes 5'-Ende und ein variables 3'-Ende, und können in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (Sequenzgel) elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Sequenziergerät Gene Read IR4200 (*LI-COR*) verwendet. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht auf einer Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes des markierten Sequenzprimers durch einen Laser. Dieser IR-Laser ( $\lambda = 800 \text{ nm}$ ) rastert das Sequenzgel im unteren Viertel ab, und regt den Fluoreszenzfarbstoff eines vorbeilaufenden DNA-Fragments an. Es erfolgt eine Lichtemission, die vom Gerät detektiert und aufgezeichnet wird.

Für die Sequenzierreaktion wurde das DYEnamic Direct cycle sequencing Kit (*Amersham*) verwendet. Die eingesetzten fluoreszenzmarkierten Sequenzierprimer sind unter 5.1.10

aufgelistet. Die Sequenzierreaktionen wurden in speziellen PCR-Tubes (Eppendorf) durchgeführt.

#### Pipettierchema für die Sequenzierreaktion

A-, C-, G- oder T-Reaktionsmix	je 1 $\mu\text{l}$
Mastermix	je 5,5 $\mu\text{l}$
aus	
Sequenzierprimer (1 mM)	2 $\mu\text{l}$
Template-DNA (3-5 $\mu\text{g}$ )	15 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	5 $\mu\text{l}$

Die Synthesezyklen wurden in einem PCR-Thermocycler (*Eppendorf*) wie folgt durchgeführt:

1 x	5 min	initiale Denaturierung	95°C
40 x	30 sec	Denaturierung	95°C
	40 sec	Primeranlagerung	T <sub>M</sub> – 2°C Primerabhängig
	60 sec	Elongation	72°C
1 x	2 min	finale Elongation	72°C

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wurde den Proben 4  $\mu\text{l}$  Stop-Puffer zugesetzt. Dieser bewirkt zum einen die Denaturierung der DNA, zum anderen schützt er durch den enthaltenen Farbstoff Fuchsin den Fluoreszenzmarker vor einer Zersetzung durch einfallendes Licht. Die Proben wurden entweder bei – 20 °C gelagert oder jeweils 2  $\mu\text{l}$  davon direkt auf das Sequenziergel aufgetragen.

#### Zusammensetzung des Sequenziergels:

Sequenzgel Stammlösung	30,3 ml
40 % Polyacrylamidlösung	4,7 ml
TEMED	47 $\mu\text{l}$
10 % APS	220 $\mu\text{l}$

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte ÜN in 1xTBE-long-run Puffer. Es wurden folgende Geräteeinstellungen gewählt:

maximale Spannung	1500 V
maximale Stromstärke	35 mA

maximale Leistung	40 W
Temperatur	50 °C

#### 5.2.4 Präparation von [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP markierten Sonden

Die in den Northern-Blots (Kap. 5.2.6) und Southern-Blots (Kap. 5.2.5) verwendeten DNA-Sonden wurden unter Verwendung des Megaprime DNA-labelling Kits (*Amersham*) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll hergestellt. Zur Synthese der DNA-Sonde werden hierbei sogenannte „*Random Primer*“ eingesetzt. Diese Primer aus 8-12 zufällig angeordneten Nukleotiden werden mit der denaturierten Einzelstrang-DNA hybridisiert und die verbleibenden Zwischenräume bei 37°C durch eine DNA-Polymerase mit unmarkierten Nukleotiden und [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP (spezifische Aktivität > 3000 Ci/mmol) aufgefüllt. Das DNA-Fragment wurde durch Restriktion des entsprechenden Sequenzbereichs aus Plasmid-DNA gewonnen und nach der Isolierung aus dem Agarosegel (Kap. 5.2.3.5) in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Polymeraserreaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l EDTA (0,2 mM) gestoppt und das nicht eingebaute [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP über G50-Säulen (*Amersham*) nach dem Hersteller-Protokoll abgetrennt. Zur Kontrolle wurden die spezifische Aktivität der markierten Oligomere in einem Szintillationszähler gemessen. Es wurden nur Sonden mit Werten von >100.000 cpm/ $\mu$ l eingesetzt. Direkt vor der Verwendung wurden die Sonden 5 min bei 100°C denaturiert.

#### 5.2.5 Southern-Blot [72]

Der Southern-Blot ist ein Verfahren bei dem spezifische DNA-Restriktionsfragmente durch Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde in einem komplexen Fragment-Gemisch nachgewiesen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Southern-Blot Verfahren zur Analyse genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen eingesetzt.

##### 5.2.5.1 Isolierung der genomischen DNA

Benötigte Puffer:

Digestion Puffer	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl
	25 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	SDS
		pH 8,0



Jeweils ca.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 5 ml Digestion Puffer durch Vortexen resuspendiert und in ein 10 ml-Röhrchen überführt. Zum Abbau der Proteine wurde zu den Proben 50  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) gegeben und 18 h bei 37°C im Schüttelschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 5  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierzu wurden die Proben nach Zugabe einer VE des fertigen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)-Mischung (*Biomol*) 1 min gevortext, die obere DNA-haltige wässrige Phase vorsichtig in ein anderes Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von  $\frac{1}{2}$  VE Ammoniumacetat (7,5 M) und 2 VE Ethanol (abs.) gefällt. Nach der Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm), wurde das Pellet an der Luft getrocknet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 200  $\mu$ l TE Puffer gelöst.

Für die nachfolgende Restriktion wurde die Konzentration der DNA UV-spektrometrisch (Kap. 5.2.2.3) bestimmt.

### 5.2.5.2 Restriktion der genomischen DNA

Jeweils 25  $\mu$ g der genomischen DNA Proben wurden in 100  $\mu$ l Puffer 2 (NEB) mit 100 U NcoI und 100 U XbaI 3h bei 37°C verdaut. Zur Entfernung der Enzyme wurde erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung der DNA, wie in 5.2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde zum Schluss in 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.2.5.3 DNA-Transfer auf Nylonmembran

Benötigte Puffer:

Denaturierungslösung	0,5 N	NaOH
	1 M	NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M	Tris/HCl pH 7
	1,5 M	NaCl
Strippinglösung	0,1 x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS

Die verdauten Proben der genomischen DNA (Kap. 5.2.5.1) wurden nach Zugabe von 10  $\mu$ l DNA-Ladepuffer auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1xTBE-Puffer ca. 3 h bei 120 V. Als Referenz diente die DNA-SmartLadder (*Eurogentec*).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und neben einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. So konnten später die detektierten Signale den entsprechenden DNA-Banden im Agarosegel zugeordnet werden.

Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel zuerst 30 min in der Denaturierungslösung inkubiert, und weitere 30 min in der Neutralisierungslösung neutralisiert. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillarblotverfahren (siehe Abb. 5.2.5.) aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet. Nach dem Blotten (ÜN, RT in 10xSSC) wurde die DNA durch 100 UV-crosslinking ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ , für 100 s) mit einem UV-Transilluminator auf der Nylonmembran fixiert. Wenn die Membran nicht sofort für die Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde sie in Folie gewickelt und bei 4 °C gelagert.

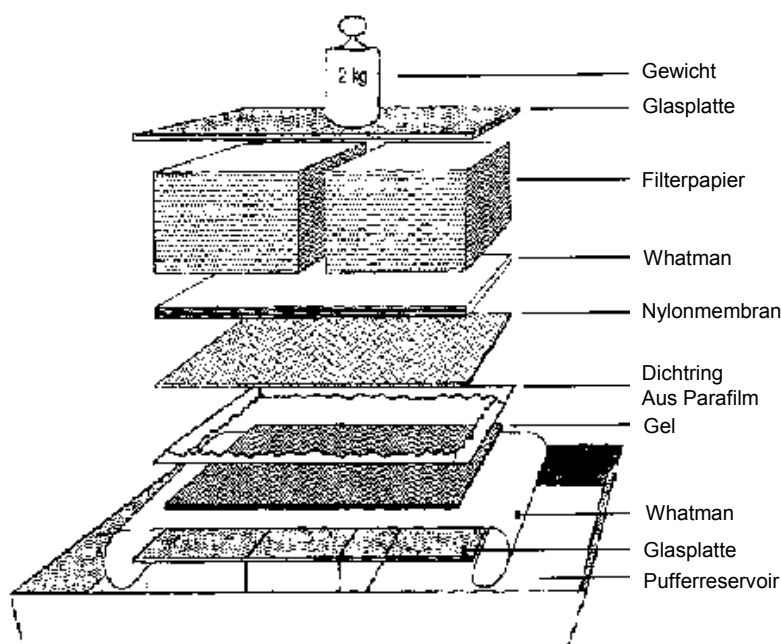


Abb. 5.2.5: Schematische Darstellung des Kapillarblotverfahrens.

#### 5.2.5.4 Southern-Hybridisierung

Benötigte Puffer:

Denhardt's Lösung	1 % (v/v)	Ficoll
	1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidin
	1 % (w/v)	BSA
Hybridisierungsmix	5x	SSC
	20 mM	NaPO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7
	5x	Denhardt's Lösung

	1 % (w/v)	SDS
	50 % (v/v)	Formamid
Waschlösung I	0,2x	SSC
	1 % (w/v)	SDS
Waschlösung II	0,1x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS

Vor der Hybridisierung der geblotteten DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde wurde die Nylonmembran mit 2xSSC angefeuchtet, so zusammengerollt, dass sich die zu hybridisierende DNA innen befindet und in eine Hybridisierungsröhre entsprechender Größe gesteckt. Die Prähybridisierung erfolgte für 5 h oder ÜN in Hybridisierungsmix (100 µl pro cm<sup>2</sup> Membran), dem vorher 100 µg/ml Lachssperma-DNA zugesetzt wurden, bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend verworfen und die Membran mit 50 µl markierter DNA-Sonde (Kap 5.2.4) in Hybridisierungsmix (50 µl pro cm<sup>2</sup> Membran) ÜN bei 42 °C hybridisiert. Es folgten mehrere Waschrunde bei 55 °C: 1 x 20 min mit Waschlösung I und 1-3 x 5-10 min mit Waschlösung II. Dann wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit einem Phosphoimager-Screen (*Fujifilm*) 1 d exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte mit dem Phosphoimager (*Fujifilm*).

Bei der wiederholten Hybridisierung einer Membran wurde die alte Sonde zuvor durch 25minütiges Aufkochen der Membran in 20-25 ml Strippinglösung abgelöst.

## 5.2.6 Northern-Blot

In Anlehnung an die nach E.M. Southern [72] benannte Nachweismethode für spezifische DNA-Restriktionsfragmente wird das Verfahren zum Nachweis spezifischer RNA-Moleküle „Northern-Blot“ genannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Northern-Blot Verfahren zur Analyse von gesamt RNA Proben eukaryontischer Zellen eingesetzt.

### 5.2.6.1 Isolierung der gesamt RNA

Die gesamt RNA-Isolierung aus den transfizierten Zellen (Kap. 5.3.10) beschrieben, erfolgte mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>RNA II (*Macherey-Nagel*) gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll. Nach der Lyse der Zellen und dem Homogenisieren des Lysats, wird die Säule hierbei durch mehrere Waschrunde über eine Säule aufgereinigt. (Vorteil des Kits ist, dass ein DNase-Verdau der Probe direkt auf der Säule erfolgt).

Die in einem Volumen von 60  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (RNase frei) eluierte RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung in 12  $\mu\text{l}$  Natriumacetat (2 M, pH 5.2) und 150  $\mu\text{l}$  Ethanol ÜN bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  präzipitiert.

### 5.2.6.2 RNA-Transfer auf Nylonmembran

Benötigte Puffer:

MOPS (10x)	0,01 M	EDTA
	0,2 M	MOPS
	0,05 M	Natriumacetat
		pH 7
RNA-Ladepuffer (1x)	50 % (v/v)	deionisiertes Formamid
	17,5 % (v/v)	Formaldehyd
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	1 % (v/v)	10xMOPS

Zusammensetzung des denaturierenden Agarosegels:

1 % (w/v)	Agarose
18 % (v/v)	Formaldehyd in 1xMOPS

Jeweils 20  $\mu\text{g}$  gesamt RNA wurden aus dem entsprechenden Volumen des RNA-Präzipitats (Kap. 5.2.6.1) abzentrifugiert (20 min, 10.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), das RNA-Pellet 30 min an der Luft getrocknet und in 20  $\mu\text{l}$  RNA Ladepuffer 10 min bei  $65^\circ\text{C}$  gelöst. Die RNA-Proben wurden auf einem 1 %igem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte in 1xMOPS ca. 3 h bei 60 V und 25 mA. Das Gel wurde anschließend 4 x 5 min in  $\text{H}_2\text{O}$  (RNase frei) geschwenkt und ÜN mittels Kapillarblotverfahren (siehe Abb. 5.2.5) in 10xSSC auf eine Nylonmembran geblottet. Anschließend wurde die DNA durch UV-crosslinking ( $\lambda = 254\text{ nm}$  für 100 s) und 2 h Inkubation bei  $80\text{ }^\circ\text{C}$  im Ofen auf der Nylonmembran fixiert. Wenn die Membran nicht sofort für die Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde sie in Folie gewickelt und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.2.6.3 Northern-Hybridisierung

Benötigte Puffer.

Hybridisierungsmix	5x	SSPE
	50 % (v/v)	deionisiertes Formamid
	5x	Denhardt's Lösung
	1 % (w/v)	SDS
	10 % (w/v)	Dextran
Waschlösung I	2x	SSPE
Waschlösung II	2x	SSPE
	2 % (w/v)	SDS
Waschlösung III	0,1x	SSPE
Strippinglösung	15 mM	NaCl
	0,1x	SSC
	1 % (w/v)	SDS

Vor der Hybridisierung der geblotteten RNA mit einer radioaktiv markierten Sonde wurde die Nylonmembran mit 2xSSPE angefeuchtet, so zusammengerollt, dass sich die zu hybridisierende RNA innen befindet und in eine Hybridisierungsröhre entsprechender Größe gesteckt. Die Prähybridisierung erfolgte für 5 h oder ÜN in Hybridisierungsmix (100 µl pro cm<sup>2</sup> Membran), dem vorher 100 µg/ml Lachssperma-DNA zugesetzt wurden, bei 42°C in einem Hybridisierungssofen. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend verworfen und die Membran mit 50 µl markierter DNA-Sonde (siehe Kap. 5.2.4) in Hybridisierungsmix (50 µl pro cm<sup>2</sup> Membran) ÜN bei 42 °C hybridisiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde der Hybridisierungsmix mit der DNA-Sonde maximal 14 Tage nach Präparation der Sonde bei 4°C aufbewahrt und ggf. nach erneuter Denaturierung der Sonde (5 min, 95°C, dann auf Eis abkühlen) wiederverwendet. Es folgten mehrere Waschriffe: 1 x 15 min mit Waschlösung I bei RT, 2 x 14 min mit Waschlösung II bei 65°C, 1-2 mal 5 min mit Waschlösung III bei 65°C. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit einem Phosphoimager Screen 3 h – 3 d exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte mit dem Phosphoimager.

Bei der wiederholten Hybridisierung einer Membran wurde die alte Sonde zuvor durch 25minütiges Aufkochen der Membran in 20-25 ml Strippinglösung abgelöst.

### 5.3 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von K.-H. Klempnauer, WWU Münster zur Verfügung gestellt. Alle Arbeiten wurden an einer Reinbank (*Zapf Instruments*) durchgeführt.

#### 5.3.1 Zelllinien

BM2	AMV-transformierte Myeloblasten	Huhn	Suspensionszellen	Burk et al. [11]
QT6 <sub>2-1</sub>	Fibroblasten	Wachtel	adhärente Zellen	Moscovici et al., 1977 [73]

#### 5.3.2 Medien

BM2 Medium	10 % (v/v) TBP
	5 % (v/v) FKS
	5 % (v/v) HS
	1 % (v/v) L-Glutamin
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640
QT6 <sub>2-1</sub> Medium	8 % (v/v) FKS
	2 % (v/v) HS
	1 % (v/v) L-Glutamin
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in IMDM

#### 5.3.3 Zellpassage

Die adhärent wachsenden Zellen QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit dem entsprechenden Medium in sterilen Petrischalen oder T75-Kulturflaschen kultiviert, die aufgrund ihrer rauhen, hydrophilen Oberfläche eine Anheftung der Zellen begünstigen. Die BM2 Zellen, als Suspensionszellen wurden in Petrischalen ohne Beschichtung vermehrt. Die Anzucht aller Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (*WTB Binder*) bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre. Zum Umsetzen der QT6<sub>2-1</sub> Zellen in den Kulturflaschen wurden die konfluenten Zellen nach Entfernung des Nährmediums, zweimal mit PBS-Puffer (37°C) gewaschen und durch zweiminütige Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von

der Flasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und je nach Bedarf 1:5 bis 1:20 verdünnt und erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

Die BM2 Zellen, als Suspensionszellen, wurden bei entsprechender Dichte durch Resuspension in frischem Kulturmedium (37°C) je nach Bedarf 1:5 bis 1:30 verdünnt.

#### 5.3.4 Lagerung von Zellen

Exponentiell wachsende Zellen wurden pelletiert (10 min, 500 rpm, RT), in FKS mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen (*Greiner Labortechnik*) langsam (1°C/min) eingefroren.

#### 5.3.5 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärenenten wachsenden Zellen zuerst trypsinisiert und in Kulturmedium suspendiert. 10 µl Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer (*Merck AG*, Darmstadt) gegeben, und aus der Zahl der in einem vorgegebenen Bereich ausgezählten Zellen die Konzentration der Zellsuspension berechnet (100 ausgezählte Zellen =  $1 \times 10^6$  Zellen /ml Zellsuspension).

#### 5.3.6 Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation [74]

Bei der Kalziumphosphat-Kopräzipitation macht man sich zu Nutze, dass Plasmid-DNA an naszierende Kalziumphosphat-Kristalle bindet. Die DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitate adsorbieren auf der Zelloberfläche adhärenenter Zellen und werden durch Endocytose aufgenommen. Durch einen drei Stunden nach der Transfektion durchgeführten Glycerinschock kann eine Verbesserung der Transfektionseffizienz erreicht werden. Hierbei wird auf die Zellen ein osmotischer Druck ausgeübt, der die Zellmembran strapaziert und die Aufnahme von Fremd-DNA erleichtert. Ein Teil der aufgenommenen DNA entgeht dem Abbau im Cytoplasma, gelangt in den Zellkern und kann dort exprimiert werden [75].

Benötigte Puffer:

DNA-Fällungspuffer	10 mM	Tris/HCl pH 7,8
	1 mM	EDTA
	300 mM	NaCl
Glycerinschocklösung	15 % (v/v)	Glycerin

(steril filtriert)	in 1 X HBS	
HBS-Puffer (2x)	50 mM	HEPES
(steril filtriert)	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		pH 7,13

Die Transfektion der in dieser Arbeit verwendeten QT6<sub>2-1</sub> Zellen erfolgte mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation. Hierzu wurden die Zellen am Vortag auf Zellkulturschalen (Ø 10 cm) mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Die zu transfizierende DNA wurde in 150 µl DNA-Fällungspuffer und 600 µl Ethanol (abs.) ÜN bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt und anschließend pelletiert (15 min, 14.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ). Unter der Reinbank wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 438 µl ddH<sub>2</sub>O und 62 µl CaCl<sub>2</sub> (2 M) resuspendiert. Bei laufendem Vortex wurde die DNA-Lösung langsam in 500 µl vorgelegten HBS-Puffer (2x) getropft und danach auf die Zellen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation wurde der Glycerinschock durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 2 min mit je 3 ml Glycerinschocklösung ( $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS-Puffer ( $37^\circ\text{C}$ ) gewaschen und je 10 ml frisches Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) zugegeben. Danach wurden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 5.3.7 Transfektion durch Elektroporation [76]

Bei dieser physikalischen Transfektionsmethode werden die Zellmembranen durch einen kurzen elektrischen Puls vorübergehend permeabel gemacht. Auf diese Weise kann im Medium vorhandene, zellfremde DNA durch Diffusion in die Zellen gelangen. Ein Teil der DNA gelangt bis in den Zellkern und wird dort exprimiert.

Die Transfektion der in dieser Arbeit verwendeten BM2 Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden, je nach Zelldichte, die Zellen aus 5 – 10 Kulturschalen pelletiert (10 min, 500 rpm, RT), einmal mit PBS ( $37^\circ\text{C}$ ) gewaschen und gezählt.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml wurden in PBS aufgenommen und jeweils 300 µl Zellsuspension in eine sterile Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt (d.h.  $6 \times 10^6$  Zellen pro Küvette). Die zu transfizierende DNA wurde zuvor mit 220 µl ddH<sub>2</sub>O, 30 µl Natriumacetat (1M) und 600 µl Ethanol 2 h bei  $-70^\circ\text{C}$  gefällt, pelletiert (15 min, 14.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Zugabe der Zellsuspension erfolgte die Elektroporation bei 300 V und 900 µF in einem Elektroporator (*PeqLab*). Anschließend wurde die Küvette ca. 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) wurde die Zellsuspension in eine Schale mit 10 ml Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) überführt und die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.



### 5.3.8 Transiente Transfektion

Werden die Zellen nach der Transfektion ohne einen Selektionsmarker kultiviert, findet keine Integration der aufgenommenen Fremd-DNA in das Genom der Empfängerzelle statt. Die zusätzliche genetische Information geht daher durch Abbau der DNA und Teilung der Zellen nach und nach wieder verloren. Folglich erfolgt die Expression der Fremd-DNA nur vorübergehend (transient).

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion geerntet.

### 5.3.9 Stabile Transfektion

Die Voraussetzung für eine stabile Expression eines Gens ist die Integration der entsprechenden kodierenden Region in das Genom der Empfängerzelle. Die Integration kann entweder ortsspezifisch durch homologe Rekombination oder zufällig an jeder beliebigen Stelle im Genom geschehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der zufälligen Integration angewandt.

Die QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden hierzu einen Tag nach der Transfektion in frischem Kulturmedium dem 500 µg/ml G418 zugefügt wurden, 1:3 verdünnt, und bei 37°C inkubiert bis auf der Platte deutlich einzelne Kolonien zu erkennen waren (ca. 2 Wochen). Die BM2 Zellen wurden einen Tag nach der Elektroporation ebenfalls mit 500 µg/ml G418 versetzt und solange bei 37°C inkubiert bis logarithmisches Wachstum der Zellen beobachtet werden konnte (ca. 3-4 Wochen).

### 5.3.10 Zellernte der adhärennten Zellen

Zur Ernte der adhärennt wachsenden Zellen, wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen mit 5 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber zunächst in 500 µl und dann noch einmal in 300 µl PBS abgeschabt und in ein auf Eis gelagertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Von der Zellsuspension wurden 300 µl für den Reporterassay und 500 µl für die SDS-Page genutzt. Wurde zusätzlich eine Gesamt-RNA-Isolierung durchgeführt, wurden die Zellsuspensionen (je 800 µl) zweier gleich transfizierter Schalen vereint und für den Reporterassay (300 µl), die SDS-Page (500 µl) und die Gesamt-RNA-Isolierung (800 µl) aufgeteilt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 5.000 rpm, 4°C) und der Überstand entfernt. Die Zellen für den Reporterassay wurden in 150 µl CAT-Lysis Puffer (*Roche*) resuspendiert, durch 5minütige Inkubation auf Eis lysiert und das Lysat durch Zentrifugation geklärt (5 min, 14.000 rpm,

4°C). Die Aufarbeitung der Zellpellets für die SDS-Page und Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte wie unter 5.4.2.1 und 5.2.6.1 beschrieben. Falls eine Weiterverarbeitung der Zellen nicht sofort erfolgte, wurden die Zellpellets bei -20°C aufbewahrt.

### **5.3.11 Zellernte der Suspensionszellen**

Die Suspensionzellen wurden zur Ernte in ein 50 ml Röhrchen (*Greiner Labortechnik*) überführt, pelletiert (5 min, 4000 rpm, 4°C) und einmal mit kaltem PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in PBS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension wie oben beschrieben für den Reportergenassay, die SDS-Page und die Gesamt-RNA-Isolierung aufgeteilt.

## **5.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **5.4.1 Reportergenassays**

Reportergenexperimente stellen eine Schlüsseltechnik bei der Untersuchung der Aktivität von Promotoren und Transkriptionsfaktoren in eukaryontischen Zellen dar. Hierbei wird der Promotor, dessen Funktion man untersuchen möchte, mit einem Reporter-Gen verknüpft. Das ist ein Gen, das normalerweise nicht in eukaryontischen Zellen vorkommt und für ein leicht zu quantifizierendes Genprodukt kodiert. Dieses Reportergenkonstrukt wird zusammen mit Expressionsvektoren von zu untersuchenden Transkriptionfaktoren transfiziert und die Expression des Reportergens quantifiziert.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde die Firefly Luciferase (kodierende Region aus pGI3basic) als Reportergen verwendet. Als Referenz zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pCMV $\beta$  eingesetzt, dieses kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors.

#### **5.4.1.1 Luciferaseassay**

Die Luciferase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Oxidation von Luciferin zu Oxo-Luciferin. Diese Reaktion ist mit einer Lichtemission verbunden, so dass die Luciferaseaktivität durch einen Photomultiplier quantifiziert werden kann.

Benötigte Puffer und Lösungen:

Reaktionspuffer	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
	2,2 mM	ATP
	11,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
Injektionspuffer	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
	0,2 M	Luciferin

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl des präparierten Zellextraktes (Kap. 5.3.10/5.3.11) in Meßröhrchen vorgelegt. Im Luminometer (*EGG&G Berthold*) wurden automatisch erst 300 µl Reaktionspuffer mit dem notwendigen ATP und dann 100 µl Injektionspuffer mit dem Substrat Luciferin injiziert. Die Chemolumineszenz wurde über einen Zeitraum von 4 sec detektiert.

#### 5.4.1.2 β-Galaktosidaseassay

Die β-Galaktosidase spaltet das Disaccharid Lactose, aber auch die glykosidische Bindung von Lactosederivaten. Für den β-Galaktosidaseassay wurde das Substrat Galacton eingesetzt. Im Galacton ist ein komplexer organischer Rest über eine glykosidische Bindung an Galaktose gekoppelt. Nach der Spaltung des Galactons durch die β-Galaktosidase zerfällt dieser organische Rest nach Erhöhung des pH Wertes. Die bei diesem Vorgang frei werdende Chemolumineszenz wird zur Quantifizierung der β-Galaktosidase genutzt.

Benötigte Puffer und Lösungen:

Reaktionspuffer	0,1 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 8
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,001 % (v/v)	Galacton
Stopppuffer	0,2 M	NaOH
	5 % (v/v)	Emerald Enhancer

Zur Quantifizierung der β-Galaktosidase wurden 5 µl Zellextrakt (Kap. 5.3.10/5.3.11) in Meßröhrchen vorgelegt. Im Luminometer wurden automatisch 100 µl Reaktionspuffer mit dem enthaltenen Substrat Galacton injiziert. Nach 30minütiger Inkubation bei RT erfolgte durch eine weitere automatische Injektion von 300 µl Stopppuffer der für den Zerfall des organischen Rests notwendige pH Shift. Das emittierte Licht wurde über einen Zeitraum von 5 sec detektiert und vom Luminometer quantifiziert.

## 5.4.2 Western-Blot

In Anlehnung an die nach E.M. Southern [72] benannte Nachweismethode für spezifische DNA-Restriktionsfragmente wird das Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine „Western-Blot“ genannt. Hierbei wird ein Proteingemisch durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht.

### 5.4.2.1 SDS-PAGE [77]

Die Proteinproben werden vor der SDS-Page durch Aufkochen in einem SDS-haltigem Probenpuffer denaturiert. Da SDS mit dem Protein über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert und eine Auflösung der dreidimensionalen Proteinstruktur bewirkt, nehmen die Proteine eine sogenannte *random-coil*-Konformation ein. Zusätzlich überdeckt die stark negative Ladung des SDS die Eigenladung des Proteins, so dass die Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel nicht aufgrund ihrer Ladung, sondern ausschließlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe bzw. Masse durch die Elektrophorese aufgetrennt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich in 10%igen Polyacrylamid-Gelen.

Benötigte Puffer :

SDS-PAGE Probenpuffer (1x)	0,65 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerol
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT

Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels (10 %ig):

Trenngel	11,5 ml	Tris/HCl (1M) pH 8,8
	8,3 ml	H <sub>2</sub> O
	9,7 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
	150 µl	SDS (20% w/v)
	295 µl	APS (10% w/v)
	15 µl	TEMED

Sammelgel	400 ml	Tris/HCl (1M) pH 6,8
	5 ml	H <sub>2</sub> O
	975 µl	Acrylamid/Bisacrylamid
	32,5 µl	SDS (20% w/v)
	26 µl	APS (10% w/v)
	9 µl	TEMED

Die Pellets der transfizierten Zellen (Kap. 5.3.10/5.3.11) wurden in 100-150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte ÜN bei 5 – 8 mA in 1xSDS-Laufpuffer.

#### 5.4.2.2 Protein-Transfer auf Nitrozellulosemembran

Nach der SDS-Page wurden die Proteine mit dem Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte 1 h bei 80 V in 1x Blotpuffer und wurde durch eine unspezifische, reversible Proteinfärbung mit Ponceau S überprüft.

#### 5.4.2.3 Immundetektion

Benötigte Puffer:

Waschpuffer	1x	PBS
	0,05 % (v/v)	Tween-20
Magermilch-Mix	1x	Waschpuffer
	5 % (w/v)	Magermilchpulver

Alle Schritte der Immundetektion wurden bei RT durchgeführt. Freie Bindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation für 1 h in Magermilch-Mix abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem gewünschten Primärantikörper (Verdünnung 1 : 1000 in Magermilchmix) inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Primärantikörper wurde der Blot dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Zweitantikörper (Verdünnung 1 : 1000 in Magermilchmix) für 1 h inkubiert, und erneut dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran in 1xPBS-Puffer äquibriert. Die Proteindetektion erfolgte mit Hilfe des ECL Chemolumineszenz Dektektionssystem durch einminütige Inkubation des Blots mit einer 1:1 Mischung der Lösungen ECL1 und ECL2. Nach der

Inkubation wurde der Blot kurz in 1xPBS-Puffer geschwenkt und anschließend mit einem Fotofilm (*Eastman Kodak Company*) bis zur optimalen Belichtung des Films (10 s bis 3 h) exponiert.

## 5.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung eGFP-exprimierender Zellen erfolgte mit dem Mikroskop Leica DM IRB (*Leica*). Hierzu wurden die Zellen in den Zellkulturschalen zuerst im Phasenkontrast bei 100 facher Vergrößerung (Objektiv 2) gekollert und anschließend durch eine Quecksilberdampfampe (FITC Filter) zur Fluoreszenz angeregt. Die Bilder wurden mit der Leica DC (*Leica*) Kamera dokumentiert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Rekombinante *mim-1* Promotoren für die Genexpression in myelomonozytären Zellen

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Expressionssystem zu entwickeln, das sowohl eine auf myelomonozytäre Zellen begrenzte, als auch regulierbare Genexpression ermöglicht. Unter Beibehaltung dieser Eigenschaften soll das Expressionssystem außerdem in einen retroviralen Vektor integriert werden. Da der retrovirale Gentransfer eine effiziente Methode zur Transduktion primärer hämatopoietischer Zellen darstellt [78, 79] könnte ein solcher Expressionsvektor auf lange Sicht Anwendung im Bereich der Gentherapie myelomonozytärer Zellen finden.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der Promoter des ausschließlich in myelomonozytären Zellen exprimierten *mim-1* Gens [80] in einen komplexen Zusammenhang viraler Sequenzen und regulatorischer Elemente integriert. Anschließend wurde überprüft, ob der Promotor auch in diesem neuen Kontext weiterhin zellspezifisch ist, und ob die Zellspezifität für myelomonozytäre Zellen durch gezielte Kombination mit transkriptionellen Enhancerelementen noch verstärkt werden kann.

#### 6.1.1 Konstruktion der rekombinanten *mim-1* Promotorkonstrukte

Ein Hauptproblem bei der Konstruktion des oben beschriebenen retroviralen Vektors stellt die Kombination des zellspezifischen Promotors mit den viralen LTRs (*long terminal repeats*) dar. Diese für die Replikation und Integration des Virus essentiellen Sequenzen enthalten ebenfalls promotoraktive Bereiche, die in Kombination mit dem eingesetzten Promotor zu Promotor-Interferenzen führen, und der geforderten Zellspezifität entgegenwirken könnten.

Um die Expression ausschließlich durch den zellspezifischen *mim-1* Promotor zu steuern, ohne die oben beschriebenen viralen Funktionen zu beeinträchtigen, wurde der Promotor des *mim-1* Gens (Bp -227 - -22) nach Deletion der viralen Promotorsequenz, in die U3 (*unique*) Region der 5'-SFFV (*spleen focus forming virus*)-LTR kloniert (Abb. 6.1.1). Die R (*repeat*) und U5 Region des Virus blieben dabei erhalten. Ähnliche retrovirale Promotorkonstrukte wurden bereits in der Literatur beschrieben [81, 82].

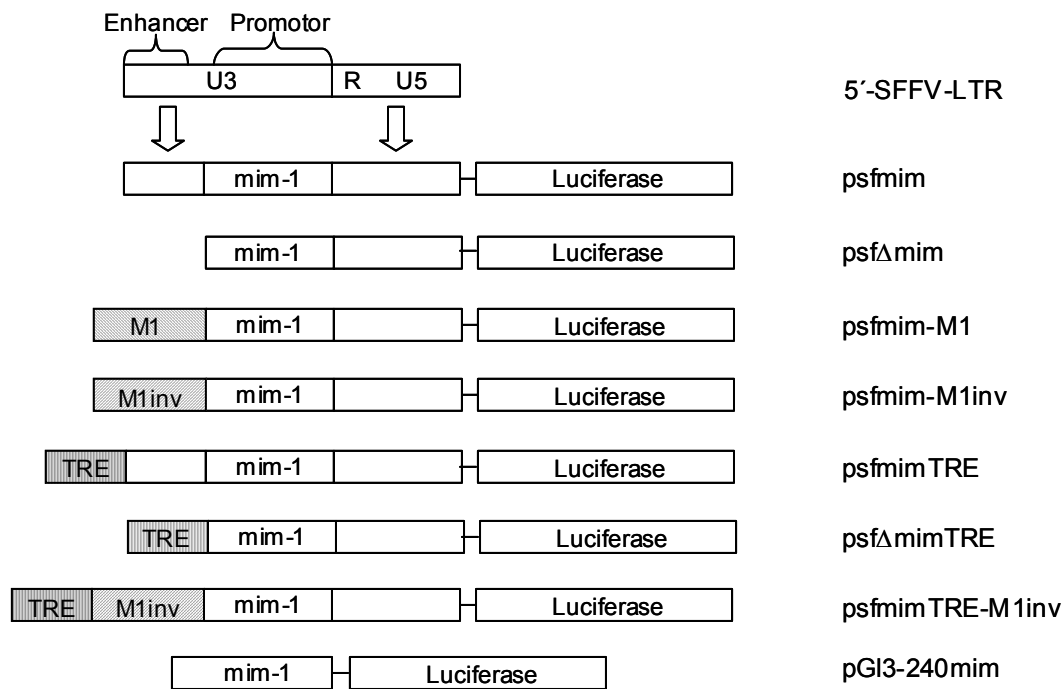


Abb. 6.1.1: Schematische Darstellung der rekombinanten *mim-1* Promotorkonstrukte. Dargestellt ist ebenfalls die 5'-SFFV-LTR. Die Pfeile kennzeichnen die in den rekombinanten *mim-1* Promotoren enthaltenen Bereiche der SFFV-LTR. Die Enhancer Region der SFFV-LTR befindet sich nur in psfmim und psfmimTRE.

