

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

Zentrum für Allergie und Umwelt
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

Optimierung des Gentransfers in humane Keratinocyten mittels rekombinanter Adeno- assoziierter Virus Vektoren

Angelika Eisenried

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. St. A. M. Braun-Falco (schriftl. Beurteilung)
1. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring (mündl. Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 17.10.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007
angenommen.

In Dankbarkeit meinen Eltern,
die mich immer unterstützen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in der Zeitschrift Archives of Dermatological Research:

M. Braun-Falco, A. Eisenried, H. Büning, J. Ring. Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer into human keratinocytes is influenced by both ubiquitin/proteasome pathway and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Arch Dermatol Res 296: 528-535

Desweiteren wurden Teile dieser Arbeit auf Vorträgen vorgestellt und in folgenden Abstrakten veröffentlicht:

S. Haug, A. Eisenried, J. Ring, M. Braun-Falco (2003) Transduction with recombinant adeno-associated virus vectors containing the gene for functional fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) allows elevation of FALDH-activity in a FALDH-deficient cell line.

2nd International Symposium on Molecular Diagnostics and Skin Gene Therapy. Düsseldorf, 27-29 März 2003 J Gene Medicine 5: S22, P16

M. Braun-Falco, A. Eisenried, A. Rizos, J. Ring (2003) Rekombinante adeno-assoziierte Viren als Vektoren zur Gentherapie von Genodermatosen: Langzeit-Genexpression in humanen Keratinozyten.

JDDG 1: Suppl 1: S122: P6.77

Verzeichnis der Abkürzungen

I. Einleitung

1. Einführung in die Gentherapie	1
1.1. Fortschritte in der Genetik	1
1.2. Aktueller Stand der Gentherapie	2
1.3. Hautgentherapie: Vor- und Nachteile	4
1.4. Überblick über häufig genutzte virale Vektoren	7
2. Adeno-assoziiertes Virus als Vektor in der Gentherapie	9
2.1. Biologie	9
2.2. Infektionsweg	11
2.3. Genetik	12
2.4. Entwicklung zum Vektor	14
2.5. Eigenschaften von rAAV-2	16
3. Problemstellung	18

II. Material und Methoden

1. Material	
1.1. Zellen, Bakterien und Plasmide	19
1.1.1. Eukaryontische Zellen	19
1.1.2. Bakterien	19
1.1.3. Plasmide	20
1.2. Enzyme	20
1.3. Chemikalien	21
1.4. Zellkulturmedien	22
1.5. Geräte und sonstige Materialien	22
2. Methoden	
2.1. Plasmidklonierung	26
2.1.1. Kultivierung und Transformation von Bakterien	26
2.1.1.1. Transformation von Plasmid-DNS in Bakterien	26
2.1.1.2. Flüssigkultur	26
2.1.1.3. Plattenkultur	27

2.1.1.4. Glycerinkultur	27
2.1.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNS	28
2.1.2.1. Extraktion von Plasmid-DNS	28
2.1.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNS	29
2.1.2.3. Isopropanolfällung	30
2.1.2.4. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS	30
2.1.3. Analyse von Plasmid-DNS	30
2.1.3.1. Restriktion	30
2.1.3.2. Auftrennung mittels Gelelektrophorese	31
2.1.3.3. Extraktion von DNS aus Agarosegel	32
2.1.4. Enzymatische Behandlung von Plasmid-DNS	33
2.1.4.1. Herstellung glatter Enden bei DNS-Fragmenten	33
2.1.4.2. Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten	33
2.1.4.3. Ligation von DNS-Fragmenten	33
2.1.5. Lipofectamintransfektion	34
2.2. Vektorherstellung	34
2.2.1. Kultivierung von 293 Zellen	35
2.2.2. Calciumphosphatpräzipitation	35
2.2.3. Virusernte	36
2.2.4. Iodixanolgradient	37
2.2.5. Bestimmung des Infektiösen rAAV-2 Titers	39
2.3. Zellkultur	39
2.3.1. Zellkulturmethoden	39
2.3.1.1. Passagieren von Zellen	40
2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl	40
2.3.1.3. Einfrieren von Zellen	40
2.3.2. Kultivierung von Fibroblasten und Hela-Zellen	41
2.3.3. Präparation von Keratinozyten aus Vorhaut	41
2.3.4. Kultivierung von Keratinozyten	42
2.3.4.1. Kultur ohne Feeder	42
2.3.4.2. Kultur auf Feederzellen	43
2.3.5. Dreidimensionale Keratinozytenkultur	44
2.3.6. Präparation von Keratinozyten aus Haarwurzeln	45
2.3.7. Transduktion von Keratinozyten	46

2.4.	Nachweisverfahren für GFP	46
2.4.1.	Nachweis in Keratinozytenkulturen ohne Feeder	46
2.4.2.	Nachweis in der dreidimensionalen Hautkultur	47

III. Ergebnisse

1.	Konstruktion von pTR-UF / C-GFP	48
1.1.	Aufbau des Plasmids	48
1.2.	Funktionsfähigkeit des Plasmids	50
1.3.	Infektiöser Titer	50
2.	Keratinozytenkultur und Transduzierbarkeit	50
2.1.	Dreidimensionale Hautkultur	50
2.2.	Etablierung der Keratinozytenkultur aus Haarwurzeln	51
2.3.	Transduktion von HeLa-Zellen und Keratinozyten	51
2.4.	Transduktion von Keratinozyten aus Vorhaut und Haarwurzeln	53
3.	Versuche zur Transduktionssteigerung	54
3.1.	UVB-Bestrahlung	54
3.2.	MG 132	56
3.3.	Tyrphostin 1	60
3.4.	AG 1478	66
4.	Expansionsverhalten von transduzierten Zellen	72
4.1.	Klonales Wachstum	72
4.2.	Dreidimensionale Hautkultur	73

IV. Diskussion

1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
2.	Keratinozyten als Zielzellen für die Gentherapie mit rAAV-2	76
3.	Transduktionssteigerung durch UV- Bestrahlung	77
3.1.	Wirkung auf die Transduktionseffizienz von rAAV-2	77
3.2.	Anwendung in der Hautgentherapie mit rAAV-2	78
4.	Transduktionssteigerung durch MG 132	79
4.1.	Physiologische Funktion des Proteasoms	79

4.2.	Experimentelle Auswirkungen von MG 132	80
4.3.	Ansätze für therapeutische Anwendungen	81
4.4.	Chancen für einen Einsatz in der Hautgentherapie mit rAA-2	82
5.	Transduktionssteigerung durch EGF-R Inhibitoren	84
5.1.	Physiologische Funktionen des EGF-R	84
5.2.	Experimentelle Wirkungen der EGF-R-Inhibitoren	85
5.3.	Ansätze für therapeutische Anwendungen	86
5.4.	Chancen für einen Einsatz in der Hautgentherapie mit rAAV-2	87
6.	Zusammenfassung und Ausblick	89
V.	FACS-Analysen	91
VI.	Literaturverzeichnis	100
VII.	Danksagung	114
VIII.	Lebenslauf	115

AAV-2	Adeno-assoziiertes Virus, Serotyp II
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	Epidermaler Wachstumsrezeptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-Rezeptor 1	Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papillomavirus
ITR	Invertierte Terminale Repetitionen
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor (Platelet derived growth factor)
poly A site	Polyadenylierungsstelle
rAAV	Rekombinantes Adenoassoziiertes Virus
RNS	Ribonukleinsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Einheiten

cm	Zentimeter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
J	Joule
M	Molar
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
kDa	KiloDalton

1. Einführung in die Gentherapie

1.1. Fortschritte in der Genetik

Seit jeher in der Kulturgeschichte hat der Mensch versucht, die Natur zu verändern und seinen Bedürfnissen anzupassen. Besonders in der Landwirtschaft züchtete er sich durch beständige Selektion unterschiedlichste Nutzierrassen und Pflanzensorten.

Hierbei legte Mendel 1865 durch die Veröffentlichung seiner Ergebnisse der „Versuche über Pflanzenhybriden“ die Basis für die Vererbungslehre. Weitere Fortschritte in der Molekularbiologie resultierten immer wieder in Nobelpreisen: 1944 wies O.T. Avery die Existenz von DNS in Chromosomen nach und J.D. Watson und F.H.C. Crick erhielten 1953 den Nobelpreis für die Darstellung der Doppelhelixstruktur von DNS. R.W. Holley gewann 1968 gemeinsam mit H.G. Khorana einen Nobelpreis für die erste Aufklärung eines kompletten Gens von 77 Basen – die Sequenz der Alanin-Transfer-DNS (Holley, 1968). H.G. Khorana gelang im weiteren 1979 die erste Gensynthese eines RNS-Moleküls bestehend aus 207 Basenpaaren, einer Tyrosin-Suppressor-Transfer-RNS (Sekiya et al. 1979).

Mit zunehmenden Erfolgen in der Molekularbiologie und den sich daraus ergebenden Anwendungen wächst gleichermaßen Angst und Erwartung in der Gesellschaft - beides oft ohne genaue Kenntnis des momentanen Standes der Forschung. Gerade der Bereich der embryonalen Stammzellforschung macht fast jeden Monat neue Schlagzeilen und zeigt besonders deutlich die Angst der Menschen vor zu großen Eingriffen in das Erbgut. Andererseits hoffen viele Menschen, die an unheilbaren Erbkrankheiten oder Tumoren leiden, auf neue effiziente Therapien durch die Genforschung.

Gerade bei Erbkrankheiten ist natürlich die Erforschung der Gensequenzen des Menschen grundlegend, um die Zusammenhänge zwischen erblich bedingten Krankheiten und der genetischen Information des Individuums zu klären. Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts läuft das *Human Genome Project*, dessen Ziel es ist, die gesamte DNS-Sequenz des Menschen zu bestimmen. Damit wird die Lokalisation einzelner Gene ermöglicht, die die wichtigste Voraussetzung darstellt, um die Zusammenhänge von Gensequenzen und Krankheiten zu erforschen. 2003 wurde das Projekt für erfolgreich beendet erklärt, nachdem alle ca. 25 000 Gene der humanen DNS identifiziert und 3 Millionen chemische Basenpaare als Träger der genetischen Information bestimmt wurden. Die Ergebnisse wurden in Datenbanken gespeichert und stellen eine schier unerschöpfliche Grundlage für weitere

I. Einleitung

Forschungsprojekte dar, die durch die gewonnenen neuen Einsichten weitere Erkenntnisse und letztendlich Therapien für Erbkrankheiten ermöglichen sollen.

1.2. Aktueller Stand der Gentherapie

Erkenntnisse über den Aufbau des menschlichen Genoms stellen in Kombination mit der Identifikation krankheitsspezifischer Gene eine wesentliche Grundlage dar, für eine erfolgreiche Gentherapie.

Gentherapie lässt sich definieren als das Einschleusen genetischen Materials in eine Zelle, mit dem Ziel eine Krankheit zu heilen oder Symptome zu lindern (Kay et al. 2001).

Der erste offiziell autorisierte Gentherapieversuch am Menschen erfolgte 1990: Die vierjährige Ashanti DeSilva wurde in den USA am National Institute of Health mit einer Infusion autologer, rekombinanter T-Lymphozyten behandelt. Ashanti leidet an einer schweren Immundefizienz, ausgelöst durch den Mangel eines bestimmten Enzyms, der Adenosin-Deaminase. Die Mehrheit der an diesem Syndrom erkrankten Kinder sterben noch in den ersten Lebensjahren. Durch die Infusion von T-Lymphozyten, in die mit Hilfe retroviraler Vektoren ein normal funktionierendes Gen für die Adenosin-Deaminase eingebracht wurde, konnte immerhin ein Anstieg der Immunfunktion auf ca. 1/5 bis 1/3 der Aktivität Gesunder erzielt werden. Noch nach 12 Jahren konnte der Vektor in T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Blaese 1993; Onodera et al. 1998; Onodera et al. 1999; Muul et al. 2003). Auch wenn sich dadurch die lebenslange exogene Substitution der Adenosin-Deaminase nicht erübrigte, war doch der Nachweis eines dauerhaften Gentransfers sehr ermutigend. Mittlerweile ließ sich bei mehreren Patienten die Aktivität der Adenosin-Deaminase auf das Niveau heterozygoter Individuen steigern (Onodera et al. 1998). Seit diesem ersten Gentherapieversuch sind bis Juli 2005 laut dem Journal of Gene Medicine 1076 klinische Gentherapiestudien registriert worden, in so unterschiedlichen Bereichen wie den klassischen monogenen Erbkrankheiten, Infektionskrankheiten oder - die meisten Versuche - im Bereich der Tumorforschung (Abbildung (Abb.) 1). Auch wenn der Hauptteil dieser Studien sich erst in Phase I-Versuchen befindet, sind doch immerhin schon 20 Phase III-Studien registriert (Abb. 2) (Clinical Trial Web site des Journal of Gene Medicine, Wiley and Sons 2005).

I. Einleitung

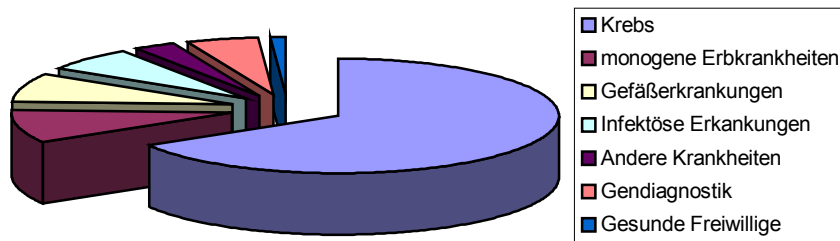


Abbildung 1: Aufteilung der klinischen Gentherapie-Studien nach Krankheiten Stand 2005 (Website des Journals of Gene Medicine vom Juli 2005).

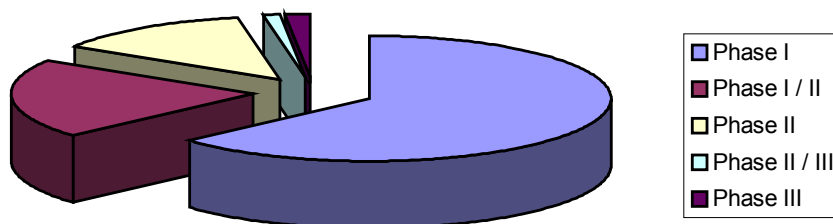


Abbildung 2: Verteilung der Gentherapie-Studien nach Studienphasen Stand 2005 (Website des Journals of Gene Medicine vom Juli 2005).

Die Euphorie für die Gentherapie wurde im Jahre 2002 schwer erschüttert, nachdem im Rahmen einer Phase II-Studie zur retroviralen Gentherapie des X-chromosomal gebundenem schwerem kombiniertem Immundefizienzsyndroms 2 von 14 Kindern an einer T-Zell-Leukämie erkrankten (Marshall 2002; Check 2003; Fox 2003; Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Kaiser 2003; Kohn et al. 2003; Marshall 2003). Die Leukämie wurde konventionell behandelt, so dass beide Kinder eine komplette Remission erreichten.