In den Konstrukten psfmim und psfmimTRE wird der *mim-1* Promotor auf der 5'-Seite von Enhancersequenzen des SFF Virus flankiert. Der SFFV-Enhancer zeichnet sich durch seine stark aktivierende Wirkung auf die Genexpression in allen Zelllinien des hämatopoietischen Systems aus [83], und sollte deshalb erwartungsgemäß auch zu einer Aktivitätssteigerung des *mim-1* Promotors in diesen Zellen führen.

Bei der Konstruktion der Vektoren psfmim-M1, psfmim-M1inv bzw. psfmimTRE-M1inv wurde eine andere Strategie verfolgt, um den Promotor gezielt in myelomonozytären Zellen zu aktivieren, und somit die Spezifität für diese Zellen zu erhöhen. An die Stelle des SFFV-Enhancers, wurde eine circa 800 bp lange Sequenz kloniert, die sich in myeloiden Zellen durch eine Anhäufung DNase-I hypersensitiver Stellen auszeichnet. Diese als M1 bezeichnete Sequenz ist in der Lage die Expression durch den *mim-1* Promotor in myelomonozytären Zellen um ein Vielfaches zu steigern, und stellt damit eine potentielle LCR („*locus control region*“) dar. Der M1-Enhancer wurde dabei sowohl in der natürlich vorkommenden als auch in inverser Orientierung (M1inv) zum Promotor kloniert (unveröffentlichte Daten von J. Kintscher, WWU, Münster).

In den Konstrukten psfmimTRE, psf $\Delta$ mimTRE und psfmimTRE-M1 gehen dem SFFV -bzw. M1 Enhancer mehrere Kopien des DNA-Bindungsmotivs des Tet-Repressors, TRE („*tet response element*“) voraus. Diese Konstrukte sollen somit die Aktivität der Promotoren in den im weiteren zu konstruierenden tTA- regulierbaren Expressionssystemen wiedergeben.



Das Reportergergen pGI3-240mim enthält den nativen *mim-1* Promotor (Bp -240 - +150 des *mim-1* Gens; [80]).

Zur Quantifizierung der Promotoraktivität schließt sich an alle rekombinanten Promotoren ebenfalls die kodierende Sequenz der Luciferase an.

### 6.1.2 Untersuchung der Zellspezifität der *mim-1* Promotorkonstrukte

Zur Untersuchung der Zellspezifität wurden transiente Transfektionsexperimente in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen durchgeführt. BM2 Zellen exprimieren entsprechend ihres Differenzierungsstadiums große Mengen v-Myb und C/EBP (Kap. 3.2.1), und stellen die Zielzellen der *mim-1* Promotor gesteuerten Expressionssysteme dar. QT6<sub>2-1</sub> Zellen sind nicht-hämatopoietische Zellen, die weder v-Myb noch C/EBP exprimieren, und dienen als Kontrollsystem.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 6.1.2 dargestellt.

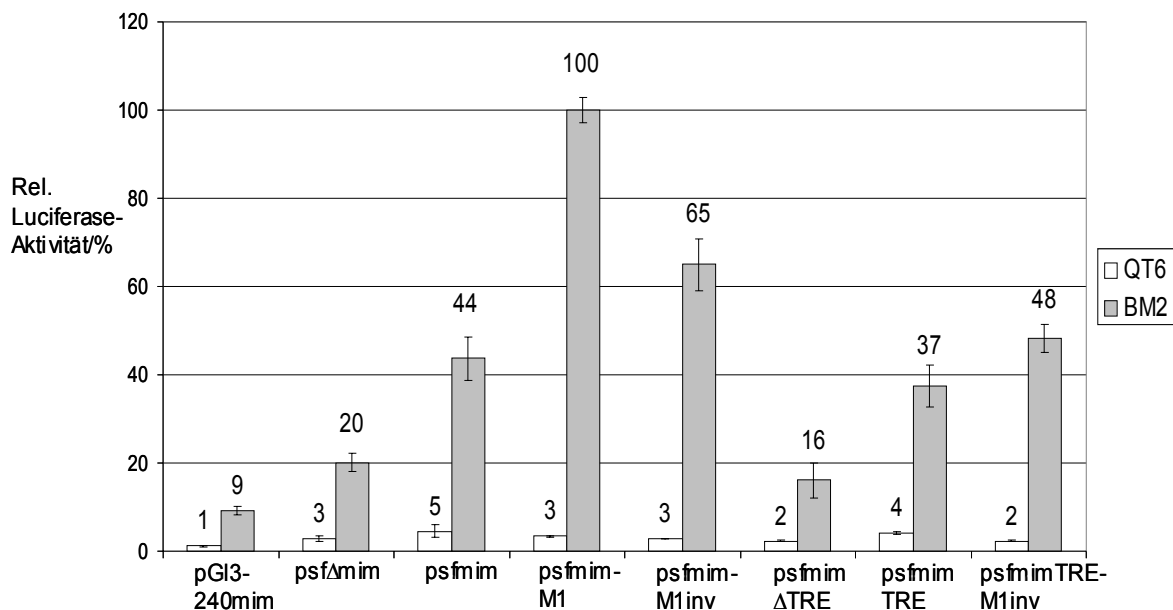


Abb. 6.1.2: Vergleich der Aktivität der Promotorkonstrukte in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.

QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mittels Kalziumphosphat-Präzipitation mit 3 µg der angegebenen Reportergergenkonstrukte und 0,5 µg pCMVβ kotransfiziert. BM2 Zellen wurden mit je 18 µg Reportergergenkonstrukt und 3 µg pCMVβ elektroporetisch bei 300 V und 90 µF transfiziert. Alle Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet und Luciferase-, sowie β-Galaktosidase- Assays durchgeführt. Die relative Luciferase-Aktivität ergibt sich als Quotient aus absoluter Luciferaseaktivität zu absoluter β-Galaktosidaseaktivität. Die maximale relative Luciferaseaktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und mit Fehlerbalken versehen. Die Ergebnisse in QT6<sub>2-1</sub> Zellen werden durch die weißen, die in BM2 Zellen durch die grauen Balken repräsentiert.

In QT6<sub>2-1</sub> Zellen besitzt der Promotor des Vektors psfmim die größte Aktivität. Die Luciferaseexpression von dem durch Enhancersequenzen des SFF Virus flankierten *mim-1*

Promotors ist fast doppelt so hoch wie durch den Promotor allein, im entsprechenden Deletionskonstrukt *psfΔmim*. Der SFFV-Enhancer steigert demnach die Aktivität des Promotors auch in nicht-hämatopoietischen Zellen, wie den QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Im Gegensatz zum SFFV-Enhancer verstärkt der Enhancer M1 die Luciferaseexpression durch den *mim-1* Promotor in QT6<sub>2-1</sub> Zellen nicht. Die Luciferaseaktivität der mit den Vektoren *psfmim-M1* bzw. *psfmim-M1inv* transfizierten Zellen entspricht dem Wert der mit *psfΔmim* transfizierten Zellen. In den nicht-myelomonozytären QT6<sub>2-1</sub> Zellen besitzt der M1 Enhancer demnach erwartungsgemäß keinen aktivierenden Einfluß auf den *mim-1* Promotor.

Die Luciferaseexpression durch die Vektoren *psfmimTRE*, *psfmimΔTRE* und *psfmimTRE-M1inv* ist etwas geringer, als die der entsprechenden Konstrukte ohne TRE-Element. Die zusätzlichen Sequenzen des Tet-Operators scheinen den Promotor folglich geringfügig zu deaktivieren.

In *pGI3-240mim* ist der Promotor weniger aktiv als in *psfΔmim*. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass die Promotorregion in *pGI3-240mim* zusätzlich das Startkodon des *mim-1* Gens enthält, daraus resultiert eine verringerte Effizienz der Initiation der Transfektion am Luciferase-Startkodon.

Plasmide	Zellspezifitätsfaktor
<i>pGI3-240mim</i>	8
<i>psfΔmim</i>	8
<i>psfmim</i>	10
<i>psfmim-M1</i>	29
<i>psfmim-M1inv</i>	23
<i>psfmimΔTRE</i>	7
<i>psfmimTRE</i>	9
<i>psfmimTRE-M1inv</i>	21

Tab. 6.1.2 : Zellspezifität der untersuchten *mim-1* Promotorkonstrukte im Vergleich. Der Zellspezifitätsfaktor ergibt sich aus der rel. Luciferaseaktivität der Reportergerkonstrukte in BM2 zur rel. Luciferaseaktivität in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (siehe Abb. 6.1.2).

Wie in der Tabelle 6.2.1 dargestellt, steigt die Luciferaseexpression aller untersuchten Konstrukte in BM2 Zellen im Vergleich zur Expression in QT6<sub>2-1</sub> Zellen an. Besonders auffällig ist die Aktivitätssteigerung bei dem Vektor *psfmim-M1*. Hier ist die exprimierte Luciferasemenge 29 mal höher als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Die ermittelte relative Luciferaseaktivität, der mit dem Plasmid *psfmim-M1inv* transfizierten BM2 Zellen beträgt nur ungefähr zwei Drittel des von *psfmim-M1* erreichten maximalen Wertes. Durch die geringe Aktivität des *mim-1* Promotors kombiniert mit dem M1 Enhancer in QT6<sub>2-1</sub> Zellen, ergibt sich trotzdem eine beachtliche Aktivitätssteigerung von QT6<sub>2-1</sub> zu BM2 Zellen um den Faktor 23. Da die Expression durch *psfmim* in BM2 Zellen weniger als die Hälfte des maximalen Wertes beträgt, ergibt sich bei vergleichsweise hohen Werten in QT6<sub>2-1</sub> Zellen, ein Faktor von 10. Die Expression durch den *mim-1* Promotor ohne Enhancer in *psfΔmim* ist acht Mal höher als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen, wie aus den Werten *psfΔmim* und *pGI3-240mim* transfizierter Zellen

ersichtlich.

Auch in BM2 Zellen besitzen die TRE-Konstrukte eine geringere Aktivität als die nicht-TRE-Konstrukte, die Faktoren entsprechen denen der Konstrukte ohne TRE.

Der Vergleich der Luciferaseexpression der Vektoren *psfmim* und *psfΔmim* zeigt, dass die Aktivität des Promotors in BM2 Zellen durch den SFFV-Enhancer noch gesteigert werden kann. Die Tatsache, dass der *mim-1*/SFFV-Promotor auch in QT6<sub>2-1</sub> Zellen eine höhere Aktivität als der einfache Promotor besitzt, zeigt, dass sich die aktivierende Wirkung des SFFV-Enhancers auch auf nicht-hämatopoietische Zellen erstreckt.

Im Gegensatz dazu verändert der M1-Enhancer die basale Aktivität des *mim-1* Promotors in QT6<sub>2-1</sub> Zellen nicht, und bewirkt eine deutliche Erhöhung der Luciferaseaktivität in BM2 Zellen (Faktor > 20). Überraschenderweise ergeben sich, je nach Orientierung der M1-Sequenzen relativ zum Promotor, Unterschiede in der Aktivität des Promotors. Dies widerspricht im Prinzip der Definition eines reinen transkriptionellen Enhancers, als „*cis*-aktive Sequenz, welche die Aktivität (mancher) eukaryontischer Promotoren steigert und unabhängig von Orientierung und Position (stromaufwärts oder –abwärts) relativ zum Promotor wirkt“ [84]. Eine LCR wird ebenfalls als Andockpunkt verschiedener *trans*-wirkender Faktoren verstanden. Diese Faktoren öffnen in einem kooperativen Prozess die Chromatinstruktur eines Genlocus, und machen ihn somit für die Transkription zugänglich [85]. Da sich eine solche regulatorische Sequenz *in vivo* mehrere hundert Basenpaare stromauf- oder abwärts vom eigentlichen Transkriptionsstartpunkt entfernt befindet, können an die LCR gebundene Faktoren durch Faltung der DNA in beliebiger Richtung in Kontakt mit der Transkriptionsmaschinerie am Promotor treten.

In den hier untersuchten Konstrukten befindet sich M1-Region direkt am 5'Ende des Promotors, eventuell wird dadurch die Flexibilität der DNA eingeschränkt, was wiederum eine bevorzugte Orientierung der Sequenz zur Folge haben könnte.

Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten [86] gezeigt werden konnte, behält der *mim-1* Promotor auch nach Integration in die LTR des SFFV Virus und Kombination mit dem TRE-Element seine Zellspezifität für myelomonozytäre Zellen. Sowohl der eingesetzte SFFV, als auch der M1 Enhancer können die Zellspezifität des Promotors für hämatopoietische Zellen verstärken. Besonders eindrucksvoll geschieht dies durch den M1 Enhancer, der die Aktivität des Promotors in BM2 Zellen im Vergleich zu QT6<sub>2-1</sub> Zellen um das 30fache erhöht.

Folglich stellen die untersuchten Promotoren geeignete Bausteine für die Konstruktion der zellspezifischen Expressionssysteme dar.

## 6.2 Regulierbarkeit der Promotoren durch die Faktoren C/EBP $\beta$ /ER und tTA

Neben der Zellspezifität stellt die Regulierbarkeit der Expression des Transgens ein essentielles Kriterium der zu etablierenden Expressionssysteme dar.

Die Regulation der Expression soll dabei durch unterschiedliche Liganden-induzierbare Transaktivatoren erfolgen. Zum einen durch eine bereits in vorangegangenen Arbeiten entwickelte  $\beta$ -Estradiol (Es) induzierbare Variante des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$ , C/EBP $\beta$ /ER (ER=*estrogen receptor*, Östrogenrezeptor) [86]. Oder durch den Tetracyclin (Tet) bzw. Doxycylin (Dox) regulierbaren chimären Transaktivator tTA des von Gossen und Bujard [22] entwickelten Tet-Off Systems.

Durch Kotransfektionsexperimente wurde untersucht, ob die Expression der *mim-1*-Promotorkonstrukte (Abb 6.1.1) tatsächlich durch die Faktoren C/EBP $\beta$ /ER bzw. tTA reguliert werden kann.

Hierzu wurden Reporterstudien in QT6<sub>2-1</sub> Zellen durchgeführt. In QT6<sub>2-1</sub> Zellen ist die Aktivität der konstruierten rekombinanten *mim-1* Promotoren durchweg gering (Kap. 6.1), die Koexpression eines funktionierenden Transaktivators sollte demnach zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des jeweiligen Promotors führen.

### 6.2.1 Untersuchung der Regulierbarkeit der rekombinanten *mim-1* Promotoren durch den Faktor C/EBP $\beta$ /ER

Um die Regulierbarkeit der Promotoren durch den Faktor C/EBP $\beta$ /ER zu bestimmen, wurden die Reportergenkonstrukte *psf $\Delta$ mim*, *psfmim*, *psfmim-M1* und *psfmim-M1inv* zusammen mit dem Vektor pCRNC-CCR/ER in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert. Zum Vergleich der Stärke der Transaktivierung und der Regulierbarkeit wurde zum Reportergen *psfmim* außerdem der Vektor pCDNA3-CCR kotransfiziert. pCRNC-CCR/ER und pCDNA3-CCR sind eukaryontische Expressionsvektoren, die für das Fusionsprotein C/EBP $\beta$ /ER bzw. den einfachen Transaktivator C/EBP $\beta$  kodieren. In beiden Vektoren wird die Expression der Proteine durch den starken, konstitutiv aktiven CMV-Promotor kontrolliert (Abb. 6.2.1A), so dass angenommen werden kann, dass beide Proteine im selben Maße und auf hohem Niveau exprimiert werden. Zum Vergleich der Luciferasexpression wurden zusätzlich Zellen mit dem Vektor pCMVluc transfiziert. In diesem Vektor kontrolliert der CMV-Promotor die Expression des Reportergens Luciferase. Um sicherzustellen, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen des Transaktivators exprimiert wurden, erfolgte außerdem ein immunologischer Nachweis der Proteine C/EBP $\beta$ /ER und C/EBP $\beta$ .

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.2.1 dargestellt.

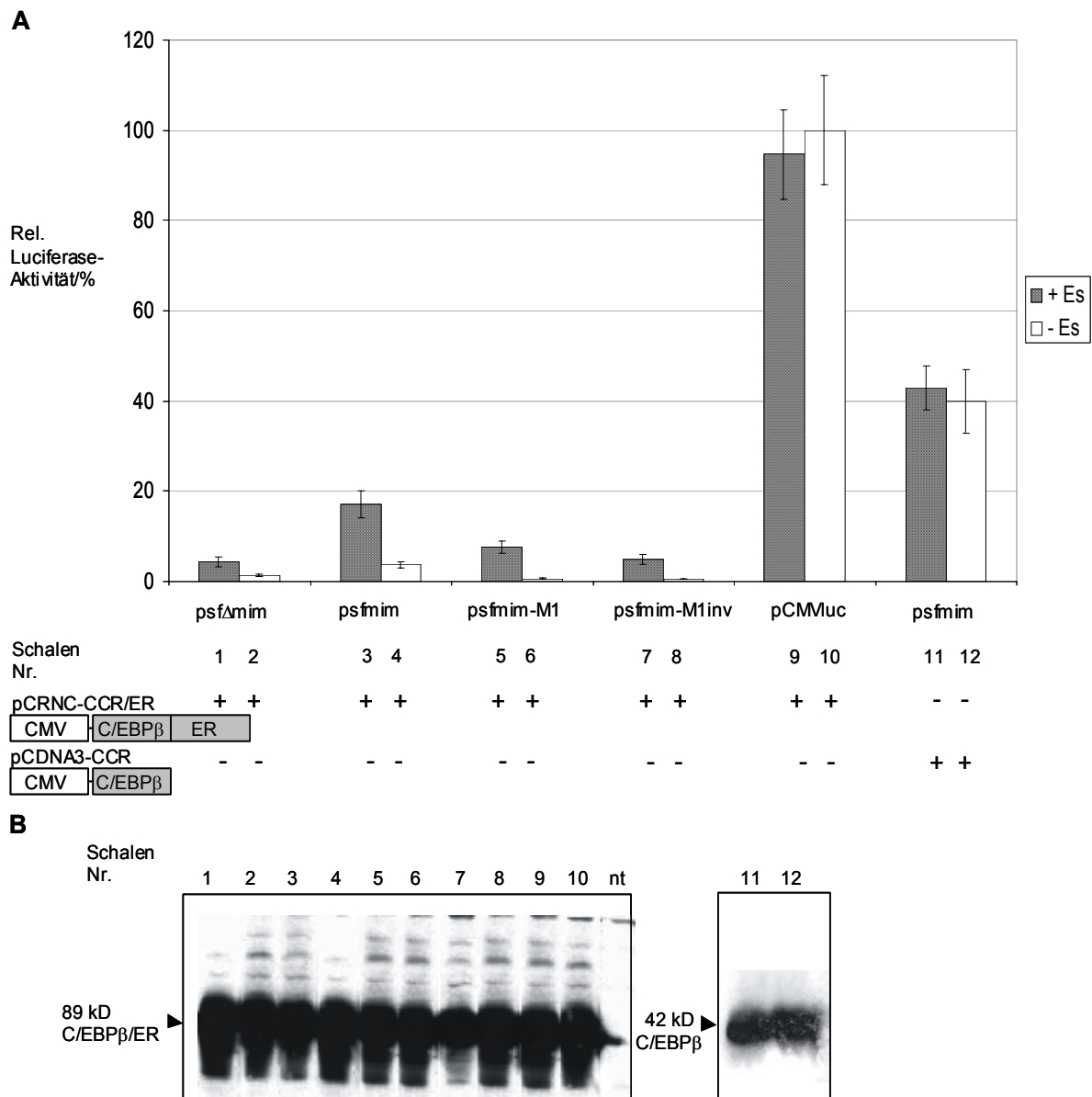


Abb. 6.2.1: Regulierbarkeit der Expression der *mim-1* Reporter-genkonstrukte durch C/EBPβ/ER. Je zwei Schalen QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit je 3 µg der angegebenen Reporter-genkonstrukte, 1 µg pCRNC-CCR/ER (bzw. 1 µg pCDNA3-CCR in den Schalen 11 und 12 ) und 0,5 µg pCMVβ kotransfiziert. Je eine Schale gleich transfizierter Zellen wurde in Gegenwart (+) von 2 µM Es kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und entsprechende Extrakte für die Reporter-genassays, bzw. die SDS-Page hergestellt. In A) ergibt sich die rel. Luciferase-Aktivität als Quotient aus absoluter Luciferaseaktivität zu absoluter β-Galaktosidaseaktivität. Die maximale rel. Luciferaseaktivität wurde auf 100% normiert. Die Ergebnisse basieren auf drei unabhängigen Experimenten. Die Luciferaseexpression der in Gegenwart von Es kultivierten Zellen wird durch die gestreiften Balken repräsentiert. Nach SDS-Page (10%) und Transfer auf Nitrozellulosemembran, erfolgte die Immunodetektion der Proteine C/EBPβ/ER bzw. C/EBPβ (B) mit dem Antikörper α-chCCR. (nt = untransfizierte QT6<sub>2-1</sub> Zellen).

Wie der Abbildung 6.2.1B zu entnehmen ist, enthalten die Zellextrakte gleiche Mengen des C/EBPβ/ER-Proteins. Auffällig ist, dass die β-Gal Expression durch den CMV Promotor in Zellen mit Es niedriger ist als in Zellen ohne Hormon (Daten nicht angegeben). Ebenso

verhält es sich bei der nicht normierten Luciferaseexpression durch den CMV Promotor. In Zellen mit Es kommt es zum „Squelching“. Dieses Phänomen wurde wiederholt bei hohen Konzentrationen eines Transaktivators in Zellen beobachtet [24] [25]. Durch das Abfangen endogener Transkriptionsfaktoren, verändert der Transaktivator das endogene Transkriptionslevel und wirkt auf diese Weise toxisch. Dieser Effekt kann also als erstes Indiz gesehen werden, dass der Faktor C/EBP $\beta$ /ER in Gegenwart von Es einen potenten Transaktivator darstellt. Die Normierung hebt den Effekt des Squelchings auf, und ermöglicht so den Vergleich der Luciferaseexpression.

Plasmide	Induktionsfaktor <sub>C/EBP<math>\beta</math></sub>
psf $\Delta$ mim	3
psfmim	5
psfmim-M1	12
psfmim-M1inv	11
pCMVluc	1

Tab. 6.2.1: Induzierbarkeit durch den Faktor C/EBP $\beta$ /ER im Vergleich. Der Induktionsfaktor<sub>C/EBP $\beta$</sub>  ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Es.

Die Aktivität der Promotoren der verschiedenen Konstrukte in Gegenwart von C/EBP $\beta$ /ER ohne Es verhält sich wie in dem vorangegangenen Reporterexperiment in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (Abb. 6.1.2). Die Luciferaseexpression durch den starken, konstitutiv aktiven CMV-Promotor ist um den Faktor 30 höher, als durch psfmim.

In Gegenwart von Es steigt die Aktivität aller *mim-1*-Promotorkonstrukte (Tab. 6.2.1). Die Expression durch psfmim beträgt im induzierten Zustand ungefähr ein Fünftel der Expression durch den CMV Promotor.

Zwar ist das Expressionslevel der beiden aktivierten M1-Enhancer Konstrukte nur halb so hoch wie durch psfmim, durch die niedrigere basale Expression ergibt sich allerdings ein fast doppelt so hoher Induktionswert von circa 12.

Im Gegensatz zur Es-abhängigen Variante, aktiviert der Faktor C/EBP $\beta$  den *mim-1* Promotor Hormon-unabhängig.

Trotz gleicher Mengen der koexprimierten Proteine ist die Aktivierung des *mim-1* Promotors in psfmim durch C/EBP $\beta$  stärker als durch C/EBP $\beta$ /ER. Wie bereits in anderen Untersuchungen Es-regulierbarer C/EBP-Faktoren festgestellt wurde [86], nimmt durch die Fusion der ER-Sequenz an die DNA-Bindungsdomäne die DNA-Bindungskonstante und somit auch das Transaktivierungspotential des Faktors ab.

Die Induktion der Promotoren entspricht im Prinzip der Tendenz der Aktivitätszunahme in myelomonozytären Zellen (Kap. 6.1). Der wesentlich geringere Induktionswert der M1 Enhancerkonstrukte im Vergleich zur Aktivitätssteigerung in BM2 Zellen verdeutlicht jedoch, dass die zellspezifische Aktivierung der Expression, besonders durch die M1-Region, ein

kooperativer Prozess mehrerer Faktoren ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression aller Promotorkonstrukte in Gegenwart von C/EBP $\beta$ /ER durch die Zugabe von Es induziert werden kann. Der Induktionsfaktor liegt zwischen drei bei psf $\Delta$ mim und 12 bei psfmim-M1, ebenso variiert die exprimierte Luciferasemenge im induzierten Zustand zwischen 6 und 18% bezogen auf die Expression durch den CMV Promotor.

### **6.2.2 Untersuchung der Regulierbarkeit der *mim-1* Promotoren durch den Faktor tTA**

Zur Evaluierung der Regulierbarkeit der Expression durch den Faktor tTA wurden analoge Transfektionsexperimente wie unter 6.2.1 durchgeführt.

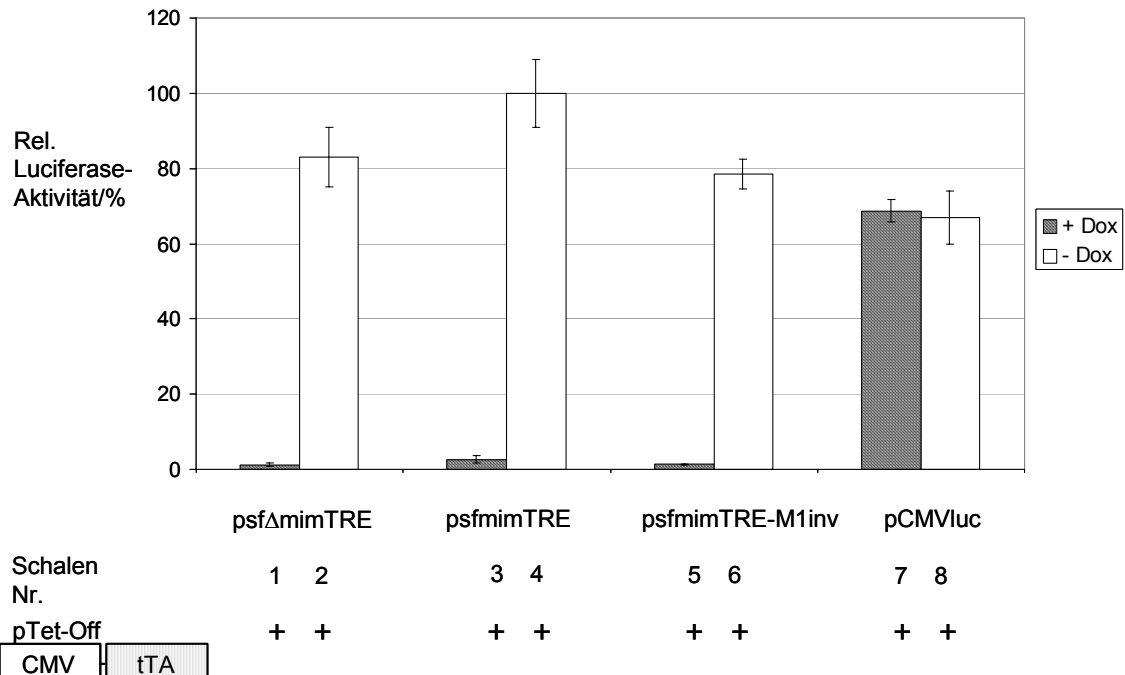
Hierzu wurden die Reportergenkonstrukte psf $\Delta$ mimTRE, psfmimTRE und psfmimTRE-M1inv zusammen mit dem Vektor pTet-Off in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Neben der Luciferasexpression, wurde zur Kontrolle die exprimierte tTA-Proteinmenge quantifiziert (Abb. 6.2.2).

Wie in der Literatur beschrieben [26-29] tolerieren verschiedene Zelltypen keine hohen Konzentrationen des Transaktivators tTA. Auch in den untersuchten QT6<sub>2-1</sub> Zellen kommt es durch die konstitutive Expression des Faktors tTA zum „*Squelching*“, wie anhand der um den Faktor 10 geringeren  $\beta$ -Gal Expression der Zellen ohne im Vergleich zu denen mit Dox abgeleitet werden kann (Daten nicht angegeben). Der Squelching-Effekt ist damit wesentlich ausgeprägter als bei dem Faktor C/EBP $\beta$ /ER in Gegenwart von Es.

Die stark transaktivierende Wirkung des Faktors tTA spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Reportergenexperiments wieder. Während die Expressionsstärke der unterschiedlichen Promotoren in Anwesenheit von Dox den in Abb. 6.1.2 dargestellten Ergebnissen in QT6<sub>2-1</sub> Zellen entspricht, steigt die Aktivität aller Promotoren in Abwesenheit von Dox um ein Vielfaches und übertrifft sogar die Expression durch den CMV Promotor.

Der mittlere Induktionswert von 50 entspricht dabei den Werten des ursprünglich entwickelten Tet-Off Systems, in dem die Luciferaseexpression dem minimalen tTA-abhängigem CMV-Promotor unterliegt [22].

**A**



**B**

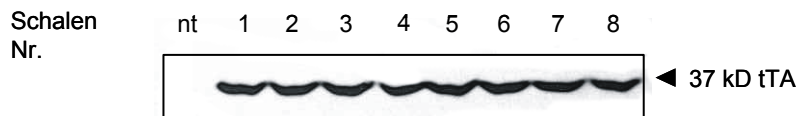


Abb. 6.2.2: Regulierbarkeit der Expression der *mim-1* Reporter-genkonstrukte durch tTA.

Je zwei Schalen QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit je 3 µg der angegebenen Reporter-genkonstrukte, 1 µg pTet-Off und 0,5 µg pCMVβ kotransfiziert. Die Zellen wurden in Gegenwart (+) bzw. Abwesenheit (-) von Dox (2 µg/ml) kultiviert. Die Ernte erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Die Zellpellets wurden halbiert und entsprechende Extrakte für die Reporter-genassays, bzw. SDS-Page hergestellt. Die Ergebnisse der Reporter-genexperimente sind unter A) dargestellt. Die rel. Luciferase-Aktivität ist der Quotient aus absoluter Luciferaseaktivität zu absoluter β-Galaktosidaseaktivität, normiert auf 100%. Die Ergebnisse basieren auf zwei unabhängigen Experimenten. Die Luciferaseexpression der in Gegenwart von Dox kultivierten Zellen wird durch die gestreiften Balken repräsentiert. Nach der SDS-Page (10%) und Transfer auf Nitrozellulose, erfolgte die Immunodetektion des tTA Proteins (B) mit dem Antikörper α-VP16. (nt = untransfizierte QT6<sub>2-1</sub> Zellen).

Plasmide	Induktionsfaktor <sub>tTA</sub>
psfΔmimTRE	66
psfmimTRE	37
psfmimTRE-M1inv	59
pCMVluc	1

Tab. 6.2.2: Induzierbarkeit durch den Faktor tTA im Vergleich. Der Induktionsfaktor<sub>tTA</sub> ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Abwesenheit und Gegenwart von Dox.

Im Gegensatz zum Faktor C/EBPβ/ER, aktiviert der Transaktivator tTA die Expression unabhängig vom jeweiligen Promotor. Trotzdem ist die Induktion der Expression bei psfmim



in Abwesenheit von Dox geringer als bei  $\text{psf}\Delta\text{mimTRE}$  und  $\text{psfmimTRE-M1inv}$  (Tab. 6.2.2). Wie aus der Abbildung 6.2.2A ersichtlich ist die Luciferaseaktivität der Zellen in Schale vier wesentlich höher als der mit dem CMV-Konstrukt transfizierten Zellen. Denkbar ist, dass hier ein kritischer Wert erreicht wird, der innerhalb von 24 Stunden bei maximaler Auslastung der Transkriptions- und Translationsmaschinerie nicht mehr gesteigert werden kann.

Wie anhand der untersuchten Reportergergenkonstrukte gezeigt werden konnte, kann durch die 5'TRE Sequenz die Expression der dahinterliegenden Promotoren durch den Faktor tTA reguliert werden.

Das Induktionspotential des chimären Dox-inhibierbaren Transaktivators ist wesentlich größer als das des Faktors C/EBP $\beta$ /ER. Welches regulatorische System im Rahmen der zu konstruierenden bicistronischen Expressionssysteme tatsächlich besser geeignet ist, muss in den weiterführenden Untersuchungen geprüft werden.

### **6.3 Monocistronische *mim-1* Promotorkonstrukte für die autoregulative Expression des Faktors C/EBP $\beta$ /ER**

Wie bereits beschrieben, kann die konstitutive Expression eines Transaktivators über einen längeren Zeitraum toxische Nebenwirkungen für die Zellen haben. Um Schäden der Zellen durch zu hohe Transaktivatorkonzentrationen zu verhindern, ist es daher sinnvoll die Expression des Transaktivatorgens selbst unter die Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen Promotors zu stellen. Im Falle eines Liganden-regulierbaren Transaktivators, kann auf diese Weise die aktive Form des Transaktivators die Expression ihres eigenen Gens durch Autoregulation hochregulieren, im inaktiven Zustand sollte die endogene Transaktivator-Konzentration hingegen auf einem basalem Level bleiben.

Bereits 1995 etablierten Shockett et al. [26] ein autoreguliertes Expressionssystem für den Faktor tTA, das seitdem vielfältige Anwendung bei der regulierbaren Expression von Transgenen gefunden hat ([87], Abb. 3.3.1).

#### **6.3.1 Konstruktion der monocistronischen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme**

Bei der Konstruktion der autoregulativen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme wurde die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  unter die Kontrolle des C/EBP $\beta$ -induzierbaren *mim-1* Promotors gestellt. Auf diese Weise sollte erreicht werden, dass der Promotor nach erstmaliger Induktion durch endogene Faktoren, durch das eigene Genprodukt stimuliert

wird. In Abb. 6.3.1 ist das Prinzip der Autoregulation der konstruierten monocistronischen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme schematisch dargestellt.

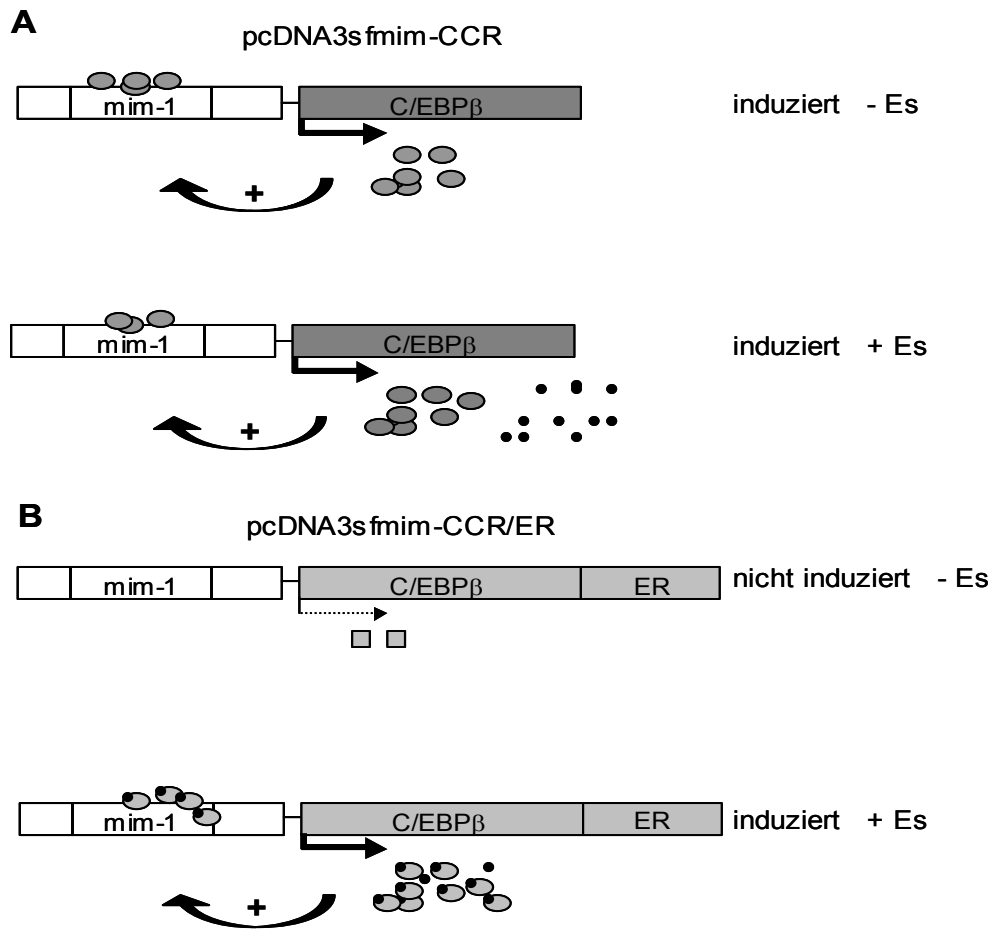


Abb. 6.3.1: Darstellung der monocistronischen autoregulativen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme im induzierten und nicht induzierten Zustand.