Um die Risiken der Gentherapie in diesem Fall richtig einzuschätzen, muss man wissen, dass auch die konventionelle Therapie des Immundefizienzsyndroms in Form der allogenen Knochenmarktransplantation große Risiken birgt: Die Mortalität kann je nach Studie bis zu 30 % betragen (Trent und Alexander 2004). Daher eröffnen sich gerade bei dieser Krankheit

I. Einleitung

Ausblicke, welche die Gentherapie zu einer wirklichen Behandlungsalternative machen: Von 5 in Frankreich behandelten Kindern zeigten 4 eine teilweise oder vollständige Wiederherstellung ihres Immunsystems (Hacein-Bey-Abina et al. 2003)

Dieser Erfolg war nur möglich durch die gezielte Auswahl einer für die Gentherapie besonders geeigneten Krankheit (Trent und Alexander 2004): die Zellen, die das fremde Gen integrieren, haben hier einen deutlichen Selektionsvorteil, da die kranken Zellen gestört sind in ihrer interzellulären Kommunikation, die ein wichtiges Signal für die Proliferation einer Zellreihe darstellt. Somit zeigen die genetisch veränderten Zellen eine bevorzugte Vermehrung, wodurch ihr Anteil im Körper weiter ansteigt. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Erreichbarkeit der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark.

Hierdurch wurde eines der Hauptprobleme für eine erfolgreiche Gentherapie gelöst: die Auswahl einer für diese Therapieform geeigneten Krankheit.

1.3. Hautgentherapie: Vor- und Nachteile

Die einfache Erreichbarkeit der Zielzellen bildet auch einen der Hauptvorteile der Hautgentherapie. Schließlich ist die Haut das größte Organ des Menschen und besitzt zahlreiche Funktionen: Sie schützt den Körper, bildet die Barriere zwischen Individuum und Außenwelt und regelt dabei den Stoffaustausch mit der Umwelt.

Auch nach einer erfolgten Gentherapie ist die Haut leicht zu kontrollieren. Gentechnisch veränderte Hautareale können kontinuierlich beobachtet und falls nötig exzidiert werden. Dies wäre bei den oben erwähnten hämatopoetischen Stammzellen mit ihrer breiten Verteilung im Knochenmark undenkbar.

Die Haut besteht aus drei Schichten: zuoberst liegt die Epidermis, gefolgt von Dermis und Subkutis. Für die Hautgentherapie ist vor allem die Epidermis relevant, die zu 90% aus Keratinozyten besteht (Fritsch 2004). Sie stellt ein sich beständig erneuerndes Gewebe dar, bei dem die Keratinozyten aus der Basalschicht nach oben wandern, bis sie sich als Hornlamellen abschilfern (Watt 1988, 1989). Dafür benötigt ein Keratinozyt in etwa 1 Monat. Die Keratinozyten innerhalb der gesamten Epidermis sind aber keine homogene Population: Es werden Stammzellen, transient amplifizierende Zellen und terminal differenzierte Zellen unterschieden (Moll et al. 1982; Barrandon und Green 1987; Jones et al. 1993, 1995). Die Stammzellen liegen in der Basalzellschicht und in Haarfollikeln und produzieren bei einer Teilung neue Stammzellen, aber auch transient amplifizierende Zellen (Gambardella und

I. Einleitung

Barrandon 2003). Letztere wandern nach oben, wobei sie sich noch circa 3-4 mal teilen, bevor sie als terminal differenzierte Zellen bis in die Hornschicht vordringen. Die Stammzellen sind die einzigen Keratinozyten, die nicht irgendwann der endgültigen Differenzierung anheimfallen, sondern lebenslang von der Basalzellschicht aus die Epidermis regenerieren. Somit ist eine stabile Gentherapie nur denkbar, wenn diese Stammzellen transfiziert werden (De Luca und Pellegrini 1997). Nur dann besteht die Möglichkeit einer lebenslangen Genexpression.

Auch wenn die Suche nach einem spezifischen Stammzellmarker bisher erfolglos blieb, sind die Zellen doch gut charakterisiert durch die Expression hoher Level von β 1-Integrin und α 6-Integrin sowie eine niedrige Expression des Rezeptors CD71 (Jones und Watt 1993, Tani et al. 2000). Auf Basis dieser Expression lassen sie sich auch zufriedenstellend isolieren.

Ebenso basiert die effiziente Vermehrung von Keratinozyten *in vitro*, sowie auch die erfolgreiche Transplantation auf den Proliferationseigenschaften der Stammzellen (Rheinwald und Green 1975, Gallico et al. 1984). Heute kann aus 1cm² Haut in 4 Wochen ein Zellkulturepithel mit einer Fläche von 1m² produziert werden (Holzmann et al. 1994), was einer Vergrößerung um den Faktor 10⁴ entspricht. Damit wird erst eine erfolgreiche *in vitro* Gentherapie möglich: Hautzellen werden aus einer Biopsie oder einem Haarfollikel gewonnen, *in vitro* vermehrt, transfiziert und zurücktransplantiert.

Während schon das Gewinnen von Keratinozyten aus einer Hautbiopsie einfach und komplikationsarm ist, ermöglicht der Nachweis von Stammzellen in Haarfollikeln eine noch sicherere Methode. Ohne operativen Eingriff allein durch das Ziehen einiger Haare lassen sich genügend Zellen isolieren, um ein Epithel zu kultivieren, das zum Beispiel erfolgreich zur Deckung von Brandwunden oder Ulcera cruri genutzt werden kann (Limat und Hunziker 1996, Taylor et al. 2000, Oshima et al. 2001).

Die Haut ist aber nicht nur die Barriere nach außen, sondern sie sezerniert auch Proteine, die über die Blutbahn in den ganzen Körper gelangen (Boyce 1994). Damit ist es theoretisch möglich, systemische Erkrankungen über die genetische Veränderung von Keratinozyten zu therapieren. Durch Keratinozyten, die das Gen für die Produktion von Erythropoetin durch einen rAAV-2 Vektor eingeschleust bekamen, ließ sich ein signifikant gesteigerter Hämatokritwert erzielen (Descamps et al. 1996). Die Vorteile der Haut als Zielobjekt für die Gentherapie sind somit vielfältig und noch einmal in Abbildung 3 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Vorteile der Hautgentherapie

Vorteile der Haut als Zielobjekt für die Gentherapie

Einfache und komplikationsarme Zellisolation
Einfache Kontrolle genetisch veränderter Hautbezirke
Möglichkeit zur Exzision bei Auftreten von Komplikationen
Effiziente Zellproliferation in vitro
Vorhandensein von Stammzellen zur Therapie von Genodermatosen
Identifizierung der verschiedenen Zelltypen durch molekulare Marker
Sekretorische Eigenschaften zur Therapie systemischer Erkrankungen

Dass die Therapie von Erbkrankheiten durch Hautgentherapie durchaus denkbar ist, zeigten zum Beispiel Chen et al. 2002 (Chen et al 2002), indem sie Keratinozyten und Fibroblasten eines Patienten mit Epidermolysis bullosa dystrophicans erfolgreich mit einem Lentivirus transduzierten. Bei der Epidermolysis bullosa dystrophicans liegt ein Fehler im Kollagen Typ VII vor, wodurch es zu einer gestörten Bildung von Ankerfibrillen kommt. Die Patienten entwickeln nach Minimaltraumen Blasen, die nur unter Narbenbildung abheilen.

Wurde aber das genetisch veränderte Epithel immunsupprimierten Mäusen transplantiert, zeigte sich eine regelrechte Bildung von Ankerfibrillen.

Ein anderes Beispiel ist die Gentherapie bei Xeroderma Pigmentosum, eine Krankheit, die einen fehlerhaften DNS-Reparaturmechanismus aufweist. Dadurch entwickeln die betroffenen Personen sehr früh Hauttumore. Auch hier konnte erfolgreich der Gendefekt korrigiert werden, auch wenn dieser Effekt noch kein dauerhafter Therapieerfolg war (Magnaldo und Sarasin 2004).

Diese Ergebnisse ermutigen weitere Forschungen im Bereich der Hautgentherapie.

Mindestens genauso wichtig wie die geeignete Zielzelle ist aber die Entwicklung einer Methode, die einen effizienten und dauerhaften Gentransfer in diese Zellen erlaubt. Nicht unzutreffend wurde der Gentransfer einmal als „die Achillesferse der Gentherapie“ (Verma und Somia 1997) bezeichnet und noch immer gibt es kein optimales Vektorsystem.

Allgemein erfolgt die Einteilung in virale und nichtvirale Vektorsysteme. Letztere ermöglichen bis auf wenige Ausnahmen keine dauerhaften Gentransfer (Kay et al. 2001).

1.4. Überblick über häufig genutzte virale Vektoren

Generell werden an ein ideales virales Vektorsystem folgende Forderungen gestellt (Ghazizadeh and Taichman 2000):

1. Fähigkeit zur Integration in die Wirts DNS
2. Ausreichende Kapazität für die Aufnahme von Genen
3. Einfache Produktion ohne Verunreinigung mit vermehrungsfähigen Viren
4. Produktion hoher Titer
5. Hohe Transduktionseffizienz ruhender oder sich vermehrender Zellen
6. Keine antigene Potenz

Leider existiert ein so ideales System nicht und die verschiedenen viralen Vektoren (Abb. 4) haben alle ihre eigenen Vor- und Nachteile.

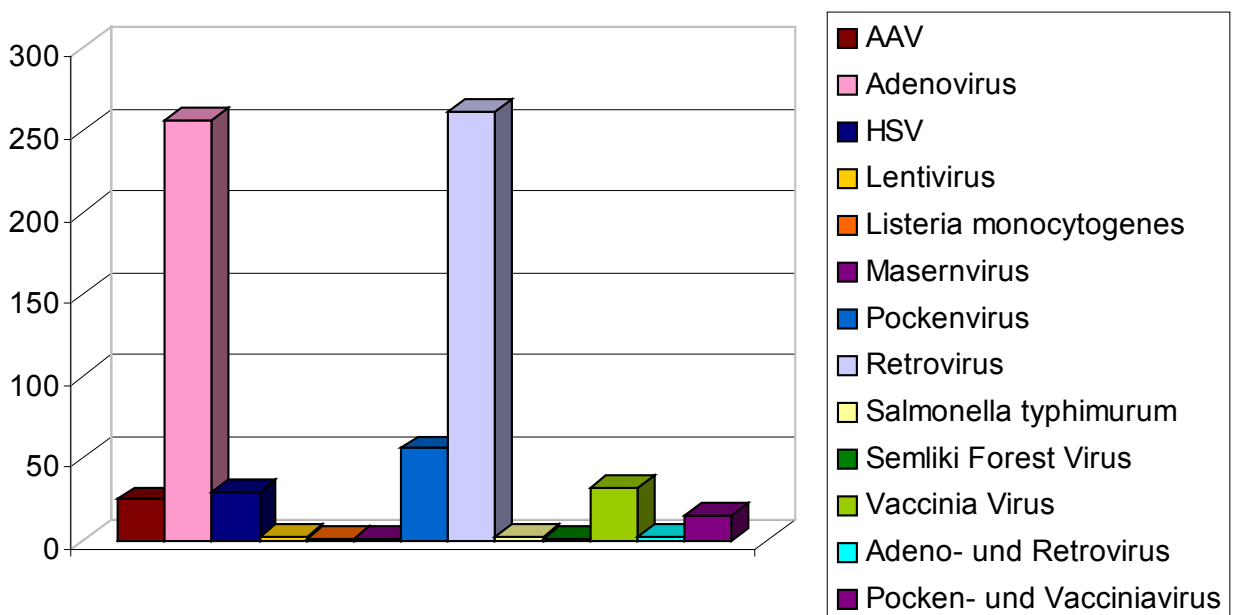


Abbildung 3: Vektorverteilung innerhalb viraler Gentherapiestudien Stand 2005 (Website des Journals of Gene Medicine vom Juli 2005).

Zu den gängigsten Vektoren in klinischen Versuchen zählen in absteigender Reihenfolge Retroviren, Adenoviren, Pockenviren, Vacciniaviren und Adeno-assoziierte Viren (Journal of Gene Medicine Clinical Trial Website). Das Grundprinzip ist dabei immer das gleiche: Die Forscher nutzen die natürliche Fähigkeit von Viren aus, Erbgut in eine Zelle einzuschleusen, das dort wie die zelluläre DNS abgelesen wird und zur Expression bestimmter Proteine

I. Einleitung

führt. Durch eine Integration in die Wirts-DNS ist eine stabile Genexpression über lange Zeit möglich.

Die bei weitem am häufigsten genutzten Viren sind Retroviren. Sie sind RNS-Viren, deren Erbgut nach dem Einschleusen in die Wirtszelle durch das Enzym reverse Transkriptase in DNS umgewandelt wird. Es gibt viele verschiedene Klassen von Retroviren. Zum Teil ist bisher keine Krankheit nachgewiesen, die durch die Viren ausgelöst wird, zum anderen zeigen einzelne onkogenes Potential, andere lösen verschiedenste Krankheiten aus. Heute ist das bekannteste Beispiel eines humanpathogenen Retrovirus sicherlich HIV-1.

Um Patienten nicht durch ein eventuelles pathogenes Potential der Viren zu gefährden, war lange einer der wichtigsten Punkte in der Entwicklung von retroviralen Vektoren die Produktion von Viren, die zu keiner Replikation mehr fähig sind. Auch wenn weiterhin ständige Kontrollen notwendig sind, ist diese Gefahr durch die heutigen Produktionsmethoden fast vollständig ausgeschaltet (Anson 2004).

Wichtiger heute ist ein anderes Risiko: das onkogene Potential der Retroviren. Nachdem die Integration willkürlich erfolgt, besteht das immer wieder diskutierte Risiko, einen Promotor in der zellulären DNS zu aktivieren oder ein Suppressorgen auszuschalten. In beiden Fällen kann es zur unkontrollierten Aktivierung von Gensequenzen kommen und damit eine Tumorentstehung ermöglicht werden. Allerdings wurde diese Gefahr lange als nicht sehr groß betrachtet (Crystal 1995). Nachdem es aber jetzt - wie schon oben erwähnt - bei zwei Kindern im Rahmen einer retroviralen Gentherapie zum Auftreten einer Leukämie kam, ist dieses Risiko auf jeden Fall neu und kritischer zu bewerten.

Doch Retroviren zeigen als Vektoren auch viele Vorteile: Sie besitzen eine hohe Transduktionseffizienz, die bei humanen Keratinozyten *in vitro* die Transduktion fast aller Zellen ermöglicht (Choate 1997, Mathor 1996). Allerdings werden solche Erfolgsraten nur *ex vivo* erzielt, da Retroviren nur proliferierende Zellen infizieren können. Ein wesentlicher Vorteil der retroviralen Vektoren ist die Möglichkeit einer dauerhaften Transduktion, da sich Retroviren – wie schon eingangs erwähnt - in die DNS integrieren. Auch lösen sie – zumindest im Vergleich zu Adenoviren - im menschlichen Körper nur geringe Immunreaktionen aus (Bessis et al. 2004) und zeigen daher ein niedrigeres Risiko einer überschießenden Immunantwort.

Adenoviren bilden ein fast genauso häufig genutztes Vektorsystem wie Retroviren. Sie sind Doppelstrang-DNS-Viren und ermöglichen im Gegensatz zu Retroviren einen Gentransfer *in vivo*, nachdem sie ruhende wie proliferierende Zellen transduzieren können (Ghazizadeh und

I. Einleitung

Taichman 2000). Allerdings ist die erzielte Genexpression transient, da keine Integration der eingeschleusten DNS in die Wirts-DNS erfolgt (Morgan und Anderson 1993, Ghazizadeh et al. 1999).

Ein gravierendes Problem ist die Immunreaktion, welche Adenoviren im menschlichen Körper auslösen. Innerhalb weniger Stunden kommt es zu einer Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die unter anderem Makrophagen und natürliche Killerzellen anlocken. Erst später kommt zu einer spezifischen Immunreaktion über antigenpräsentierende Zellen (Bessis et al. 2004).