A) In pcDNA3s fmim-CCR erfolgt die positive Rückkopplung des Faktors C/EBP $\beta$  Es-unabhängig. B) In pcDNA3s fmim-CCR/ER aktiviert der Faktor C/EBP $\beta$ /ER den Promotor nur in Gegenwart von Es.

Bei dem Vektor pCDNA3s fmim-CCR erfolgt die Aktivierung des Promotors durch den Faktor C/EBP $\beta$  unabhängig vom Liganden Es (Abb. 6.3.1A). Im Gegensatz dazu kann die Expression von pCDNA3s fmim-CCR/ER durch Es reguliert werden (Abb. 6.3.1B). Nur in Gegenwart des Hormons kann der Faktor C/EBP $\beta$ /ER durch positive Rückkopplung auf den Promotor die Expression seines eigenen Gens verstärken. In Abwesenheit des Hormons wird die Expressionsstärke des Faktors C/EBP $\beta$ /ER durch die basale Aktivität des Promotors bestimmt.

### 6.3.2 Untersuchung der autoregulativen Expression der Faktoren C/EBPβ und C/EBPβ/ER durch monocistronische *mim-1* Promotorkonstrukte

Um zu überprüfen, ob die konstruierten Vektoren tatsächlich wie in Abb. 6.3.1 funktionieren, wurden Transfektionsexperimente in QT6<sub>2-1</sub> Zellen durchgeführt. Zum Vergleich der Expressionsstärke wurden neben den in Abbildung 6.3.2 A dargestellten C/EBPβ-Expressionsvektoren die Vektoren pCDNA3-CCR und pCRNC-CCR/ER transfiziert. Abb. 6.3.2 B zeigt die Immunodetektion der Proteine C/EBPβ und C/EBPβ/ER.

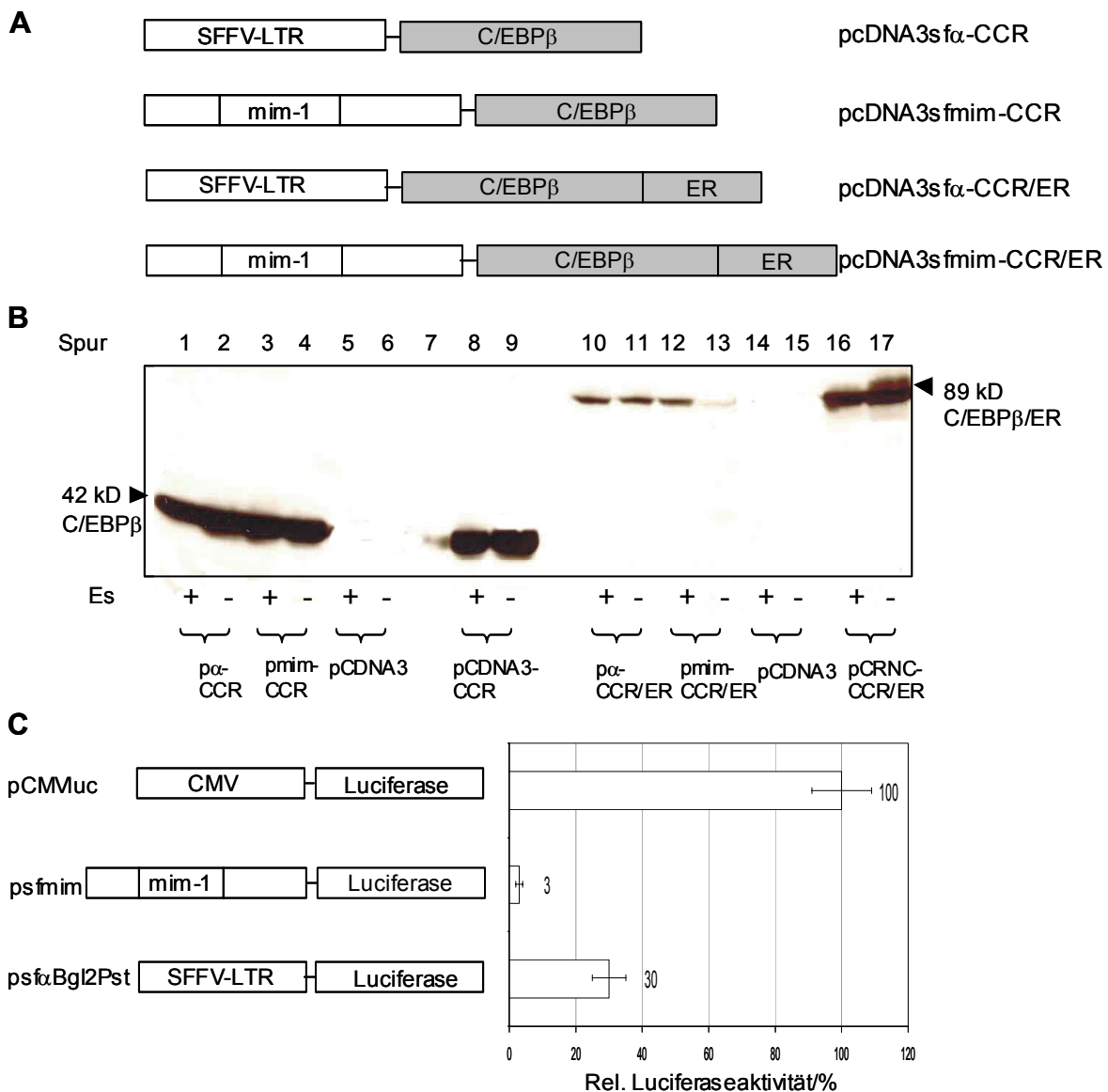


Abb. 6.3.2: Untersuchung der autoregulativen Expression der Faktoren C/EBPβ und C/EBPβ/ER durch die monocistronischen *mim-1* Promotorkonstrukte.

Je 3 µg der angegebenen unter A) schematisch dargestellten C/EBPβ-Expressionsvektoren, sowie der Vektoren pCDNA3-CCR, pCRNC-CCR/ER und pCDNA3 (Leervektor) wurden zusammen mit 0,5 µg pCMVβ in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Gleich transfizierte Zellen wurden mit (+) und ohne (-) 2 µM Es kultiviert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, und die Zellextrakte durch SDS-Page (10%) und Western-Blot analysiert. Zur Immunodetektion der Proteine C/EBPβ/ER bzw. C/EBPβ wurde der Antikörper α-chCCR verwendet (B). In C) ist die Aktivität der Promotoren ohne

Autoregulation dargestellt. 3 µg der entsprechenden Luciferasereportergergenkonstrukte und 0,5 µg pCMVβ wurden in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, die exprimierte Luciferasemenge quantifiziert und über die β-Galaktosidaseexpression normiert. Die Ergebnisse vier unabhängiger Messungen wurden gemittelt und mit Fehlerbalken versehen.

Betrachtet man zuerst die Aktivität des SFFV, *mim-1* und CMV Promotors der entsprechenden Luciferase-Reportergergenkonstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen im Vergleich (Abb. 6.3.2 C), zeigt sich, dass der *mim-1* Promotor in diesen Zellen 10 mal schwächer als die SFFV-LTR, und circa 30 mal schwächer als der CMV Promotor ist.

Kontrolliert der *mim-1* Promotor jedoch die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBPβ, kann seine Aktivität in diesen Zellen um den Faktor 10 gesteigert werden, wie anhand des vergleichbaren C/EBPβ-Expressionslevels von pcDNA3sfα-CCR und pcDNA3sfmim-CCR abgeleitet werden kann (Spur 2 und Spur 4, Abb. 6.3.2 B). Die Stimulation des *mim-1* Promotors durch Autoregulation, ist demnach effizienter als durch konstitutiv koexprimiertes C/EBPβ-Protein (Vergleich Spur 4 und Spur 12, Abb. 6.2.1).

Vergleicht man die Stärke der detektierten Signale, scheint die exprimierte C/EBPβ-Proteinmenge durch die SFFV-LTR bzw. den *mim-1* Promotor, sogar an die des starken CMV-Promotors heranzureichen. Demnach müsste auch die SFFV-LTR durch den Faktor C/EBPβ induzierbar sein. Entsprechend den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten [86] ist dies aber nicht der Fall. Wahrscheinlich ist, dass die Differenz der Signalstärken der α-HRP markierten Proteine durch zu lange Expositionszeiten des Fotofilms ungenau wiedergegeben wird.

Im Gegensatz zum Vektor pcDNA3sfmim-CCR kommt es beim Vektor pcDNA3sfmim-CCR/ER nur in Gegenwart von Es zur Hochregulation der Expression. Im induzierten Zustand ist die exprimierte C/EBPβ/ER-Menge durch pcDNA3sfmim-CCR/ER geringer als durch die SFFV-LTR. Die Aktivierung des Promotors durch Autoregulation ist demnach bei dem Faktor C/EBPβ/ER weniger effektiv als bei der hormonunabhängigen Variante. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen unter 6.2.1 überein, wonach der ER-fusionierte Faktor schwächer transaktivierend auf den *mim-1* Promotor wirkt. In Abwesenheit des Hormons, kann die C/EBPβ/ER Expression nicht vollständig ausgeschaltet werden, Grund hierfür ist die basale Aktivität des *mim-1*/SFFV-Promotors in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (Kap. 6.1).

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein C/EBPβ/ER unter der Kontrolle des *mim-1* Promotors in der Lage ist die Expression seines eigenen Gens Es-abhängig hochzuregulieren. Im induzierten Zustand kann die Aktivität des Promotors auf diese Weise um ein Vielfaches gesteigert werden.

Der Faktor C/EBPβ/ER stellt somit einen geeigneten Schalter der *mim-1* regulierbaren Genexpression dar.

## 6.4 Konstruktion der bicistronischen Expressionssysteme

Auf Grundlage der bisherigen Untersuchungen wurde im folgenden eine Reihe von bicistronischen Expressionssystemen entwickelt. In allen Systemen wird die Expression des regulierbaren Transaktivators im ersten Cistron und die Transkription des Reportergens im zweiten Cistron über einen der in Kap. 6.1 untersuchten rekombinanten *mim-1* Promotoren aktiviert. Als regulierbarer Transaktivator, wurde entweder der Dox-inhibierbare Faktor tTA, oder der Es-aktivierbare Faktor C/EBP $\beta$ /ER gewählt. Als Reporter für die genaue Quantifizierung der Expressions- und Regulationskapazität dient das Luciferasegen. Um die Expression beider Gene von einem einzigen Transkript zu ermöglichen, wurden die kodierenden Regionen für das Regulator- und Reporter gen über eine 700 bp lange IRES („*Internal ribosomal entry site*“) aus dem PV (*Polio Virus*) miteinander verbunden. Alternativ wurden analoge Konstrukte ohne PV IRES kloniert. Bei den C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukten werden die beiden kodierenden Bereiche durch eine ca. 69 bp lange, bei den tTA-Konstrukten durch eine 67 bp lange intercistronische Sequenz getrennt. In Abb. 6.4.1 sind zwei Vertreter der unterschiedlichen bicistronischen Expressionssysteme, dargestellt.

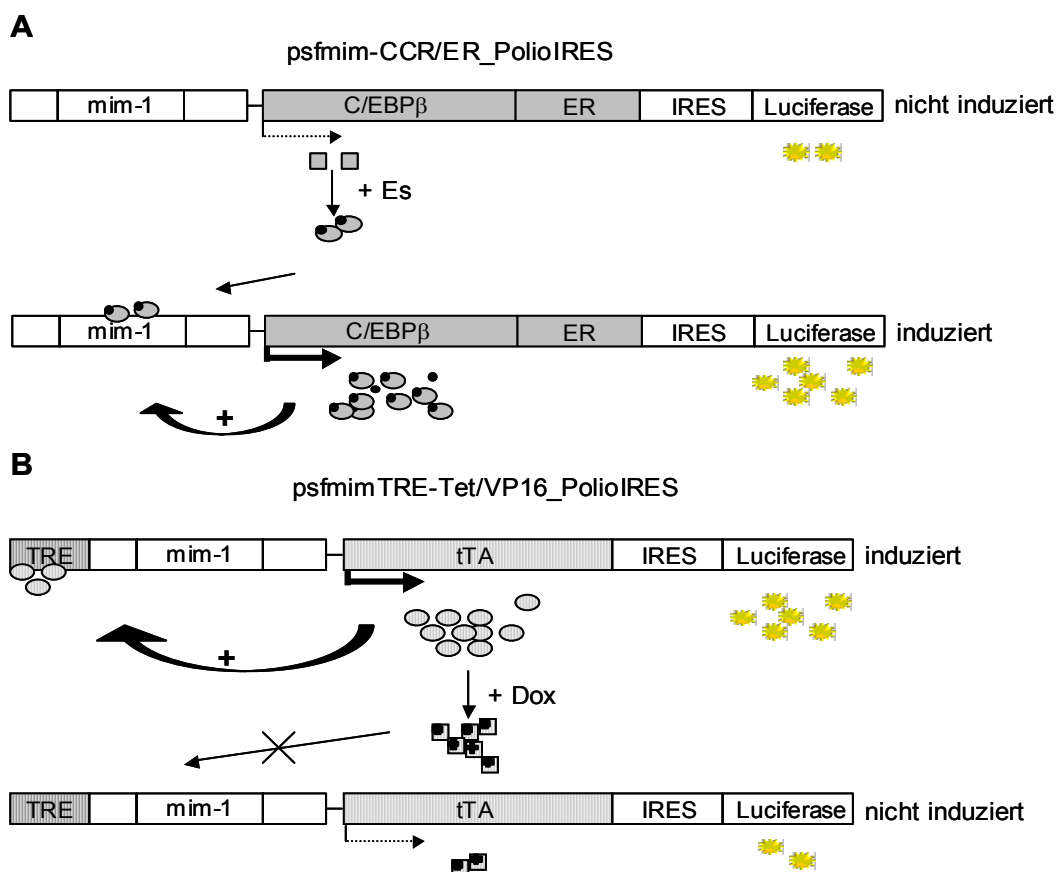


Abb. 6.4.1: Darstellung der unterschiedlichen bicistronischen Expressionssysteme beim Übergang vom induzierten und den nicht induzierten Zustand.

A) In psfmim-CCR/ER\_PolioIRES reguliert das Fusionsprotein C/EBP $\beta$ /ER die Expression durch den rekombinanten *mim-1* Promotor. Durch ES wird das System induziert, und die Transkription des C/EBP $\beta$ /ER- und Luciferasegens hochreguliert. In B) erfolgt die Regulation durch den chimären Faktor tTA und den tTA-abhängigen *mim-1* Promotor. Die Induktion erfolgt in Abwesenheit von Dox.

### 6.5 Zeitlicher Verlauf der Reporterexpression der bicistronischen Expressionssysteme in transienten Transfektionen

Vor der Untersuchung der Funktionalität der bicistronischen Expressionssysteme in transienten Transfektionen, wurde zuerst der Frage nachgegangen, zu welchem Zeitpunkt die Quantifizierung des exprimierten Reportergens erfolgen soll.

Dadurch, dass sich bei den konstruierten Vektoren die Aktivität des Promotors nach erstmaliger Induktion durch Autoregulation zuerst sukzessiv hochregulieren muss, ist es möglich, dass die Luciferaseexpression im Vergleich zum nicht-autoregulierten Expressionssystem zeitlich versetzt erfolgt. Andererseits muss beachtet werden, dass nach Hochregulation des Systems, DNA- und Proteinabbauprozesse in Kraft treten können, die die Expression verringern.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde bereits die Kinetik der Autoregulation in einem C/EBP regulierbaren Expressionssystem untersucht. Um eine dem bicistronischen Vektor-Konstrukt analoge Reaktionsfolge von - Promotorinduktion, Regulator-Expression, positiver Rückkopplung und Reporterexpression - zu simulieren, wurde das Reporterogen *psfmim* mit einem durch den *mim-1* Promotor gesteuerten C/EBP-Expressionsvektor in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert (Abb. 6.5), und die Luciferaseexpression zu verschiedenen Zeiten nach der Transfektion bestimmt. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass das System einen Zeitraum von 24 Stunden braucht um durch Autoregulation maximal aktiv zu werden, danach sinkt die Expression des Reportergens.

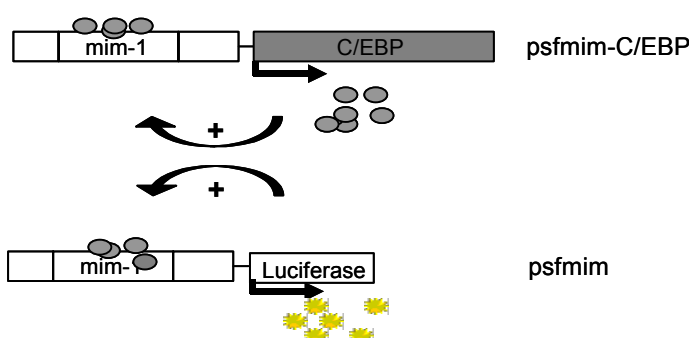
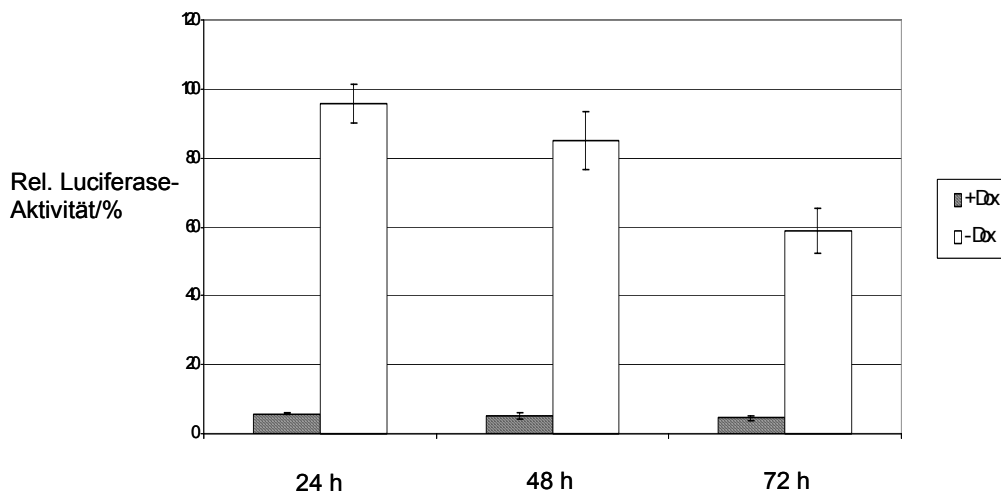


Abb. 6.5: Zwei-Plasmid Transfektion zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression bei Autoregulation durch den Faktor C/EBP. Durch Koexpression des C/EBP-Expressionvektors und des Reportergens *psfmim*, wird eine dem bicistronischen Vektor analoge Reaktionsfolge simuliert.

### 6.5.1 Untersuchung der Regulator- und Reporterexpression eines bicistronischen Vektors in Abhängigkeit von der Zeit

Um zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt nach der Transfektion die Luciferaseexpression des bicistronischen Vektors maximal ist, wurden Transfektionsexperimente in QT6<sub>2-1</sub> Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse des Luciferaseassays und des tTA-Immunoblots sind in Abb. 6.5.1 dargestellt.

**A**



**B**

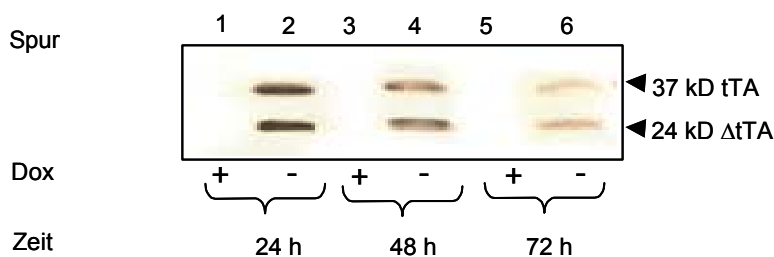


Abb. 6.5.1: Regulator- und Reporterexpression eines bicistronischen Vektors in Abhängigkeit von der Zeit.

Sechs Schalen QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit je 3 µg psmimTRE-Tet/VP16\_PoliIRES und 0,5 µg pCMVβ transfiziert. Nach dem Glycerinschock wurden die Zellen trypsiniert, in 10 ml Medium aufgenommen und vereinigt. Je 10 ml der Zellsuspension wurde erneut auf Schalen verteilt, und die Hälfte der Zellen in Gegenwart (+) bzw. Abwesenheit (-) von Dox (2 µg/ml) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten, wie angegeben, geerntet. Die Zellpellets wurden halbiert und entsprechende Extrakte für die Reporteragenassays, bzw. die SDS-Page hergestellt. Die Ergebnisse der Reporteragenexperimente sind unter A) dargestellt. Die rel. Luciferase-Aktivität (= abs. Luciferaseaktivität/ abs. β-Galaktosidaseaktivität) wurde auf 100% normiert. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt und mit Fehlerbalken versehen.

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Page (10%) erfolgte der Transfer auf Nitrozellulose und die Immunodektion (B) des tTA-Proteins durch den Antikörper α-VP16.

Entsprechend den Ergebnissen der Zwei-Plasmid-Transfektion erreicht auch die Luciferaseexpression des bicistronischen Expressionsvektors bereits nach 24 Stunden die maximale Aktivität (Abb. 6.5.1 A). In den darauffolgenden 48 Stunden nimmt sowohl die Luciferaseaktivität als auch die Expression des tTA-Proteins ab (Abb. 6.5.1 B).

Die zweite Bande im tTA-Immunoblot ist ein Degradationsprodukt des Proteins, das in einer Vielzahl von Zellen bei hohen Konzentrationen des Transaktivators detektiert werden kann [88]. Mutmaßlich handelt es sich hierbei um eine C-terminal verkürzte Form des Proteins. Demzufolge scheinen die Zellen zu hohen tTA-Konzentrationen durch Abspaltung der Transaktivierungsdomäne des Proteins entgegenzuwirken. Die Abnahme des gesamten tTA Expressionslevels ist außerdem ein Indiz für den Abbau der DNA. Zusammen bewirken diese Prozesse die Abnahme der endogenen Transaktivatorkonzentration und folglich auch, wie bereits oben festgestellt, der Luciferaseaktivität.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Diplomarbeit, ergibt sich auch bei den autoregulativen Expressionssystemen als optimaler Zeitpunkt zur Quantifizierung der Luciferaseexpression 24 h nach Transfektion.

## **6.6 Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration**

In den vorangegangenen Experimenten zur Untersuchung der Induzierbarkeit bzw. des Phänomens der Autoregulation, wurden gemäß den Angaben in der Literatur 2 nmol/ml (2  $\mu$ Mol)  $\beta$ -Estradiol [89] und 2  $\mu$ g/ml Dox [90] eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Aktivität des Promotors durch den Liganden-abhängigen Transaktivator maximal induziert bzw. inhibiert werden. Im folgenden soll ein genauer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Liganden und der Induktion der Expression erstellt werden. So soll überprüft werden, ob eine „Feinregulation“ des Systems möglich ist, d.h. ob durch eine definierte Menge des Liganden ein bestimmtes Expressionslevel eingestellt werden kann. Außerdem soll herausgefunden werden, ob auch geringere Konzentrationen der Liganden ausreichend sind, um das System maximal zu induzieren. Auf diese Weise können nicht-spezifische, pleiotrope Effekte durch zu hohe Konzentrationen des Hormons bzw. Antibiotikums minimiert werden, die besonders in Langzeitstudien zur Veränderungen im Wachstum und der Morphologie der Zellen führen können.



### 6.6.1 Untersuchung der Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration

Um den Einfluss der Ligandenkonzentration auf die Induktion der Expression zu untersuchen, wurden QT6<sub>2-1</sub> Zellen mit den Vektoren psfmim-CCR/ER\_PoliIRES bzw. psfmimTRE-Tet/VP16\_PoliIRES transfiziert und die Reporterexpression in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Es und Dox bestimmt. Die Ergebnisse der Reporterexperimente sind in der Abb. 6.6.1 dargestellt.

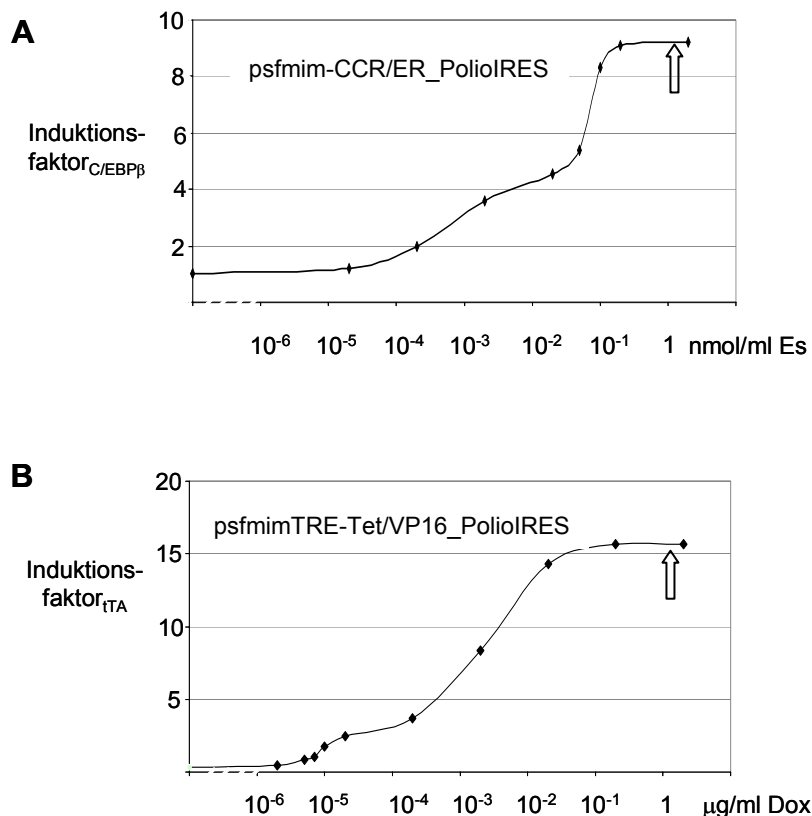


Abb. 6.6.1 Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration.

QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit 2,5 μg psfmim-CCR/ER\_PoliIRES bzw. psfmimTRE-Tet/VP16\_PoliIRES transfiziert. Die Zellen wurden in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Es (A), bzw. Dox (B), wie angegeben, und in Abwesenheit des Liganden kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen. Die Luciferaseaktivität wurde über die β-Galaktosidaseaktivität normiert. (Induktionsfaktor<sub>CCR</sub> = rel. Luciferaseaktivität + Es/rel. Luciferaseaktivität – Es; Induktionsfaktor<sub>tTA</sub> = rel. Luciferaseaktivität – Dox/rel. Luciferaseaktivität + Dox). Die Pfeile kennzeichnen standardmäßig eingesetzten Konzentrationen der Liganden.

Wie aus der Abb. 6.6.1A ersichtlich, ist die Luciferaseexpression durch den Vektor psfmim-CCR/ER\_PoliIRES bereits in Gegenwart von 0.2 nmol/ml Es maximal. Die Luciferaseexpression im induzierten Zustand ist 8 mal höher als im nicht-induzierten Zustand, und kann auch durch höhere Konzentrationen des Hormons nicht mehr gesteigert werden. Bei Es-Konzentration < 0.2 nmol/ml sind nicht mehr alle C/EBPβ/ER Moleküle mit dem Liganden assoziiert, folglich sinkt die Transaktivierung, und damit auch die

Luciferaseexpression, und erreicht bei 0,1 pmol/ml Es einen basalen Wert.

Der Faktor tTA kann in einem Bereich von 1 pg/ml – 20 ng/ml durch Dox reguliert werden (Abb. 6.6.1B). Bei Konzentrationen > 20 ng/ml Dox erreicht die Induktionskurve ein Plateau. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Kap. 6.5, beträgt die maximale Induktion 16. Dox-Konzentrationen < 1 ng/ml sind zu gering, um den Faktor tTA effektiv zu inhibieren, der Induktionsfaktor beträgt eins.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide Transaktivatoren eine hohe Sensitivität für ihren Liganden besitzen. Bereits ein Hundertstel der bisher eingesetzten Dox-Konzentration, und ein Zehntel der Es-Konzentration sind ausreichend, um das entsprechende Expressionssystem maximal zu induzieren. Außerdem erstreckt sich in beiden Systemen die Regulierbarkeit durch den jeweiligen Liganden über mehrere Zehnerpotenzen, dadurch ist nicht nur ein Ein- oder Ausschalten, sondern eine „Feinregulation“ des Expressionslevels durch den Liganden möglich.

## **6.7 Bicistronische C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme**

Zur Untersuchung der Funktionalität der autoregulativen C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme, wurde in den folgenden Experimenten die Expression und Regulierbarkeit in Nicht-Zielzellen und Zielzellen bestimmt. Um ein zusammenhängendes Bild des Expressionsmechanismus zu erhalten, wurden durch RNA- und Proteinstudien, sowohl das Level der Transkription, als auch der Translation des 1. und 2. Cistrons quantifiziert.

### **6.7.1 Expressionsstudien der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Nicht-Zielzellen**

Zur genauen Charakterisierung der bicistronischen C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Nicht-Zielzellen, wurde das Expressionsverhalten der konstruierten Vektoren in QT6<sub>2-1</sub> Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.7.1 dargestellt.

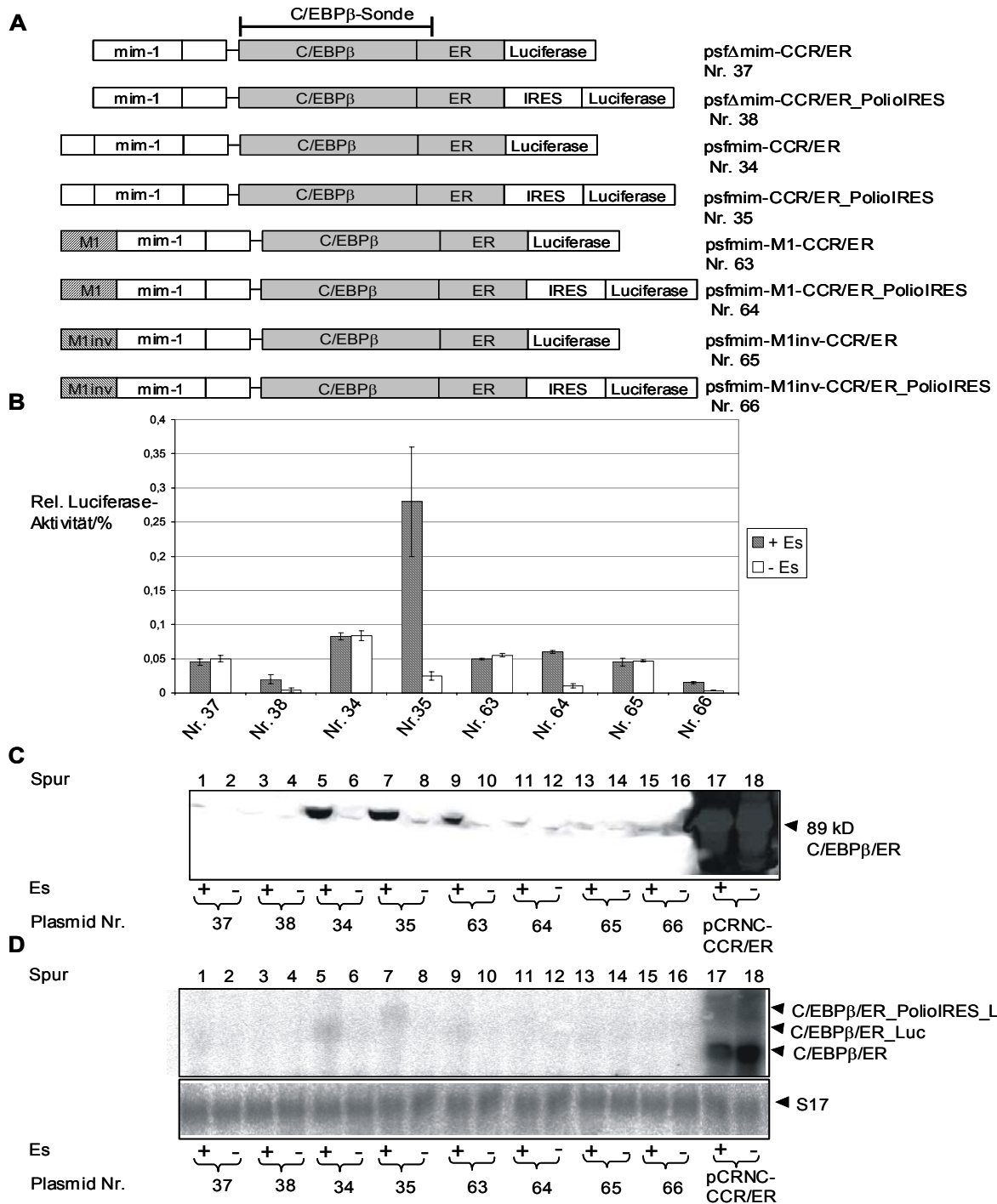


Abb. 6.7.1: Expressionsstudien der C/EBPβ/ER-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Je 3 μg der unter A) schematisch dargestellten Vektoren, sowie der Vektoren pCMVluc und pCRNC-CCR/ER wurden zusammen mit 0,5 μg pCMVβ in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) Es (2 μMol) kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellpellets für die Reporterassays, SDS-Page und Gesamt-RNA-Isolierung aufgeteilt. Die Ergebnisse der Reporterassays sind unter B) dargestellt. Die Luciferase-Aktivität wurde über die β-Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von drei unabhängigen Messungen. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Page (10%) erfolgte der Transfer auf Nitrozellulose und die Immunodetektion des C/EBPβ/ER-Proteins durch den Antikörper α-chCCR (C). Die Gesamt-RNA wurde in einem 1%igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit der [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten C/EBPβ-Sonde (1300 bp EcoRI/XbaI-Fragment, siehe A)) und zur Kontrolle mit einer S17-Sonde (unten) hybridisiert. Gezeigt sind die Autoradiogramme (D), die Pfeilspitzen markieren die mit der Sonde hybridisierten mRNAs.

Beim Vergleich der Luciferaseaktivität fällt auf, dass das Verhältnis der Aktivität der Promotoren der IRES und Nicht-IRES Konstrukte im nicht induzierten Zustand, dem der einfachen Reportergenkonstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen entspricht (Abb. 6.1). Die Unterscheidung in IRES und Nicht-IRES-Konstrukte ist sinnvoll, da die Expression der Luciferase in diesen Konstrukten auf zwei unterschiedlichen Translationsmechanismen beruht. Die Translation des zweiten Cistrons erfolgt in den IRES-Konstrukten durch interne Initiation in den Nicht-IRES-Konstrukten durch Reinitiation der Ribosomen an der 69 bp langen intercistronischen Sequenz (siehe Kap. 3.4). Dass die Expression des stromabwärtsliegenden Cistrons durch alternatives Spleißen der mRNA ermöglicht wird, kann anhand der Ergebnisse der RNA-Untersuchung ausgeschlossen werden.

Da die Expression des zweiten Gens durch Reinitiation meist wesentlich schwächer ist als durch interne Initiation [91], überrascht, dass die Luciferaseexpression gleicher Promotoren der Nicht-IRES-Konstrukte ohne Es höher ist als die der IRES-Konstrukte. Ursache hierfür könnte die geringere Stabilität der IRES-Transkripte sein. Da jedoch das Transkriptionslevel aller Konstrukte im nicht-induzierten Zustand unter der Nachweisgrenze der RNA-Detektion liegt, ist an dieser Stelle keine Aussage zur Stabilität der unterschiedlichen RNAs möglich.

Wie in dem Vektor pcDNA3sfmim-CCR/ER (siehe Abb.6.3.2) befindet sich in den Vektoren psfmim-CCR/ER und psfmim-CCR/ER\_PoliolIRES die kodierende Region für den Faktor C/EBP $\beta$ /ER im 1.Cistron, die Translation erfolgt Cap-abhängig. Auch in den bicistronischen Konstrukten kann die C/EBP $\beta$ /ER-Expression in Gegenwart von Es durch Autoregulation hochreguliert werden (Abb. 6.7.1C, Spur 5 und 7). Das Phänomen der Autoregulation führt auch bei dem Konstrukt psfmim-M1-CCR/ER zur Erhöhung der C/EBP $\beta$ /ER-Expression (Spur 9). Im Vergleich dazu sind die Signale aller anderen Konstrukte auch im induzierten Zustand sehr schwach. Ein analoges Bild zeigt sich bei der RNA-Detektion (Abb.6.7.1D). Demzufolge sind nur die Promotoren mit der höchsten basalen Aktivität in QT6<sub>2-1</sub> Zellen in der Lage die Expression bereits 24 Stunden nach der Induktion effizient „aufzuschaukeln“.

Auffällig ist außerdem, dass die Zahl der RNA-Transkripte der Nicht-IRES-Konstrukte (C/EBP $\beta$ /ER\_Luc) im induzierten Zustand höher ist als die der entsprechenden IRES-Konstrukte (C/EBP $\beta$ /ER\_PoliolIRES\_Luc). Dies bestätigt die Vermutung, dass die bicistronischen Transkripte durch die PV IRES destabilisiert werden. Dieser Effekt wurde bereits bei anderen monocistronischen IRES-Konstrukten beobachtet [92]. Die Ursache hierfür ist unklar, möglicherweise wird in manchen Zellen ein Abwehrmechanismus gegen die virale Sequenz in Gang gesetzt, der den nucleolytischen Abbau der IRES-mRNA beschleunigt.

Plasmide	Induktionsfaktor <sub>C/EBPβ</sub>
psfΔmim-CCR/ER	1
psfΔmim-CCR/ER_PoliolIRES	4
psfmim-CCR/ER	1
psfmim-CCR/ER_PoliolIRES	9
psfmim-M1-CCR/ER	1
psfmim-M1-CCR/ER_PoliolIRES	6
psfmim-M1inv-CCR/ER	1
psfmim-M1inv-CCR/ER_PoliolIRES	4

Tab. 6.7.1: Induktion der Luciferaseexpression der C/EBPβ/ER-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen im Vergleich. Der Induktionsfaktor<sub>C/EBPβ</sub> ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Es.

Trotz der hohen Sensitivität des Luciferaseassays, kann bei allen Nicht-IRES-Transkripten im induzierten Zustand keine Erhöhung der Luciferaseexpression beobachtet werden (Tabelle 6.7.1). Dies ist besonders erstaunlich, da die Induktion bei manchen Konstrukten zu einer deutlichen Erhöhung des Transkriptionslevels führt (Plasmid Nr. 63). Möglicherweise inhibiert das Genprodukt des 1. Cistrons, das C/EBPβ/ER-Protein, den Prozess der Reinitiation der Ribosomen. Folglich kann die Aktivitätsteigerung des Promotors nicht auf die Expression des Reportergens übertragen werden.

Im Gegensatz dazu führt die Es-Zugabe bei allen IRES-Konstrukten zu einer Erhöhung der Luciferaseexpression. Wie bei der Expression des 1. Cistrons richtet sich die Höhe der Induktion dabei nach der basalen Aktivität des Promotors. Hieraus ergibt sich die maximale Induktion bei psfmim-CCR/ER\_PoliolIRES (Faktor 9). Setzt man die Luciferaseexpression und C/EBPβ/ER-Expression in Bezug zur jeweiligen Expression durch den CMV Promotor, wird deutlich, dass die PV IRES vermittelte Translation durch interne Initiation wesentlich ineffizienter ist, als die Cap-abhängige Translation vom gleichen Transkript. Diese Beobachtung stimmt überein mit vorangegangenen Untersuchungen der PV IRES [93] [94].

### 6.7.2 Expressionsstudien der C/EBPβ/ER-Konstrukte in Zielzellen

Zur Charakterisierung der konstruierten Expressionssysteme in Zielzellen, wurden das Expressionsverhalten der unter 6.7.1A dargestellten Vektoren in BM2 Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.7.2.1 dargestellt.

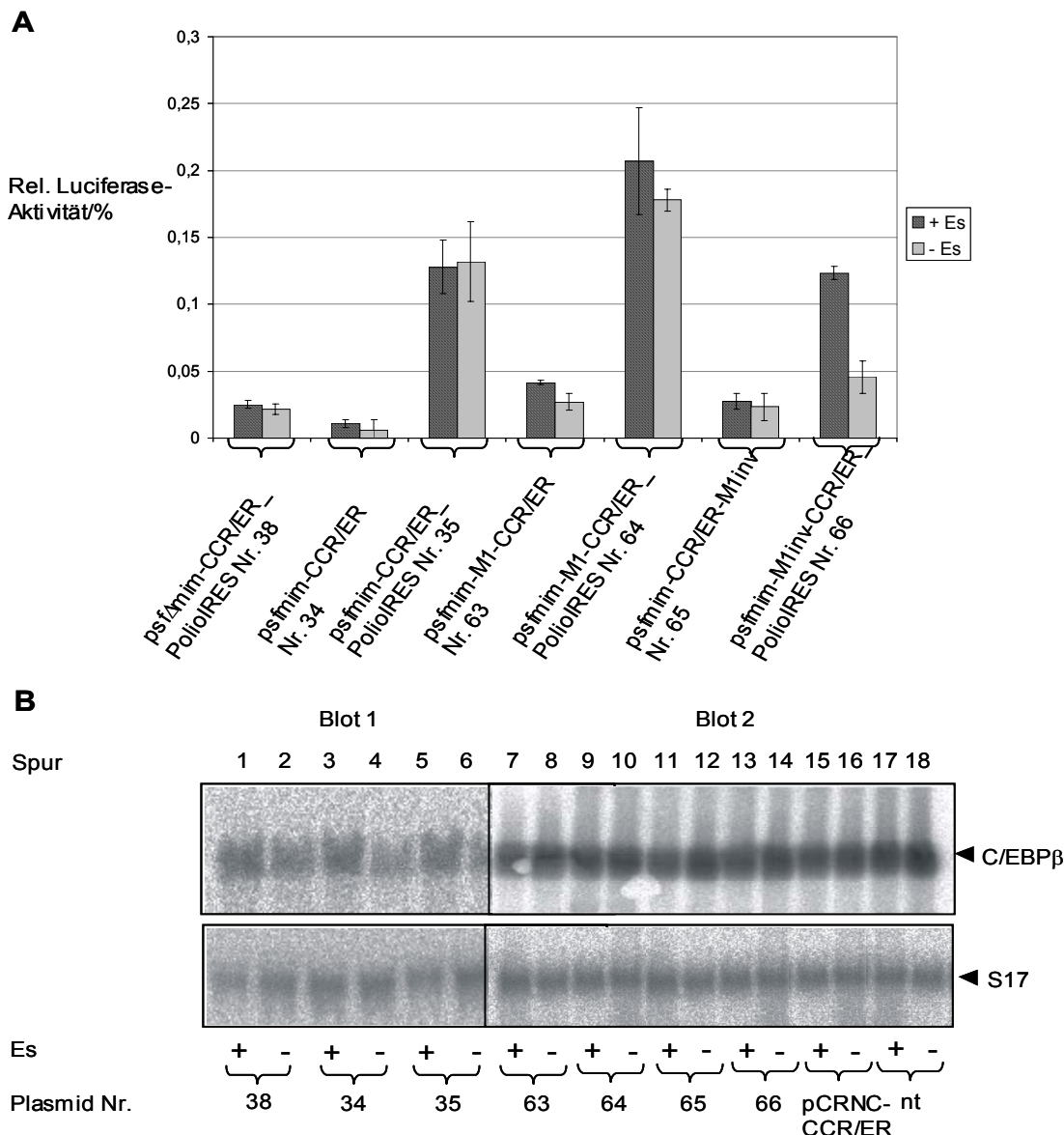


Abb. 6.7.2.1: Expressionsstudien der C/EBPβ/ER-Konstrukte in BM2 Zellen. Je 18 μg der angegebenen Vektoren, sowie der Vektoren pCMVluc und pCRNC-CCR/ER wurden zusammen mit 3 μg pCMVβ durch Elektroporation in BM2 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) Es (2 μM) kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellpellets für die Reporterassays und die Gesamt-RNA-Isolierung aufgeteilt. Die Ergebnisse der Reporterassays sind unter A) dargestellt. Die Luciferase-Aktivität wurde über die β-Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von drei unabhängigen Messungen. Die Gesamt-RNA wurde in einem 1%igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert (Blot 1 und 2). Die Membranen wurden mit der [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten C/EBPβ-Sonde (siehe Abb. 6.7.1 A) und zur Kontrolle mit einer S17-Sonde (unten) hybridisiert. Gezeigt sind die Autoradiogramme (B), die Pfeilspitzen markieren die mit der Sonde hybridisierte mRNA. (nt = untransfizierte BM2 Zellen).

Aufgrund der niedrigen Aktivität des rekombinanten *mim-1* Promotors ohne Enhancer in BM2 Zellen, sowie der geringen Effizienz der Translation des Reportergens durch Reinitiation, wurde auf die Untersuchung des Vektors *psfΔmim-CCR/ER* in BM2 Zellen verzichtet. Wie der Vergleich untransfizierter mit transfizierten BM2 Zellen im Northern Blot (Abb. 6.7.2.1B) zeigt, wurde durch die Sonde nur endogene C/EBPβ-RNA detektiert. Auch im Western-Blot

konnten keine Signale der Größe des C/EBP $\beta$ /ER-Proteins (89 kD) detektiert werden (Blot nicht abgebildet).

Die Tatsache, das selbst bei dem CMV-Promotorkonstrukt, pCRNC-CCR/ER, die exprimierte C/EBP $\beta$ /ER-Menge unter der Nachweisgrenze lag, ist ein Indiz für die niedrige Transfektionseffizienz in BM2 Zellen. Tatsächlich sind die  $\beta$ -Galaktosidasewerte trotz Einsatz der 6fachen Menge des pCMV $\beta$ -Plasmids in BM2 Zellen im Mittel 30 mal niedriger als in QT6<sub>2.1</sub> Zellen. Wie Untersuchungen ergaben, konnte die Transfektionseffizienz durch Elektroporation auch durch den Einsatz größere Mengen der Vektoren nicht wesentlich erhöht werden.

Ein Vergleich der Expressionsstärke der unterschiedlichen Konstrukte kann daher nur anhand der Reportergenexperimente erfolgen. Wie in der Abb. 6.7.2.1A zu erkennen, unterscheidet sich die exprimierte Luciferasemenge der IRES-Konstrukte mit und ohne Es in BM2 Zellen kaum. Die Erwartung, dass die höhere Aktivität der Promotoren in den Zielzellen, zu einem starken Anstieg der Expression im induzierten im Vergleich zum nicht-induzierten Zustand führt, wird nicht erfüllt. Im Gegensatz dazu scheint es so zu sein, das eine ständige Induktion der rekombinanten *mim-1*-Promotoren durch endogene, zellspezifische Faktoren erfolgt. Eine zusätzliche Erhöhung der Expression durch positive Rückkopplung des Transaktivators C/EBP $\beta$ /ER auf den Promotor ist daher nicht mehr möglich. Das Resultat ist der Verlust der Regulierbarkeit durch den Liganden (Abb.6.7.2.2). Eine Ausnahme bildet der Vektor p<sub>psfmim</sub>-M1inv-CCR/ER\_PolioIRES. Hier ist noch eine Induktion der Expression um den Faktor 3 möglich. Dieser Effekt ist nicht leicht zu erklären, da, wie vorangegangene Untersuchungen zeigten, besonders der M1-Enhancer durch die Gesamtheit der endogenen Faktoren in BM2 Zellen stärker stimuliert wird als durch Autoregulation des Faktors C/EBP $\beta$ /ER (Kap. 6.2.1).

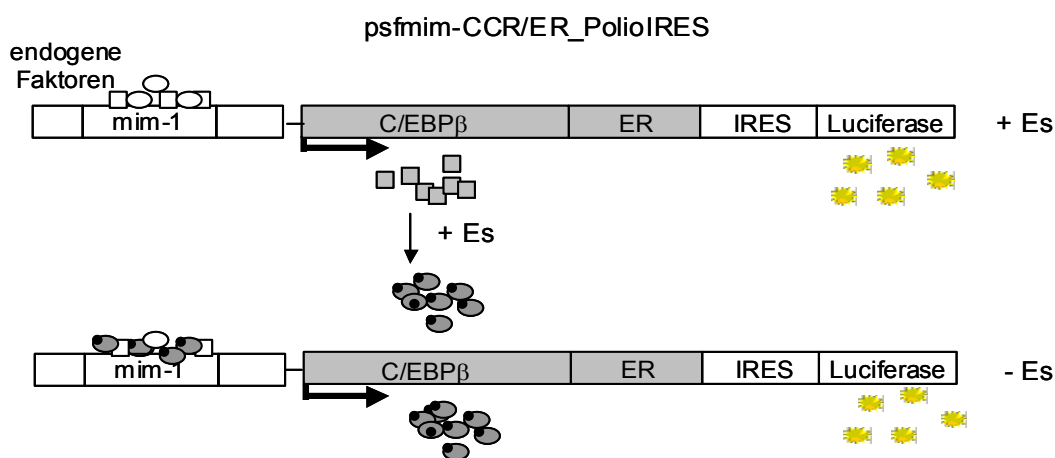


Abb. 6.7.2.2: Verlust der Regulierbarkeit der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen. Endogene Faktoren stimulieren den Promotor auch in Abwesenheit von Es. Die positive Rückkopplung des Faktors C/EBP $\beta$ /ER auf den Promotor in Gegenwart des Hormons bewirkt keine weitere Erhöhung der Promotoraktivität.

Ein anderer Ansatz den Verlust der Regulierbarkeit zu erklären, ist die geringe Transfektionseffizienz der BM2 Zellen. Zwar ist die Aktivität der rekombinanten *mim-1* Promotorkonstrukte in BM2 Zellen höher als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen, die Zahl der Kopien pro Zelle jedoch wesentlich geringer. Wie bereits bei den QT6<sub>2-1</sub> Zellen beobachtet werden konnte, muss der Promotor eine gewisse basale Expression besitzen, nur dann werden genügend Transaktivatorproteine exprimiert, um das System nach erstmaliger Induktion hochzuregulieren. Denkbar ist, dass aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz, in BM2 Zellen, die Konzentration des Faktors C/EBP $\beta$ /ER zu niedrig ist, um durch positive Rückkopplung den Promotor zu stimulieren. In diesem Fall würden die Balken im Luciferaseassay einfach die basale Aktivität der Promotoren in diesen Zellen wiedergeben.

Die Höhe der Luciferaseexpression der IRES- und Nicht-IRES Konstrukte richtet sich nach der Aktivität des jeweiligen Promotors in BM2 Zellen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter 6.1, ergibt sich folgende Reihenfolge der Aktivität und damit auch Luciferaseexpression: *mim-1/M1* > *mim-1/M1inv*  $\approx$  *mim-1/SFFV* > *mim-1*.

Die exprimierte Luciferasemenge der Nicht-IRES Konstrukte ist ca. 4 mal geringer als der IRES-Konstrukte mit gleichem Promotor. Wie bereits beschrieben ist die Ursache hierfür wahrscheinlich die geringere Effektivität der Translation des 2. Cistrons durch Reinitiation als durch interne Initiation.

### **6.7.3 Vergleich der Expression der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen**

Um einen Eindruck von der Expressionsstärke der untersuchten C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme in Ziel- und Nicht-Zielzellen zu bekommen, wurden die Ergebnisse der Luciferaseexpression in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen in Abb. 6.7.3 zusammengefasst.



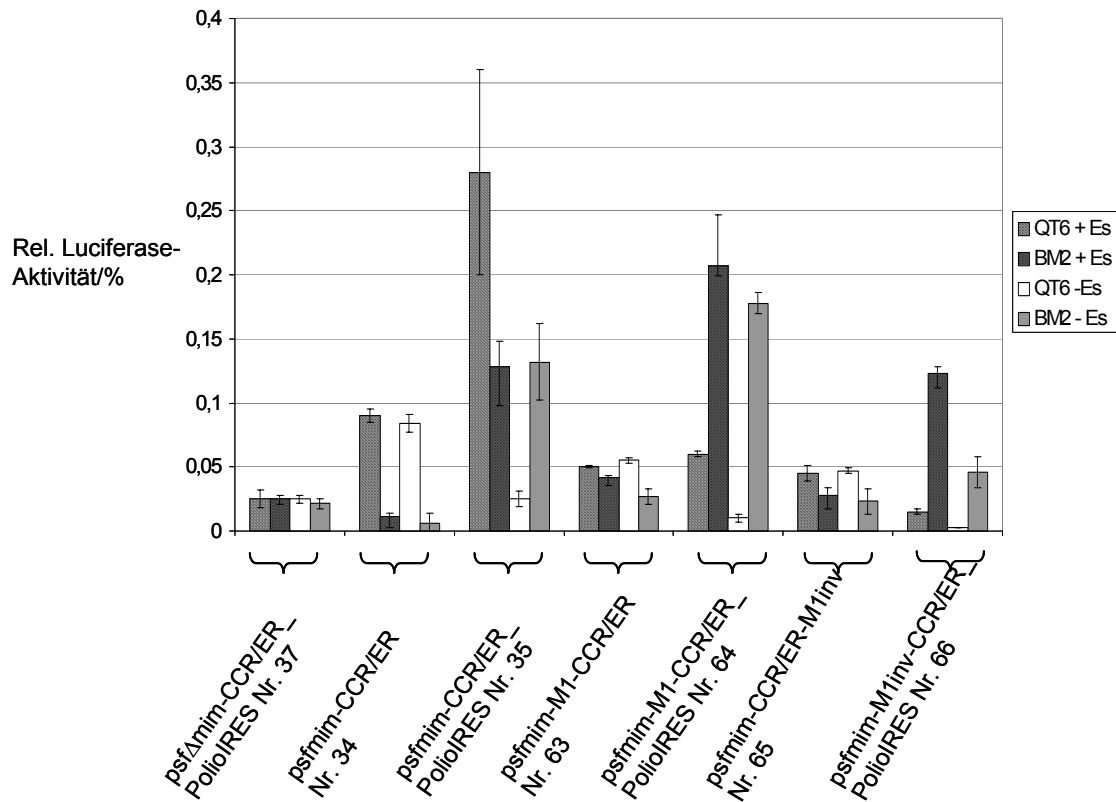


Abb. 6.7.3: Vergleich der Luciferaseexpression der C/EBPβ/ER-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der angegebenen Vektoren, normiert auf die Luciferaseexpression (100%) des Vektors pCMVluc in der jeweiligen Zelllinie.

Vergleicht man zuerst die Expression der Nicht-IRES-Konstrukte, fällt auf, dass neben der fehlenden Regulierbarkeit, die Aktivität der Promotoren in QT6<sub>2-1</sub> Zellen scheinbar größer ist als in BM2 Zellen. Dies widerspricht den Ergebnissen zur Untersuchung der Zellspezifität (Kap 6.1). Die Differenz der Aktivität in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen ist bei psfmim-CCR/ER am größten, am kleinsten bei psfmim-M1-CCR/ER. Denkbar ist, dass das bicistronische Konstrukt in BM2 Zellen weniger stabil ist als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen, oder, dass der Mechanismus der Reinitiation zellspezifisch verläuft. Auf diese Weise kann nur der sehr aktive *mim-1/M1* Promotor das Transkriptionslevel in BM2 Zellen an das in QT6<sub>2-1</sub> Zellen heranbringen.

Bei den IRES-Konstrukten kann die Expression in QT6<sub>2-1</sub> Zellen im Gegensatz zu BM2 Zellen durch Autoregulation um ein Vielfaches gesteigert werden. Im induzierten Zustand übertrifft das Expressionslevel des Vektors psfmim-CCR/ER\_PoliolRES in QT6<sub>2-1</sub> Zellen auf diese Weise sogar die Expression in BM2 Zellen. Im nicht-induzierten Zustand ist die Differenz der Luciferaseexpression in Ziel- und Nichtzielzellen aller bicistronischen Konstrukte kleiner als die der entsprechenden monocistronischen Reportergergenkonstrukte. So ist die Luciferaseaktivität des Vektors psfmim in BM2 Zellen ca. 10 Mal so hoch wie in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (Abb. 6.2.1), im bicistronischen Konstrukt, psfmim-CCR/ER\_PoliolRES, ist die Differenz der Aktivität in den beiden Zellen nur etwa halb so groß. Grund hierfür könnte wiederum die

geringere Stabilität der bicistronischen IRES-Konstrukte in BM2 Zellen sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass die PV IRES vermittelte Translation des 2. Cistrons in BM2 Zellen weniger effektiv ist als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Die IRES wirkt somit der Zellspezifität des Promotors für myelomonozytäre Zellen entgegen. Auch Borman et al. [95] berichteten bereits von der Zellspezifität der Polio IRES.

Zusammen bewirken diese Effekte, dass trotz der sehr hohen Aktivität des *mim-1/M1*-Promotors in BM2 Zellen, die Luciferaseexpression der Konstrukte *psfmim-M1inv-CCR/ER\_PolioIRES* und *psfmim-M1-CCR/ER\_PolioIRES* in den Zielzellen nur um den Faktor 3 bzw. 5 höher ist als in den Nicht-Zielzellen.

Zusammenfassend, kann gesagt werden, dass die hohe Spezifität der eingesetzten Promotoren für myelomonozytäre Zellen in den bicistronischen Konstrukten nicht effizient auf die Expression des 2. Cistrons übertragen werden kann. Neben der Verringerung der Zellspezifität kommt es bei transienten Transfektionen zum Verlust der Regulierbarkeit in den Zielzellen. Im folgenden wurde daher ein alternatives C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssystem entwickelt (Kap. 6.9), und das Expressionsverhalten der oben beschriebenen C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte nach stabiler Integration in BM2 Zellen untersucht (Kap. 6.10).

## 6.8 Die bicistronischen tTA-Expressionssysteme

Entsprechend der Untersuchung der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte wurde im folgenden auch das Expressionsverhalten der bicistronischen tTA-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen untersucht.

### 6.8.1 Expressionstudien der tTA-Konstrukte in Nicht-Zielzellen

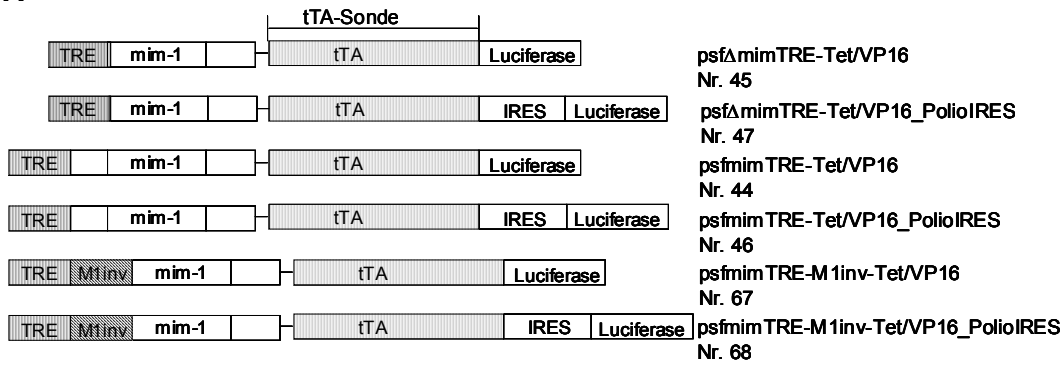
Die Ergebnisse zur Untersuchung des Expressionsverhaltens der tTA-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen sind in Abb. 6.8.1 dargestellt.

Die Studien der Protein- und RNA-Expression (Abb. 6.8.1B/C) zeigen, dass durch autoregulative Expression des Faktors tTA die Aktivität der Promotoren aller untersuchten bicistronischen Konstrukte gesteigert werden kann. Auffällig ist, dass im induzierten Zustand (- Dox) die Zahl der IRES-Transkripte (*tTA\_PolioIRES\_Luc*) niedriger ist als der Nicht-IRES-Transkripte (*tTA\_Luc*). Wie schon bei der Untersuchung der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte vermutet, könnte die Ursache hierfür die Destabilisierung der bicistronischen RNAs durch die IRES sein. Die Differenz wird bei der Detektion des tTA-Proteins noch deutlicher. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Sekundärstruktur des IRES-Transkriptes die Cap-abhängige Translation des ersten Cistrons inhibiert [96]. Kinetische Aspekte, wonach die

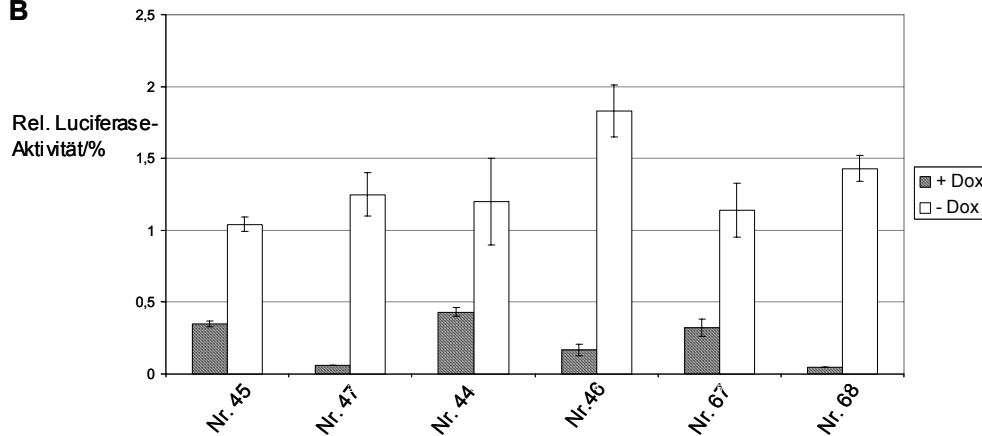
Transkription der 700 bp längeren Sequenz mehr Zeit in Anspruch nimmt, und folglich die Expression der IRES-Konstrukte zeitlich versetzt erfolgt, spielen wohl eher eine untergeordnete Rolle.

Anhand des Immunoblots ist außerdem zu erkennen, dass die Aktivität der untersuchten *mim-1* Promotoren auch durch autoregulative Expression des Faktors tTA nicht an die des CMV-Promotors in pTet-Off (Spur 15/16) heranreicht. Idealerweise liegt das an der geringen Aktivität der rekombinanten *mim-1* Promotoren in den QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Da die Erhöhung der Aktivität schwacher Promotoren durch Autoregulation normalerweise mindestens so effizient ist wie durch konstitutive Expression des Faktors tTA (vergleiche Abb. 6.2.2) [26, 97, 98], ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Ursache für die Differenz das geringere Steady-State-Level der mRNA der bicistronischen Konstrukte im Vergleich zum monocistronischen Konstrukt (pTet-Off) ist.

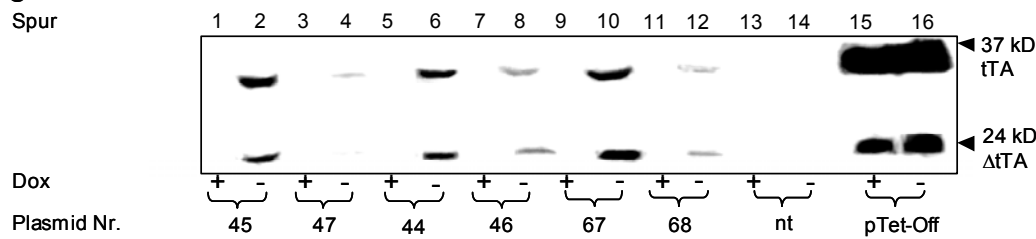
**A**



**B**



**C**



**D**

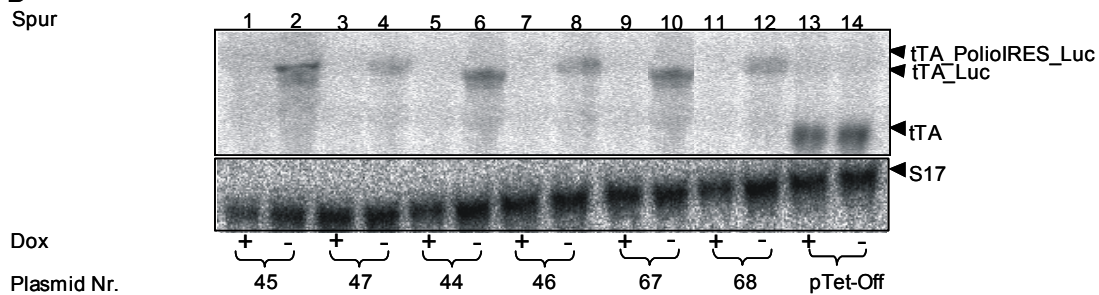


Abb. 6.8.1: Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen.

Je 3 µg der unter A) schematisch dargestellten Vektoren, sowie der Vektoren pCMVluc und pTet-Off wurden zusammen mit 0,5 µg pCMVβ in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) Dox (2 µg/ml) kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellpellets für die Reporterassays, SDS-Page und Gesamt-RNA-Isolierung aufgeteilt. Die Ergebnisse der Reporterassays sind unter B) dargestellt. Die Luciferase-Aktivität wurde über die β-Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von drei unabhängigen Messungen. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Page (10%) erfolgte der Transfer auf Nitrozellulose und die Immunodetektion C) des tTA-Proteins durch den Antikörper α-VP16. Die Gesamt-RNA wurde in einem 1%igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit der [α<sup>32</sup>-P]-dCTP markierten Tet/VP16-Sonde (1000 bp KpnI/NheI-Fragment, siehe A) und zur Kontrolle mit einer S17-Sonde (unten) hybridisiert. Gezeigt sind die Autoradiogramme (D), die Pfeilspitzen markieren die mit der Sonde hybridisierte mRNA.

Plasmide	Induktionsfaktor <sub>tTA</sub>
psfΔmimTRE-Tet/VP16	3
psfΔmimTRE-Tet/VP16_PoliolIRES	21
psfmim-Tet/VP16	3
psfmim-Tet/VP16_PoliolIRES	11
psfmim-M1inv-Tet/VP16	4
psfmim-M1inv-Tet/VP16_PoliolIRES	29

Tab. 6.8.1: Induktion der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen im Vergleich. Der Induktionsfaktor<sub>tTA</sub> ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Abwesenheit und Gegenwart von Dox.

Wie aus den Ergebnissen der Reportergenexperimente (Abb. 6.8.1 A) ersichtlich, spiegelt das Verhältnis der Luciferaseexpression der IRES und Nicht-IRES-Konstrukte im nicht-induzierten Zustand (+Dox) die Aktivität der Promotoren in QT6<sub>2-1</sub> Zellen wieder ( $mim-1/SFFV > mim-1 \approx mim-1/M1inv$ ). Im induzierten Zustand (-Dox) ist trotz höherer Expression des Faktors tTA, die Luciferaseaktivität aller Nicht-IRES-Konstrukte wesentlich niedriger als der IRES-Konstrukte (Tab. 6.8.1). Möglicherweise, inhibiert, wie schon bei den C/EBPβ/ER-Konstrukten erwähnt, das Genprodukt des ersten Cistrons, in diesem Fall der Faktor tTA, die Reinitiation der Ribosomen.

Die Luciferaseexpression durch den *mim-1/SFFV* Promotor in psfmimTRE-Tet/VP16\_PoliolIRES ist trotz geringerer Induktion im Vergleich zu den anderen IRES-Konstrukten maximal. Wie bereits beschrieben (Kap. 6.2.2), ist die Ursache für die geringere Induktion wahrscheinlich, dass im induzierten Zustand bei maximaler Aktivität Auslastung des Systems ein Expressionslimit erreicht wird.

Trotz der guten Regulierbarkeit durch Dox, ist auch bei den IRES-Konstrukten die exprimierte Luciferasemenge wesentlich geringer als bei der Cap-abhängigen Expression durch den CMV Promotor in pCMVluc (maximal 2 %). Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei den tTA-Konstrukten die Cap-abhängige Translation des ersten Cistrons wesentlich effizienter ist als die Cap-unabhängige Translation des 2. Cistrons vom gleichen Transkript. Folglich funktioniert zwar die autoregulative Hochregulation der Expression des Faktors tTA, die hohe Aktivität des Promotors kann jedoch nur zu einem Bruchteil auf die Expression des Reportergens übertragen werden.

### 6.8.2 Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in Zielzellen

Zur Untersuchung der Funktionalität der tTA-Konstrukte wurden die in der Abb. 6.8.1 A dargestellten Vektoren in BM2 Zellen transfiziert. Aufgrund der geringen Aktivität des Promotors, sowie der geringen Effizienz der Translation des zweiten Cistrons durch Reinitiation, wurde auf die Untersuchung des Vektors psfΔmimTRE-Tet/VP16 in BM2 Zellen verzichtet.

Entsprechend den Untersuchungen in QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurde auch in BM2 Zellen, neben der

Luciferaseexpression, das tTA- und RNA-Expressionslevel bestimmt. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz der BM2 Zellen durch Elektroporation (s.o.), konnten jedoch sowohl im tTA-Immunoblot als auch bei der RNA-Detektion keine Signale der erwarteten Größe detektiert werden, die entsprechenden Blots wurden daher nicht abgebildet. Die Ergebnisse der Reporter-genexperimente sind in Abb. 6.8.2 dargestellt.