Im Jahr 1999 kam es durch eine derartige Immunreaktion sogar zum Tod eines Patienten nach Injektion von Adenoviren in die Portalvene (Marshall 1999, Miller 2000). Auch wenn hierbei eine sehr große Viruslast appliziert wurde, werden doch seitdem adenovirale Vektoren vorsichtiger eingesetzt.

Ein weiterer, immer häufiger genutzter Vektor basiert auf Adeno-assoziierten-Viren.

2. Adeno-assoziiertes Virus als Vektor in der Gentherapie

2.1. Biologie

Es wurden 5 Serotypen humaner Adeno-assoziierte-Viren (AAV) identifiziert (Snyder 2002), von denen AAV Genotyp II (AAV-2) als Vektor am besten untersucht ist.

AAV-2 werden eingeordnet in die Familie der Parvoviren. Sie sind unbekapselte Viren in der Form eines Icosaheders mit einem Durchmesser von 20 – 26 nm. Sie enthalten eine einzelsträngige lineare Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit einer Länge von $4,68 \times 10^3$ Basenpaaren (Bp).

AAV-2 wird weiter dem Genus der Dependoviren zugeteilt. Diese Bezeichnung macht eine wesentliche Besonderheit des Lebenszyklus von AAV-2 deutlich: Um sich effizient zu vermehren, benötigt AAV-2 eine gleichzeitig bestehende Koinfektion der Zelle durch einen Helfervirus. Als geeignete Helferviren wurden vor allem Adenoviren, aber auch Herpes- oder Cytomegalieviren identifiziert (Atchison et al. 1965; Hoggan et al. 1966; Buller et al. 1981; McPherson et al. 1985).

I. Einleitung

In Abwesenheit von Helferviren dringt AAV-2 zwar in eine Wirtszelle ein, vermehrt sich aber nicht. Es entsteht eine latente Infektion, bei der die virale DNS stabil in die zelluläre DNS eingebaut wird, wobei sich das Virus zu 60 – 70 % in den q-Arm des Chromosoms 19 integriert (Kotin et al. 1990, 1991, 1992; Samulski et al. 1991). Dabei scheinen die sogenannten Rep-Proteine des Virus für die gezielte Integration eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies ist wichtig, da durch die Integration von Virus-DNS in ein Chromosom auch Veränderungen im Ablesemuster der zellulären DNS entstehen können – wie bereits bei den Retroviren erwähnt wurde. So können Protoonkogene ein- oder Tumorsuppressorgene ausgeschaltet werden, wodurch es zu Veränderungen in der Expression der betreffenden Genprodukte in der Zelle kommen kann. Dieser Mechanismus kann auch zur Entartung von Zellen und Tumorentstehung führen. Für den Integrationsort von AAV-2 auf Chromosom 19 wurde bisher noch keine derartige Wirkung nachgewiesen.

Während der latenten Infektion erfolgt eine geringe Expression viruseigener Proteine, der schon erwähnten Rep-Proteine. Diese bewirken eine Unterdrückung der weiteren viralen Genexpression und DNS-Replikation und ermöglichen damit erst die Etablierung einer latenten Infektion (Berns and Giraud 1996).

Erst die Koinfektion mit einem Helfervirus ermöglicht eine effiziente Bildung neuer infektiöser AAV-2 Partikel in der Zelle: Bei Adenoviren sind die dafür entscheidenden Genprodukte identifiziert worden: E1a, E1b, E2a, Va-RNS und E4 (Xiao et al. 1998). Diese greifen an verschiedenen Punkten in die Vermehrung von AAV-2 ein. Durch ihre Expression kommt es zur Aktivierung von AAV-Promotern, zur Vermehrung der viralen mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) in der Zelle, sowie zu einer verstärkten Translation der RNS (Chang und Shenk 1990, Laughlin et al. 1982, Muzyczka 1992, Samulski et al. 1987). Letztendlich führen all diese Vorgänge zu einer deutlich vermehrten Bildung viraler Proteine.

Auch wenn die Zelle Stressfaktoren ausgesetzt ist, wird durch Veränderungen in der zellulären Funktion das Ablesen der viralen DNS ermöglicht und es kommt zur Bildung infektiöser Partikel. Dies wurde experimentell nachvollzogen, indem die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt wurden (Nevins 1982; Wu et al. 1986) oder mit genotoxischen Substanzen behandelt wurden (Schlehofer et al. 1986; Yakobson et al. 1987; Yalkinoglu et al. 1988).

I. Einleitung

2.2. Infektionsweg

Der Weg, über den AAV-2 in die Zelle eindringt und sein Genom in die Wirts-DNS einbaut, ist immer noch Gegenstand der Forschung. Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen bindet AAV-2 zunächst an einen Heparansulfatproteoglycan-Rezeptor (Summerford und Samulski 1998). Für das Eindringen sind weitere Korezeptoren wichtig, wie der FGF-Rezeptor 1 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1) oder der $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Rezeptor (Qing et al. 1999, Summerford und Samulski 1999). Danach gelangt AAV-2 in Clathrin umhüllten Vesikeln in die Zelle. Durch die Reaktion des GTP (Guanosin-Triphosphat)-bindenden-Proteins Rac1 wird die Phosphatidyl-3-Kinase aktiviert. Dies führt zu Veränderungen im Zytosol, die erst die Passage der AAV-2 enthaltenden Endosomen ermöglichen (Sanlioglu et al. 2000). Im Endosom verbleibt das Virus bis zum späten endosomalen Kompartiment. Währenddessen verschiebt sich im Lauf der Reifung des Endosoms der pH-Wert in den sauren Bereich und bewirkt Konformationsänderungen bestimmter viraler Schlüsselproteine. Dadurch wird es für das Virus möglich aus dem Endosom ins Zytosol zu entkommen. Dort wird ein Teil der Viren wohl durch zelleigene Proteasomen abgebaut, bevor die AAV-2 Partikel in den Zellkern gelangen können (Abb. 4).

Ist die virale DNS in den Nukleus vorgedrungen, wird ein Teil der einzelsträngigen Virus-DNS zu einer doppelsträngigen DNS umgebildet, bevor der Einbau in die eukaryontische DNS erfolgt. Ein weiterer Teil der viralen DNS bleibt in episomaler Form im Zellkern, integriert sich also nicht in das Wirts-Genom (Douar et al. 2001).

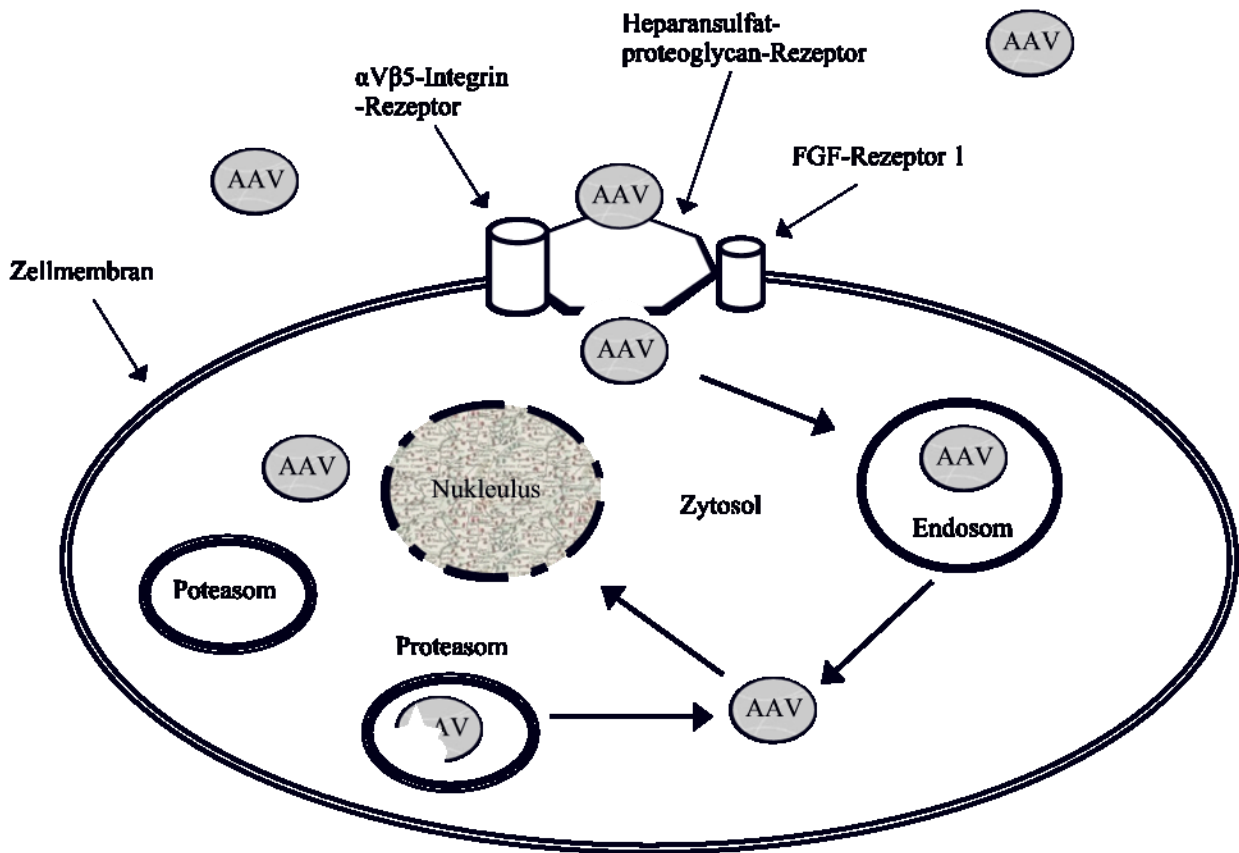


Abbildung 4: Infektion einer Zelle durch AAV-2 und intrazelluläre Prozessierung: AAV-2 dringt über den Heparansulfatproteoglycan-Rezeptor und Korezeptoren in die Zelle ein und verbleibt im Endosom bis er ins Zytosol entlassen wird. Dort droht der Abbau durch Proteasomen, bevor das Virus in den Nukleus gelangt.

2.3. Genetik

Die vollständige Nukleotidsequenz von AAV-2 von 4680 Basen wurde 1983 entschlüsselt (Srivastava et al. 1983).

An beiden Enden weist das Genom sogenannte Invertierte Terminale Repetitionen (ITR). Sie haben eine Länge von 145 Bp. und bilden eine Haarnadelstruktur in T-Form, die aus zwei kleinen inneren Palindromen besteht und einem größeren äußeren (Abb. 5). Die ITR sind wichtig für die Integration der AAV-DNS in das Wirtsgenom (McLaughlin et al. 1988; Samulski et al. 1989). Am 3'-Ende der Haarnadelstruktur beginnt die virale DNS-Replikation. Daneben spielen die ITR eine Rolle für das Ausschneiden der Virus-DNS aus der DNS des

I. Einleitung

Der zweite Leserahmen kodiert für drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Alle werden vom p40 Promotor aus transkribiert. Durch unterschiedliche Start-Kodone für die Translation resultieren 3 unterschiedliche Proteine mit 87, 73 beziehungsweise 62 kDa. Das Protein VP3 ist das kleinste von ihnen, aber im Vergleich zu den anderen Proteinen in einem Verhältnis von 20 : 1 : 1 am häufigsten vertreten (Rabinowitz und Samulski 2000).

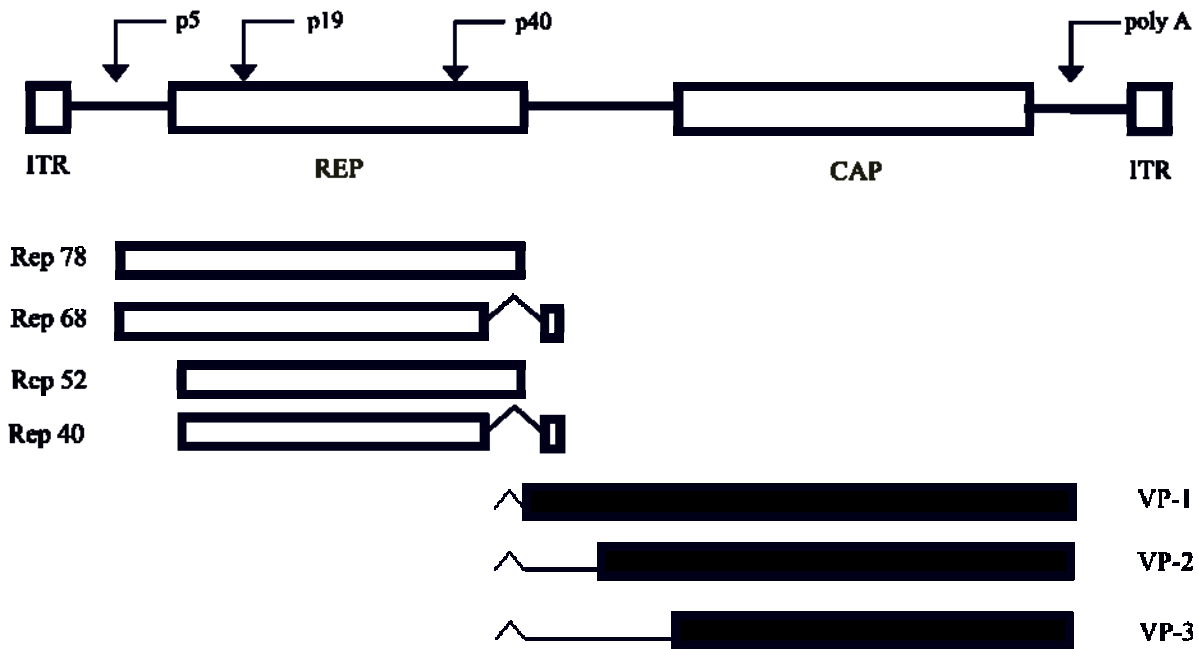


Abbildung 6: Genom von AAV-2: Oben ist die genetische Struktur von AAV -2 dargestellt mit den beiden ITR und den dazwischen liegenden Expressionskassetten der Rep- und Cap-Proteine. Diese sind darunter eigens abgebildet, wobei die Introns durch Striche gekennzeichnet sind.

2.4. Entwicklung zum Vektor

AAV-2 wurde erstmals 1984 als Transduktionsvektor für ein Neomycin-Resistenzgen durch Hermonat und Muzyczka (Hermonat und Muzyczka 1984) benutzt. Um AAV-2 als Vektor effizient einsetzen zu können, stellte sich die Frage, welche Teile des AAV-Genoms unabdingbar waren für eine erfolgreiche Infektion von Zellen. Dabei zeigte sich, dass nur die beiden ITR nötig sind, um einen funktionsfähigen rekombinanten Vektor herzustellen

I. Einleitung

(McLaughlin et al. 1988; Samulski et al. 1987, 1989). Allerdings scheint durch den Wegfall der Rep-Proteine auch die bevorzugte Integration auf Chromosom 19 nicht mehr gewährleistet. Es bleibt offen, ob andere Integrationsstellen an Bedeutung gewinnen oder ein zufälliger Einbau erfolgt. Miller et al. zeigten im Jahre 2002, dass auch rekombinantes AAV-2 (rAAV-2) als Vektor bevorzugt auf Chromosom 19 integriert, aber an einer anderen Stelle als Wildtyp-AAV-2 (Miller et al. 2002). Des Weiteren scheint sich rAAV-2 besonders leicht in gebrochene Chromosome zu integrieren. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass genotoxische Substanzen den Einbau von rAAV-2 erleichtern.