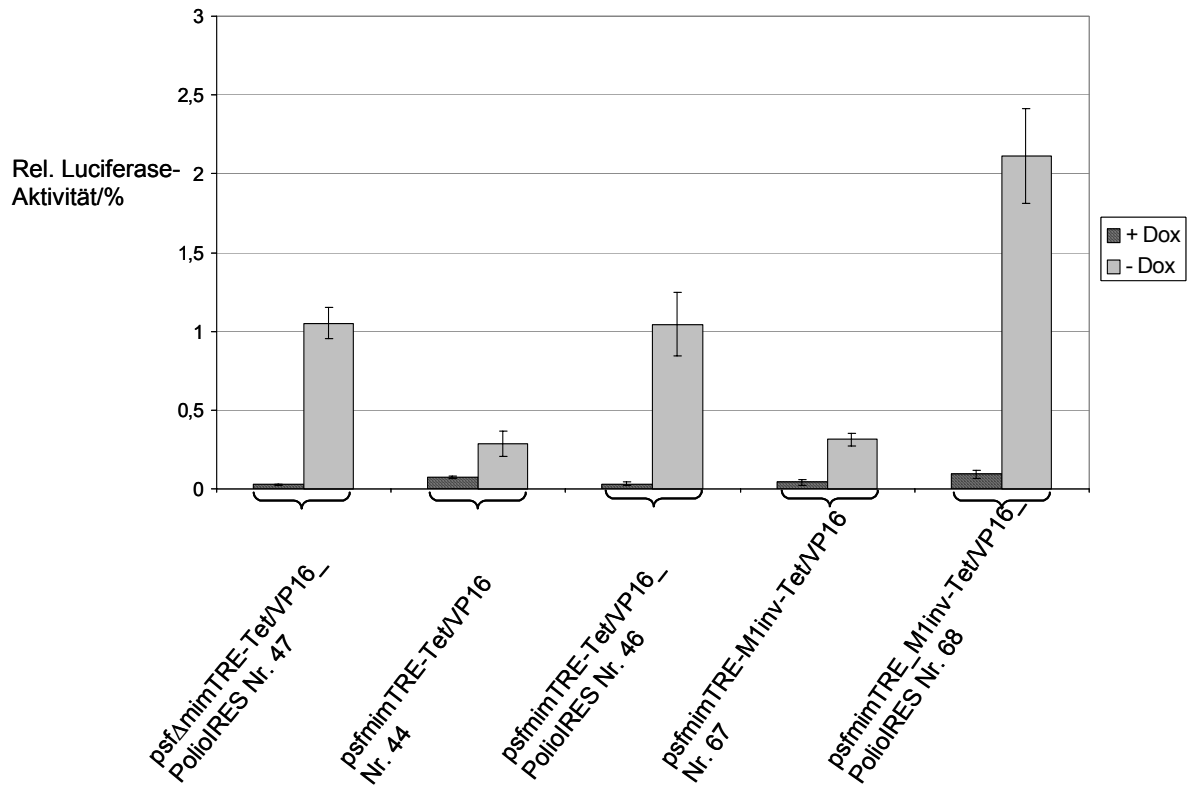


Abb. 6.8.2: Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in BM2 Zellen.

Je 18 µg der angegebenen Vektoren, sowie des Vektors pCMVluc wurden zusammen mit je 3 µg pCMVβ in BM2 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) Dox (2 µg/ml) kultiviert. Mit den Zellextrakten wurden die Reporter-genexperimente durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität wurde über die β-Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von drei unabhängigen Experimenten.

Plasmide	Induktionsfaktor <sub>tTa</sub>
psfΔmimTRE-Tet/VP16_PoliIRES	36
psfmim-Tet/VP16	4
psfmim-Tet/VP16_PoliIRES	33
psfmim-M1inv-Tet/VP16	7
psfmim-M1inv-Tet/VP16_PoliIRES	23

Tab. 6.8.2: Induktion der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in BM2 Zellen im Vergleich. Der Induktionsfaktor ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Dox.

Gemäß den Erwartungen ist die Luciferaseexpression bei den tTA-Konstrukten auch in BM2 Zellen durch den Liganden Dox regulierbar. Folglich kann durch die autoregulative Expression des starken Transaktivators tTA die Aktivität der Promotoren in BM2 Zellen noch

gesteigert werden.

Im nicht-induzierten Zustand entspricht die Luciferaseexpression der IRES-Konstrukte der Aktivität der Promotoren in BM2 Zellen (*mim-1/M1inv* > *mim-1/SFFV* > *mim-1*; vergl. Kap. 6.1). Da auch in BM2 Zellen die Luciferaseexpression der Nicht-IRES-Konstrukte höher ist als der IRES-Konstrukte ist, liegt die Vermutung nahe, das auch in diesen Zellen die IRES-Transkripte weniger stabil sind als die Nicht-IRES-Transkripte.

In Abwesenheit von Dox ist die Induktion aller Nicht-IRES-Konstrukte geringer als der IRES-Konstrukte (Tab. 6.8.2). Wie bereits oben beschrieben, ist die Ursache hierfür wahrscheinlich nicht die geringere Aktivierung des Promotors durch Autoregulation, sondern die niedrigere Translationsrate durch Reinitiation im Vergleich zur internen Initiation.

Die Luciferaseexpression durch *psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolIRES* ist maximal. Trotz der höheren Aktivität des *mim-1/M1*-Promotors, die mit einer höheren initialen Konzentration des Transaktivators tTA einhergeht, ist das Induktionslevel von *psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16* niedriger als das der anderen IRES-Konstrukte. Grund hierfür könnte wiederum die maximale Auslastung des Promotors im induzierten Zustand sein.

### 6.8.3 Vergleich der Expression der tTA-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen

Um einen Eindruck von der Expressionsstärke der untersuchten tTA-Expressionssysteme in Ziel- und Nicht-Zielzellen zu bekommen, wurden die Ergebnisse der Luciferaseexpression in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen in Abb. 6.8.3 zusammengefasst.

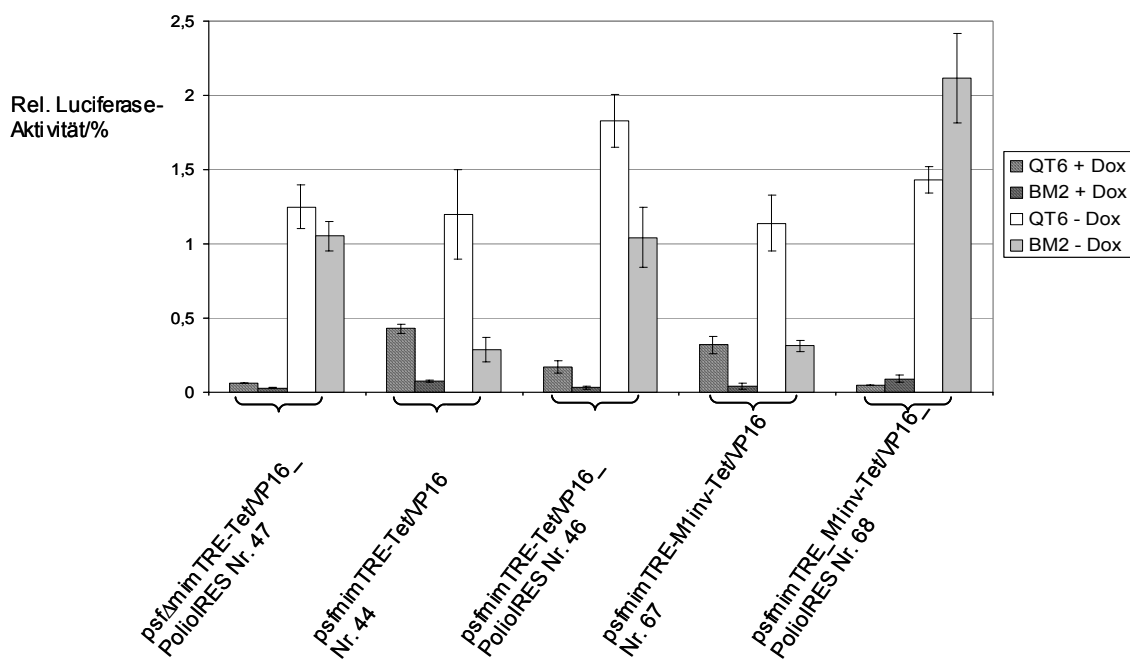


Abb. 6.8.3: Vergleich der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der angegebenen Vektoren, normiert auf die Luciferaseexpression (100%) des Vektors pCMVluc in der jeweiligen Zelllinie.

Wie schon bei den C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukten beobachtet werden konnte, ist trotz der Zellspezifität der Promotoren für myelomonozytäre Zellen (vergleiche Kap. 6.1), die Luciferaseexpression aller untersuchten bicistronischen Konstrukte mit Ausnahme des Vektors psmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolIRES in BM2 Zellen geringer als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Im Gegensatz zu den Erwartungen, ist die Expression der *mim-1* Promotorkonstrukte in BM2 Zellen nicht im „Vorteil“ gegenüber der Expression in QT6<sub>2-1</sub> Zellen.

Denkbar ist das die Verringerung der Luciferaseexpression, durch den Verlust des bicistronischen Konstruktes im Vergleich zum Plasmid pCMVluc in BM2 Zellen verursacht wird. Möglicherweise durch die mit zunehmender Größe der Vektors abnehmende Transfektionseffizienz der Elektroporation (pCMVluc Vektor ca. 5400 bp; bicistronischer Vektor ca. 7500-8200 bp), oder die geringere Stabilität der bicistronischen im Vergleich zur monocistronischen mRNA (pCMVluc). Ebenfalls kann die geringe Effizienz der Expression des 2. Cistrons durch Reinitiation bzw. interner Initiation in BM2 der Zellspezifität der Promotoren entgegenwirken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch die konstruierten tTA-Expressionssysteme nicht allen erforderlichen Kriterien entsprechen. Zwar ermöglicht die autoregulative Expression des Faktors tTA eine effiziente Regulation der Expression des Reportergens in beiden untersuchten Zelllinien, die Anordnung des Regulators und des Reportergens auf einem Vektor führt jedoch zum Verlust der Zellspezifität der Expression des Reportergens. Ursache hierfür ist möglicherweise die geringe Transfektionseffizienz der bicistronischen Vektoren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden im folgenden die Funktionalität der tTA-Expressionssysteme nach stabiler Integration in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen untersucht (Kap. 6.10).

## 6.9 Die bicistronischen $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme

Unter 6.7.2 wurde der Verlust der Regulierbarkeit der konstruierten C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme in BM2 Zellen beobachtet. Als Ursache wurde vermutet, dass der Promotor in den Zielzellen durch endogene Transkriptionsfaktoren „ausgelastet“ ist, und so durch autoregulative Expression des Faktors C/EBP $\beta$ /ER nicht stärker stimuliert werden kann (Abb. 6.7.7.2). Bei der Konstruktion der neuen C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme wurde daher die Strategie verfolgt, die Expression des *mim-1* Promotors nicht durch einen induzierbaren Aktivator sondern durch einen induzierbaren Repressor zu regulieren. Dieser sollte in Gegenwart des Liganden an den Promotor binden, und ihn durch Verdrängung funktionsfähiger Transaktivatoren inhibieren. In Abwesenheit des Liganden sollte der Repressor keinen Einfluss auf den Promotor ausüben, so dass die Expressionsstärke durch



die Zellspezifität des Promotors bestimmt wird.

Als Repressor sollte der Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 fungieren. Hierbei handelt es sich um eine durch Deletion der Transaktivierungsdomäne verkürzte Form (N-terminal -110 Aminosäuren) des Faktors C/EBP $\beta$ .

### **6.9.1 Untersuchung der Inhibierung des *mim-1* Promotors durch den Faktor C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110**

Vor der Konstruktion der regulierbaren  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionsvektoren, wurde überprüft, ob der Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 den *mim-1* Promotor tatsächlich durch Verdrängung funktionsfähiger Transaktivatoren inhibieren kann. Hierzu wurde der Vektor psfmim zusammen mit dem C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor pCDNA3-CCR in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert, und die Aktivität des Reportergens in Abwesenheit und Gegenwart des Vektors pCDNA3-CCR $\Delta$ 110 bestimmt. Da im folgenden die Regulation des Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER durch den Liganden Tamoxifen erfolgen soll, wurde außerdem untersucht, ob der Ligand die Funktion des Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 beeinflusst. Die Ergebnisse der Reporterstudien, sowie der Immunodetektion der Proteine C/EBP $\beta$  und C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 sind in Abb. 6.9.1 dargestellt.

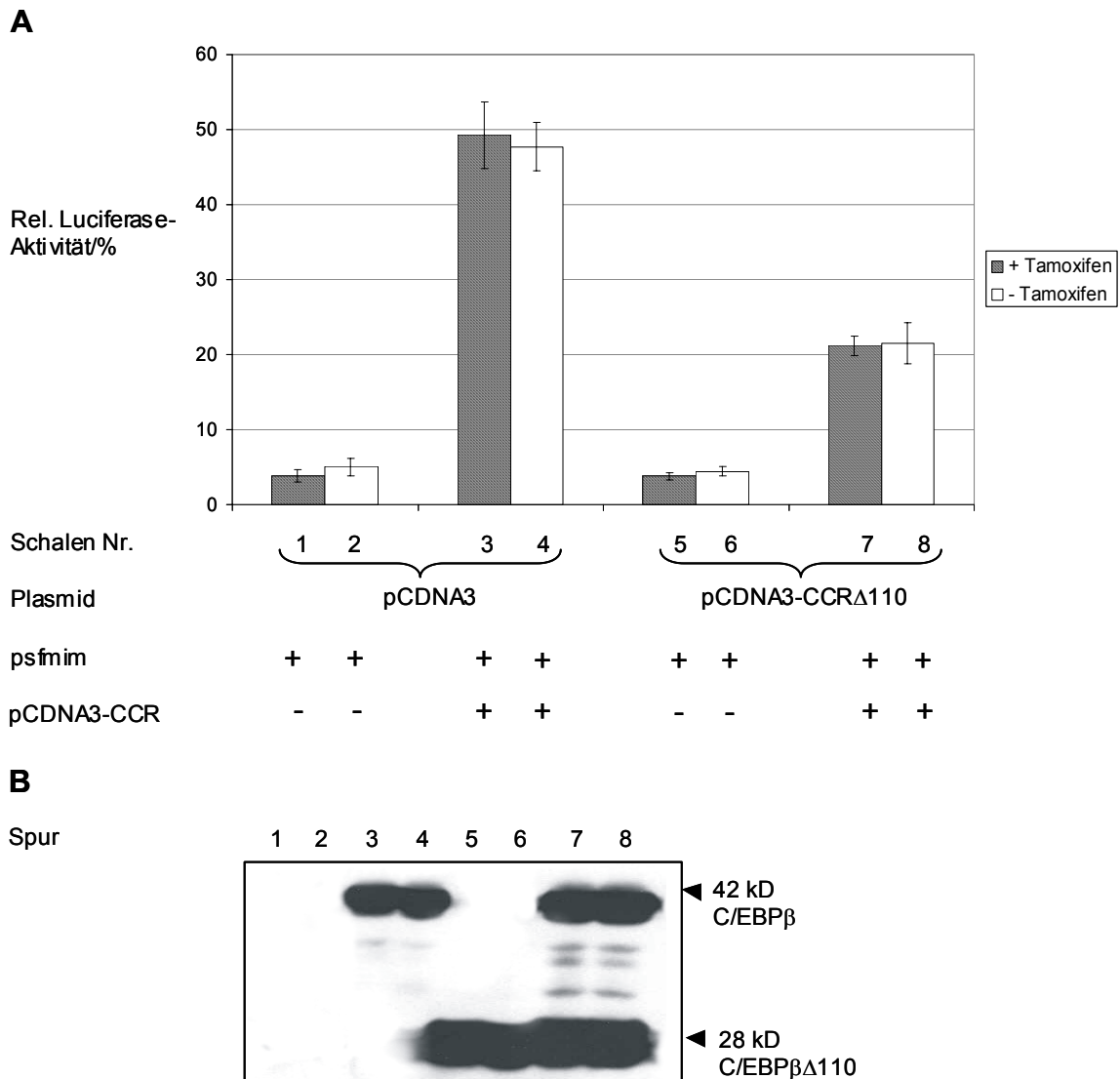


Abb. 6.9.1: Inhibierung des *mim-1* Promotors durch den Faktor C/EBPβΔ110. QT6<sub>2-1</sub> Zellen wurden mit 3 μg psfmim und 1 μg der Vektoren pCDNA3, pCDNA3-CCRΔ110 und pCDNA3-CCR (wie oben beschrieben) und 0,5 μg pCMVβ kotransfiziert. Gleich transfizierte Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) 2 μM Tamoxifen kultiviert. Anschließend wurden Zellextrakte für die Reporterassays und SDS-Page hergestellt. In A) ergibt sich die relative Luciferase-Aktivität als Quotient aus absoluter Luciferaseaktivität zu absoluter β-Galaktosidaseaktivität. Die Ergebnisse basieren auf drei unabhängigen Experimenten. Nach SDS-Page (10%) und Transfer auf Nitrozellulosemembran, erfolgte die Immunodetektion der Proteine C/EBPβ und C/EBPβΔ110 (B) mit dem Antikörper α-chCCR.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen (Abb. 6.2.1), kann die Aktivität des *mim-1* Promotors durch konstitutive Expression des Faktors C/EBPβ um den Faktor 10 gesteigert werden (Abb. 6.9.1A, vergleiche Schale 2 zu 4). Während das niedrige basale Expressionslevel des *mim-1* Promotors durch den Faktor C/EBPβΔ110 nicht beeinflusst wird (Schale 6), führt die Koexpression vergleichbarer Mengen der Faktoren C/EBPβ und C/EBPβΔ110 (Abb. 6.9.1B, Spur 8) dazu, dass die Aktivität des *mim-1* Promotors auf die Hälfte des maximalen Wertes (Spur 8) sinkt. In Gegenwart von Tamoxifen wird die Aktivität

des *mim-1* Promoters nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Faktor C/EBP $\beta$  nach Deletion der Transaktivierungsdomäne tatsächlich als Repressor des *mim-1* Promotors fungieren kann. Der Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 stellt folglich einen geeigneten Baustein für die  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme dar.

### 6.9.2 Konstruktion der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme

Die  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme wurden in analoger Weise wie die C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme konstruiert. In Abb. 6.9.2 ist die Liganden-abhängige Regulation der Expression eines solchen  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionsvektors dargestellt.

Wie in Abb. 6.9.2 zu erkennen ist, erfolgt die Regulation des Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER durch den Liganden Tamoxifen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des *mim-1* Promotors durch den Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER mit Tamoxifen effizienter als mit Es ist (Daten nicht angegeben). Vermutet wurde, dass das Transaktivierungspotential der ER-Domäne in Gegenwart von  $\beta$ -Estradiol der Inhibierung des *mim-1* Promotors durch den Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110 entgegenwirkt.

Da die Repression der Expression bei den C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER-Konstrukten ähnlich wie bei den tTA-Konstrukten die kontinuierliche Zugabe des Liganden erfordert, ist der Einsatz von Tamoxifen aufgrund seiner geringen Nebenwirkungen für eine langfristige Anwendung *in vivo* ohnehin von Vorteil.

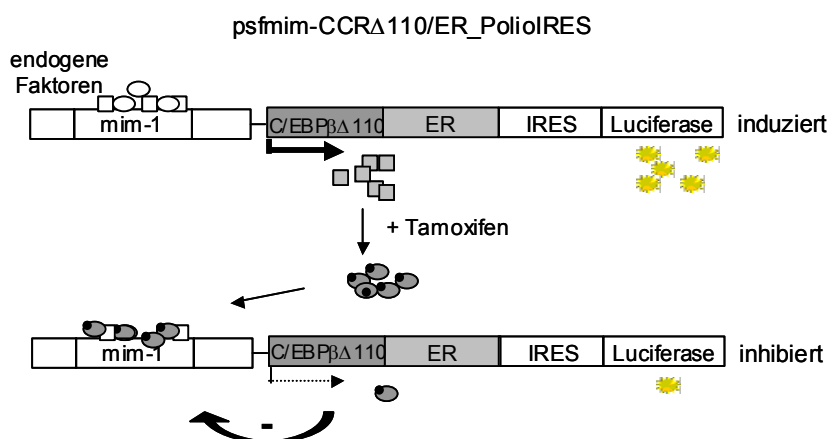
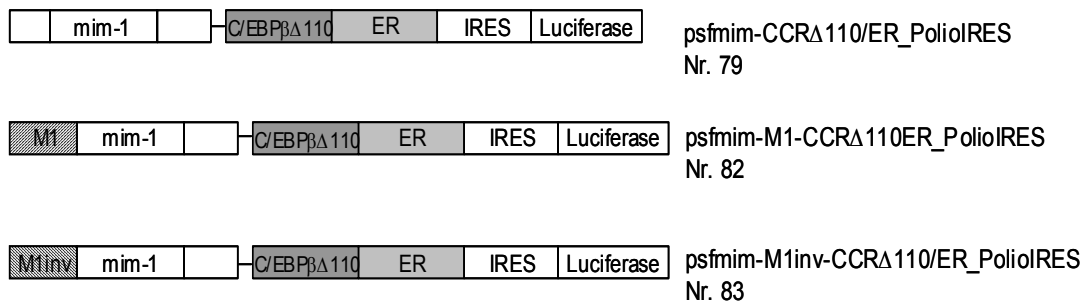


Abb. 6.9.2: Liganden-abhängige Regulation der Expression eines  $\Delta$ C/EBP $\beta$ -Expressionsvektors. In Zielzellen wird der Promotor des Vektors psfmim-CCR $\Delta$ 110/ER\_PoliolIRES durch endogene Faktoren aktiviert, und die hinter dem Promotor liegenden Gene exprimiert. In Gegenwart des Liganden bindet der Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER an den Promotor, verdrängt endogene Faktoren und inhibiert so die Expression.

### 6.9.3 Expressionsstudien der $\Delta C/EBP\beta/ER$ -Konstrukte in Nicht-Zielzellen

Die Luciferaseexpression der  $\Delta C/EBP\beta/ER$ -Konstrukte in Nicht-Zielzellen wurde durch Transfektionsexperimente in QT6<sub>2-1</sub> Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Reporter-genexperimente sind in Abb. 6.9.3 dargestellt.

**A**



**B**

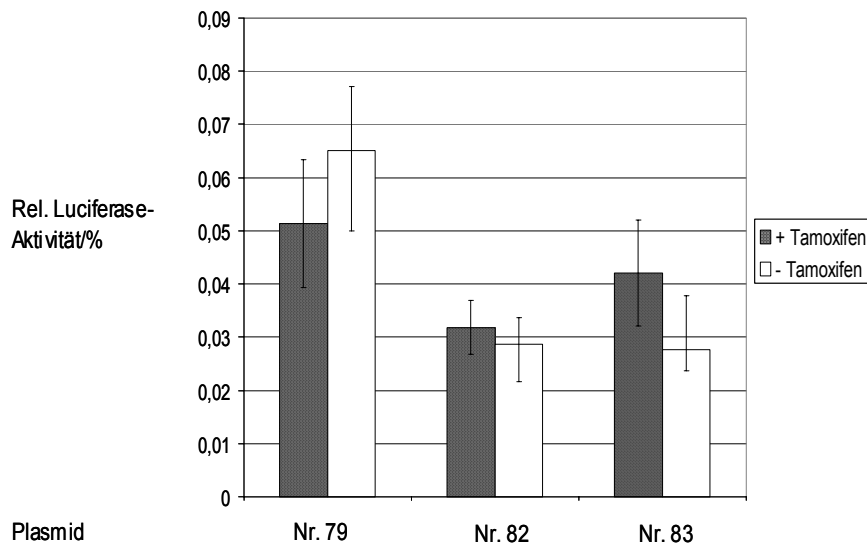


Abb. 6.9.3: Expressionsstudie der  $\Delta C/EBP\beta/ER$ -Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen.

Je 3  $\mu$ g der unter A) schematisch dargestellten Vektoren, sowie des Vektors pCMVluc wurden zusammen mit 0,5  $\mu$ g pCMV $\beta$  in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit und ohne Tamoxifen (2  $\mu$ Mol) kultiviert. Die Ergebnisse der Reporter-genexperimente sind unter B) dargestellt. Die Luciferase-Aktivität wurde über die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von zwei unabhängigen Messungen.

Das basale Expressionslevel der  $\Delta C/EBP\beta/ER$ -Konstrukte in Abwesenheit von Tamoxifen entspricht dem der bicistronischen C/EBP $\beta/ER$ -Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (siehe Abb. 6.7.1.1A), d.h. die Faktoren C/EBP $\beta/ER$  und C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER haben den gleichen Effekt auf die Translation des Luciferasegens.

In Gegenwart von Tamoxifen kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression aller drei untersuchten Konstrukte. Das heißt, dass durch Expression des Faktors C/EBP $\beta\Delta$ 110 die Aktivität des *mim-1* Promtors in QT6<sub>2-1</sub> nicht weiter verringert werden kann.

Dies ist leicht zu begründen. Zum einen, da durch die niedrige Aktivität des Promotors die Expressionsrate des Repressors gering ist, zum anderen da der Repressor nicht mit Transaktivatoren um die Bindung an dem Promotor konkurrieren muss.

**6.9.4 Expressionsstudien der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Zielzellen**

Die Luciferaseexpression der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Zielzellen wurde durch Transfektion in BM2 Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Reporterexperimente sind in Abb. 6.9.4 dargestellt.

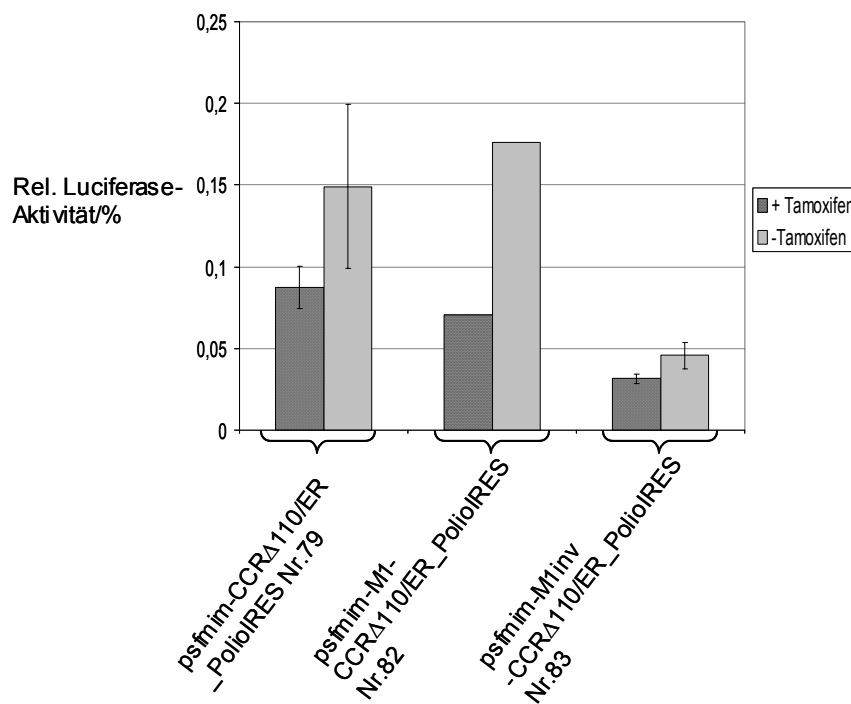


Abb. 6.9.4: Expressionsstudie der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen. Je 18  $\mu$ g der angegebenen Vektoren, sowie des Vektors pCMVluc wurden zusammen mit 3  $\mu$ g pCMV $\beta$  in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit und ohne Tamoxifen (2  $\mu$ Mol) kultiviert. Die Luciferase-Aktivität wurde über die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert, und die rel. Luciferaseaktivität von pCMVluc gleich 100% gesetzt (nicht dargestellt). Dargestellt ist der gemittelte Wert von zwei unabhängigen Messungen.

Plasmide	Repressionsfaktor
psfmim-CCR/ER_PolioIRES	1,7
psfmim-M1-CCR/ER_PolioIRES	2,5
psfmim-M1inv-CCR/ER_PolioIRES	1,5

Tab. 6.9.4: Repression der Luciferaseexpression der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen im Vergleich. Der Repressionsfaktor ergibt sich aus dem Quotient der rel. Luciferaseaktivität in Abwesenheit und Gegenwart von Tamoxifen.

Auch in BM2 Zellen entspricht das basale Luciferaseexpressionslevel der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in Abwesenheit des Liganden dem der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte (siehe Abb. 6.7.2.1A).

In Gegenwart von Tamoxifen nimmt die Luciferaseexpression aller Konstrukte ab. Die Repression der Expression ist proportional zur Höhe der Promotoraktivität der jeweiligen Konstrukte (Tab. 6.9.3), folglich erreicht sie beim Vektor psmim-M1-CCRΔ110/ER den maximalen Wert (Faktor 2,5).

Die Ergebnisse zeigen, dass in Zellen die endogenes C/EBP enthalten das Prinzip der Inhibierung des Promotors durch autoregulative Expression des Repressorproteins C/EBPβΔ110/ER tatsächlich funktioniert. Je höher die Aktivität des Promotors und damit auch die Expression des Repressors C/EBPβΔ110/ER, desto stärker die Inhibierung in Gegenwart von Tamoxifen.

### 6.9.5 Vergleich der Expression der ΔC/EBPβ/ER-Konstrukte in Ziel- und Nicht-Zielzellen

Zum Vergleich der Expressionsstärke der ΔC/EBPβ/ER-Konstrukte wurden die Ergebnisse der Luciferaseexpression in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen in Abb. 6.9.5 zusammengefasst.

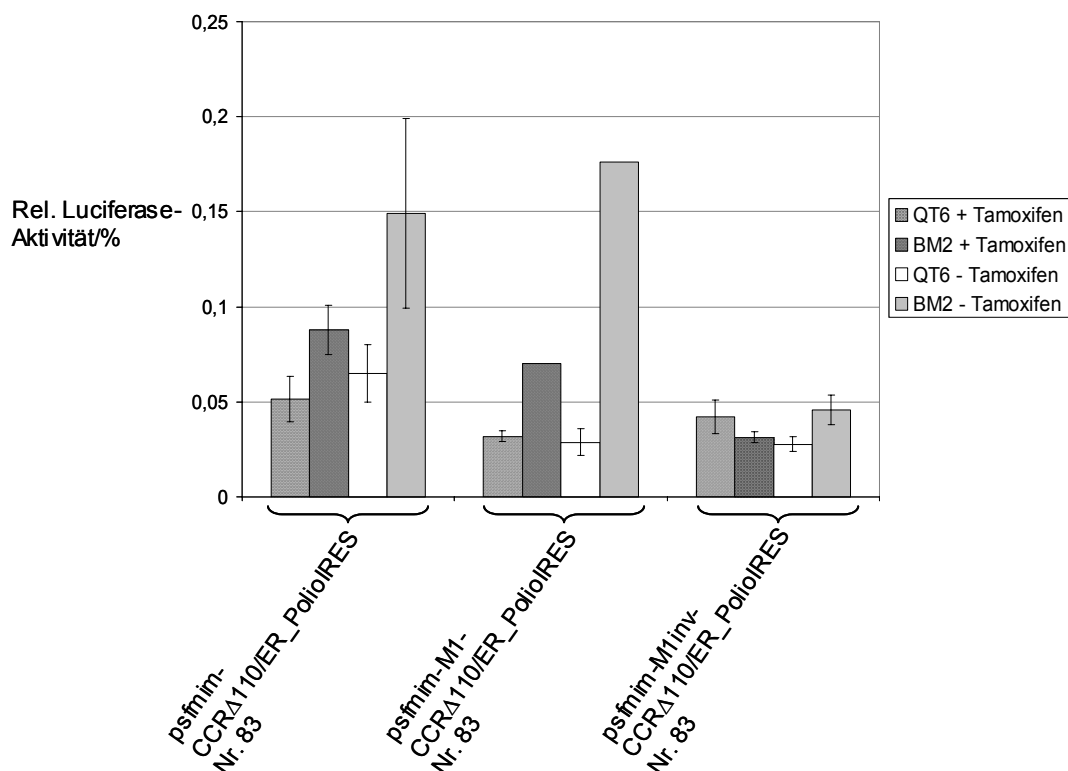


Abb. 6.9.5: Vergleich der Luciferaseexpression der ΔC/EBPβ/ER-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der angegebenen Vektoren, normiert auf die Luciferaseexpression (100%) des Vektors pCMVluc in der jeweiligen Zelllinie.

In Abwesenheit von Tamoxifen ist die Luciferaseexpression aller Konstrukte in BM2 Zellen höher als in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Am deutlichsten ist Differenz beim Vektor psfmim-M1-CCR $\Delta$ 110/ER\_PoliIRES (Faktor 6). Während bei den C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukten im induzierten Zustand durch Autoregulation in QT6<sub>2-1</sub> Zellen eine Angleichung der Expressionslevel in Ziel- und Nichtzielzellen erfolgt (Abb. 6.7.2.1), wird die Expression bei den  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukten durch die basale Aktivität der Promotoren in der jeweiligen Zelllinie bestimmt. Auffällig ist die niedrigere Expression des Vektors psfmim-M1inv-CCR/ER\_PoliIRES in BM2 Zellen. Ursache hierfür ist möglicherweise eine Mutation in der Sequenz der Promotor- oder Enhancerregion.

Wie bereits beobachtet, wird in Gegenwart von Tamoxifen die Expression der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen herunterreguliert. Im reprimierten Zustand ist das Expressionslevel des *mim-1*/M1-Konstruktes in BM2 Zellen nur etwa doppelt so hoch wie in QT6<sub>2-1</sub> Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression des *mim-1* Promotors in BM2 Zellen tatsächlich durch den Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER reguliert werden kann. Der Nachteil der  $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme ist allerdings, dass die Spanne in der eine Regulation der Expression erfolgen kann im Vergleich zu den anderen konstruierten Expressionssystemen sehr klein ist. In Abwesenheit des Liganden wird die Höhe der Expression durch die basale Aktivität des Promotors in der jeweiligen Zelllinie begrenzt. In Gegenwart des Liganden kann die Expression hingegen niemals völlig ausgeschaltet werden, da der Repressor damit auch die Expression seines eigenen Gens inhibieren würde. Folglich stellt sich durch autoregulative Expression des Repressors ein Expressionsgleichgewicht ein.

## 6.10 Vergleich der Expressionssysteme nach stabiler Integration in Ziel- und Nicht-Zielzellen

Wie einleitend beschrieben, soll in weiterführenden Arbeiten die Integration der entwickelten Expressionssysteme in einen retroviralen Vektor erfolgen. Retroviren bieten neben dem effizienten Gentransfer in eine Vielzahl von Zellen den Vorteil der stabilen Integration des retroviralen Vektors ins Wirtsgenom und ermöglichen so die stabile Expression des interessierenden Gens über einen langen Zeitraum [54, 56, 57].

Da die stabile Integration der Fremd-DNA an zufälligen Stellen in das Genom der Empfängerzelle erfolgt, wird die Expression eines stabil integrierten Vektors stark von regulatorischen Sequenzen in der chromosomalen Umgebung des Integrationsortes beeinflusst.

Aus diesem Grund wurden die konstruierten C/EBP $\beta$ /ER- bzw. tTA-Expressionssysteme hinsichtlich der Regulierbarkeit und Zellspezifität nach stabiler Integration in Ziel- und Nichtzielzellen untersucht.

Der Vergleich der Expressionsstärke der Vektoren nach stabiler Integration ist außerdem von Vorteil, da durch Quantifizierung der integrierten Vektorkopien durch Southern Blot Hybridisierung, Probleme aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen der untersuchten Zelllinien eliminiert werden können.

Um die Funktionalität der konstruierten C/EBP $\beta$ /ER- bzw. tTA-Expressionssysteme nach stabiler Integration zu untersuchen, wurden die Vektoren psfmim-M1-CCR/ER\_PoliolRES und psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolRES zusammen mit einem Neomycin-Expressionsvektor in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen transfiziert und in Gegenwart von Geneticin (G418) selektioniert. Die oben genannten Expressionsvektoren wurden ausgewählt, da sie im Rahmen der transienten Transfektionsexperimente die höchste Zellspezifität für myelomonozytäre Zellen aufwiesen.

Um ein repräsentatives Bild der Expression der unterschiedlichen Zellklone zu erhalten, erfolgte nach der Selektion die Analyse von Zellpools. Die Ergebnisse des Reporter-genexperiments und der Southern-Blot Analyse sind in Abb. 6.10 dargestellt.