Ein weiteres Problem in der Entwicklung von rAAV-2-Vektoren war die Verunreinigung durch Adenoviren, die zwar für die Produktion benötigt wurden, im Menschen aber unerwünscht waren, da Adenoviren als Helferviren eventuell zu einer unkontrollierten Vermehrung der rAAV-2 beitragen können. 1998 gelang es Xiao et al. die adenoviralen Helferfunktionen intrans durch Plasmide bereitzustellen (Xiao et al. 1998). Das adenovirale Helferplasmid trägt die E2a, E4orf6 und VA Funktionen. Durch Kultivierung auf 293 Zellen, die Ad E1a und E1b exprimieren, werden die benötigten Helferfunktionen vervollständigt. Dadurch gelingt es heute rAAV-Titer von bis zu 10^{14} infektiösen Partikeln/ml zu produzieren, ohne das Risiko von Verunreinigungen durch Adenoviren oder Wildtyp-AAV.

Ein weiterer Ansatzpunkt für viele Forschungsprojekte ist die geringe Transportkapazität von rAAV-2 für Transgene. Nachdem bekannt ist, dass sich Transgene im Größenrahmen von 50% - 110% der Wildtyp-DNS gut verpacken lassen (Muzyczka 1992), können in einen rAAV-2 circa 4,7 kBp eingebaut werden. Bei größeren Transgenen lässt die Effizienz schnell nach, bis die Verpackung unmöglich wird. Aber auch zu kleine Transgene wirken sich negativ aus. Letzteres kann durch eine Wiederholung der eingebauten DNS-Sequenz vermieden werden. Nachdem aber auch ein Transport größerer Transgene erwünscht ist, laufen Versuche, um die Kapazität von rAAV-2 zu steigern. So gibt es die Möglichkeit, virale Kapsidhybride zu bilden zum Beispiel mit Parvovirus B19, die größere DNS-Fragmente transportieren können (Ponnazhagan et al. 1998).

Eine andere Überlegung setzt an einer weiteren Besonderheit bei der Integration von rAAV-2 an, nämlich der häufig anzutreffenden Tandemanordnung: Dabei schließt sich an das Ende der ersten AAV-2-Sequenz der Kopf einer zweiten Sequenz aus einem weiteren AAV-2 an. Dies eröffnet die Möglichkeit, größere Gene auf zwei Viren aufzuteilen. Für eine Expression des funktionsfähigen Genprodukts ist dann eine gleichzeitige Infektion der Zelle mit beiden Vektoren nötig. Xiao et al. (1999) zeigten, dass das Markergen β -Galaktosidase exprimiert wurde, obwohl die Expressionskassette auf zwei rAAV-2-Vektoren aufgeteilt war.

2.5. Eigenschaften von rAAV-2

Während die Abhängigkeit der Virusreplikation von Helferviren in der Produktion von rAAV-2 zunächst ein Problem darstellte, erhöht diese Eigenart des AAV-2 auch die Sicherheit eine Gentherapie mit rAAV-2. Eine unkontrollierte Vermehrung der DNS wird erst möglich, wenn gleichzeitig eine Infektion mit Wildtyp-AAV-2 und Adenovirus oder anderen Helferviren vorliegt.

Des weiteren gibt es bis heute keinen Beweis für eine Krankheit im Menschen, die auf die Infektion mit AAV-2 zurückzuführen ist, obwohl 80 – 90% aller Erwachsenen seropositiv auf AAV-Kapsidproteine sind. Die Serokonversion erfolgt meist schon in der Kindheit (Blacklow et al. 1968, 1971; Hoggan 1970; Parks et al. 1970). Bisher gibt es nur sehr vereinzelte Anzeichen für einen pathologischen Effekt:

Etwas widersprüchliche Ergebnisse liefert eine Langzeitstudie über Mäuse mit Mucopolysaccharidose, die durch einen Gentransfer mit rAAV behandelt wurden (Donsante et al. 2001). Dabei zeigte sich bei den mit rAAV behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl von hepatozellulären Karzinomen und Angiosarkomen. Diese Tumore traten in der Kontrollgruppe nicht auf. Über eine PCR ließ sich aber die klonale Expansion einer transduzierten Zelle ausschließen. In anderen Studien von Mäusen der selben Forschungsgruppe, die auch mit einem gleichen Vektor transduziert wurden, zeigte sich keine erhöhte Tumoranzahl. Nachdem zusätzlich die Anzahl an Tieren zu klein war, lässt sich aus diesem Versuch wohl kaum auf ein onkogenes Potential von rAAV-2 schließen.

Nachgewiesen wurde nur, dass es durch den Einbau von rAAV-2 innerhalb des menschlichen Genoms zu kleineren Umstrukturierungen an der Integrationsstelle kommt (Miller et al. 2002).

rAAV-2 integriert besonders häufig in aktiv transkribierte Regionen. Daraus könnte man ein onkogenes Potential von rAAV-2 erwarten. Wenn man aber bedenkt, dass es im Laufe der normalen Transkription an Bruchstellen der Doppelstrang-DNS in einem Drittel der Fälle zu Mutationen kommt (Allen et al. 2003) und sich rAAV-2 gerade in schon existierende Bruchstellen integriert, besteht kein Hinweis darauf, dass der Einbau von rAAV-2 zu einem größeren Schaden führt als schon die normale Transkription (McCarty et al. 2004).

Einige Studien wiesen sogar auf den protektiven Effekt einer AAV-Infektion gegen eine viral induzierte Tumorentstehung hin (Casto und Goodheart 1972; Mayor et al. 1973; Cukor et al. 1975; De La Maza und Carter 1981; Ostrove et al. 1981; Hermonat 1989).

I. Einleitung

Die Immunantwort auf eine Transduktion von Muskelzellen mit Adenoviren und rAAV-2 wurde direkt verglichen (Xiao et al. 1996, Bessis et al. 2004). Dabei zeigte sich für rAAV-2 innerhalb des ersten Tages kaum eine Immunreaktion. Damit ist für rAAV-2 das Risiko einer überschießenden Immunantwort mit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Chemokine gering, ganz im Gegensatz zu den Adenoviren. Allerdings ließ sich dosisabhängig nach Tagen ein Antikörpertiter gegen virale Kapsidproteine nachweisen.

Die Immunreaktion scheint auch davon abzuhängen, wie rAAV-2 in den Körper gebracht wird (Brocksted et al. 1999), ebenso wie von den individuellen Voraussetzungen der Zielperson. Während durch die Antikörperbildung kaum eine Gefahr für den Patienten besteht, kann eine zweite rAAV-Applikation in ihrer Wirkung deutlich abgeschwächt werden, wie auch Hengge et al. 2000 in einem Versuch zur Transduktion von Epidermis *in vivo* zeigten. Dennoch wurden in dem Versuch Kerationzyten über einen Zeitraum von mehr als sechs Wochen erfolgreich transduziert (Hengge et al 2000). Auch eine Transduktion der Haarfollikel war über die gesamte Versuchsdauer zu beobachten.

Der limitierende Effekt durch Antikörper wurde vor allem in Muskelgewebe in unterschiedlichen Studien nachgewiesen (Fisher et al. 1997, Kessler et al.1996, Chirmule et al. 2000, Xiao et al. 2000). Dem liegt eine T-Zell vermittelte Aktivierung der B-Zellen gegen das Virion zugrunde. Durch eine vorübergehende Immunsuppression während der Infektion mit AAV-2 ließ sich AAV-2 erneut anwenden, ohne dass die Partikel durch Antikörper inaktiviert wurden (Halbert et al. 1998, Manning et al. 1998).

Ein großer Vorteil von AAV-2 gerade auch im Vergleich zu Retroviren ist seine unumstrittene Fähigkeit, auch ruhende Zellen zu infizieren. Versuche zur Effektivität der Transduktion ruhender Zellen liefern allerdings noch widersprüchliche Ergebnisse: Während Russel et al. 1994 eine niedrigere Transduktionseffizienz ruhender Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen nachwies (Russel et al. 1994), zeigte Miao et al., dass der Zellzyklus keinen Einfluss hatte auf die Effizienz der Transduktion in Hepatozyten (Miao et al. 2000).

Generell kann rAAV-2 als Vektor sehr verschiedene Gewebe transduzieren, wenn auch mit einer unterschiedlichen Effizienz (Monahan et al. 2000). rAAV-2 zeigte sich besonders effektiv bei Muskel- oder Gehirnzellen sowie Bronchialepithelien (Xiao et al. 1996, During et al. 1998, Sanlioglu et al. 2001). Wesentlich schlechter ließen sich Gefäßendothelien oder Makrophagen transduzieren (Ponnazhagan et al. 1996, 1997, Nicklin et al. 2001).

I. Einleitung

Die Transduktionseffizienz hängt zum Beispiel auch davon ab, wie stark Heparansulfatproteoglycan-Rezeptoren und Korezeptoren von der Zelle präsentiert werden. Aber viele weitere Faktoren müssen erst noch bestimmt werden.

3. Problemstellung

Eine hohe Gentransfereffizienz ist ein entscheidender Punkt für die erfolgreiche praktische Anwendbarkeit eines Vektors. Keratinozyten sind prinzipiell durch rAAV-2 zu transduzieren (Braun-Falco 1999), aber genauere Untersuchungen zur Effizienz von rAAV-2 speziell in Keratinozyten bei Kultivierung ohne Selektionsdruck fehlen bisher. Ebenso wie Methoden zur Transduktionssteigerung, die notwendig sind um rAAV-2 als vollwertige Alternative zu Retroviren in der Hautgentherapie zu etablieren.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, Möglichkeiten zu untersuchen, die Transduktionseffizienz von rAAV-2 in Keratinozyten zu steigern und die transduzierten Zellen *in vitro* in Bezug auf ihr Proliferationsverhalten und die Weitergabe und Stabilität des Transgens zu beobachten.

1. Material

1.1. Zellen, Bakterien und Plasmide

1.1.1. Eukaryontische Zellen

293 Zellen

Humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 (Graham, 1977), erworben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 305), Braunschweig, Deutschland

HeLa Zellen

Humane Zervix-Karzinomzelllinie, kultiviert seit 1951 von einem epithelialen Zervixkarzinom einer 31 jährigen Frau, (Gey 1952, Scherer 1953),erworben von DSMZ (ACC 57)

NIH3T3:

Kontakt-inhibierte embryonale Maus-Fibroblasten Zelllinie (Jainchill, 1969) erworben von DSMZ (ACC 59)

Primäre humane Keratinozyten

präpariert aus Vorhäuten oder Zellen der äußeren Haarwurzelscheide von Kindern bis 9 Jahren, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Th. A. Angerpointner, Kinderchirurgische Praxis, München

1.1.2. Bakterien

Escherichia coli

One Shot Top10 competent cells von *Invitrogen Cor.*, Carlsbad, CA, USA

Eigenschaften: F-mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC)f80lacZDM15DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7679 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

II. Material und Methoden

1.1.3. Plasmide

pAAV-2 / C-GFP

zur Verfügung gestellt von Dr. med. M. Braun-Falco (Braun-Falco 1999)

pCEP4

erworben von *Invitrogen Cor.*

pEGFP-N3

Clontech Lab. Inc., Palo Alto, Ca, USA

phrGFP

erworben von *Stratagene*, La Jolla, CA, USA

psub 201

dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Dr. R Samulski, Gene Therapy Center and Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, USA (Samulski 1989)

pTR-UF

dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Samulski (Xiao 1998)

pXX6

dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Samulski (Xiao 1998)

pRC

dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von A. Girod (Braun-Falco 1999)

1.2. Enzyme

New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

II. Material und Methoden

Alkalische Phosphatase (CIP), T4-DNS-Polymerase, T4-DNS-Ligase, Restriktionsenzyme (Acc I, BamH I, Bgl II, EcoR, Hind III, Kpn I, Mlu I, Nae I, Not I), Nukleotidlösung

MP Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA
RNase A

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland
Benzonase 25 U/ μ l

1.3. Chemikalien

Calbiochem[®], La Jolla, CA, USA
MG 132, MOPS, AG 1478, Tyrphostin 1 und 23

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm, Deutschland
Isopropanol, Tris

GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Agarose, 1kb DNS-Leiter

Invitrogen Cor.
DMRIE-C-Reagenz

Merck, E. AG
Aceton, Dimethylsulfoxid (DMSO), EDTA, Borsäure, Kalziumchlorid, Glycerin, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumphosphat, Natriumhydroxid Plätzchen, SDS, Triton X-100

Roth, C., Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz, Bacto Agar, Trypton/Pepton aus Casein, Ethidiumbromid 1 %, Hefe-Extrakt, Hepes

II. Material und Methoden

Sigma Chemie, München, Deutschland

Albumin aus bovinem Serum, Albumin Solution 7,5% Fraktion5, Ammoniumsulfat, endotoxinfreies Wasser, Ethanol absolut, L-Asorbic Acid, Phenolrot, Protease X, Optiprep Iodixanol 60 %, Natriumphosphat, Trypanblau Solution 0,4%

1.4. Zellkulturmedien

Biochrom KG, Seromed[®]

DMEM (Dulbecco's modifiziertes minimal essentielles Eagles Medium), EDTA (1%), EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) (5 mg/ml), Ethanolamin (0,1 mM), Hams F12, Hydrocortison (1,4 µM), Insulin (10 mg/ml), FCS (Fetales Kälber Serum), L-Glutamin (200mM), MCDB 153, NCS (Neugeborenen Kälberserum), Phosphoethanolamin (0,1 mM), PBS, Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 mg/ml), Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%), Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%)

GibcoBRL

DMEM mit Glutamin, KSFM, Rinderhypophysenextrakt 25mg/Einheit

Sigma Chemie

Adenin Hydrochlorid,Choleratoxin, Rinderhypophysenextrakt (25 mg/Einheit)

1.5. Geräte und sonstige Materialien

Beckmann, München, Deutschland

Festwinkelrotor Ti70, Ultrazentrifuge L80, Ultrazentrifugationsröhrchen Quick Seal Polyallomer 25 x 89 mm

Becton Dickinson / Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Cell Culture Insert (0,4 µm Porengröße), Multiwell TM 6 Well, FACS Calibur, Konische Röhrchen 15ml, 50ml (Polypropylen), Konische Röhrchen 15ml, 50ml

II. Material und Methoden

(Polystyren), Mikrolance 3-Injektionskanüle, Pipetten (Polystyren) 10 ml, 25 ml,
Sterile Spritze 30 ml

Bio-Rad. Hercules, CA, USA

Gel Doc Dokumentationssystem Quantity One Version 4,1, Sub-Cell GT Agarose
Gel Elektrophorese System , Power Pac 300 System

Corning Costar Cor., Cambridge, MA, USA

Sterile Zellschaber, Costar Stripette 5ml, 10ml und 25ml

Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland

Pipetten 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l 1000 μ l, Pipettenspitzen Ep TIPS Standard 0,1-
10 μ l, Thermomixer 5437

Gerhardt, Königswinter, Deutschland

Thermoshake TH05

Greiner GmbH, Nürtingen, Deutschland

Petrischalen 10cm unbeschichtet (für Bakterienkultur), Pipettenspitzen 100 μ l,
1000 μ l, Reagenzröhrchen 10ml, 50ml, Reaktionsgefäß 1,5ml mit Deckel

Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge Universal 32R Rotanta

H + P, Oberschleißheim, Deutschland

Dampfsterilisator Varioclav

Integra biosciences, Chur, Schweiz

Pipetboy acu

Julabo, Seelbach, Deutschland

Wasserbad Typ F12

Kendro, Hanau, Deutschland

II. Material und Methoden

CO₂-Begasungsbrutschrank Hera Cell, Heraeus Megafuge 1,0, Heraeus Megafuge 1,0 R, Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HSP 12, Sorvall Zentrifuge RC 26 Plus, Sorvall SA-300 Rotor

Kern und Sohn Waagen, Balingen, Deutschland
770 Feinwaage

Kodak, Stuttgart, Deutschland
Ektochrome 160T Professional

Moulinex, Solingen, Deutschland
Microchef FM 3915

Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
Cryo-Tube 1,8ml Innengewinde und U-Boden, Impfnadeln, Impfösen, Nunclon-SI Multidish zellkulturbeschichtet mit 6, 12 und 24 Vertiefungen, Zellkulturpetrischalen 40 x 12 mm, 58 x 15 mm, 92 x 17 mm

Peske, Aindling, Deutschland
Zellkulturschalen (für 293 Zellen) 15cm, Kanülen BD Mikrolance

pfm, Köln, Deutschland
Skalpel Feather

Quiagen, Hilden, Deutschland
Endo free Plasmid Kit, Gel Extraction Kit (50), Plasmid Kit Mini und Maxi

Ricoh, Tokyo, Japan
XR X 3000 Fotokamera

Roth, C.
Drigalski Spatel, sterile Kanülen 100 Sterican

Sartorius, Göttingen, Deutschland

II. Material und Methoden

Minisart Sterilfilter Porengröße 0,2 µm, Waage C 420 p

Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Bio Trap Membrane 1 und 2

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Vortex-Genie 2

Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

Laborzentrifuge Typ 1-15

Wagner und Muntz, München, Deutschland

Deckgläschen, Dumont Pinzetten gebogen, Handzähler, Neubauer Zählkammer,
Reagenzglasständer

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25, Microm HM500 O-Kryostat-Mikrotom

2. Methoden

2.1. Plasmidklonierung

Die mikrobiologischen Methoden folgten Standardprotokollen (Ausubel 1987, Sambrook 1989). Soweit nicht anders angegeben wurde für alle Zentrifugationen die Heraeus Megafuge 1,0 von Kendro verwendet. Als Bakterien dienten kompetente *Escherichia Coli* (*E. coli*) Top 10 mit Ampicillinresistenz.

2.1.1. Kultivierung und Transformation von Bakterien

2.1.1.1. Transformation von Plasmid-DNS in Bakterien

LB-Medium:	Trypton / Pepton aus Casein	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Natriumchlorid	5 g
	Aqua dest.	ad 1 l

Für die Transformation tauten die bei minus 80 °C gelagerten kompetenten Bakterien langsam auf Eis auf. 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit 20 µl eisgekühlter DNS-Lösung in einem 1,8 ml Reaktionsgefäß gemischt und erneut für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 5 Minuten ein Hitzeschock in einem 37 °C warmem Wasserbad. Durch die Verdünnung mit 1 ml 37 °C warmen LB-Medium wurde die Transformation beendet und die Suspension in ein 10 ml Greiner-Röhrchen überführt.

2.1.1.2. Flüssigkultur

Die Bakterien wurden bei 37 °C und 200 Upm in autoklaviertem LB-Medium vermehrt. Die Beigabe von Ampicillin-Natriumsalz in einer Endkonzentration von 80 µg/l bewirkte eine Selektion von ampicillinresistenten Bakterien. Die Inkubationszeit war abhängig von der Menge an LB-Medium und der Ausgangsmenge an Bakterien. Ziel war, die Vermehrung der Bakterien gegen Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase zu stoppen. 8×10^8 Bakterien/ml

II. Material und Methoden

galten als ideal entsprechend einer photometrisch bei 600 nm bestimmten optischen Dichte von 0,8 – 1.

2.1.1.3. Plattenkultur

LB-Agar:	Trypton / Pepton aus Casein	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Natriumchlorid	5 g
	Bacto Agar	15 g
	Aqua dest.	ad 1 l

Zum Isolieren einzelner Bakterienklone diente die Plattenkultur. Dabei wurde autoklavierter LB-Agar in der Mikrowelle erhitzt, bis er flüssig wurde. Nachdem er unter Rühren wieder auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurde Ampicillin-Natriumsalz in einer Endkonzentration von 80 µg/l hinzugegeben. Der Agar ließ sich dann gleichmäßig in sterile 10 cm Petrischalen ausgießen und nach dem Abkühlen und Erhärten bis zu maximal 6 Wochen bei 4 °C aufbewahren.

Vor Gebrauch wurden die Platten für einige Stunden zum Trocknen offen unter die Werkbank gelegt.

Je 50 µl und 500 µl des LB-Mediums mit den transformierten Bakterien wurde auf die Platten aus LB-Agar gegeben und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt, bis die Flüssigkeit vollständig eingezogen war. Nach einer Inkubation von mindestens 16 h bei 37 °C konnte man mit Impfnadeln einzelne Klone picken. Diese wurden zunächst in 5 ml LB-Medium für 1 h kultiviert, in 500 ml Medium überführt und über Nacht für 12 bis 14 h inkubiert.

2.1.1.4. Glycerinkultur

Zur mittelfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen bei – 20 °C eingefroren. Dazu wurden LB-Medium und 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und autoklaviert. 500 µl dieser Suspension wurden gemeinsam mit 500 µl Bakterien aus einer Übernachtskultur in ein 1,8 ml Gefrier Röhrchen gefüllt und langsam über Stunden auf minus 20 °C heruntergekühlt und tiefgefroren. Bei Bedarf konnte je ein Röhrchen in 500 ml LB-Medium über Nacht vermehrt werden.

II. Material und Methoden

2.1.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNS

Die Plasmid-DNS-Isolation und -Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Plasmid Kits der Firma Quiagen. Die DNS-Extraktion mittels alkalischer Bakterienlyse entsprach weitgehend dem Protokoll von Birnboim und Doly (Birnboim 1983). Die Reinigung der DNS folgte dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie.

2.1.2.1. Extraktion von Plasmid-DNS

Puffer 1:	Tris Hcl (pH 8)	50 mM
	EDTA (pH 8)	10 mM
	+ RNase A	100 µg/ml (vor Gebrauch dazugeben)

Puffer 2:	NaOH	200 mM
	SDS	1 %

Puffer 3:	KoAc (pH 5,5)	3 M
-----------	---------------	-----

RNase A Stammlösung:

RNase A	10 mg/ml
Tris Hcl (pH 7,5)	10 mM
NaCl	15 mM

Um DNS-Plasmide zu vermehren, wurden transformierte *E. coli* über Nacht bei 37 °C in 500 – 800 ml LB-Medium inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde bei 4500 Upm für 10 Min abzentrifugiert, das entstandene Pellet mit 10 ml Puffer 1 mit RNase A aufgenommen und in 50 ml Röhrchen überführt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml Puffer 2 hinzugegeben und damit eine alkalische Lysereaktion gestartet.

Das Reaktionsgemisch inkubierte erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Lysereaktion durch Zugabe von 10 ml eisgekühltem Puffer 3 gestoppt wurde. Das Röhrchen ruhte anschließend für 15 Minuten auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 20.000 Upm und 0 °C für 30 Min (Ultrazentrifuge Beckmann)

II. Material und Methoden

sammelten sich die bakteriellen Proteine und die chromosomale DNS im Pellet. Der Überstand mit der Plasmid-DNS wurde in ein neues Röhrchen überführt und ein zweites Mal bei 20.000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss folgte die weitere Aufreinigung des Überstands nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie.

2.1.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNS

Puffer QBT:	NaCl	750 mM
	MOPS (pH 7,0)	50 mM
	Ethanol	15 %
	Triton X 100	0,15 %

Puffer QC :	NaCl	1 M
	MOPS (pH 7,0)	50 mM
	Ethanol	15 %

Puffer QF :	NaCl	1,2 M
	MOPS (pH 8,5)	50 mM
	Ethanol	15 %

Nach der Extraktion der Plasmid-DNS wurde diese in wässriger Lösung auf Quiagensäulen gegeben. Diese waren davor mit QBT-Puffer äquilibriert worden. Nachdem der Überstand vollständig durch die Säulen gelaufen war, wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und dann die DNS mit 3 ml QF-Puffer eluiert und aufgefangen.

Für die Überprüfung neuer rekombinanter Plasmide wurden gepickte Klone in nur 7 ml Medium vermehrt. Damit reduzierte sich auch die benötigte Menge an Puffer 1 bis 3 auf je 300 µl. Die Elution erfolgte mit 1 ml QF-Puffer.

Im Anschluss folgte eine Isopropanolfällung des Eluats bei Raumtemperatur.

Für die Virusherstellung wurde endotoxinfreie DNS benötigt, da Endotoxine aus den lysierten Bakterien die Transfektionseffizienz reduzieren können (Weber et al. 1995). Die Aufreinigung folgte den Angaben des Endofree Plasmid Kits von

II. Material und Methoden

Quiagen. Diese sind fast identisch mit den bereits beschriebenen Vorgaben des gewöhnlichen Plasmid Kits von Quiagen. Das Kit enthält noch zusätzlich einen Puffer zur Entfernung von Endotoxinen.

2.1.2.3. Isopropanolfällung

DNS in wässriger Lösung wurde mit dem 0,1-fachen Volumen an 3 M Kaliumacetat (pH 5,2) versetzt. Dieser Schritt entfiel nach der Quiagen-Säulenpräparation, da die DNS hierbei schon in salzhaltigem Medium gelöst war. Anschließend wurde das 0,7-fache Volumen raumtemperierten absoluten Isopropanols dazu pipettiert. Nach kurzem Mischen folgte eine Zentrifugation bei 4500 Upm für 30 Min. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. War kein Alkoholgeruch mehr feststellbar, so wurde das Pellet vollständig in Wasser gelöst.

Die endotoxinfrei aufgereinigte DNS für die Virusproduktion wurde nicht in Wasser aufgenommen sondern mit 5 ml 70% Ethanol bei 4500 UpM und 4°C für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet getrocknet, bevor es in endotoxinfreiem TE Puffer aufgenommen wurde.

2.1.2.4 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS

Die Plasmid-DNS-Konzentration wurde im Photometer bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt im Vergleich zu reinem Wasser. Über die optische Dichte wurde nach folgender Formel die gesuchte DNS Konzentration X berechnet: $1 \text{ OD}_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l DNS} = X$.

2.1.3. Analyse von Plasmid-DNS

2.1.3.1. Restriktion

Durch Restriktion von Plasmid-DNS und Vergleich der sich ergebenden Fragmente lässt sich die Struktur der Plasmid-DNS näher bestimmen. Die

II. Material und Methoden

Plasmid-DNS wurde nach den Herstellerangaben von Biolabs® mit den benötigten Restriktionsenzymen geschnitten, meist bei 37°C. Für Analysezwecke wurde 1 µg DNS mit 1-5 Einheiten des gewünschten Restriktionsenzymen versetzt und in 10 µl Reaktionsvolumen bei entsprechender Temperatur für ca. 2 Stunden inkubiert. Für die Präparation von Plasmid-DNS wurden die Volumina jeweils vervielfacht. Anschließend wurde die DNS auf ein Gel aufgetragen, um die einzelnen Fragmente aufzutrennen.

2.1.3.2. Auftrennung mittels Gelelektrophorese

TBE-Puffer:	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2 mM
Auftragspuffer	Tris HCl (pH 8)	10 mM
	EDTA (pH 8)	50 mM
	Ficoll	10 %
	Bromphenolblau	0,01 %
	Xylencyanol	0,01 %
	Glycerin	10 %

Es wurden 1 –1,5 %-ge Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer durch dreimaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Bei einer Elektrophorese zu Analysezwecken wurde zur besseren Markierung der DNS nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid lagert sich an die DNS an und macht sie damit im Fluoreszenzlicht sichtbar.

Das auf ca. 40° C abgekühlte Gel wurde in eine Form gegossen und ein Kamm eingesetzt. Dann wurde das erstarrte Gel in eine Gelkammer gelegt, die so mit TBE-Puffer gefüllt wurde, dass das Gel von der Flüssigkeit bedeckt war. Nach dem Lösen des Kamms wurden die Laschen vorsichtig mit der DNS-Lösung gefüllt, die vorher mit 10 % Auftragspuffer vermischt worden war. Durch das Anlegen eines Spannungsfeldes wanderten die DNS-Fragmente je nach Ladung

II. Material und Methoden

und Größe unterschiedlich schnell innerhalb des Gels. Bei einer Spannung von 80-120 Volt trennten sich die DNS-Fragmente auf und bildeten verschiedene Banden. Diese konnten durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids bei 366 nm dargestellt werden. Durch den Vergleich mit den Banden einer 1 kb-DNS-Leiter ließ sich die Länge der Fragmente ermitteln.

Bei den präparativen Gelen erfolgte die DNS – Markierung mit Ethidiumbromid erst nach der Auftrennung im Spannungsfeld durch Schwenken in ethidiumbromidhaltigen Puffer, um die Gefahr für Strangbrüche durch Ethidiumbromid zu verringern.

2.1.3.3. Extraktion von DNS aus Agarosegel

Die Extraktion der gewünschten Bande erfolgte entweder über das Gelextraktions-Kit von Quiagen oder durch Elektroelution.

A: Gelextraktions-Kit von Quiagen

Mit dem Gelextraktions-Kit wurde nach Herstellerangaben verfahren: Das Gel wurde in einem Bindepuffer in einem Wasserbad bei 37°C gelöst, auf die vorbereitete Säule aufgetragen und für eine Minute bei 10.000 Upm zentrifugiert. Danach wurde die DNS in der Säule zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch eine einminütige Zentrifugation mit 70 °C warmen Wasser in ein 1,8 ml Gefäß bei 10.000 Upm.

B: Elektroelution

Die Elektroelution nutzt wie schon die Elektrophorese die Wanderung der DNS in einem Spannungsfeld. Dazu wurde in die Elutionskammer, am zur Anode ausgerichteten Ende, die DNS-undurchlässige Membran 1 eingesetzt. Diese war zuvor unter fließendem Wasser durchfeuchtet worden. Die DNS-permeable Dialysemembran wurde vor Membran 1 in der Kammer befestigt. Nachdem die ganze Elutionskammer in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt worden war, wurden die Gelstücke mit der Fragment-DNS in der Mitte der Elutionskammer platziert. Für ca. 4 Stunden wurde eine Spannung von 90 Volt angelegt. Die DNS wanderte im Spannungsfeld Richtung Anode. Nachdem die erste Membran DNS-durchlässig war, gelangten die Fragmente zwischen die beiden Membranen. Dort sammelten sie sich, da die zweite Membran für DNS

II. Material und Methoden

nicht permeabel war. Nachdem sich dabei viele DNS-Fragmente direkt an der hinteren Membran anlagerten, wurde anschließend der Stromfluss für 1 Minute umgepolt, um die DNS etwas von der Membran zu lösen. Das Flüssigkeitsvolumen zwischen den beiden Membranen, das die Ansammlung der Fragmente enthielt, wurde abpipettiert und die DNS durch Isopropanolfällung präzipitiert.

2.1.4. Enzymatische Behandlung von Plasmid-DNS

2.1.4.1. Herstellung glatter Enden bei DNS-Fragmenten

Für Ligationen mit glatten Enden wurden die DNS-Schnittstellen mit T4 DNS Polymerase behandelt. Diese füllt in 5'- 3' Richtung auf und kürzt 3'- 5' Überhänge. Genau nach Herstellerangaben wurden Nukleotide, Puffer, BSA, DNS und Enzym zusammengegeben und bei 16 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

Im Anschluss wurde die DNS erneut mit Isopropanol gefällt um die übriggebliebenen nicht eingebauten Einzelnukleotide zu entfernen.

2.1.4.2. Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten

Vor jeder Ligation wurde mit alkalischer Kälberphosphatase (CIP) das größere DNS-Stück nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um einen Eigenringschluss zu vermeiden. Dabei wurde pro µg Fragment-DNS 1 µl 10-fach Dephosphorylierungspuffer, 1 Einheit alkalische Phosphatase und 9 µl Aqua dest. hinzugegeben. Die Lösung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten gestoppt.