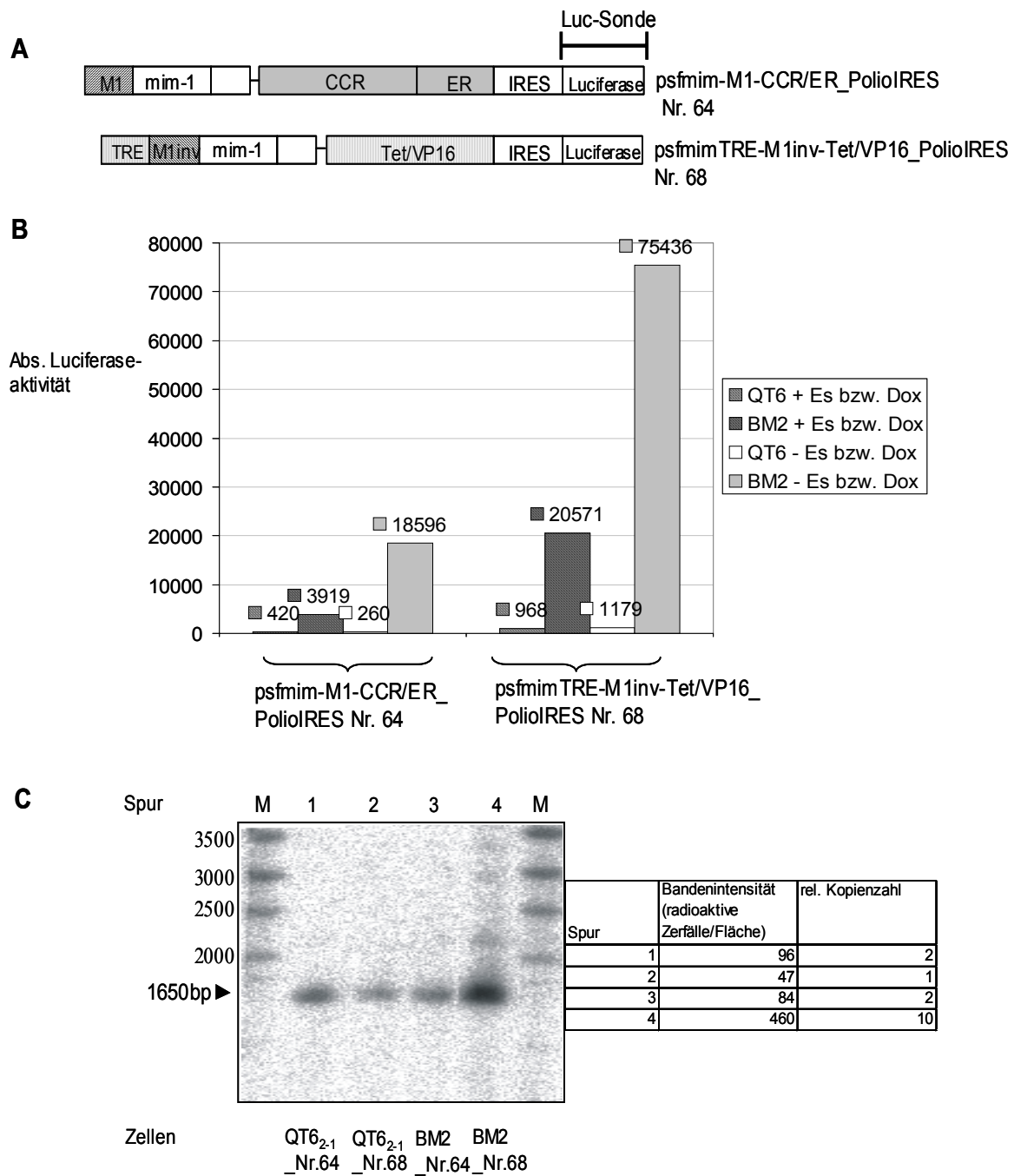


Abb. 6.10: Luciferaseexpression und Southern-Blot Analyse der Vektoren psfmim-M1-CCR/ER\_PoliolRES und psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolRES nach stabiler Integration in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.

QT6<sub>2-1</sub> Zellen und BM2 Zellen wurden mit je 18 µg der unter A) schematisch dargestellten Vektoren, sowie 3 µg (BM2) des *Neo*-Expressionsvektors (p#Neo574) kotransfiziert. Die Zellen wurden in Gegenwart von 500 µg/ml G418 selektioniert. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und jeweils 1,5 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro ml Medium in Gegenwart und Abwesenheit von Es (2 µMol) bzw. Dox (2 µg/ml) 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellpellets für den Reporterassay und die Isolierung der genomischen DNA aufgearbeitet. Die Ergebnisse des Reporterassays sind unter B) dargestellt. Gezeigt werden die absoluten Luciferase-Aktivitäten. C) 25 µg genomische DNA der stabilen Zellen wurden mit NcoI und XbaI (je 100 u) verdaut und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Nach Auftrennung der Proben im Agarosegel (1%ig) und anschließendem Southern-Blot, erfolgte die Hybridisierung mit der [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten Luc-Sonde (1650 bp NcoI/XbaI-Fragment, siehe A)). Gezeigt ist das Autoradiogramm, die Pfeilspitzen markieren die mit der Sonde hybridisierte DNA. In der Tabelle wurden die Intensitäten der detektierten Banden, und die daraus berechnete durchschnittliche Kopienzahl zusammengefasst. (M = DNA-SmartLadder).

Zelllinie		Induktionsfaktor <sub>CCR</sub>	Zellspezifitätsfaktor
QT6 <sub>2-1</sub> (Nr. 64)	+ Es	1,6	72
	- Es		
BM2(Nr. 64)	+ Es	0,2	
	- Es		
		Induktionsfaktor <sub>tTA</sub>	
QT6 <sub>2-1</sub> (Nr. 68)	+ Dox	1,2	63
	- Dox		
BM2(Nr. 68)	+ Dox	3,7	
	- Dox		

Tab. 6.10: Induzierbarkeit der Luciferaseexpression der untersuchten Zellpools im Vergleich. (Induktionsfaktor<sub>CCR</sub> = abs. Luciferaseaktivität + Es/ abs. Luciferaseaktivität – Es; Induktionsfaktor<sub>tTA</sub> = abs. Luciferaseaktivität + Es/ abs. Luciferaseaktivität – Es; Zellspezifitätsfaktor = abs. Luciferaseaktivität induziert in BM2/ abs. Luciferaseaktivität reprimiert in QT6<sub>2-1</sub>).

Die Detektion der 1650 bp-Bande in allen Spuren des Southern-Blots (Abb. 6.11.1C) zeigt, dass die stabile Integration beider Konstrukte in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen erfolgreich war.

Die Zahl der integrierten Kopien des C/EBPβ/ER-Expressionsvektors in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen ist gleich (Spur 1 und Spur 3). Die deutlich höhere Luciferaseexpression im nicht-induzierten Zustand in BM2\_Nr.64 Zellen im Vergleich zu QT6<sub>2-1</sub>\_Nr.64 Zellen (Faktor 72) kann folglich auf die Zellspezifität des Promotors zurückgeführt werden. Der Vergleich mit den Ergebnissen der transienten Transfektionsexperimente (vergl. Tab. 6.1.2) zeigt, dass die Zellspezifität des *mim-1/M1* Promotors durch stabile Integration noch gesteigert werden kann.

Überraschend ist, dass die Luciferaseexpression der BM2 (Nr. 68) Zellen in Gegenwart von Es abnimmt, der Induktionsfaktor ist < 1. Dieser Effekt ist nicht leicht zu erklären, möglicherweise ist jedoch die Induktion des Promotors durch endogenes C/EBP so hoch, dass der schwächer transaktivierende Faktor C/EBPβ/ER durch positive Rückkopplung auf den Promotor als Repressor der Expression fungiert.

Ein direkter Vergleich der Luciferaseaktivität der mit dem tTA-Konstrukt transfizierten Zellen ist aufgrund der unterschiedlichen Kopienzahl in BM2\_Nr.68 Zellen und QT6<sub>2-1</sub>\_Nr.68 Zellen (Faktor 10) nicht möglich. Aus diesem Grund muss der in Tab. 6.10 angegebene Zellspezifitätsfaktor korrekterweise noch durch den Faktor 10 geteilt werden. Warum bei gleicher Transfektionsmethode 5 Mal mehr Kopien des Vektors p<sub>psfmim</sub>TRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolIRES als des Vektors p<sub>psfmim</sub>-M1-CCR/ER\_PoliolIRES stabil in die BM2 Zellen integriert wurden, ist unklar.

Auffällig ist auch, dass im Southern-Blot der BM2\_Nr.68 Zellen (Spur 4) neben der prominenten Bande bei 1650 bp zusätzliche Banden detektiert wurden, die auf die

Integration veränderter Vektoren hinweisen. Die Größe der Banden (>1650 bp) deutet auf einen partiellen Verdau der genomischen DNA, oder eine Deletion innerhalb der Konstrukte hin, die eine der Schnittstellen mit einschließt. Umfasst die Deletion die NcoI Schnittstelle, d.h. den Transkriptionsstartpunkt des Luciferasegens, und Teile der IRES, leisten die verkürzten Integrate keinen Beitrag zu Expression des Reportergens.

Bei allen Konstrukten ist die Induzierbarkeit nach stabiler Integration in BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen niedriger als nach transienter Transfektion. Hauptsächlich lässt sich dieser Effekt wohl darauf zurückführen, dass Pools von Zellen und keine Einzelklone untersucht wurden. Da die Aktivität eines Promotors durch den Einfluss regulatorischer Elemente in der Umgebung des Integrationsortes beeinflusst wird, ist es wahrscheinlich, dass die einzelnen Zellen kein einheitliches Regulationsverhalten aufweisen. Bei der Analyse von Zellpools werden die Expressionswerte im induzierten und reprimierten Zustand gemittelt, so dass eine Abnahme des Regulationspotentials resultiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Zellspezifität der Expression durch stabile Integration der untersuchten Konstrukte wesentlich gesteigert werden kann.

### **6.11 EGFP-Expression der tTA-GFP-Konstrukte nach transienter Transfektion in QT6<sub>2-1</sub> Zellen**

Wie in Kap. 6.8 dargelegt, kann die Expression der konstruierten tTA-Expressionssysteme sowohl in QT6<sub>2-1</sub> als auch in BM2 Zellen effizient durch den Liganden Dox reguliert werden. Neben der guten Regulierbarkeit bieten die bicistronischen Konstrukte den Vorteil, dass die Expression des Reportergens mit der Expression des Transaktivators korreliert. Anhand der Expression des Reportergens können so Zellen mit einem bestimmten tTA-Expressionslevel gezielt ausgewählt, und in späteren Anwendungen für die Untersuchung der Funktionalität tTA-regulierbarer Gene eingesetzt werden.

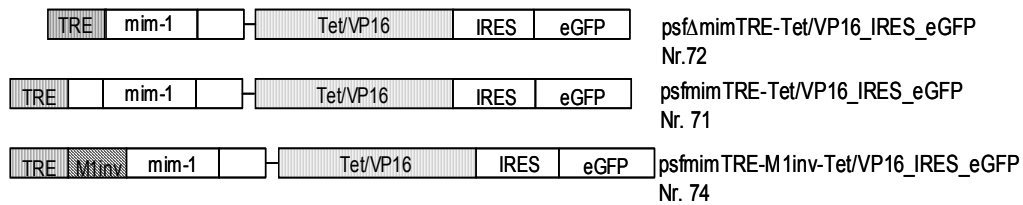
Aus praktischen Gründen wurden daher analoge tTA-Expressionssysteme mit dem „*enhanced Green Fluorescence Protein*“ (eGFP, [99] [100]) konstruiert. Vorteil der tTA-eGFP-Systeme ist, dass die Zellen zur Quantifizierung des Reportergens nicht geerntet werden müssen, und somit direkt für weitere Expressionsstudien verwendet werden können.

#### **6.11.1 Transiente Transfektion der tTA-eGFP-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen**

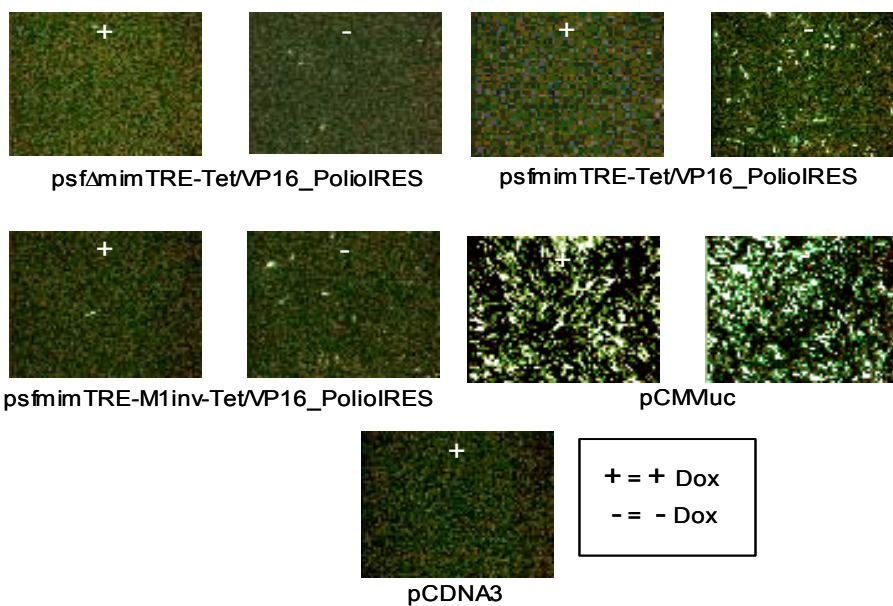
Um die Korrelation der Expression des tTA und eGFP Proteins zu untersuchen, wurden die unter 6.11.1A dargestellten tTA-eGFP-Expressionsvektoren transient in QT6<sub>2-1</sub> Zellen

transfiziert. Neben Fluoreszenzaufnahmen der eGFP-Expression der mit und ohne Dox kultivierten Zellen, wurde die tTA-Expression immunologisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.11.1.

**A**



**B**



**C**

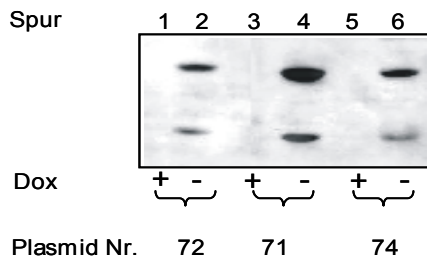


Abb. 6.11.1: Expressionsstudien der tTA-eGFP-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen. Je 3 µg der unter (A) schematisch dargestellten Vektoren wurden zusammen mit 0,5 µg pCMVβ in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit (+) und ohne (-) Dox (2 µg/ml) kultiviert, und die eGFP-Expression im Fluoreszenz-Mikroskop visualisiert (B). Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Extrakte in der SDS-Page (10%) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose, erfolgte die Immunodetektion (C) des tTA-Proteins durch den Antikörper α-VP16.

Wie die Fluoreszenzaufnahmen zeigen (Abb. 6.11.1B), findet in den Zellen die mit den regulierbaren eGFP-Expressionvektoren transfiziert nahezu keine eGFP Expression in Gegenwart von Dox statt. In Abwesenheit von Dox steigt die eGFP-Expression mit der jeweiligen Aktivität des Promotors in QT6<sub>2-1</sub> Zellen (*mim-1*/SFFV >

*mim-1* = *mim-1/M1inv*). Die Cap-abhängige eGFP-Expression des CMV Promotorkonstruktes ist hingegen konstitutiv. Der tTA-Immunoblot zeigt (Abb. 6.11.1C), dass das Expressionslevel des Regulatorproteins tTA tatsächlich mit dem des Reporters (eGFP) korreliert.

### 6.11.2 Stabile Transfektion der tTA-eGFP Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> Zellen

Wie bereits erwähnt kann die Regulierbarkeit eines stabil integrierten Vektors je nach Integrationsort stark variieren. Deshalb ist es nach stabiler Transfektion eines tTA-Expressionsvektors üblich Einzelklone zu analysieren, um Klone mit guter Regulierbarkeit aufzufinden. Da dieser Prozess zeit- und arbeitsintensiv ist, wurde untersucht, ob dieses Verfahren durch Verwendung der konstruierten tTA-eGFP-Konstrukte vereinfacht werden kann.

Hierzu wurden die Vektoren *psfmimTRE-Tet/VP16\_IRES\_eGFP* und *psfmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_IRES\_eGFP* stabil in QT6<sub>2-1</sub> Zellen transfiziert. Die eGFP-Expression einzelner adhärent wachsender Klone wurde in Gegenwart und Abwesenheit von Dox fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Bilder in Abb. 6.11.2 zeigen ausgewählte Klone, die sich durch eine besonders effiziente Regulation der eGFP-Expression auszeichneten.

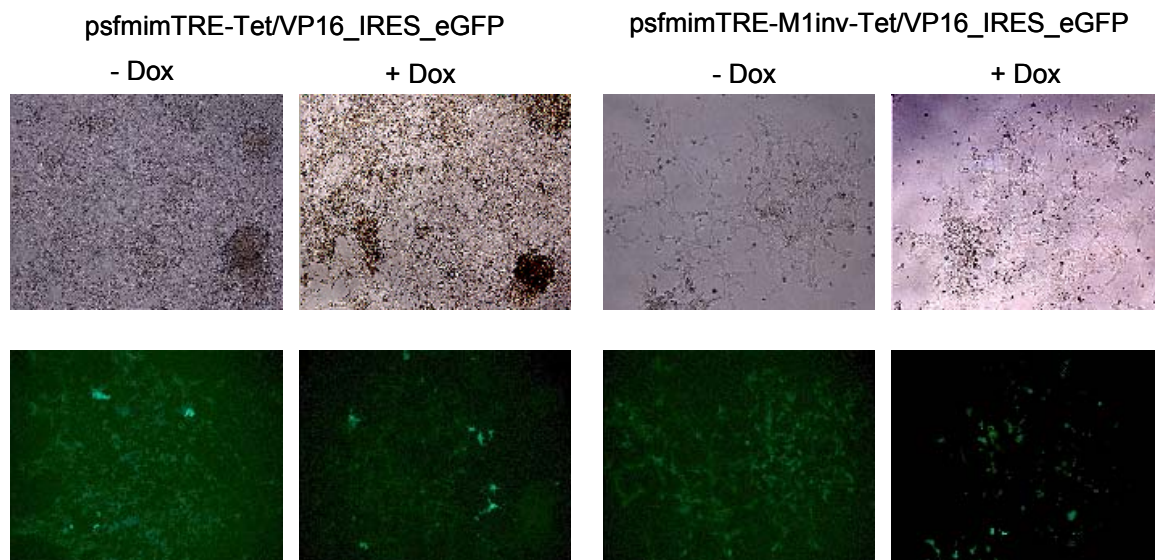


Abb. 6.11.2: Regulierbarkeit stabiler tTA-eGFP-QT6<sub>2-1</sub> Klone.

Je 18 µg der angegebenen Vektoren wurden zusammen mit dem 0,5 µg des *Neo*-Expressionsvektors pNeo#574 in QT6<sub>2-1</sub> Zellen kotransfiziert. Nach der Selektion in Gegenwart von 500 µg/ml G418, wurden Fluoreszenzbilder der Zellen gemacht und Klone mit besonders hoher eGFP-Expression ausgewählt. Anschließend wurden die Zellen weitere 48 h in Gegenwart von Dox (2 µg/ml) kultiviert, und die ausgewählten Klone erneut unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dargestellt sind die Licht- und Fluoreszenzmikroskopbilder zweier ausgewählter Zellklone in Abwesenheit und Gegenwart von Dox.

Wie zu erwarten, variierte die Regulationskapazität der eGFP exprimierenden QT6<sub>2-1</sub> Klone stark. Bei beiden Konstrukten wiesen über 70 % keine oder nur eine sehr geringe Regulierbarkeit durch den Liganden auf.

Im Vergleich zur transienten Transfektion (Kap.6.11.1) fällt auf, dass auch in den stabilen Klonen mit guter Regulierbarkeit, die eGFP-Expression durch Dox nicht vollständig ausgeschaltet werden kann. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, wie bereits oben erwähnt, der aktivierende Einfluss der chromosomalen Sequenzen auf den Promotor.

Da, wie bereits unter 6.11.1 gezeigt werden konnte, die Expression des eGFP-Proteins mit dem des Transaktivators tTA korreliert, ermöglichen die konstruierten bicistronischen eGFP-Vektoren bei adhärennten Zellen eine schnelle und einfache Selektionierung von Klonen mit guter tTA-Regulierbarkeit. Die auf einer Zellkulturschale meist gut voneinander abgegrenzt wachsenden Einzelklone können auf eine andere Zellkulturschale übertragen und, nach der Kultivierung, zur Expressionsregulation tTA-abhängiger Gene eingesetzt werden.

## 7 Diskussion

Die Entdeckung einer Vielzahl zellspezifischer, regulativer Elemente, wie Enhancer und Promotoren, sowie die Verfügbarkeit von Systemen die eine regulierbare Genexpression ermöglichen, hat die Entwicklung potentieller Gentherapievektoren in den letzten Jahren erheblich vorangetrieben. Trotzdem ist die Sicherheit dieser Vektoren häufig limitiert, da sie entweder eine zellspezifische oder eine regulierbare Expression des Transgens ermöglichen, und nur in seltenen Fällen beide Eigenschaften in sich vereinen.

Seitdem Joyner et al. [79] 1983 das erste Mal von dem erfolgreichen Transfer eines Fremdgens in humane hematopoietische Zellen berichteten, wurde ein Schwerpunkt auf die Entwicklung von Vektoren zur Korrektur von Defekten hämatopoietischer Zellen gelegt. Eine Vielzahl von Krankheiten des hämatopoietischen Systems sind bereits hinsichtlich ihres genetischen Defekts gut charakterisiert worden (z.B. Defekte im Purinmetabolismus: ADA; der Globinsynthese: Thallassämien, Sichelzellanämie; der Leukozyten Adhäsion: LAD). Zudem stellen hämatopoietische Vorläuferzellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung generell geeignete Ziele für gentherapeutische Maßnahmen dar. Da Retroviren in der Lage sind proliferierende Zellen effizient und stabil zu transduzieren, basieren die meisten der entwickelten gentherapeutischen Ansätze, wie schon bei Joyner et al. [79], auf retroviralen Vektoren [5, 78, 101-103]

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung von Expressionssystemen, die eine regulierbare, als auch auf myelomonozytäre Zellen des hämatopoietischen Systems begrenzte Expression eines Transgens ermöglichen. Vergleichbare Systeme die genau diese Kriterien erfüllen, wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ein solches Expressionssystem könnte nach Integration in einen retroviralen Vektor aufgrund seiner Zellspezifität Anwendung in der Therapie der chronischen Granulomatose (CGD, "*Chronic Granulomatous Disease*") finden. Die CGD ist eine relativ seltene, hinsichtlich ihres molekularen Defektes jedoch sehr gut charakterisierte Krankheit und beruht darauf, dass die phagozytierenden myelomonozytären Zellen aufgrund einer Unfähigkeit zur Erzeugung von Superoxyd bestimmte Keime nicht abtöten können. Der zu Grunde liegende genetische Defekt wurde im Gen der NADPH-Oxidase lokalisiert, und müsste im Prinzip durch den Transfer der Gene der defekten NADPH-Oxidase Untereinheiten in die betroffenen Zielzellen korrigiert werden können.

## 7.1 Strategien bei der Konstruktion der Expressionssysteme

Um ein hinsichtlich der Zellspezifität und Regulierbarkeit optimales Expressionssystem zu entwickeln, wurden gut charakterisierte genetische Elemente unter der Berücksichtigung einiger bereits bekannter Aspekte, wie im Folgenden dargestellt, miteinander vereint.

### 7.1.1 Der *mim-1* Promotor integriert in die U3 Region der SFFV LTR als „*Double Copy*“ Vektor

Der zentrale Baustein für die zellspezifische Expression der konstruierten Vektoren ist der gut charakterisierte Promotor des ausschließlich in myelomonozytären Zellen exprimierten *mim-1* Gens [11, 20]. In Hinblick auf die spätere Integration der konstruierten Expressionssysteme in einen retroviralen Vektor, wurde der zellspezifische Promotor nach Deletion der viralen Promotor- und Enhancersequenzen in die 5'LTR („*Long Terminal Repeat*“) des SFF („*Spleen Focus Forming*“) Virus integriert und so die Situation in einem retroviralen „*Double-Copy*“ Vektor (siehe Kap. 3.5.3) simuliert [67]. Im Gegensatz zu den meisten bisher existierenden retroviralen Vektoren für hämatopoietische Zellen, die auf dem MML („*Moloney Murine Leukemia*“ [104]) Virus basieren [105] [106] wurde die LTR des SFF Virus ausgewählt, da sie sich nach Baum et al. [83] durch eine besonders hohe Aktivität in den Zellen des hämatopoietischen Systems auszeichnet. Durch Integration des zellspezifischen Promotors in die LTR sollte gewährleistet werden, dass die Kontrolle der Expression ausschließlich durch den zellspezifischen Promotor erfolgt. In Vektoren in denen sich der Promotor hingegen zusammen mit dem Transgen zwischen den beiden flankierenden LTRs befand, führte der aktivierende Einfluss der 5'LTR zu einer Erhöhung der Basalaktivität des Promotors [107], und somit zu einer Verringerung der Zellspezifität. Ein genereller Vorteil von zellspezifischen Promotoren gegenüber starken viralen Promotoren (z.B. CMV oder LTR) besteht zudem darin, dass bei letzteren mehrfach von einer Verringerung der Aktivität nach stabiler Integration berichtet wurde [108] [109]. Dieses als transkriptionelles Silencing bezeichnete Phänomen konnte bei zellspezifischen Promotoren hingegen nicht beobachtet werden [110] [111]. Nach stabiler Integration des retroviralen Vektors sollte somit durch den *mim-1* Promotor eine zellspezifische und stabile Langzeit-Expression gewährleistet sein.

### 7.1.2 SFFV- oder M1 Enhancer

Da die Aktivität eines zellspezifischen Promotors häufig nicht ausreicht, um ein therapeutisches Gen auf hohem Niveau zu exprimieren [110, 112-114], wurde der *mim-1*



Promotor mit zusätzlichen Enhancerelementen kombiniert.

Hierzu wurde der Promotor, wie oben beschrieben, ohne Deletion des SFFV-Enhancers in die U3 Region der 5'LTR integriert, oder der SFFV-Enhancer durch den für myelomonozytäre Zellen spezifischen Enhancer des *mim-1* Gens, M1 (unveröffentlichte Ergebnisse von J. Kintscher, WWU Münster) ersetzt.

### 7.1.3 Ligandenabhängige Regulatorproteine tTA oder C/EBP $\beta$ /ER

Ein weiterer essentieller Baustein der konstruierten Expressionssysteme sind die Regulatorproteine tTA und C/EBP $\beta$ /ER. Die Regulation des *mim-1* Promotors durch beide Faktoren sollte in Abhängigkeit von einem externen Liganden erfolgen. Vorteil eines externen Liganden ist, dass die Regulation des Promotors relativ leicht durch Zugabe bzw. Wegnahme des Liganden zum Medium realisiert werden kann. Da die eingesetzten Liganden ( $\beta$ -Estradiol und Doxycyclin) zügig von den Zellen aufgenommen werden und eine hohe Affinität zu der jeweiligen Proteinbindungsstelle besitzen [115] [116], sollten sie zudem eine schnelle und sensitive Regulation der Expression ermöglichen.

Der chimäre Transaktivator tTA wurde aufgrund der hohen Effizienz der Expressionsregulation tTA-abhängiger Gene ausgewählt (unter anderen [22, 26, 87]). Um den *mim-1* Promotor durch tTA regulieren zu können, wurden auf die 5'-Seite des Promotors mehrere Kopien des DNA-Bindungsmotivs des Faktors tTA, TRE („*Tet Response Element*“), kloniert. Hoffmann et al. [117] und Veelken et al. [109] benutzen bereits ähnliche Strategien, um die Expression eines zellspezifischen Promotors durch tTA zu regulieren. Zusätzlich wurden Systeme mit einer konditionellen Variante des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  konstruiert. Der *mim-1* Promotor kann bekanntlich durch den in myelomonozytären Zellen exprimierten Faktor C/EBP $\beta$  aktiviert werden [11]. Durch Fusion der DNA-Bindungsdomäne des C/EBP $\beta$  Proteins mit der Östrogenbindungsdomäne des menschlichen Östrogenrezeptors, wurde eine  $\beta$ -Estradiol induzierbare Variante des Transkriptionsfaktors hergestellt. Die gute Regulierbarkeit ER-fusionierter Proteine durch den Liganden  $\beta$ -Estradiol wurde bereits beschrieben [116] [118]. Da sich das Regulatorprotein C/EBP $\beta$ /ER von einem zellulären Faktor ableitet, sollte es keine immunologischen Nebenwirkungen haben.

### 7.1.4 Autoregulative Expression von tTA und C/EBP $\beta$ /ER

Da die konstitutive Expression eines starken Transaktivators zum „Squelching“ (siehe Kap. 3.3.1) führen kann, wurden die Bausteine des Expressionssystems so angeordnet, dass tTA und C/EBP $\beta$ /ER die Expression ihres eigenen Gens regulieren. Durch Autoregulation sollte die Expression der Transaktivatoren so auf die Zeit der Induktion begrenzt, und toxische

Effekte minimiert werden [87].

Zudem sollte der zellspezifische *mim-1* Promotor durch positive Rückkopplung der Transaktivatoren im induzierten Zustand um ein Vielfaches aktiviert werden [109, 119].

### 7.1.5 Bicistronische Anordnung von Regulator- und reguliertem Gen über Polio Virus IRES oder Intercistron

Ein Liganden-regulierbares Expressionssystem besteht normalerweise aus zwei Komponenten: einem Gen, das für den Transaktivator kodiert, und einem Gen unter der Kontrolle des Transaktivator-induzierbaren Promotors.

In Abb. 7.1.5 sind mehrere Strategien dargestellt, nach denen ein solches regulierbares Expressionssystem aufgebaut sein kann.

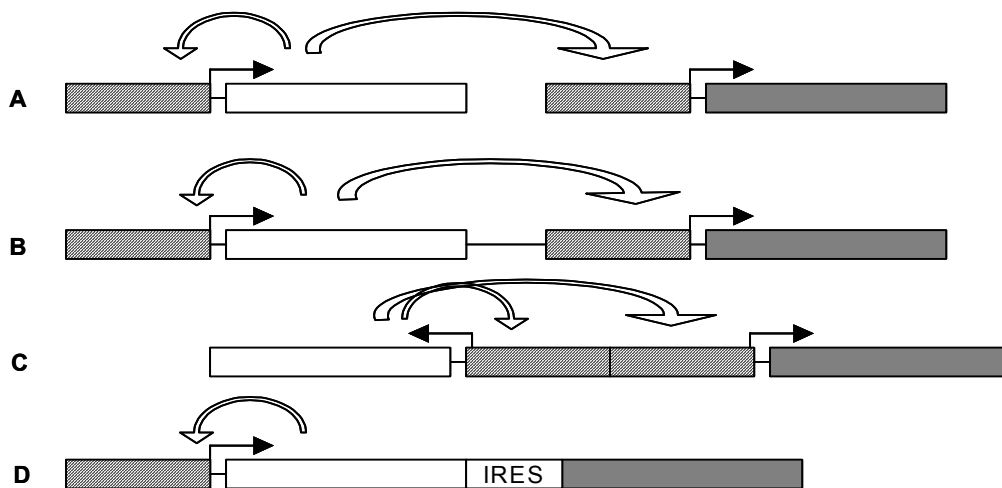


Abb.7.1.5: Strategien zur Konstruktion regulierbarer Expressionssysteme.

Das Transaktivator- und das regulierbare Gen sind (A) auf zwei unabhängigen Vektoren lokalisiert; (B) in einem Vektor als unabhängige Expressionskassetten vereint; (C) unter der Kontrolle eines bidirektionalen Promotors; oder (D) unter der Kontrolle eines Promotors in bicistronischer Anordnung. (Die geschwungenen Pfeile zeigen die Rückkopplung des Transaktivators auf den Promotor. In (D) kann sich der autoregulierte Transaktivator im ersten oder im zweiten Cistrons befinden.)

Obwohl in allen Systemen eine autoregulative Expression des Transaktivators möglich ist, ergeben sich bei den meisten Systemen, besonders in Hinblick auf eine stabile Expression nach retroviralem Gentransfer Probleme. Die stabile Kofektion des Transaktivator- und regulierbaren Gens durch zwei unabhängige Vektoren (A) ist aufgrund mehrerer Transfektions- und Selektionsschritte aufwendig und zeitintensiv. Da nicht sichergestellt werden kann, dass beide Vektoren in selbem Maße von den Zelle aufgenommen und exprimiert werden, ist ein solches von Shockett et al. [26] entwickeltes Expressionssystem für eine *in vivo* Anwendung im Rahmen einer Genterapie nicht geeignet. Sind beide Expressionseinheiten auf einem Vektor entsprechend (B) vereint (z.B. bei Paulus et al. [120]), können Interferenzen der Promotoren untereinander und zusätzlich in Verbindung mit

der 5'LTR auftreten. Letzteres gilt auch für das Expressionssystem mit bidirektionalem Promotor ((C), [90]). Abhilfe kann jedoch die Verwendung eines SIN-Vektorsystems (siehe Abb. 3.5.4; [121]) schaffen.

Um eine Expressionskontrolle des Transaktivators und des regulierbaren Gens durch den gleichen Promotor, der *mim-1*(TRE)/LTR, zu ermöglichen, wurde daher Strategie D [87] [98] gewählt.

Hierzu wurden die kodierenden Regionen über eine PV (*Polio Virus*) IRES (siehe Kap. 3.4.2 [50]) bzw. ein Intercistron (siehe Kap. 3.4.3) miteinander verbunden.

Die PV IRES besitzt gegenüber der ebenfalls häufig genutzten EMCV (*Encephalomyocarditis Virus*) IRES den Vorteil, dass sie in variablen Abstand zum stromabwärts liegenden Cistron positioniert werden kann [122].

Die kurzen (ca. 60 bp) intercistronischen Sequenzen hingegen können der PV IRES, besonders bei der späteren Integration in einen retroviralen Vektor, überlegen sein. So wurde berichtet, dass die komplexe Sekundärstruktur der IRES mit zahlreichen Haarnadelschleifen, die Verpackung in einen Retrovirus erschweren kann [123]. Außerdem ist denkbar, dass im Vergleich zu den synthetischen Intercistrons zwischen der langen (ca. 600 bp) viralen IRES Sequenz und den *trans*-Sequenzen des retroviralen Vektors häufiger Rekombinationsereignisse stattfinden (siehe Kap. 3.5.3).

### 7.1.6 Luciferase oder eGFP als Reportergergen

Um eine schnelle und sensitive Quantifizierung der Expression des 3'Cistrons zu ermöglichen, wurde stromabwärts der IRES bzw. des Intercistrons das Reportergergen Luciferase kloniert. Im Rahmen späterer Anwendungen kann das Reportergergen dann durch ein entsprechendes therapeutisches Gen ersetzt werden.

Zusätzlich wurden tTA-Expressionssysteme mit dem Reportergergen eGFP („*enhanced Green Fluorescence Protein*“) konstruiert. Durch Fluoreszenzanregung kann intrazelluläres eGFP sichtbar gemacht werden. Nach stabiler Transfektion eines eGFP-Expressionsvektors können so positive Zellklone einfach und schnell unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

## 7.2 Funktionalität der konstruierten Expressionssysteme

### 7.2.1 Die Expression durch die rekombinanten *mim-1* Promotoren erfolgt zellspezifisch

Ziel dieser Arbeit war es, durch Verwendung eines zellspezifischen Promotors die Expression der konstruierten Systeme auf myelomonozytäre Zellen zu begrenzen. Alternativ kann bei der Verwendung von retroviralen Vektoren die Zellspezifität auch durch Modifikation der in der Virushülle befindlichen Env-Proteine (siehe Kap. 3.5.1) festgelegt werden. In entsprechenden Ansätzen unterliegt das Transgen dann häufig der Kontrolle eines konstitutiven viralen Promotors [124].