2.1.4.3. Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation erfolgte mit T4 DNS Ligase über Nacht bei 12°C. Die Ligase verknüpft dephosphorylierte und phosphorylierte Enden von DNS-Fragmenten.

II. Material und Methoden

Das Verhältnis des größeren zum kleineren DNS-Fragments wurde für die Reaktion im Bereich von 1:1 bis 1:9 variiert.

2.1.5. Lipofectamintransfektion

Die Funktionalität der klonierten Plasmide wurde mit Hilfe einer Lipofectamintransfektion in Keratinozyten getestet. Als Positivkontrolle diente ein bekanntes CMV-GFP Plasmid und die Negativkontrolle wurde ohne DNS durchgeführt.

Es wurden Keratinozyten der Passage 2 in 6-Loch-Platten mit einer Zellzahl von 200.000 Zellen ausplattiert und am folgenden Tag bei einer Dichte von ca. 70 % transfiziert. Dabei diente MCDB 153 mit Supplementen, aber ohne Rinderhypophysenextrakt, als Zellkulturmedium. Es wurde 5 µl DMRIE-C Reagens in 500 µl Medium verdünnt und 1 µg Plasmid-DNS in ebenfalls 500 µl Medium. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben in ein 1,8 ml Röhrchen und vorsichtig vermischt, bevor sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten.

Die Keratinozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen, dann konnte das mit der DNS vermischte DMRIE-C Reagens auf die Zellen gegeben werden. Nach 12 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden 2 ml voll supplementiertes KSFM hinzugefügt. Nach 48 Stunden erfolgte die Kontrolle der Expression im Fluoreszenzmikroskop.

2.2. Vektorherstellung

Die Vektorherstellung orientierte sich an den Methoden von Xiao et al. 1998. Dabei werden über eine Dreifachtransduktion von 293 Zellen rAAV-2-Partikel hergestellt, die frei sind von Verunreinigungen durch Adenoviren. Die virale Helferfunktion übernahmen das Plasmid pRC und das adenovirale Kofaktorplasmid pXX6. Alle Plasmide wurden über Nacht in LB-Medium

II. Material und Methoden

vermehrt, das Vektorplasmid und das Helferplasmid pRC mit 100 µg Ampicillin in 300 ml LB-Medium, das pXX6 Plasmid mit nur 50 µg Ampicillin.

Soweit nicht anders angegeben wurde für Zentrifugation die Megafuge 1,0 von Kendro benutzt.

2.2.1. Kultivierung von 293 Zellen

Für die Virusherstellung wurden 293 Zellen als Verpackungszelllinie auf einer 15 cm Petrischale von Peske in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Die Zugabe von FCS-haltigem DMEM stoppte den Vorgang und die Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Platte wurde mit DMEM nachgespült, um die letzten Zellen einzusammeln. Die Suspension wurde gut resuspendiert und die Zellen in einer Neubauer Kammer gezählt. Danach konnten $7,5 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale ausplatiert werden. Dabei war vor allem die gleichmäßige Verteilung der Zellen wichtig. Für eine Herstellung von rAAV-2 wurden 15 Petrischalen benötigt.

2.2.2. Calciumphosphatpräzipitation

HBS Puffer

Hepes	5,955 g
NaCl	8,18 g
NaP 1,5 mM	1,5 ml
Endotoxinfreies Wasser	ad 500 ml

Der pH Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen bei einer Konfluenz von 80 % folgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 2 bis 3 Stunden begann die Calciumphosphatpräzipitation auf den 15 Platten. Dazu wurde zunächst CaCl_2 mit endotoxinfreiem Wasser vermischt, so dass eine 250 mM Lösung entstand. Der HBS Puffer und CaCl_2 mussten vor Gebrauch steril filtriert werden. Für die Transfektion wurden die AAV-Plasmid-DNS und die beiden Helferplasmide in einem äquimolaren Verhältnis in einem Puffer aus 1 ml 250 mM CaCl_2 -Lösung

II. Material und Methoden

und 1 ml HBS-Puffer gelöst. Pro 15 cm Petrischale waren 7,5 µg Vektorplasmid, 7,5 µg PRC und 22,5 µg pXX6 nötig.

Nachdem die Transfektion immer für fünf Platten aus einem Ansatz erfolgte, wurde jeweils die fünffache Menge in einem 50 ml Polystyrolröhrchen gemischt und ruhte dann für 2 Minuten auf Eis, bevor die Lösung auf die Platten verteilt wurde. Die Zellen inkubierten für weitere 24 Stunden im Brutschrank. Dann folgte die Umstellung des Mediums auf DMEM mit 2 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin.

2.2.3. Virusernte

Lysispuffer

NaCl 150 mM

Tris HCl 50 mM

Eingestellt auf pH 8,5

PBS / MK Puffer

PBS (10-fach konzentriert) 50 ml

MgCl₂ 1M 0,5 ml

KCl 2,5 M 0,5 ml

Endotoxinfreies Wasser ad 500 ml

An Tag 4, 48 Stunden nach der Transfektion, sollten 80 % – 90 % der Zellen transfeziert sein, um die Ernte beginnen zu können. Die Zellen ließen sich mit einem Zellschaber lösen und in einem Röhrchen sammeln. Die Platten wurden mit DMEM nachgespült und die Röhrchen auf Eis gekühlt, bevor die Zellen dann bei 2.300 UpM für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugierten. Der Überstand wurde abgekippt. In insgesamt 7,5 ml bis 10 ml Lysis Puffer folgte die Resuspension der Zellen aller 15 Platten. Anschließend wurden die Zellsuspension für 10 Minuten in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und danach für 10 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Dieser Vorgang wiederholte sich noch zweimal, bevor die Zellen nach weiteren 10 Minuten im flüssigen Stickstoff bei minus 70°C bis zum nächsten Tag eingefroren wurden. Durch das wiederholte Einfrieren und Auftauen wurden die 293-Zellen zerstört und dadurch die Viren freigesetzt.

II. Material und Methoden

Bei 37°C tauten die Zellen am 5. Tag in 10 Minuten auf und wurden dann abzentrifugiert und in ein SS34 Röhrchen überführt. Es wurde Benzonase zugesetzt mit einer Endkonzentration von 50 U/ml und die Mischung bei 37°C für wenige Minuten inkubiert. Dann folgte eine Zentrifugation in der Sorvall Zentrifuge bei 5.850 UpM für 20 Minuten bei 4°C. Der Überstand enthielt hierbei den Virus und musste vorsichtig in ein neues SS34 Röhrchen überführt werden. Es wurde das 0,583-fache Volumen an 4°C kalter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit pH 7 zugegeben. Das Röhrchen inkubierte anschließend für 20 Minuten auf Eis, bevor es für 20 Minuten bei 8420 UpM und 4°C in der Sorvall Zentrifuge abzentrifugiert wurde. Der Überstand mit dem Virus wurde erneut in ein neues SS34 Röhrchen überführt und Ammoniumsulfatlösung mit dem 0,682-fachen Volumen des Überstands zugegeben. Wiederum inkubierte das Röhrchen für 20 Minuten auf Eis und wurde dann für 20 Minuten bei 12.620 UpM und 4°C zentrifugiert. Dadurch sammelte sich der Virus im Pellet und der Überstand konnte verworfen werden. Das Pellet wurde mit 7,5 ml PBS / MK Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt.

2.2.4. Iodixanolgradient

15 % Iodixanol Puffer

PBS (10-fach konzentriert)	5 ml
MgCl ₂ 1M	50 µl
KCl 2,5 M	50 µl
NaCl 5M	10 ml
Optiprep Iodixanol	12,5 ml
Phenolrot 0,5 %	75 µl
Endotoxinfreies Wasser	ad 50 ml

25 % Iodixanol Puffer

PBS (10-fach konzentriert)	5 ml
MgCl ₂ 1M	50 µl
KCl 2,5 M	50 µl
Optiprep Iodixanol	20 ml
Phenolrot 0,5 %	100 µl

II. Material und Methoden

Endotoxinfreies Wasser ad 50 ml

40 % Iodixanol Puffer

PBS (10-fach konzentriert) 5 ml
MgCl₂ 1M 50 µl
KCl 2,5 M 50 µl
Optiprep Iodixanol 33,3 ml
Endotoxinfreies Wasser ad 50 ml

60 % Iodixanol Puffer

MgCl₂ 1M 50 µl
KCl 2,5 M 50 µl
Optiprep Iodixanol 50 ml
Phenolrot 0,5 % 50 µl
Endotoxinfreies Wasser ad 500 ml

Die Aufreinigung des Virus erfolgte nach der 1999 veröffentlichten Methode von Zolotukhin et al. (Zolotukhin et al. 1995).

Sie begann mit dem Schichten des Iodixanolgradienten in einem Ultrazentrifugationsröhrchen. Das Tara für die anschließende Zentrifugation musste ebenso wie das Virus geschichtet werden. Von einer 100 Sterican Kanüle wurde die Spitze abgeschnitten und zunächst die Virussuspension in PBS / MK Puffer ins Röhrchen gegeben. Dann wurde mit der Kanüle knapp über dem Boden des Röhrchens 5 ml 40 % Iodixanol zugegeben und dadurch die Virussuspension unterschichtet. Genauso erfolgte die Zugabe von 6 ml des 60 % Iodixanols am Boden. Abschließend wurde die Virussuspension mit PBS / MK Puffer überschichtet. Der fertige Gradient musste in der Ultrazentrifuge von Beckman 1 Stunde bei 70 000 UpM zentrifugiert werden. Das Virus sammelte sich dabei in der 40 % Iodixanol Phase. Diese war zu erkennen, da sie im Gegensatz zu den anderen Iodixanolphasen kein Phenolrot enthielt. Mit einer Kanüle wurde über dem oberen Rand der Phase eingestochen und mit einer zweiten knapp unter dem unteren Rand, so dass die Spitze in der Phase lag. Durch die obere Kanüle konnte Luft in das Röhrchen gelangen, so dass aus der unteren Kanüle das Virus in ein vorbereitetes Gefäß abfließen konnte. Sobald die Phase erschöpft war oder sich mit den anderen Phasen vermischte, wurde die Sammlung des Virus gestoppt. Das

II. Material und Methoden

gewonnene Viruslysate wurden dann zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei minus 70°C eingefroren.

2.2.5. Bestimmung des infektiösen rAAV-2 Titers

Der infektiöse Titer gibt die Anzahl von Viruspartikeln pro ml an, die in der Lage sind, HeLa-Zellen zu infizieren unter der Annahme, dass ein Virus eine Zelle infiziert.

Der Titer ließ sich aus einer Verdünnungsreihe errechnen. Dazu wurden 10.000 HeLa-Zellen pro Loch einer 48 Loch Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit 200 µl FCS freiem DMEM bedeckt. Es folgte die Zugabe von 10µl Viruslysate, das in den folgenden Löchern 1 : 10 seriell verdünnt wurde.

Zuletzt wurde jedes Loch auf 250 µl aufgefüllt und die Platte für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Alle 30 Minuten wurde sie geschwenkt, um den Virus gleichmäßig zu verteilen.

Nach zwei Stunden wurde 1 ml Vollmedium in jedes Loch dazugegeben und die Platte für weitere 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der infizierten Zellen ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmen. Damit konnte man die Anzahl infektiöser Partikel pro ml berechnen.

Der Mittelwert aus drei Verdünnungsreihen ergab den infektiösen Titer.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Für Zentrifugationen wurde gewöhnlich die Zentrifuge Universal 32R von Hettich verwendet.

II. Material und Methoden

2.3.1.1. Passagieren von Zellen

Nachdem bei zu dichter Zellzahl das Wachstum je nach Zellart mehr oder weniger stark reduziert ist, erfolgte bei einer Konfluenz von 70 – 80 % ein Passagieren der Zellen. Soweit nicht anders erwähnt wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich fast alle Zellen gelöst hatten. Die Zugabe der gleichen Menge FCS-haltigen Mediums inaktivierte das Trypsin. Die Zellsuspension wurde dann in ein Röhrchen überführt und die Platte mit PBS nachgespült, um möglichst alle Zellen zu sammeln. Es folgte eine Zentrifugation bei 4.500 UpM für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Medium aufgenommen, die Zellen gezählt und in der gewünschten Dichte ausplattiert.

2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden für die Zählung in einem bekannte Volumen Medium gemischt. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau 10 % verdünnt und in eine Neubauer Kammer gegeben. Die Zellen aller 4 Eckquadranten wurden unter dem Mikroskop gezählt.

Das Ergebnis der Quadranten wurde anschließend durch 4 geteilt und die 1:1 Verdünnung mit Trypanblau durch die Multiplikation mit 2 ausgeglichen. Multiplizierte man das Resultat mit dem Faktor 10^4 , so ergab sich die Anzahl der Zellen pro Milliliter, aus der sich mit dem bekannten Suspensionsvolumen die absolute Zellzahl berechnen ließ.

2.3.1.3. Einfrieren von Zellen

Als Einfriermedium diente eine Mischung aus 90 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 10 % DMSO. Die Zellen wurden wie üblich trypsiniert, abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Währenddessen lag das Einfriermedium auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in dem Einfriermedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und schließlich in die Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden wieder zurück auf das Eis gelegt und bei minus 80°C eingefroren. Am darauffolgenden Tag konnten die Röhrchen in flüssigem Stickstoff versenkt werden.

Durch das beständige Kühlen sollte das Einfriermedium die Zellen möglichst wenig schädigen.

II. Material und Methoden

Aufgetaut wurden die Zellen rasch im warmen Wasserbad, mit Medium verdünnt und dann abzentrifugiert, um das DMSO und Kälberserum zu entfernen. Danach ließen sich die Zellen wie gewohnt weiterkultivieren.

2.3.2. Kultivierung von Fibroblasten und HeLa-Zellen

DMEM (supplementiert):

DMEM	
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
Glutamin	2 mM

Fibroblasten dienten als Feederzellen für die Keratinozyten. Sie wurden in supplementiertem DMEM kultiviert und alle zwei bis drei Tage mit Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % eins zu vier gesplittet.

HeLa-Zellen wurden in supplementiertem DMEM bei 37°C kultiviert und alle zwei bis drei Tage mit Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % eins zu drei gesplittet.

2.3.3. Präparation der Keratinozyten aus Hautproben

Thermolysinpuffer:

HEPES	10 mM
NaCl	142 mM
KCl	6,7 mM
NaOH	0,43 mM
CaCl ₂	1,0 mM
pH von 7,4	

Keratinozyten wurden nach Zirkumzision aus menschlicher Vorhaut gewonnen gemäß der Methode von Leigh und Watt (Leigh und Watt 1994). Sichtbares Fettgewebe wurde entfernt und die Haut durch 5 minütige Inkubation mit

II. Material und Methoden

Betaisodona weitgehend von Keimen befreit. Es folgte wiederholtes 5 minütiges Waschen mit PBS, bis keine Verfärbung durch Betaisodona mehr sichtbar war. Dann wurde die Haut mit einem Skalpell in circa 5 x 5 mm große Stücke geschnitten. Dem Thermolysinpuffer wurde vor Gebrauch Protease X aus dem Bakterium *Thermolyticus roccoco* zugefügt und die Mischung durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm gegeben. Danach wurden die Hautstücke in den Puffer gelegt und inkubierten darin über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde die dünne Epidermis mit Dumont Pinzetten vorsichtig von der Dermis abgezogen und mit dem Stratum corneum nach oben in eine Petrischale mit 20 ml PBS gelegt. Um die einzelnen Zellen zu lösen, wurden die Epidermishäutchen für 20 Minuten bei 37°C in 15 ml Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % inkubiert. Die Zugabe von 15 ml FCS-haltigem Medium stoppte die Wirkung des Trypsins. Durch vorsichtiges mehrmaliges Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette wurden die Keratinozyten weiter vereinzelt, um dann – ohne die übriggebliebenen zusammenhängenden Teile der Epidermis – in ein Röhrchen überführt zu werden. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 1.500 UpM und Raumtemperatur wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in supplementiertem KSFM durch häufiges Resuspendieren gelöst. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der Zellen in einer 15 cm Petrischale mit einer Konzentration von 20.000 Zellen pro cm².

2.3.4. Kultivierung von Keratinozyten

2.3.4.1. Kultur ohne Feeder

KSFM (supplementiert):

KSFM	
EGF	10 ng/ml
Rinderhypophysenextrakt	50 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml

Die Kultur in serumfreien Medium orientierte sich an der Methode von Boyce und Ham (Boyce und Ham 1983) und ermöglicht eine Keratinozytenkultivierung ohne Feederzellen. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Keratinozyten

II. Material und Methoden

üblicherweise nach dieser Methode in serumfreien Medium kultiviert. Dazu erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf beschichteten Kulturschalen. Nach 2-3 Tagen wurde jeweils das alte Medium abgesaugt und neues zugegeben.

Bei einer Zelldichte von etwa 80 % wurden die Keratinozyten im Normalfall mit Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % gesplittet, um keine vollständige Konfluenz der Zellen entstehen zu lassen. Eine Inkubation mit PBS für wenige Minuten vor dem Passagieren erleichterte das Lösen der Zellen.

2.3.4.2. Kultur auf Feederzellen

KGM (supplementiert):

DMEM	75 %
Hams F12	25 %
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
EGF	10 ng/ml
Ethanolamin	0,1 mM
Hydrocortison	1,4 mM
Phosphoethanolamin	0,1 mM
Choleratoxin	0,1 nM
FCS	10 %
Adenin	0,18 mM

Als Feederzellen dienten NIH 3T3 Zellen. Die Methode folgte der Veröffentlichung von Rheinwald und Green (Rheinwald und Green 1975).

Die trypsinierten Fibroblasten wurden in einer Neubauer Kammer gezählt. Nach einer Zentrifugation bei 1.500 UpM für 10 Minuten wurde der Überstand abgekippt bis auf 0,5 ml. Die Zellen wurden anschließend durch Bestrahlung mit 8.000 rad behandelt, um eine weitere Vermehrung der NIH 3T3 zu vermeiden. Nachdem die Fibroblasten durch mehrmaliges Resuspendieren wieder in Medium aufgenommen worden waren, erfolgte das Ausplattieren der Feederzellen mit einer Dichte von 5.000 Zellen pro cm². Auf diese Zellgrundlage wurden dann die Keratinozyten in der gewünschten Anzahl gegeben und in supplementiertem KGM kultiviert. Nach ein bis zwei Wochen löste sich der Feeder zum Teil von

II. Material und Methoden

der Kulturschale und es mussten die Fibroblasten durch EDTA 0,1 % weggespritzt und die verbleibenden Keratinozyten bei Bedarf gesplittet werden.

2.3.5. Dreidimensionale Keratinozytenkultur

Die Methode orientierte sich an der Veröffentlichung von Rikamura 1997 (Rikamura 1997). Das Epidermisäquivalent sollte auf der Grundlage einer humanen, deepidermialisierten Dermis (DED) gezüchtet werden.

Dazu wurden Hautpräparate in Quadrate von 1×1 cm geschnitten und in PBS 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach ließ sich die Epidermis abziehen. Die Dermisstücke wurden dann in Alufolie gewickelt. Um die Dermiszellen abzutöten folgte 10 Zyklen aus Einfrieren und Auftauen. Die Präparate lagerten dabei für 10 Minuten im flüssigen Stickstoff und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 10 Abfolgen wurde die in Alufolie gewickelte Dermis bei minus 70°C gelagert.

Für das Züchten einer dreidimensionalen Epidermis auf DEDs wurden Keratinozyten aus der 2. oder einer späteren Passage verwendet. Diese wurden wie üblich mit Trypsin/EDTA gelöst, zentrifugiert und – nach der Aufnahme in KSFM – gezählt. Währenddessen blieb Zeit, die ca. 1×1 cm großen Dermisstücke mit der Fettseite nach unten auf je eine Zellkultureinlage mit 0,45 µm Porengröße in eine 6-Loch-Platte zu legen und die Einlage einige Male mit einer Kanüle zu durchstechen, um dem Medium den Durchtritt zu erleichtern.

400.000 Keratinozyten wurden abgezählt, nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstands in 15-20 µl KSFM aufgenommen und vorsichtig auf die Mitte des Dermisstückchens pipettiert. Danach wurde die Kulturschale mit ca. 2,5 ml supplementiertem KGM aufgefüllt, so dass die Luft-Medium-Grenze knapp unterhalb der Dermisoberfläche lag, und die 6-Loch-Platte bei 37°C bzw. 33°C inkubiert. Dabei war darauf zu achten, nicht zu viel Medium in das Loch zu geben, da sonst die Gefahr bestand, die noch nicht adhärennten Keratinozyten von der Dermis herunterzuspülen.

Nach 3 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, der dann alle 2-3 Tage durchgeführt wurde. Nach frühestens 14 Tagen wurde das Hautstück entnommen und Kryo- oder Paraffinschnitte angefertigt.

II. Material und Methoden

Nachdem Gibbs et al 1997 (Gibbs et al 1997) gezeigt haben, dass die Kultivierung der dreidimensionalen Hautäquivalente bei 33°C in Medium ohne EGF bessere Ergebnisse liefert, wurden dreidimensionale Hautbildern parallel bei 37°C mit KGM mit EGF, 37°C mit KGM ohne EGF, 33°C mit KGM mit EGF und 33°C mit KGM ohne EGF kultiviert.

Nach 14 Tagen wurden Paraffinschnitte angefertigt. Dafür wurde sie in 3 % Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Das Präparat konnte dann geschnitten werden. 4 µm dicke Schnitte wurden auf Objektträger gelegt und im Automaten entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Die Präparate wurden im Hinblick auf ihre Morphologie unter dem Mikroskop verglichen.

2.3.6. Präparation von Keratinozyten aus Haarwurzeln

Die Kultivierung von Keratinozyten aus Haarwurzeln erfolgte mit kleinen Abwandlungen nach der Methode von Limat und Hunziker (Limat und Hunziker 1989). Mit einer stumpfen Pinzette wurden ca. 30 Haare möglichst nah an der Wurzel erfasst und mit einer schnellen Bewegung gezogen. Anschließend wurde jedes Haar kurz nach der Wurzel abgeschnitten und der distale Anteil verworfen. Die proximalen Stücke wurden in einer 6 cm Petrischale zweimal mit PBS gewaschen. Dann folgte die Inkubation der Haarwurzeln mit Trypsin 0,1 % / EDTA 0,02 % bei 37°C für 20 – 30 Minuten. Wenn unter dem Mikroskop eine deutliche Auflockerung der Haarwurzel sowie einzelne gelöste Zellen erkennbar waren, wurde der Vorgang durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette lösten sich die Zellen weiter vom Haarschaft. Das Medium wurde dann mit den Haaren in ein Röhrchen überführt und die Platte noch mit Medium nachgespült, um alle Zellen in dem Röhrchen zu sammeln. Von dort konnten die Zellen je nach Wunsch auf Feederlayer überführt oder auch in serumfreien Medium weiterkultiviert werden.

2.3.7. Transduktion von Keratinozyten

Es wurden Keratinozyten der ersten Passage trypsiniert, gezählt und in einer 24-Loch-Platte ausplattiert. Die Zellanzahl variierte dabei je nach Versuch.

Für einen Tag erfolgte die Kultivierung in voll supplementiertem KSFM. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über zwölf Stunden mit rAAV-2 in EGF freiem Medium inkubiert. Nach erneutem Waschen konnte wieder voll supplementiertes KSFM zugegeben werden.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen passagiert und auf eine 6-Loch-Platte überführt.

2.4. Nachweisverfahren für GFP

Das verwendete GFP emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 506 nm, wenn es durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 500 nm angeregt wird.

2.4.1. Nachweis in Keratinozytenkulturen ohne Feeder

Im Fluoreszenzmikroskop ließen sich bei gefiltertem Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm die GFP exprimierenden Zellen auf ihrer Kulturschale erkennen.

Die jeweilige Expression wurde auch im FACS (Fluorescenc Activated Cell Sorter) Gerät bestimmt. Dafür wurden die Zellen trypsiniert, abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und gut resuspendiert. Es wurden stets mindestens 10.000 Zellen bestimmt. Auch eine Messung nicht transduzierter Keratinozyten erfolgte jeweils, um ihre Eigenfluoreszenz zu bestimmen. Diese Kontrolle wurde über den ganzen Zeitraum des Versuchs parallel zu den transduzierten Keratinozyten geführt. Die Grenze zwischen GFP positiven und GFP negativen Zellen wurde so gezogen, dass 1% der nicht transduzierten Kontrolle in den GFP positiven Bereich fiel.

II. Material und Methoden

2.4.2. Nachweis in der dreidimensionalen Hautkultur

Für Kryoschnitte wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff gefroren und bei minus 25°C 12 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger gelegt. Die Schnitte konnten dann direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 525 nm betrachtet und danach mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt werden, um die Hautstrukturen besser darstellen zu können.

1. Konstruktion von pTR-UF / C-GFP

1.1. Aufbau des Plasmids

Als Backbone diente das Plasmid pTR-UF (6.253 Basenpaare) mit AAV-Sequenzen. Das Plasmid wurde mit den Enzymen *BamH* I bei Basenpaar 3007 und *Kpn* I bei Basenpaar 181 geschnitten, so dass ein Fragment von 3.427 bp entstand. Dieses enthält virale ITRs sowie eine Ampicillinresistenz.

Aus pCEP4 (10,4 kb) wurde mit dem Enzym *Sal* I durch Schnitte bei Basenpaar 8 und 1316 ein Fragment mit 1308 bp entnommen. Es beinhaltet einen Cytomegalieviruspromotor, eine multiple Klonierungsstelle und ein SV40-Polyadenylierungssignal.

In dem phrGFP promoterless (3,7 kb) Plasmid von *Stratagene*® wurde durch Schnitte mit *Hind* III bei Basenpaar 87 und *Kpn* I bei Basenpaar 840 ein 753 bp langes Fragment ausgeschnitten, das die GFP Sequenz von Basenpaar 117 – 833 enthält.

Das Fragment aus pTR-UF wurde dephosphoryliert und seine Enden geglättet, um dann mit dem Fragment aus pCEP4, dessen Enden ebenfalls geglättet worden waren, über Nacht ligiert. Die DNS wurde danach in Bakterien transformiert und einzelne Klone gepickt und aufgereinigt. Es folgte eine Restriktionsanalyse mit unterschiedlichen Enzymen und einer anschließenden Auftrennung der Banden in der Gelelektrophorese, um die Ligation zu überprüfen und die korrekt ligierten Klone zu bestimmen.

Das hiermit gewonnene neue Plasmid wurde mit *Hind* III und *Xho* I linearisiert. Nach dem erneuten Glätten der Enden und Dephosphorylieren erfolgte die Ligation mit dem phrGFP-Fragment zwischen Basenpaar 425 und 442.

Dadurch entstand ein Plasmid mit einer Länge von ca. 5.500 bp (siehe Abb. 7).

III. Ergebnisse

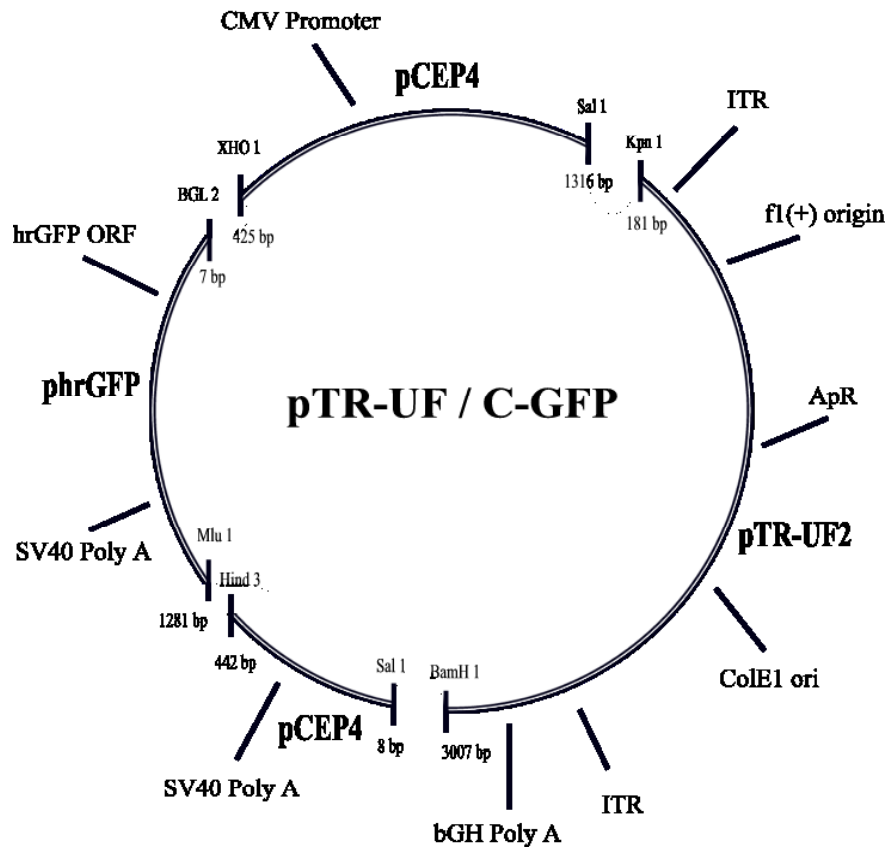


Abbildung 7: Aufbau des Plasmids pTR-UF / C-GFP aus den Plasmiden pTR-UF, pCEP4 und phrGFP mit Angabe der jeweils verwendeten Restriktionsenzymen.

Im Anschluß wurde eine Restriktionsanalyse mehrerer Klone mit *Acc 1* und *Nae 1* durchgeführt. *Acc 1* schneidet das pTR-UF-Fragment nicht, das pCep4-Fragment einmalig bei Basenpaar 9 und das phrGFP-Fragment ebenfalls einmal bei Basenpaar 102. *Nae 1* schneidet das pTR-UF-Fragment bei Basenpaar 6.100, das pCep4-Fragment bei Basenpaar 421 und das phrGFP-Fragment bei Basenpaar 393. Bei einem korrekt eingebauten GFP Plasmid müssten die Banden für *Acc1* bei 1.154 und 4.317 liegen, beziehungsweise für *Nae1* bei 3.506, 1514 und 451. Die Probeschnitte mit *Acc1* und *Nae1* zeigten bei den ausgewählten Klonen die erwarteten Banden und bewiesen dadurch die korrekte Konstruktion des Plasmids in der richtigen Reihenfolge und Ausrichtung.

III. Ergebnisse

1.2. Funktionsfähigkeit des Plasmids

Die Funktionalität des Plasmids, das heißt die Bildung von GFP in transduzierten Zellen, ließ sich durch eine Lipofectamintransfektion in Keratinozyten nachweisen. Dabei zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop wenige Tage nach Transfektion eine GFP-Expression der Zellen, die mit dem neuen Plasmid transfeziert wurden, die vergleichbar war mit der GFP-Expression eines bewährten Plasmids.