Die Untersuchung der Reportergerkonstrukte *psf $\Delta$ mim* und *pGI3-240mim* zeigte, dass der *mim-1* Promotor auch nach Integration in die SFFV LTR seine Spezifität für myelomonozytäre Zellen behält (je 8fache Aktivierung). Es ist wahrscheinlich, dass die Funktionalität der SFFV LTR durch die Deletion der regulatorischen Elemente und Integration des zellspezifischen Promotors nicht beeinträchtigt wird. So berichteten Grande et al. [125] von einem ähnlichem retroviralen Vektorssystem, in denen der Enhancer des erythroiden GATA-1 Transkriptionsfaktorgens autoreguliert in die 5'LTR des MML Virus integriert wurde, und die Veränderungen der LTR keinen Einfluss auf die Verpackung der viralen mRNA in einen retroviralen Partikel, bzw. auf die Integration in das Genom der Wirtszelle hatte.

In Kombination mit dem SFFV-Enhancer kann die Zellspezifität des *mim-1* Promotors für myeloide Zellen um den Faktor 10 gesteigert werden. Vorangegangene Experimente [86] zeigten, dass die Aktivität der rekombinanten *mim-1/SFFV-LTR* in den hämatopoietischen BM2 Zellen sogar stärker ist als die der viralen SFFV-LTR allein (Faktor 1,5). Flasshove et al. [82] entwickelten ein ähnliches System, in dem sie anstelle eines zellspezifischen Promotors den TK („*Thymidine Kinase*“) Promotor in die U3 Region der SFFV-LTR inserierten. Untersuchungen entsprechender Reportergerkonstrukte in hämatopoietischen CD34 Zellen zeigten, dass die Expression durch die TK/SFFV-LTR wesentlich niedriger ist als durch die native SFFV-LTR.

Nachteilig bei dem SFFV-Enhancer ist jedoch, dass die Aktivierung der Transkription nicht strikt auf hämatopoietische Zellen beschränkt zu sein scheint. So konnte beobachtet werden, dass in Kombination mit dem SFFV-Enhancer die basale Aktivität des *mim-1* Promotors auch in Nicht-Zielzellen erhöht wird. Dieses kann, wie im Folgenden diskutiert (siehe Kap. 7.2.6) sowohl die Regulierbarkeit, als auch die Zellspezifität der Expression beeinträchtigen.

Wesentlich besser geeignet für die zellspezifische Aktivierung des *mim-1* Promotors ist der M1 Enhancer. Bei unveränderter basaler Aktivität in QT6<sub>2-1</sub> Zellen stimuliert er den Promotor in BM2 Zellen um nahezu das 30fache. Somit erreicht der zellspezifische Promotor in den Zielzellen die Aktivität des starken viralen CMV Promotors.

Die hohe Aktivität des *mim-1* Promotors in Kombination mit dem M1 Enhancer ist besonders beeindruckend, wenn man sie mit der Aktivität von Promotoren/Enhancern anderer ausschließlich in bestimmten Differenzierungsstadien hämatopoietischer Zellen exprimierter

Gene vergleicht. In Tabelle 7.2.1 sind einige dieser Promotoren zusammen mit den bereits entwickelten Gentherapieansätzen dargestellt.

Promotor Enhancer	Identifiziert von	Zielzelle	Therapeutisches Gen	gentherapeutischer Ansatz von
CD11a	Cornwell et al., 1990 [126]	Leukozyten	ADA	Bauer et al., 1994 [113]
CD11b	Shelley et al., 1991 [127]	Leukozyten	ADA	
CD18	Agura et al., 1992 [128]	Leukozyten	ADA	
$\beta$ -Globin/LCR	Grosveld et al., 1987 [129]	Erythrozyten	$\beta$ -Globin	Ido et al, 1995 [130]
				Einerhandt et al., 1995 [131]
				Novak et al., 1990 [132]
				Walsh et al., 1992 [133]
$\beta$ - Globin/GATA- 1 Enhancer		Erythrozyten	$\beta$ -Globin	Grande et al., 1990 [125]

Tab. 7.2.1: Zellspezifische Promotoren für die zielzellengerichtete Expression eines therapeutischen Gens.

Nach Bauer et al. [113] sind die Promotoren/Enhancer der drei ausschließlich in Leukozyten exprimierten Gene CD11a, CD11b, CD18 in den Zelllinien K562 (unreife Leukozyten) sowie den myeloiden HL-60 Zellen nach transients Transfektion weit weniger aktiv, als die virale 5'LTR oder der CMV Promotor (Faktor 15). Eine ausreichende Expression des therapeutischen ADA Gens erfordert daher zusätzliche *cis*-aktivierende Sequenzen.

Bisherigen Berichten zur Folge erfolgte die zellspezifische Aktivierung eines nicht-konstitutiven Promotors nur durch LCRs ähnlich effektiv wie durch den M1 Enhancer.

So gelang es verschiedene Globin Gene, durch den  $\beta$ -Globin Promotor in Kombination mit den wichtigsten regulatorischen Domänen der gut charakterisierten  $\beta$ -Globin LCR auf hohem Niveau Erythrozyten-spezifisch zu exprimieren [130-132].

Dies könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass es sich bei der M1 Region, die zahlreiche DNase I-hypersensitive Stellen enthält, ebenfalls um eine LCR handelt. Dieser Aspekt soll in Kap. 7.2.10 genauer diskutiert werden.

## 7.2.2 Problematik der Zellspezifität

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Frage nach der Zellspezifität durch die Untersuchung des rekombinanten Promotors in nur zwei Zelllinien nicht ausreichend

beantwortet werden kann. Die untersuchten BM2 und QT6<sub>2-1</sub> Zellen stellen im Prinzip nur zwei Grenzfälle dar, Zellen mit den myeloiden-spezifischen Transkriptionsfaktoren Myb und C/EBP sowie Zellen ohne diese beiden Faktoren. Doch verhält sich der *mim*-1 Promotor auch im Vergleich zu Zellen die den myeloiden Zellen physiologisch ähnlicher sind zellspezifisch? Wie hoch ist die Expression in den ebenfalls aus myeloiden Zellen hervorgehenden erythroiden Zellen oder den ausdifferenzierten Granulozyten und Makrophagen (siehe Abb. 3.1). Um die Zellspezifität zu validieren, sind folglich Untersuchungen in einer Reihe anderer (hämatopoietischer) Zellen notwendig. Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der differenzierungsspezifischen Expression in myeloiden Zellen, stellen HL60 Zellen dar. Diese Zellen differenzieren in Gegenwart von Dimethylsulfoxid zu Granulozyten, in Gegenwart von Phorbolmyristataacetat zu Makrophagen [107].

Zur Untersuchungen der Zellspezifität von Promotoren und Enhancern sind Reportergenexperimente in unterschiedlichen Zelllinien sehr verbreitet. Doch können diese Experimente immer nur gewisse Tendenzen vorgeben; ob die Expression tatsächlich strikt gewebe- und differenzierungsspezifisch erfolgt, kann letztlich nur durch *in vivo* Untersuchungen geklärt werden.

### 7.2.3 Das Prinzip der Autoregulation funktioniert

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl C/EBP $\beta$ /ER als auch tTA durch den rekombinanten *mim*(TRE)-1 Promotor autoregativ die Expression ihres eigenen Gens regulieren können. Während die Expression im nicht-induzierten Zustand durch die basale Aktivität des Promotors in der jeweiligen Zelllinie bestimmt wird, bewirkt die positive Rückkopplung beider Transaktivatoren auf den zellspezifischen Promotor eine effiziente Hochregulation der Expression. C/EBP $\beta$ /ER als auch tTA funktionieren somit durch Zugabe bzw. Wegnahme des jeweiligen Liganden als molekulare Schalter der konstruierten Expressionssysteme. Die Induktion des Promotors und somit auch die Regulation der Expression durch das chimäre tTA Protein mit der viralen Transaktivierungsdomäne ist effizienter als durch das von einem zellulären Transkriptionsfaktor abgeleitete C/EBP $\beta$ /ER (+Es) Protein. Je nach dem erforderlichen Expressionsniveau ist jedoch der Einsatz beider Faktoren zu Regulation der Genexpression in einem therapeutischen Expressionsvektor denkbar.

### 7.2.4 Die Induktion des *mim*(TRE)-1 Promotors durch C/EBP $\beta$ /ER und tTA ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Liganden

Die Ergebnisse aus Kap. 6.5.1 zeigten, das bereits ein Bruchteil der üblicherweise in der

Literatur angegebenen Ligandenkonzentration ausreichend ist [89, 90], um die Expressionssysteme maximal zu induzieren (0,2 nmol Es) bzw. zu reprimieren (20 ng/ml Dox). Die hohe Affinität beider Regulatorproteine zu dem jeweiligen Liganden, und die damit verbundene Sensitivität der Systeme ist natürlich vor allen Dingen in Hinblick auf eine stabile Integration der Expressionssysteme von Vorteil. Hierdurch können bei wiederholter (Induktion der C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme), und besonders bei kontinuierlicher (Repression der tTA-Expressionssysteme) Zugabe des Hormons Es bzw. des Antibiotikums Dox unspezifische pleiotrope Nebenwirkungen minimiert werden.

Wie erwartet erfolgt die Induktion durch den Liganden zudem konzentrationsabhängig. Der Konzentrationsbereich in dem eine Regulation der Expression möglich ist, erstreckt sich in beiden Fällen über mehrere Zehnerpotenzen, so dass nicht nur ein Liganden-abhängiges Ein- und Ausschalten, sondern eine „Feinregulation“ der Expression möglich ist.

Damit erfüllen beide Systeme ein wichtiges Kriterium eines Gentherapievektors, nämlich die Möglichkeit die Expressionsstärke eines therapeutischen Genproduktes nicht nur zeitlich, sondern auch quantitativ steuern zu können und so individuell auf einen physiologisch relevanten Wert einzustellen.

### **7.2.5 Verminderung der Toxizität des Transaktivators tTA durch Autoregulation**

Ein weiteres Ziel der Autoregulation war es, die Expression des Transaktivators auf die Zeit der Induktion zu beschränken, um „Squelching“-Effekte insbesondere des starken Transaktivators tTA zu minimieren. Problematisch ist allerdings, dass in der Phase der Induktion durch Autoregulation höhere tTA-Expressionslevel erreicht werden können als durch konstitutive Expression [26]. Gallia et al. [97] beobachteten bei autoregulativer Expression von tTA durch den minimalen CMV Promotor, bereits nach 48 h eine Reihe morphologischer Veränderungen, sowie ein verlangsamtes Wachstum und eine geringere Teilungsrates der transfizierten Zellen.

Zwar konnte bei den untersuchten stabilen QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen keine diese Veränderungen festgestellt werden, dennoch ist die Repression des Transaktivators besonders bei der Langzeitkultivierung der Zellen durch kontinuierliche Dox-Zugabe erforderlich. Vorteil ist, dass hierzu, wie unter 7.2.4, beschrieben bereits sehr niedrige Dox-Konzentrationen ausreichend sind, die auch auf Dauer keine schädigenden Effekte für die Zellen haben sollten.

Zur Verwendung eines Tet-Off regulierbaren Expressionssystems in einem transgenen Organismus, wäre es natürlich trotzdem von großem Vorteil eine kontinuierliche Verabreichung des Antibiotikums zu vermeiden. Eine Möglichkeit bestünde darin das tTA Protein durch eine Variante mit verringertem Transaktivierungspotential und somit

verringertes Toxizität einzusetzen. Baron et al. [88] entwickelten solche tTA-Varianten aus der minimalen (12 Aminosäuren) VP16-Transaktivierungsdomäne. Durch Variation der Kopienzahl der minimalen Transaktivierungsdomäne können Transaktivatoren mit abgestuftem Transaktivierungspotential generiert werden, die es ermöglichen ein Gleichgewicht zwischen Transaktivierung einerseits, und verminderter Toxizität durch „Squelching“ andererseits, einzustellen.

Ein weiterer Vorteil der Verkürzung der VP16 Domäne ist zudem, dass potentielle Epitope durch die eine Immunantwort hervorgerufen werden kann, eliminiert werden.

### **7.2.6 Autoregulierbarkeit führt zu Hochregulation der Expression auch in Nicht-Zielzellen**

Um die autoregulative Expression eines Transaktivators zu ermöglichen ist eine geringe Transaktivator-unabhängige Basalexpression des Promotors notwendig. Da bereits eine minimale Induktion des Promotors ausreicht, damit sich das System durch Autoregulation sukzessiv „aufschaukelt“, stellt die basale Aktivität der rekombinanten *mim-1* Promotoren in QT6<sub>2-1</sub> Zellen ein großes Problem dar.

Während in den untersuchten C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssystemen der *mim-1* Promotor nur in Kombination mit dem SFFV-Enhancer aktiv genug ist, um die Expression des Systems in den Nicht-Zielzellen hochzuregulieren, führt die Autoregulation des starken Transaktivators tTA auch zur Aktivierung des *mim-1* bzw. *mim-1/M1* Promotors.

Erwartet wurde, dass aufgrund der Zellspezifität des Promotors und der damit verbundenen höheren initialen Induktion, die Expressionssysteme in BM2 Zellen im Vergleich zu den QT6<sub>2-1</sub> Zellen einen „Vorsprung“ besitzen.

Es scheint jedoch so zu sein, dass durch positive Rückkopplung insbesondere des starken Transaktivators tTA auf den Promotor schnell ein Zustand erreicht wird in dem die Transkriptionsmaschinerie ausgelastet und die Induktion maximal ist. Beide unerwünschten Nebeneffekte der Autoregulation -Hochregulation der Expression in den Nicht-Zielzellen und Auslastung der Transkriptionsmaschinerie in den Zielzellen- führen letztendlich zum Verlust der Zellspezifität.

Durch Minimierung des Promotors auf die entscheidenden regulatorischen Elemente, d.h. auf die C/EBP- und Myb-Bindungsstellen, könnte die Expression in den Nicht-Zielzellen ausgeschaltet werden. Ein zusätzlicher positiver Effekt könnte sein, dass auch die Basalexpression in BM2 Zellen gesenkt wird und dadurch die Regulierbarkeit zunimmt.



### **7.2.7 Induktion der C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme durch endogene Faktoren führt zum Verlust der Regulierbarkeit**

Nach Saez et al. [21] darf ein optimales, regulierbares System nicht mit endogenen Aktivatoren oder zellulären Reaktionswegen interferieren (siehe 3.3). Wie die Untersuchungen in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen zeigten, erfüllen die C/EBP $\beta$ /ER-Expressionssysteme dieses Kriterium nicht. Problematisch erwies sich zum einen, dass der Transaktivator des Systems selbst, C/EBP $\beta$ /ER (+Es), den *mim-1* Promotor weniger stark aktiviert, als die Summe der endogenen Transkriptionsfaktoren in BM2 Zellen. Aus diesem Grund kann die Aktivität des in den Zielzellen bereits induzierten Promotors durch positive Rückkopplung des Faktors C/EBP $\beta$ /ER nicht mehr gesteigert werden. Das Resultat ist der Verlust der Regulierbarkeit der Expression.

Da sich das Regulatorprotein C/EBP $\beta$ /ER von einem zellulären Transkriptionsfaktor ableitet, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass es im aktiven Zustand (+Es) mit zellulären Reaktionswegen interferiert. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Tatsache, dass es nicht gelang stabile BM2 Zellen mit konstitutiv exprimiertem C/EBP $\beta$ /ER in Gegenwart von Es zu generieren. Nach der Transfektion bildeten die Suspensionszellen Ausläufer und hefteten sich, ähnlich wie differenzierte Zellen, an den Boden der Zellkulturschale, und starben dann innerhalb von wenigen Tagen. BM2 Zellen durchlaufen normalerweise kein Differenzierungsprogramm, sondern bleiben durch die Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP und Myb in dem Stadium myeloider Vorläuferzellen (siehe Abb. 3.1). Scheinbar bringt die Expression des Faktors C/EBP $\beta$ /ER (+Es) dieses transkriptionelle Kontrollsystem aus dem Gleichgewicht und führt letztendlich zur Apoptose der Zellen.

### **7.2.8 Durch autoregulative Expression des Repressors C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER limitiert sich das Expressionssystem selbst**

Da, wie unter 7.2.6 beschrieben, die autoregulative Expression des Transaktivators C/EBP $\beta$ /ER zum Verlust der Regulierbarkeit in den Zielzellen führt, wurde versucht die Expression des *mim-1* Promotors durch den Es induzierbaren Repressor C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER zu regulieren. Dieser sollte in Gegenwart des Liganden an den Promotor binden, und ihn durch Verdrängung endogener Transkriptionsfaktoren inhibieren. In Abwesenheit des Liganden sollte der Repressor keinen Einfluss auf den Promotor ausüben, so dass die Expressionsstärke durch die Zellspezifität des Promotors bestimmt wird.

Die Untersuchung der C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER Expressionssysteme zeigte, dass die Regulation des *mim-1* Promotors durch den Repressor tatsächlich funktioniert. Während die autoregulatorische Expression des Faktors C/EBP $\beta\Delta$ 110/ER in QT6<sub>2-1</sub> Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der basalen Expression führt, bewirkt sie in BM2 Zellen eine

Repression des *mim-1* Promotors.

Nachteil dieses Systems ist jedoch die geringe Regulationskapazität. Im induzierten Zustand (-Tamoxifen) wird die Expression durch die basale Aktivität des zellspezifischen Promotors in der jeweiligen Zelllinie begrenzt, im reprimierten Zustand (+Tamoxifen) kann die Expression aufgrund der autoregulativen Expression des Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER nie völlig ausgeschaltet werden. Durch Autoregulation des Repressors limitiert sich das System somit selbst.

Trotzdem stellt der Faktor C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER einen hoffnungsvollen Kandidaten für die effiziente Regulation der *mim-1*-Expressionssysteme nach stabiler Integration in die Zielzellen dar. Es konnte gezeigt werden, dass die basale Aktivität des *mim-1*/M1 Promotors nach stabiler Integration in BM2 Zellen sehr hoch ist. Zudem sollte aufgrund der starken Aktivierung des Promotors durch endogene Faktoren die Inhibierung des zellspezifischen Promotors durch C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER besonders effizient sein. (So konnte bereits gezeigt werden, dass nach stabiler Integration selbst der Faktor C/EBP $\beta$ /ER durch Rückkopplung auf den *mim-1*/M1 Promotor und Verdrängung aktiverer Transkriptionsfaktoren die Expression inhibiert.)

Durch konstitutive Expression könnte die Regulationskapazität von C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER erhöht werden. Aufgrund möglicher Promotorinterferenzen ist jedoch die Vereinigung beider Expressionskassetten ([konstitutiver Promotor]-[C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER] und [*mim-1* Promotor]-[Zielgen]) in einem retroviralen Vektor problematisch (siehe Kap. 7.1.5). Außerdem stellt sich bei konstitutiver Expression wiederum die Frage nach dem Einfluss des Faktors C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER (+Tamoxifen) auf endogene zelluläre Regulationsprozesse.

### 7.2.9 Niedrige Expression des 3'Cistrons durch Reinitiation und interne Initiation

In den konstruierten Expressionssystemen erfolgt die Translation des 3'Cistrons Cap-unabhängig, entweder durch Reinitiation an einem Intercistron, bzw. durch interne Initiation an der PV IRES. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass ein großes Defizit beider Systeme die geringe Effizienz der Translation des 3'Cistrons ist. Die Aktivität des Promotors wird nur zu einem Bruchteil auf die Expression des 3'Cistrons übertragen, wodurch eine Verringerung der Regulierbarkeit und Zellspezifität resultiert.

Die Ursachen für die geringe Effizienz der Translation des 3'Cistrons durch Reinitiation können vielfältiger Natur sein. Eine mögliche Ursache ist die Länge des 3'Cistrons. So berichteten Luukkonen et. al. [51], dass die Fähigkeit der Ribosomen zur Reinitiation mit zunehmender Länge des stromaufwärts liegenden ORFs abnimmt. Kozak [52] vermutete, dass während der Translation des 5'Cistrons eine Reihe von Translationsfaktoren nicht direkt bei Eintritt der 60S Ribosomenuntereinheit, sondern erst nach und nach von dem

Ribosomenkomplex dissoziieren, und je nach Länge des 5'Cistrons nicht mehr für die Reinitiation am 3'AUG zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist die Translation des 3'Cistrons durch Reinitiation nur effizient, wenn das stromaufwärts liegende ORF für ein kurzes Peptid und nicht für ein komplettes Protein kodiert.

Denkbar ist außerdem, dass neben der Länge auch die Sequenz des stromaufwärts liegenden ORFs (kodierende Region des Regulators) einen Einfluss auf die Translation des 3'ORFs (kodierende Region des Reporters) hat. So berichteten Grant et al. [134], dass nach Translation einiger kurzer 5'ORFs keine Reinitiation der Ribosomen an einem stromabwärts liegenden Startkodon stattfand. Ein weiteres Indiz für den Einfluss der Sequenz könnte die Beobachtung von Havenga et al. [135] sein, wonach je nach Anordnung verschiedener kodierender Regionen in einem bicistronischen retroviralen Vektor die durch ein 36 bp langes Intercistron vermittelte Translation des 3'Cistrons stark variierte.

Wie bereits einleitend erwähnt, spielt für die Effizienz der Reinitiation auch die Länge und Struktur der intercistronischen Sequenz eine Rolle. In dem Intercistron dürfen sich keine weiteren Startkodons und stabile Sekundärstrukturen, wie Haarnadelschleifen, befinden [136]. Diese Bedingungen erfüllen die eingesetzten Intercistrone.

Zur optimalen Länge des Intercistrone kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen keine eindeutige Aussage gemacht werden. Zwar zeigte Kozak [32], dass die Effizienz der Reinitiation durch die Verlängerung der intercistronischen Sequenz schrittweise verbessert werden kann (max. 150 bp), nach Optimierung der umgebenden Sequenzen bewirkten jedoch auch sehr kurze Intercistrone (15 bp) eine effiziente Translation des stromabwärts liegenden Cistrone [53] [135].

Generell scheinen die Intercistron-Konstrukte aufgrund der geringen Effizienz der Reinitiation für die Expression eines korrigierenden Gens im Rahmen einer Gentherapie ungeeignet. Denkbar wäre jedoch, dass ein Intercistron die Expression eines Selektionsmarkers in einem polycistronischen Vektor kontrolliert, aufgrund der niedrigen Expression könnte dann eine stringente Selektion erfolgen [137].

Wesentlich effizienter als die Translation durch Reinitiation erwies sich bei der Koexpression mehrerer Genprodukte von einem einzigen Promotortranskript in vielen Fällen die Translation durch interne Initiation [91] [94].

Dies spiegelte sich auch beim Vergleich der IRES- und Nicht-IRES Konstrukte in dieser Arbeit wieder. Trotzdem kann auch im Falle der IRES-vermittelten Translation die Aktivität des Promotors nur zu einem Bruchteil auf die Expression des 3'Cistrone übertragen werden. Die Cap-abhängige Translation des 1. Cistrone (kodierende Region des Regulators) ist in allen Konstrukten wesentlich höher als die Translation des 2. Cistrone (kodierende Region des Reportergens) vom selben Transkript (mindestens Faktor 10).

Ähnliches wurde bereits bei der Untersuchung einer Reihe anderer bicistronischer PV IRES Expressionssysteme beobachtet [82, 93, 94], so dass angenommen werden kann, dass die

Cap-abhängige Translation generell effizienter ist als die Translation durch interne Initiation. Eine weitere Ursache für die geringe Effizienz der internen Initiation könnte auch der geringe Abstand der PV IRES zu stromaufwärts liegenden Cistron sein (ca. 15 bp). Nach Attal et al. [138] funktioniert die PV IRES nur dann optimal, wenn sie 100 Nukleotide nach dem Stoppkodon des 1. Cistrons inseriert wird.

Darüberhinaus wird die IRES-vermittelte Translation in einem bicistronischen Vektor scheinbar auch von der Sequenz und Anordnung des 5' und 3' ORFs beeinflusst.

So zeigten Hennecke et al. [96], dass die Sequenz bzw. das Genprodukt des 1. Cistrons die interne Initiation zum Teil drastisch inhibiert. Da es sich bei den konstruierten Expressionssystemen mit tTA und C/EBP $\beta$ /ER um zwei völlig verschiedene Proteine handelt, ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass beide im selben Maße die Translation des 5' Cistrons inhibieren.

Ein weiterer wichtiger Punkt, ist die Tatsache, dass die Effizienz der PV IRES stark von der jeweiligen Zelllinie abhängt [139]. Wie der Vergleich der Expression der IRES-Konstrukte in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen zeigte, scheint die Zellspezifität der PV IRES der Zellspezifität des Promotors entgegenzuwirken.

Eine Verbesserung der Translationseffizienz und Zellspezifität der Expressionssysteme könnte möglicherweise durch die EMCV IRES erzielt werden. Diese weist nahezu keine Zellspezifität auf und ist in vielen Fällen effizienter als die PV IRES [139]. Da die EMCV IRES in einem exakten Abstand zum Startkodon des 3' Cistrons inseriert werden muss [140], ist jedoch die Integration in den komplexen bicistronischen Vektor aufwendig. Alternativ könnte eine zelluläre IRES, wie die BiP („*Immunoglobulin heavy-chain Binding Protein*“) [35], eingesetzt werden. Diese muss ebenso wie die PV IRES nicht exakt positioniert [141] werden, und könnte der viralen IRES zudem bei der Vermeidung von Rekombinationsereignissen bei der Integration in einen retroviralen Vektor (siehe Kap. 3.5.3) überlegen sein. Da bei einigen anderen zellulären IRES Elementen eine zellzyklusabhängige [142, 143], oder zellspezifische Aktivierung [144, 145] beobachtet wurde, ist ebenfalls darauf zu achten, dass die Aktivität der IRES nicht mit der Zellspezifität für myelomonozytäre Zellen interferiert.

Neben der geringen Effizienz der Cap-unabhängigen Translation bewirkt die beobachtete Destabilisierung der IRES-Transkripte eine zusätzliche Verringerung der Expression. Auch Attal et al. [92] zeigten bereits die ungewöhnliche Instabilität der PV IRES-mRNA. Die genaue Ursache der Degradation ist unklar. Denkbar ist, dass regulatorische Bereiche in der komplexen Haarnadelstruktur der IRES den nucleolytischen Abbau der IRES-mRNA beschleunigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Effektivität der Cap-unabhängigen Translation sowohl durch Reinitiation als auch durch interne Initiation je nach Kontext stark

variiert. Sie ist nicht nur abhängig von dem jeweiligen Konstrukt, sondern im Falle der PV-IRES vermittelten Translation auch von der Zelllinie und wahrscheinlich auch dem physiologischen Status der Zellen. Um die entwickelten Expressionssysteme hinsichtlich der Expression des 3'Cistrons gezielt zu optimieren, ist ein besseres Verständnis des Mechanismus der Reinitiation und internen Initiation notwendig.

#### **7.2.10 Erhöhung der Zellspezifität und Verminderung der Regulierbarkeit nach stabiler Integration in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen**

Die Untersuchung der Konstrukte psmim-M1-CCR/ER\_PoliolRES und psmimTRE-M1inv-Tet/VP16\_PoliolRES in QT6<sub>2-1</sub> und BM2 Zellen (Kap. 6.10) zeigte, dass sich die Zellspezifität der Expression durch die stabile Integration erhöht. Nach stabiler Integration kann die Aktivität des Promotors durch *cis*-regulatorische Elemente in der Umgebung des Integrationsortes beeinflusst werden. Warum dies im Falle der BM2 Zellen zu einer Aktivierung der Expression, im Falle der QT6<sub>2-1</sub> Zellen eher zu einer Repression der Expression führt, ist unklar. Eine vage Vermutung ist, dass der Vektor je nach Transfektionsmethode (Kalziumphosphat-Präzipitation bzw. Elektroporation) in unterschiedliche chromosomale Bereiche (reprimierend oder aktivierend) integriert wird. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der M1 Enhancer in seiner Funktion als LCR in einem kooperativem Prozess mit zellspezifischen Faktoren die Chromatinstruktur unabhängig vom Integrationsort auflockert [85], und so den Vektor in den Zielzellen für die Transkription zugänglicher macht als in den Nichtzielzellen.

Der Vergleich der Expression im stabilen und transienten Zustand zeigt, dass die Regulierbarkeit der untersuchten Expressionssysteme im stabilen Zustand abnimmt. Ursache hierfür ist wahrscheinlich der je nach Integrationsort variierende Einfluss der chromosomalen Sequenzen auf die basale Aktivität des Promotors [120] [121]. Aus diesem Grund weisen die Zellen kein einheitliches Regulationsverhalten auf. Durch die Untersuchung eines Pools von Zellen wird die Expression im reprimierten und induzierten Zustand gemittelt, woraus letztendlich eine geringe Regulationskapazität resultiert. Auch die Integration mehrerer Kopien, wie bei chemischen und physikalischen Transfektionsmethoden üblich, kann aus diesem Grund der Regulierbarkeit der Expressionssysteme entgegenwirken. Da durch retrovirale Vektoren bei niedrigem Virus/Zell Verhältnis nach Infektion nur eine einzelne Kopie des viralen Vektors integriert wird [121], könnten die Regulationseigenschaften durch retrovirale Transduktion der Zellen verbessert werden. Im Prinzip ist natürlich die Selektion und Analyse von Einzelklonen sinnvoll, um einen Klon mit guten Regulationseigenschaften zu finden. Leider kann diese Methode nicht immer angewendet werden, wie zum Beispiel im Rahmen einer *in vivo* Gentherapie. Hier erfolgt die Infektion eines Organs durch den retroviralen Vektor auf direktem Weg. Um den Einfluss *cis*-

regulatorischer Elemente aus der Umgebung auf den Promotor des stabil integrierten Vektors zu verhindern, und so ein homogenes Expressionsverhalten und eine bessere Regulierbarkeit zu erreichen, könnten sogenannte Insulatoren eingesetzt werden.

Insulator-Sequenzen definieren die Grenzen zwischen unterschiedlich regulierten Loci und schützen Promotoren vor dem Einfluss benachbarter regulatorischer Elemente [146]. So entwickelten Pikaart et al. [147] eine Expressionskassette, die flankiert von den Insulator-Sequenzen des  $\beta$ -Globin-Locus vom Huhn (chicken HS4-Insulator), ein sehr einheitliches Expressionsverhalten in einer Vielzahl von Zellklonen aufwies.

Handelt es sich bei der M1 Sequenz tatsächlich um eine LCR, sollte auch sie in der Lage sein, den Promotor eines Expressionssystems vor regulatorischen Elementen in der Nähe des Integrationsortes abzuschirmen. Es bleibt zu überprüfen, ob die Regulierbarkeit der konstruierten Expressionssysteme durch zusätzliche flankierende M1-Sequenzen auf der 3'Seite der Expressionkassette verbessert werden kann.

### **7.2.11 Bicistronische eGFP Expressionssysteme für die schnelle Selektion stabiler Zellen**

Wie bereits unter 7.2.10 diskutiert, kann die Expressionsstärke und Regulierbarkeit eines stabil integrierten Vektors je nach Integrationsort in der Empfängerzelle stark variieren. Aus diesem Grund ist die Verwendung des „Tet-Off“ Systems für die regulierbare Expression eines Transgens häufig aufwendig. Um Zellklone mit dem gewünschten Expressionslevel und guter Regulierbarkeit des stabil integrierten tTA-Expressionsvektors zu generieren, müssen eine Vielzahl von Einzelklonen selektioniert und analysiert werden. Dieser sehr zeit- und arbeitsintensive Prozess, kann, wie die Ergebnisse in Kap. 6.10 zeigten, durch die konstruierten bicistronischen tTA-eGFP-Expressionssysteme wesentlich erleichtert werden.

Da aufgrund der bicistronischen Anordnung die Expressionsstärke des Transaktivators tTA mit der des Reportergens korreliert (siehe Abb. 6.8.1 und 6.11.1), können Zellklone mit guter Regulierbarkeit des Transaktivators tTA einfach und schnell anhand des fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren eGFP Proteins detektiert werden. Einen besonderen Vorteil bietet diese Methode bei der Selektion adhärent wachsender Zellen, hier kann die Detektion einzelner Klone ohne vorherige Einzelklonselektion aus einem Pool von Zellklonen einer Zellkulturschale erfolgen. Positive Einzelklone können anschließend auf eine andere Zellkulturschale übertragen und nach weiterer Kultivierung zur Expressionsregulation tTA-abhängiger Gene eingesetzt werden.

Setzt man die bistrischen GFP-Expressionsvektoren, wie hier beschrieben, bei der Untersuchung von Genregulationsmechanismen ein, kann im Prinzip auf den Aspekt der Zellspezifität verzichtet werden. Der Ersatz der zellspezifischen Elemente (*mim-1* Promotor und M1 Enhancer) durch den minimalen CMV Promotor könnte die Regulierbarkeit der

Systeme in einer Vielzahl von Zellen verbessern.

Ein System mit analoger Funktionsweise wurde bereits von Callus und Mathey-Prevot [148] entwickelt. Hier kontrolliert der minimale tTA-abhängige CMV Promotor autoregulatorisch die Expression eines GFP/tTA Fusionsproteins. Nachteil dieses Systems ist jedoch, dass das Induktionspotential des Faktors tTA durch Fusion mit dem GFP Protein vermindert wird.

Um die tTA-Expression anhand der GFP-Expression quantifizieren zu können, kotransfizierten Mosser et al. [149] neben dem tTA- einen GFP-Expressionsvektor. In beiden Vektoren erfolgt die Kontrolle der Expression durch den tTA-abhängigen minimalen CMV Promotor. Da jedoch beide Vektoren in unterschiedliche chromosomale Bereiche integriert werden können, und sich zudem die Zahl der integrierten Kopien unterscheiden kann, ist eine Korrelation zwischen der tTA- und GFP-Expression unwahrscheinlich. Ein weiteres Problem ist zudem, dass die GFP-Expressions-kassette mit dem eigentlich zu regulierenden Gen um den Transaktivator konkurriert, und so die Induktion inhibieren kann.

Auch dem Ansatz von Liu et al. [150] ist das in dieser Arbeit entwickelte Expressionssystem überlegen. Hier sind die kodierenden Regionen für tTA und GFP ebenfalls in einem bicistronischen IRES-Vektor unter der Expressionskontrolle einer viralen LTR vereint. Aufgrund der konstitutiven Expression des Faktors tTA kann es jedoch, wie vorangehend diskutiert, zum „*Squelching*“ kommen.

### **7.2.12 Mögliche Anwendungen der entwickelten Expressionssysteme im Rahmen einer Gentherapie**

Wie bereits in den einzelnen Abschnitten erläutert, funktionieren die konstruierten Expressionsvektoren in vielerlei Hinsicht nicht optimal. Neben der schlechten Regulierbarkeit, ist ein weiteres großes Defizit der C/EBP $\beta$ /ER- und C/EBP $\beta$  $\Delta$ 110/ER-Expressionssysteme, dass die von einem zellulären Transkriptionsfaktor abgeleiteten Regulatorproteine im aktiven Zustand mit zellulären Reaktionswegen interferieren können. Deshalb ist eine Anwendung eines solchen Vektors im Rahmen einer Gentherapie generell sehr bedenklich. Besser geeignet sind daher die Systeme in denen die Expressionsregulation durch den Transaktivator tTA erfolgt. Um eine Verringerung der Zellspezifität durch Autoregulation in Nicht-Zielzellen zu verhindern, und die Regulierbarkeit in den Zielzellen zu erhöhen, ist es notwendig den *mim-1* Promotor zu minimieren (siehe Kap. 7.2.6). Generell sollte die Expression des *mim-1* Promotors in Kombination mit dem M1-Enhancer erfolgen, da so die Zellspezifität des Promotors erheblich verbessert werden kann. Für eine mögliche Anwendung eines solchen Vektors im Rahmen einer *in vivo* Gentherapie (siehe Abb. 7.2.12) sollte zudem die Regulierbarkeit im stabilen Zustand durch flankierende Insulatorsequenzen verbessert werden.

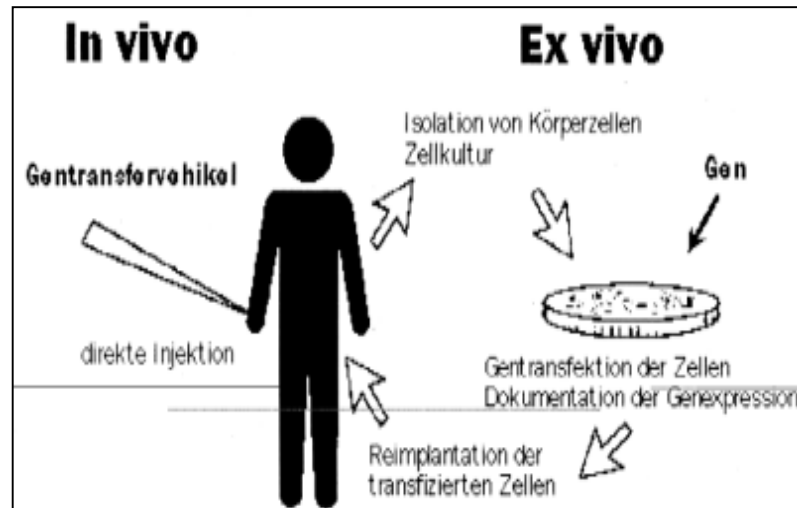


Abb. 7.2.12.1: Schematische Darstellung der *in* und *ex vivo* Gentherapie.

Erfolgt im Vorfeld der gentherapeutischen Behandlung eine Selektion der Zellen die nach stabiler Transfektion des Expressionsvektors die gewünschten Expressionseigenschaften besitzen (*ex vivo* Gentherapie Abb. 7.2.12.1), könnte das konstruierte eGFP-tTA-Expressionssystem Anwendung finden.

Hierzu müsste es allerdings durch Sequenzen, die einen effizienten Austausch des Reportergens durch ein entsprechendes therapeutisches Gen ermöglichen, modifiziert werden. Auf diese Weise könnten Zellklone in denen der eGFP-tTA-Vektor an einem geeigneten Genlocus integriert wurde anhand der eGFP-Expression detektiert werden, und im Anschluß das eGFP-Gen durch das therapeutische Gen ausgetauscht werden.

Realisiert werden könnte diese Strategie durch ein FLP/FRT-System [151]. Die FLP-Rekombinase erkennt spezifische Rekombinationssequenzen sogenannte FRT- („*Flip Recognition Target*“) Sequenzen. Flankiert man das Reportergen sowie das einzubringende Gen durch ein Set geeigneter FRT-Sequenzen, sollte durch Rekombination ein effizienter Genaustausch stattfinden (Abb. 7.2.12.2).

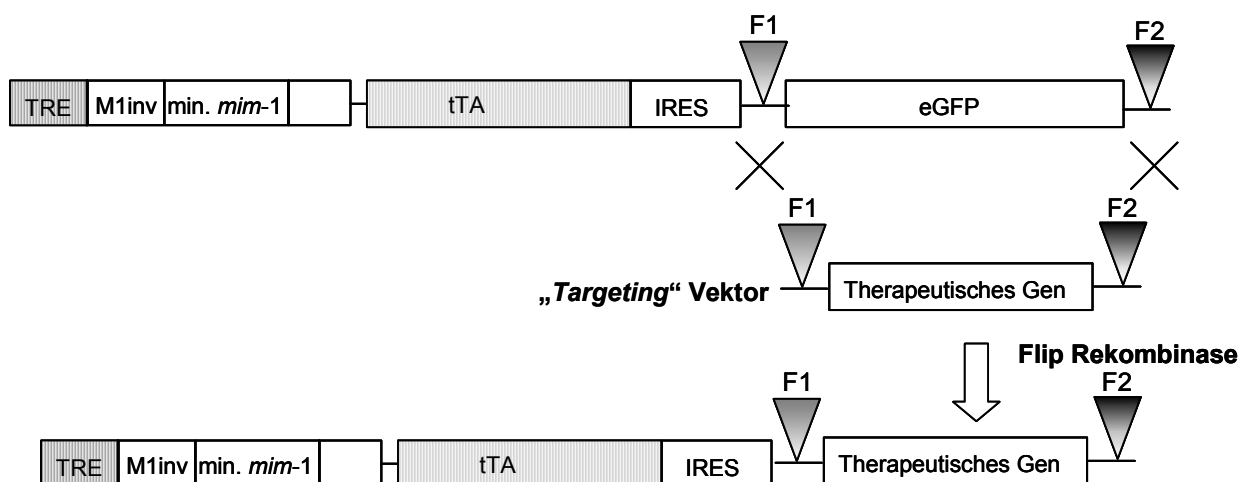


Abb. 7.2.12.2: Austausch eines Gens durch das FLP/FRT-System.

Nach stabiler Integration des Expressionsvektors in einen geeigneten Genlocus, kann das von FLP-

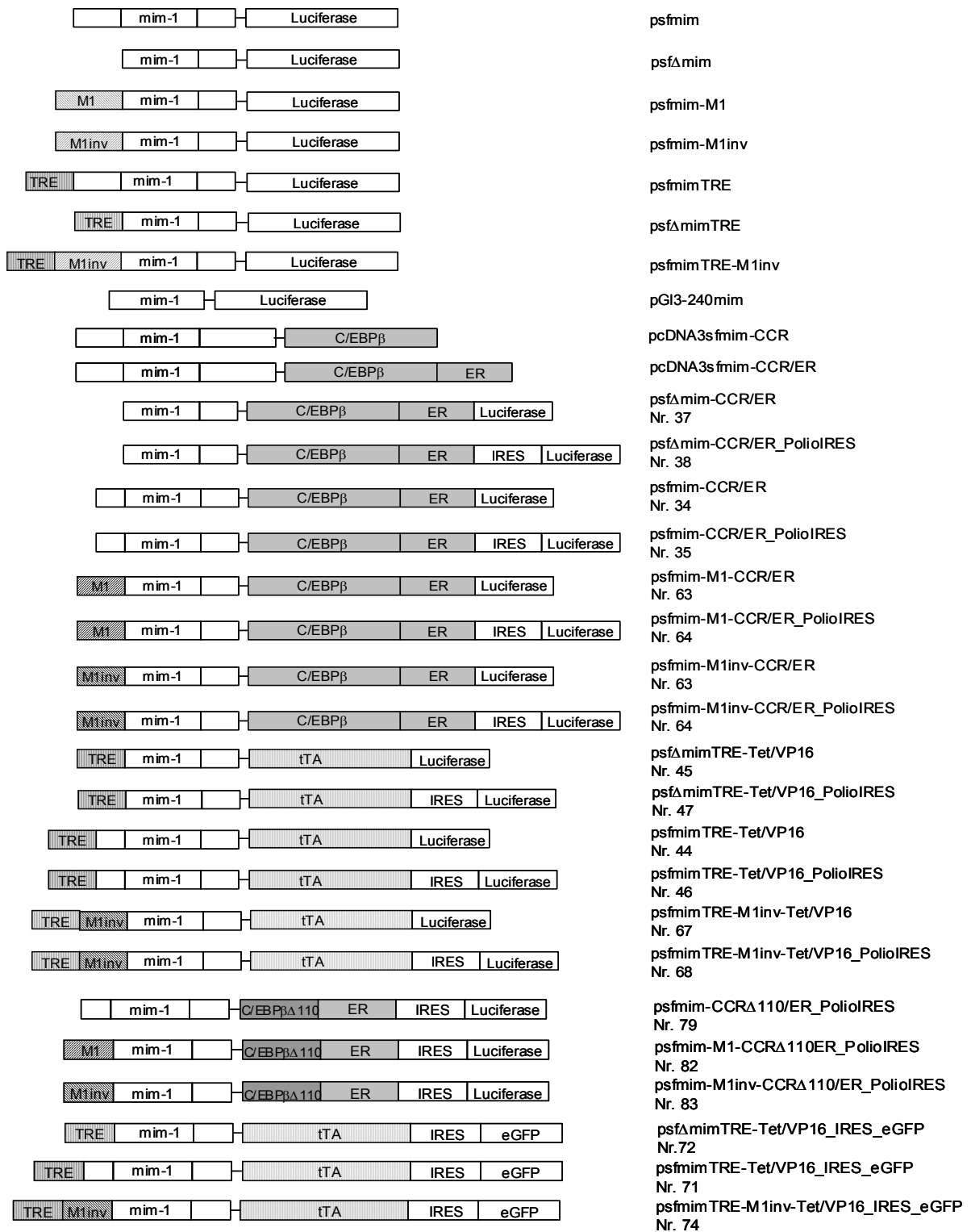


Sequenzen (F1 und F2) flankierte Reporter-gen mit Hilfe der Flip-Rekombinase durch das entsprechende therapeutische Gen des Targeting-Vektors ausgetauscht werden.

Auf diesem Wege sollte letztendlich auf der Grundlage der in dieser Arbeit entwickelten Expressionssysteme, eine regulierbare und auf myelomonozytäre Zellen begrenzte Expression eines therapeutischen Gens ermöglicht werden.

## 8 Anhang

Die untersuchten Expressionsvektoren im Überblick



## Abbildungsverzeichnis

Tab. 1.1.: Beispiele für Krankheiten, die sich für gentherapeutische Ansätze eignen. ....	12
Abb. 3.2.1: Das hämatopoietische System (vereinfacht) [7]. ....	14
Abb. 3.2.3: Schematische Darstellung der Promotorregion des <i>mim-1</i> Gens. ....	16
Abb. 3.3.1: Das Tet-Off System [22] . ....	17
Tab. 3.4.1: Eukaryotische Translationsfaktoren [31]. ....	19
Abb. 3.4.1: Mechanismus der Cap-abhängigen Ribosomen Rekrutierung zur mRNA (vereinfacht) [34]. ....	20
Abb. 3.4.2: Mechanismus der Cap-unabhängigen Ribosomen Rekrutierung zur mRNA durch die Polio Virus IRES. ....	21
Abb. 3.4.3: Translation einer bicistronischen mRNA durch IRES-vermittelte interne Initiation, oder durch Reinitiation an einem Intercistron. ....	22
Abb. 3.5.2: Herstellung rekombinanter Retroviren mit Hilfe von Verpackungszelllinien. ....	24
Abb. 3.5.4: Konstruktion retroviraler Vektoren für die zellspezifische Genexpression. ....	25
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der zu konstruierenden bicistronischen Expressionssysteme. ....	26
Abb. 5.2.5: Schematische Darstellung des Kapillarblotverfahrens. ....	47
Abb. 6.1.1: Schematische Darstellung der rekombinanten <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte. ....	61
Abb. 6.1.2: Vergleich der Aktivität der Promotorkonstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen. ....	62
Tab. 6.1.2 : Zellspezifität der untersuchten <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte im Vergleich. ....	63
Abb. 6.2.1: Regulierbarkeit der Expression der <i>mim-1</i> Reporter-genkonstrukte durch C/EBP $\beta$ /ER. ....	66
Tab. 6.2.1: Induzierbarkeit durch den Faktor C/EBP $\beta$ /ER im Vergleich. ....	67
Abb. 6.2.2: Regulierbarkeit der Expression der <i>mim-1</i> Reporter-genkonstrukte durch tTA. .	69
Tab. 6.2.2: Induzierbarkeit durch den Faktor tTA im Vergleich. ....	69
Abb. 6.3.1: Darstellung der monocistronischen autoregulativen C/EBP $\beta$ -Expressionssysteme im induzierten und nicht induzierten Zustand. ....	71
Abb. 6.3.2: Untersuchung der autoregulativen Expression der Faktoren C/EBP $\beta$ und C/EBP $\beta$ /ER durch die monocistronischen <i>mim-1</i> Promotorkonstrukte. ....	72
Abb. 6.4.1: Darstellung der unterschiedlichen bicistronischen Expressionssysteme beim Übergang vom induzierten und den nicht induzierten Zustand. ....	74
Abb. 6.5: Zwei-Plasmid Transfektion zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression bei Autoregulation durch den Faktor C/EBP. ....	75
Abb. 6.5.1: Regulator- und Reporter-genexpression eines bicistronischen Vektors in Abhängigkeit von der Zeit. ....	76
Abb. 6.6.1 Induktion der bicistronischen Expressionssysteme in Abhängigkeit von der	

Ligandenkonzentration.....	78
Abb. 6.7.1: Expressionsstudien der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	80
Tab. 6.7.1: Induktion der Luciferaseexpression der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen im Vergleich.....	82
Abb. 6.7.2.1: Expressionsstudien der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen.....	83
Abb. 6.7.2.2: Verlust der Regulierbarkeit der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen.....	84
Abb. 6.7.3: Vergleich der Luciferaseexpression der C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.....	86
Abb. 6.8.1: Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	89
Tab. 6.8.1: Induktion der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen im Vergleich.....	90
Abb. 6.8.2: Expressionsstudien der tTA-Konstrukte in BM2 Zellen.....	91
Tab. 6.8.2: Induktion der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in BM2 Zellen im Vergleich.....	91
Abb. 6.8.3: Vergleich der Luciferaseexpression der tTA-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der angegebenen Vektoren, normiert auf die Luciferaseexpression (100%) des Vektors pCMVluc in der jeweiligen Zelllinie.....	92
Abb. 6.9.1: Inhibierung des <i>mim-1</i> Promotors durch den Faktor C/EBP $\beta$ $\Delta$ 110.....	95
Abb. 6.9.2: Liganden-abhängige Regulation der Expression eines $\Delta$ C/EBP $\beta$ - Expressionsvektors.....	96
Abb. 6.9.3: Expressionsstudie der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	97
Abb. 6.9.4: Expressionsstudie der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen.....	98
Tab. 6.9.4: Repression der Luciferaseexpression der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in BM2 Zellen im Vergleich.....	98
Abb. 6.9.5: Vergleich der Luciferaseexpression der $\Delta$ C/EBP $\beta$ /ER-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.....	99
Abb. 6.10: Luciferaseexpression und Southern-Blot Analyse der Vektoren psmim-M1- CCR/ER_PoliolIRES und psmimTRE-M1inv-Tet/VP16_PoliolIRES nach stabiler Integration in QT6 <sub>2-1</sub> und BM2 Zellen.....	102
Tab. 6.10: Induzierbarkeit der Luciferaseexpression der untersuchten Zellpools im Vergleich. .....	103
Abb. 6.11.1: Expressionsstudien der tTA-eGFP-Konstrukte in QT6 <sub>2-1</sub> Zellen.....	105
Abb. 6.11.2: Regulierbarkeit stabiler tTA-eGFP-QT6 <sub>2-1</sub> Klone.....	106
Abb. 7.1.5: Strategien zur Konstruktion regulierbarer Expressionssysteme.....	111
Tab. 7.2.1: Zellspezifische Promotoren für die zielzellengerichtete Expression eines therapeutischen Gens.....	114

---

Abb. 7.2.12.1: Schematische Darstellung der <i>in</i> und <i>ex vivo</i> Gentherapie. ....	125
Abb. 7.2.12.2: Austausch eines Gens durch das FLP/FRT-System. ....	125

## 9 Literaturverzeichnis

1. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Science, 1992. **256**(5058): p. 808-13.
2. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-42.
3. Romano, G., C. Pacilio, and A. Giordano, *Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals*. Stem Cells, 1999. **17**(4): p. 191-202.
4. Maxwell, I.H., L.M. Glode, and F. Maxwell, *Expression of the diphtheria toxin A-chain coding sequence under the control of promoters and enhancers from immunoglobulin genes as a means of directing toxicity to B-lymphoid cells*. Cancer Res, 1991. **51**(16): p. 4299-304.
5. Sorrentino, B.P., et al., *Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1*. Science, 1992. **257**(5066): p. 99-103.
6. Metcalf, D., *The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 27-30.
7. Foos, G., S. Grimm, and K.H. Klempnauer, *The chicken A-myb protein is a transcriptional activator*. Oncogene, 1994. **9**(9): p. 2481-8.
8. Mitchell, P.J. and R. Tjian, *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. Science, 1989. **245**(4916): p. 371-8.
9. Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight, *Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1538-52.
10. Williams, S.C., C.A. Cantwell, and P.F. Johnson, *A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1553-67.
11. Burk, O., et al., *Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors*. Embo J, 1993. **12**(5): p. 2027-38.
12. Ness, S.A., et al., *Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types*. Genes Dev, 1993. **7**(5): p. 749-59.
13. Smith, L.T., et al., *PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells*. Blood, 1996. **88**(4): p. 1234-47.
14. Lekstrom-Himes, J. and K.G. Xanthopoulos, *Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28545-8.
15. Cammenga, J., et al., *Induction of C/EBPalpha activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2206-14.
16. Radomska, H.S., et al., *CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4301-14.
17. Nerlov, C., et al., *Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2413-23.
18. Ford, A.M., et al., *Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10838-43.
19. Lüscher, B. and R.N. Eisenmann, *New light on Myc and Myb. Part II*. Genes Dev, 1990. **4**: p. 2235-2241.
20. Mink, S., U. Kerber, and K.H. Klempnauer, *Interaction of C/EBPbeta and v-Myb is required for synergistic activation of the mim-1 gene*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1316-25.
21. Saez, E., et al., *Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice*. Curr Opin Biotechnol, 1997. **8**(5): p. 608-16.
22. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(12): p. 5547-51.

23. Mink, S., et al., *The v-Myb oncoprotein activates C/EBPbeta expression by stimulating an autoregulatory loop at the C/EBPbeta promoter*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1447**(2-3): p. 175-84.
24. Sadowski, I., et al., *GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator*. *Nature*, 1988. **335**(6190): p. 563-4.
25. Triezenberg, S.J., R.C. Kingsbury, and S.L. McKnight, *Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression*. *Genes Dev*, 1988. **2**(6): p. 718-29.
26. Shockett, P., et al., *A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6522-6.
27. Shockett, P.E. and D.G. Schatz, *Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(11): p. 5173-6.
28. Bohl, D., N. Naffakh, and J.M. Heard, *Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 299-305.
29. Howe, J.R., et al., *The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(23): p. 14168-74.
30. Rhoads, R.E., *Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(5): p. 3017-20.
31. Knippers, R., *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 7. Auflage, 1997.
32. Kozak, M., *Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(10): p. 3438-45.
33. Sachs, A.B., *Messenger RNA degradation in eukaryotes*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 413-21.
34. Vagner, S., B. Galy, and S. Pyronnet, *Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(10): p. 893-8.
35. Macejak, D.G. and P. Sarnow, *Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA*. *Nature*, 1991. **353**(6339): p. 90-4.
36. Johansen, L.K. and C.D. Morrow, *Inherent instability of poliovirus genomes containing two internal ribosomal entry site (IRES) elements supports a role for the IRES in encapsidation*. *J Virol*, 2000. **74**: p. 8335-8342.
37. Johannes, G., et al., *Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999. **96**: p. 13118-13123.
38. Gradi, A., et al., *Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1998. **95**: p. 11089-11094.
39. Cuesta, R., G. Laroia, and J.C. Schneider, *Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIFG and facilitating dissociation of cap-initiation complexes*. *Genes Dev*, 2000. **14**: p. 1460-1470.
40. Jang, S.K., et al., *Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo*. *J Virol*, 1989. **63**(4): p. 1651-60.
41. Pelletier, J., et al., *Translational efficiency of poliovirus mRNA: mapping inhibitory cis-acting elements within the 5' noncoding region*. *J Virol*, 1988. **62**(7): p. 2219-27.
42. Chappell, S.A., et al., *A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation*. *Oncogene*, 2000. **19**(38): p. 4437-40.
43. Hu, G., et al., *mRNA cap recognition: dominant role of enhanced stacking interactions between methylated bases and protein aromatic side chains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7149-54.
44. Wilson, J.E., et al., *Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome*. *Cell*, 2000. **102**(4): p. 511-20.

45. Kanamori, Y. and N. Nakashima, *A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation*. *Rna*, 2001. **7**(2): p. 266-74.
46. Kaminski, A. and R.J. Jackson, *The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovascular RNAs is conditional rather than absolute*. *Rna*, 1998. **4**(6): p. 626-38.
47. Walter, B.L., et al., *Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements*. *Rna*, 1999. **5**(12): p. 1570-85.
48. Izumi, R.E., et al., *Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation*. *Virus Res*, 2001. **76**(1): p. 17-29.
49. Hunt, S.L., et al., *unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA*. *Genes Dev*, 1999. **13**(4): p. 437-48.
50. Pelletier, J. and N. Sonenberg, *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*. *Nature*, 1988. **334**(6180): p. 320-5.
51. Luukkonen, B.G., W. Tan, and S. Schwartz, *Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance*. *J Virol*, 1995. **69**(7): p. 4086-94.
52. Kozak, M., *Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes*. *Gene*, 1999. **234**(2): p. 187-208.
53. Levine, F., J.K. Yee, and T. Friedmann, *Efficient gene expression in mammalian cells from a dicistronic transcriptional unit in an improved retroviral vector*. *Gene*, 1991. **108**(2): p. 167-74.
54. Daly, G. and Y. Chernajovsky, *Recent developments in retroviral-mediated gene transduction*. *Mol Ther*, 2000. **2**(5): p. 423-34.
55. Landau, N.R. and D.R. Littman, *Packaging system for rapid production of murine leukemia virus vectors with variable tropism*. *J Virol*, 1992. **66**(8): p. 5110-3.
56. Pear, W.S., et al., *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8392-6.
57. Naviaux, R.K., et al., *The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses*. *J Virol*, 1996. **70**(8): p. 5701-5.
58. Coffin, J.M., *Structure of the retroviral genome*. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., 1984: p. 369-512.
59. Varmus, H.E. and R. Svantstrom, *Replication of retroviruses*. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., 1984: p. 369-512.
60. Bowerman, B., et al., *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA*. *Genes Dev*, 1989. **3**(4): p. 469-78.
61. Colicelli, J. and S.P. Goff, *Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site*. *Cell*, 1985. **42**(2): p. 573-80.
62. Mann, R. and D. Baltimore, *Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNAs*. *J Virol*, 1985. **54**(2): p. 401-7.
63. Otto, E., et al., *Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vector sequences*. *Hum Gene Ther*, 1994. **5**(5): p. 567-75.
64. Scarpa, M., et al., *Characterization of recombinant helper retroviruses from Moloney-based vectors in ecotropic and amphotropic packaging cell lines*. *Virology*, 1991. **180**(2): p. 849-52.
65. Cullen, B.R., P.T. Lomedico, and G. Ju, *Transcriptional interference in avian retroviruses--implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis*. *Nature*, 1984. **307**(5948): p. 241-5.
66. Yu, S.F., et al., *Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(10): p. 3194-8.



67. Hantzopoulos, P.A., et al., *Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3519-23.
68. Gunzburg, W.H. and B. Salmons, *Development of retroviral vectors as safe, targeted gene delivery systems*. J Mol Med, 1996. **74**(4): p. 171-82.
69. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., 1989.
70. Del Sal, G., G. Manfioletti, and C. Schneider, *A one tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**: p. 9878.
71. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
72. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Biol Chem, 1975. **98**: p. 503-517.
73. Moscovici, C., et al., *Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail*. Cell, 1977. **11**(1): p. 95-103.
74. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infection of human Adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**: p. 456-467.
75. Watson, J.D., et al., *Rekombinante DNA*. Spektrum Verlag, Heidelberg, 1993.
76. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation*. Embo J, 1982. **1**: p. 841-845.
77. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
78. Dick, J.E., et al., *Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W<sup>v</sup> mice*. Cell, 1985. **42**(1): p. 71-9.
79. Joyner, A., et al., *Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells*. Nature, 1983. **305**(5934): p. 556-8.
80. Ness, S.A., A. Marknell, and T. Graf, *The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim-1 gene*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1115-25.
81. Salmons, B., et al., *Construction of retroviral vectors for targeted delivery and expression of therapeutic genes*. Leukemia, 1995. **9 Suppl 1**: p. S53-60.
82. Flasshove, M., et al., *Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(7): p. 391-9.
83. Baum, C., et al., *The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6323-31.
84. Lewin, G., *Gene*. Spektrum Verlag, Heidelberg; 6. Auflage, 1998.
85. Dillon, N. and F. Grosveld, *Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control*. Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 134-7.
86. Schikorra, N., *Konstruktion eines Vektors für die zellspezifische und regulierbare Genexpression in eukaryontischen Zellen*. Diplomarbeit, 2000.
87. Hofmann, A., G.P. Nolan, and H.M. Blau, *Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5185-90.
88. Baron, U., M. Gossen, and H. Bujard, *Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2723-9.
89. Burk, O. and K.H. Klempnauer, *Estrogen-dependent alterations in differentiation state of myeloid cells caused by a v-myb/estrogen receptor fusion protein*. Embo J, 1991. **10**(12): p. 3713-9.
90. Strathdee, C.A., M.R. McLeod, and J.R. Hall, *Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector*. Gene, 1999. **229**(1-2): p. 21-9.

91. Martinez-Salas, E., *Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 458-64.
92. Attal, J., et al., *The efficiency of different IRESs (internal ribosomes entry site) in monocistronic mRNAs*. Mol Biol Rep, 2000. **27**(1): p. 21-6.
93. Dirks, W., M. Wirth, and H. Hauser, *Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells*. Gene, 1993. **128**(2): p. 247-9.
94. Mizuguchi, H., et al., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector*. Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-82.
95. Borman, A.M., et al., *Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(5): p. 925-32.
96. Hennecke, M., et al., *Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(16): p. 3327-34.
97. Gallia, G.L. and K. Khalili, *Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system*. Oncogene, 1998. **16**(14): p. 1879-84.
98. Fussenegger, M., et al., *Autoregulated multicistronic expression vectors provide one-step cloning of regulated product gene expression in mammalian cells*. Biotechnol Prog, 1997. **13**(6): p. 733-40.
99. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
100. Yang, T.T., L. Cheng, and S.R. Kain, *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4592-3.
101. Cherry, S.R., et al., *Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7419-26.
102. Gansbacher, B., et al., *Retroviral gene transfer induced constitutive expression of interleukin-2 or interferon-gamma in irradiated human melanoma cells*. Blood, 1992. **80**(11): p. 2817-25.
103. Gansbacher, B., et al., *Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity*. Cancer Res, 1990. **50**(24): p. 7820-5.
104. Shinnick, T.M., R.A. Lerner, and J.G. Sutcliffe, *Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus*. Nature, 1981. **293**(5833): p. 543-8.
105. Ali, M., N.R. Lemoine, and C.J. Ring, *The use of DNA viruses as vectors for gene therapy*. Gene Ther, 1994. **1**(6): p. 367-84.
106. Marshall, E., *Gene therapy's growing pains*. Science, 1995. **269**(5227): p. 1050, 1052-5.
107. Malik, P., et al., *Retroviral-mediated gene expression in human myelomonocytic cells: a comparison of hematopoietic cell promoters to viral promoters*. Blood, 1995. **86**(8): p. 2993-3005.
108. Challita, P.M. and D.B. Kohn, *Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2567-71.
109. Veelken, H., et al., *Enhancement of a constitutively active promoter for gene therapy by a positive feed-back transcriptional activator mechanism*. Int J Mol Med, 1998. **2**(4): p. 423-428.
110. Scharfmann, R., J.H. Axelrod, and I.M. Verma, *Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4626-30.
111. Hafenrichter, D.G., et al., *Optimization of liver-directed retroviral gene delivery*. Transplant Proc, 1994. **26**(6): p. 3379-80.
112. Hafenrichter, D.G., et al., *Quantitative evaluation of liver-specific promoters from retroviral vectors after in vivo transduction of hepatocytes*. Blood, 1994. **84**(10): p. 3394-404.

113. Bauer, T.R., Jr., et al., *Expression from leukocyte integrin promoters in retroviral vectors*. Hum Gene Ther, 1994. **5**(6): p. 709-16.
114. Naffakh, N., et al., *Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3194-8.
115. Berens, C. and W. Hillen, *Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes*. Eur J Biochem, 2003. **270**(15): p. 3109-21.
116. Mattioni, T., J.F. Louvion, and D. Picard, *Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains*. Methods Cell Biol, 1994. **43 Pt A**: p. 335-52.
117. Hoffmann, A., et al., *A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(5): p. 1078-9.
118. Umek, R.M., A.D. Friedman, and S.L. McKnight, *CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch*. Science, 1991. **251**(4991): p. 288-92.
119. Nettelbeck, D.M., V. Jerome, and R. Muller, *A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters*. Gene Ther, 1998. **5**(12): p. 1656-64.
120. Paulus, W., et al., *Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 62-7.
121. Unsinger, J., et al., *Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes*. Mol Ther, 2001. **4**(5): p. 484-9.
122. Jackson, R.J., M.T. Howell, and A. Kaminski, *The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(12): p. 477-83.
123. Duke, G.M., M.A. Hoffman, and A.C. Palmenberg, *Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1602-9.
124. Cosset, F.L., et al., *Packaging cells for avian leukosis virus-based vectors with various host ranges*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5671-6.
125. Grande, A., et al., *Transcriptional targeting of retroviral vectors to the erythroblastic progeny of transduced hematopoietic stem cells*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3276-85.
126. Cornwell, R.D., K.A. Gollahon, and D.D. Hickstein, *Description of the leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 or CD11a) promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4221-5.
127. Shelley, C.S. and M.A. Arnaout, *The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10525-9.
128. Agura, E.D., M. Howard, and S.J. Collins, *Identification and sequence analysis of the promoter for the leukocyte integrin beta-subunit (CD18): a retinoic acid-inducible gene*. Blood, 1992. **79**(3): p. 602-9.
129. Grosveld, F., et al., *Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice*. Cell, 1987. **51**(6): p. 975-85.
130. Ido, A., et al., *Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human alpha-fetoprotein gene promoter*. Cancer Res, 1995. **55**(14): p. 3105-9.
131. Einerhand, M.P.W., et al., *Regulated high-level human b-globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer*. Gene Ther, 1995. **2**: p. 336-343.
132. Novak, U., et al., *High-level beta-globin expression after retroviral transfer of locus activation region-containing human beta-globin gene derivatives into murine erythroleukemia cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3386-90.
133. Walsh, C.E., et al., *Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7257-61.
134. Grant, C.M., P.F. Miller, and A.G. Hinnebusch, *Requirements for intercistronic distance and level of eukaryotic initiation factor 2 activity in reinitiation on GCN4 mRNA vary with the downstream cistron*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2616-28.

135. Havenga, M.J., et al., *Second gene expression in bicistronic constructs using short synthetic intercistrons and viral IRES sequences*. *Gene*, 1998. **222**(2): p. 319-27.
136. Kozak, M., *New ways of initiating translation in eukaryotes?* *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(6): p. 1899-907.
137. Davies, M.V. and R.J. Kaufman, *Internal translation initiation in the design of improved expression vectors*. *Curr Opin Biotechnol*, 1992. **3**(5): p. 512-7.
138. Attal, J., M.C. Theron, and L.M. Houdebine, *The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors*. *Genet Anal*, 1999. **15**(3-5): p. 161-5.
139. Borman, A.M., et al., *Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(18): p. 3656-63.
140. Pestova, T.V., C.U. Hellen, and I.N. Shatsky, *Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(12): p. 6859-69.
141. Oumard, A., et al., *Translation of NRF mRNA is mediated by highly efficient internal ribosome entry*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(8): p. 2755-9.
142. Cornelis, S., et al., *Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site*. *Mol Cell*, 2000. **5**(4): p. 597-605.
143. Pyronnet, S., L. Pradayrol, and N. Sonenberg, *A cell cycle-dependent internal ribosome entry site*. *Mol Cell*, 2000. **5**(4): p. 607-16.
144. Creancier, L., et al., *Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation*. *J Cell Biol*, 2000. **150**(1): p. 275-81.
145. Stoneley, M., et al., *Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(3): p. 687-94.
146. Prioleau, M.N., et al., *An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken beta-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene*. *Embo J*, 1999. **18**(14): p. 4035-48.
147. Pikaart, M.J., F. Recillas-Targa, and G. Felsenfeld, *Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators*. *Genes Dev*, 1998. **12**(18): p. 2852-62.
148. Callus, B.A. and B. Mathey-Prevot, *Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **257**(3): p. 874-8.
149. Mosser, D.D., et al., *Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products*. *Biotechniques*, 1997. **22**(1): p. 150-4, 156, 158-61.
150. Liu, X., et al., *Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels*. *Anal Biochem*, 2000. **280**(1): p. 20-8.
151. Umlauf, S.W. and M.M. Cox, *The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific genetic recombination reaction*. *Embo J*, 1988. **7**(6): p. 1845-52.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Nadja Schikorra  
Geburtstag: 08.03.1976  
Geburtsort: Castrop-Rauxel  
Familienstand: ledig  
Name der Eltern: Heinz-Jürgen und Jutta Schikorra, geb. Kunath

### Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule a. d. Henrichenburger Straße,  
Recklinghausen  
1986 – 1995 Marie-Curie-Gymnasium, Recklinghausen  
13.06.1995 Abitur am Marie-Curie-Gymnasium,  
Recklinghausen

### Studium

10/1995 Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-  
Universität, Münster  
05.10.1997 Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
1999 – 2000 Diplomarbeit im Institut für Biochemie,  
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster  
bei Prof. Dr. K.-H. Klempnauer  
08.06.2000 Diplom Chemikerin

### Beginn der Dissertation

01.07.2000 Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Univer-  
sität, Münster bei Prof. Dr. K.-H. Klempnauer  
10/2000 – 10/2002 Chemiefonds-Stipendium des Verbandes der  
chemischen Industrie

### Tätigkeiten

10/2002 – 12/2003 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie,  
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Ich bedanke mich ganz herzlich...

...bei Herrn Prof. Dr. Klempnauer für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, für die vielen Anregungen und Tipps und seine stete Diskussionsbereitschaft.

„Ich habe eine Menge gelernt.“

...bei Herrn Prof. Dr. Liese für die Übernahme des Koreferates.

...bei Kristina Beck (und Christian Schachtrup „Schachi“) für die Durchsicht meiner Arbeit .

...bei dem ehemaligen Mitglied der Arbeitsgruppe, Ursula Schlichter, die mich damals auf den rechten Weg brachte.

...bei Frank Berkenfeld für die tatkräftige Unterstützung in den letzten, besonders stressigen Wochen.

...bei Anne Brehmer-Fastnacht, die dafür gesorgt hat, dass die Zellen immer in „Bestform“ waren

...bei Thorsten Hahnhoff, „T“, dafür, dass er mir seine „Rechner-betörende Aura“ zur Verfügung gestellt hat, um diese Arbeit in die rechte Form zu bringen.

...bei allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises und des ganzen Instituts für das entspannte Arbeitsklima, die zahlreichen sachlichen, vor allen Dingen aber auch „unsachlichen“ Gespräche.

„Es hat Spaß mit euch gemacht!“

...bei meinen Freunden aus dem Semester für die vielen lustigen (Wein-seeligen) Abende.

„Das Semester bricht nicht auseinander!“

...bei meinen Eltern und Großeltern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, und mir immer wieder geholfen haben „die Seele ein wenig baumeln zu lassen“.

...bei Alfons.

„Es ist mehr als schön, dass es dich gibt!“