1.3. Infektiöser Titer

Der infektiöse Titer wurde auf Hela-Zellen bestimmt und wird angegeben mit der Anzahl infektiöser Viruspartikel pro μl Viruslysat. Es ergaben sich circa 1×10^8 infektiöse Partikel / μl .

2. Keratinozytenkultur und Transduzierbarkeit

2.1. Dreidimensionale Hautkultur

Auf der deepidermialisierten Dermis lies sich eine Epidermis züchten, die in HE gefärbten Präparaten denselben Aufbau zeigte wie natürliche Epidermis, einzig das Stratum corneum war etwas verdickt.

Das morphologisch beste Ergebnis lieferte dabei eine Kultur des dreidimensionalen Hautbildes bei 33°C und in KSM ohne EGF.

Durch immunhistochemische Färbungen ließ sich die Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten in den verschiedenen Schichten besser bestimmen. Involukrin ist ein Marker, der differenzierte Keratinozyten anfärbt und in der Epidermis normalerweise im Stratum spinosum exprimiert wird. In der Hautkultur zeigte sich der Marker auf suprabasale Schichten beschränkt. Der Proliferationsmarker Ki 67 war dagegen vor allem in basalen Schichten

III. Ergebnisse

nachweisbar. Damit ergibt sich ein Muster, das auch der normalen Haut *in vivo* entspricht.

2.2. Etablierung der Keratinozytenkultur aus Haarwurzeln

Keratinozyten ließen sich aus Haarwurzeln expandieren, wenn mindestens 15 Haarwurzeln zur Verfügung standen.

Morphologisch unterschieden sie sich nicht von den Keratinozyten aus Vorhaut (Abb. 8). Im Proliferationsverhalten war kein Unterschied zwischen den Keratinozyten aus Vorhaut und denen aus den Haarwurzeln zu erkennen.

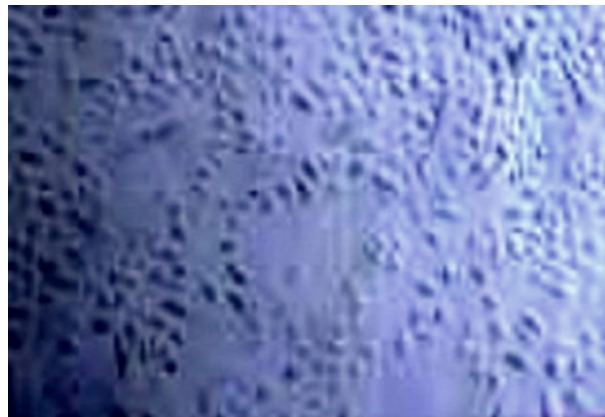


Abbildung 8: Keratinozyten aus Haarwurzeln in Passage 5. Die Keratinozyten lassen morphologisch keine Unterschiede zu Keratinozyten aus Vorhaut erkennen.

2.3. Transduktion von HeLa-Zellen und Keratinozyten

Um die Transduzierbarkeit von Keratinozyten durch rAAV-2 im Vergleich zu HeLa-Zellen zu testen, wurden je 20.000 Zellen in ein Loch einer 24-Loch-Platte ausplattiert. Nach einem Tag erfolgte eine zwölfstündige Inkubation mit dem rAAV-2 / C-GFP.

7 Tage nach Transduktion wurde die GFP-Expression sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie verglichen.

III. Ergebnisse

Dabei zeigten HeLa-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutlich höhere Expression als die Keratinozyten (Abb. 9).

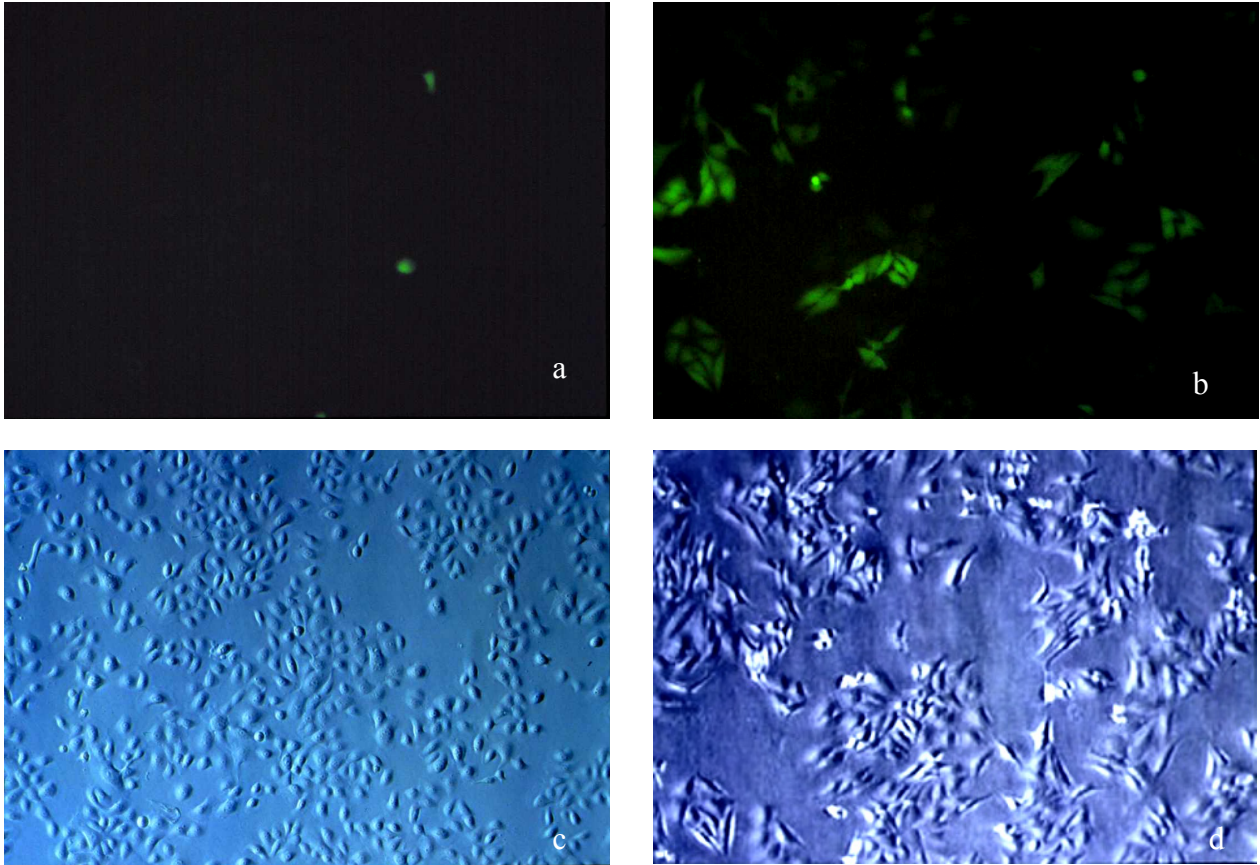


Abbildung 9: Vergleich von HeLa-Zellen (b, d) und Keratinozyten (a, c) in Passage 1 an Tag 7 nach Transduktion im Fluoreszenzmikroskop unter 100facher Vergrößerung. Es zeigen sich deutlich mehr GFP-exprimierende Zellen bei den HeLa-Zellen als bei den Keratinozyten.

III. Ergebnisse

Diese Ergebnis bestätigte sich in der Durchflusszytometrie am selben Tag: Für drei Wells transduzierter Keratinozyten ergeben sich im Mittel 3,31 % GFP positiver Zellen mit einer Standardabweichung von 1,89 % bei 10.000 ausgezählten Zellen. Für die parallel unter gleichen Bedingungen transduzierten HeLa-Zellen ergab sich ein Mittelwert von 79,54 % und eine Standardabweichung von 9,31 % (Abb. 10). Daraus resultiert eine 24fach höhere Transduktionsrate bei HeLa-Zellen als bei Keratinozyten.

Vergleich der Transduzierbarkeit von HeLa-Zellen und Keratinozyten

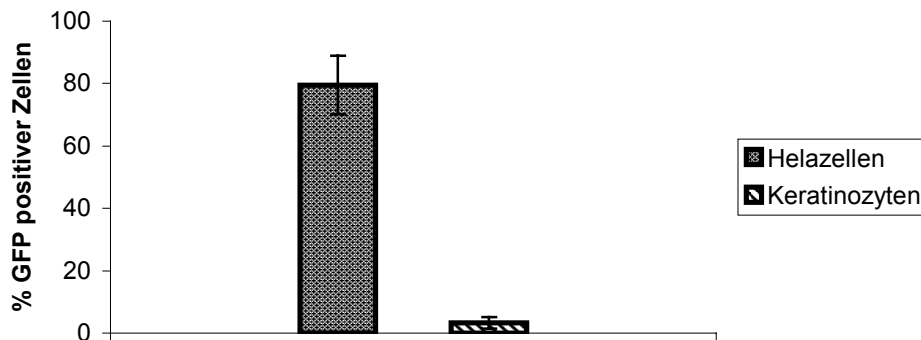


Abbildung 10: Es wurden HeLa-Zellen und Keratinozyten in je drei Ansätzen parallel mit AAV transduziert. An Tag 7 nach Transduktion wurden jeweils die Anzahl GFP positiver Zellen bestimmt. Es zeigten sich bei den Keratinozyten im Durchschnitt 3,31% GFP positiv, bei den HeLa-Zellen 79,54%

2.4. Transduktion von Keratinozyten aus Vorhaut und Haarwurzeln

Die Transduktion von Vorhautkeratinozyten und Keratinozyten aus Haarzellen der gleichen Passage zeigte keine Unterschiede in der Transduktionseffizienz (Abb. 11). Sowohl die GFP-Expression innerhalb der ersten Passage nach Transduktion als auch die Expression nach bis zu 3 Passagen war unter dem Fluoreszenzmikroskop vergleichbar.

III. Ergebnisse

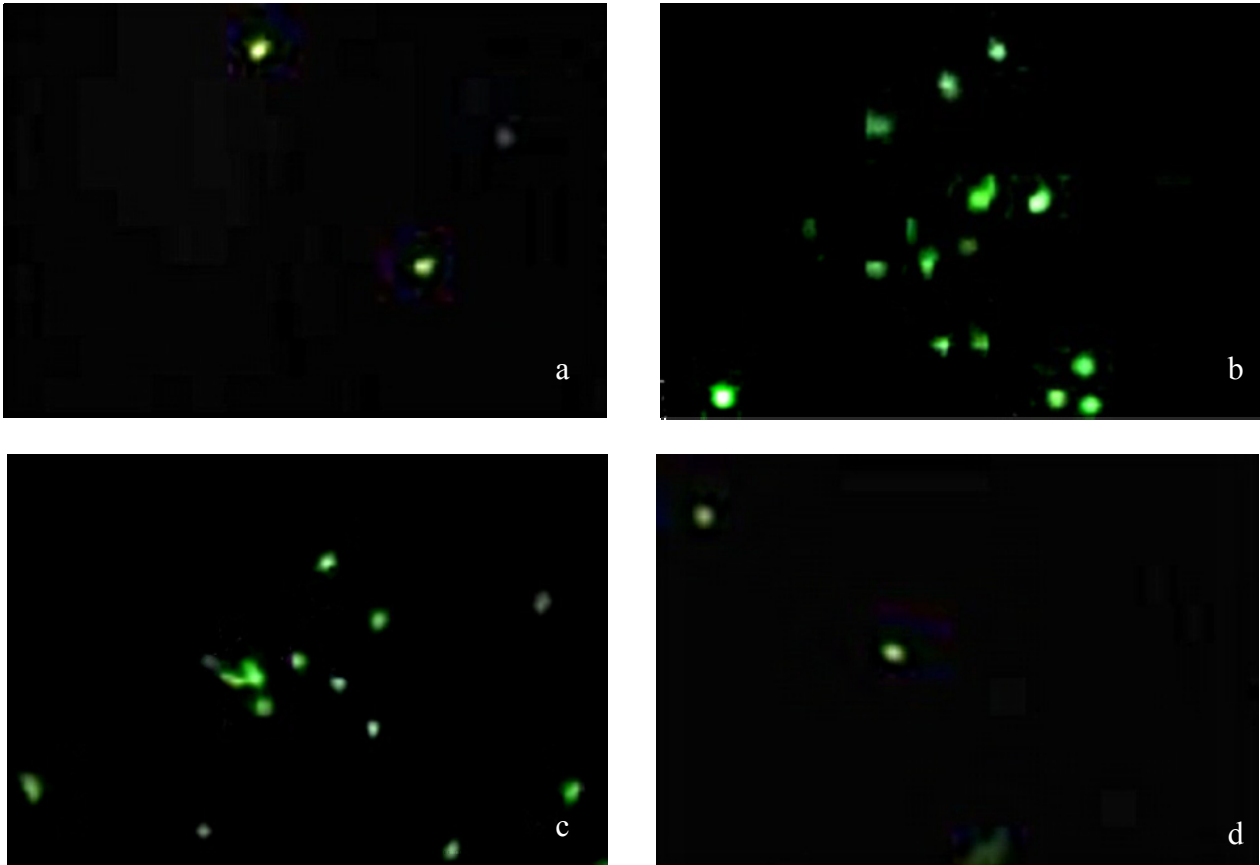


Abbildung 11: Vergleich der Expression von Keratinozyten aus Haarzellen und aus Vorhaut in Passage 1 nach Transduktion in 100facher Vergrößerung. Abbildung a und c zeigen den am besten exprimierenden Bereich von zwei Versuchsansätzen transduzierter Haarzellen, Abbildung b und d von zwei Versuchsansätzen transduzierter Keratinozyten aus Vorhaut der entsprechenden Patienten. Trotz leichter Schwankungen in der Expression ließen sich im Vergleich dreier Patienten keine relevanten Expressionsunterschiede feststellen.

3. Versuche zur Transduktionssteigerung

3.1. UVB-Bestrahlung

Der Versuchsaufbau orientierte sich an der Veröffentlichung von Alexander et al. 1994.

III. Ergebnisse

Es wurden Keratinozyten der ersten Passage trypsiniert und in einer 24-Loch-Platte ausplattiert mit einer Dichte von 4.000 Zellen pro cm^2 . Für einen Tag folgte die Kultivierung in voll supplementiertem KSFM.

Es wurden zunächst Versuche ohne die Zugabe von Virus durchgeführt, um die für Keratinozyten in Kultur tolerierbare Strahlendosis herauszufinden. Dabei fanden Energiedosen von 2 J/m^2 bis 20 J/m^2 Anwendung. Nach der ersten Passage wurden die Zellen mit einer nicht der Strahlung ausgesetzten Kontrolle verglichen.

Nach einer UVB-Bestrahlung von mehr als 10 J/m^2 starben fast alle Keratinozyten noch vor dem ersten Passagieren. Erst bei Konzentrationen von $4\text{--}5 \text{ J/m}^2$ war eine Weiterführung und Expansion der Zellkultur möglich. Diese Dosen wurden daher auch für die Transduktionsversuche genutzt.

Die Transduktion erfolgte direkt im Anschluss an die UVB-Bestrahlung mit einer Energie von 5 J/m^2 für 12 Stunden mit $30\mu\text{l}$ rAAV-2 in EGF freiem Medium.

Bei der Kontrolle der GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich weder in Passage 0 noch in einer späteren Passage eine Expressionssteigerung (Abb. 12).

Es war daher im Rahmen der für primäre Keratinozyten tolerierbaren Energiedosen keine relevante Steigerung der Transduktionseffizienz zu beobachten.

III. Ergebnisse

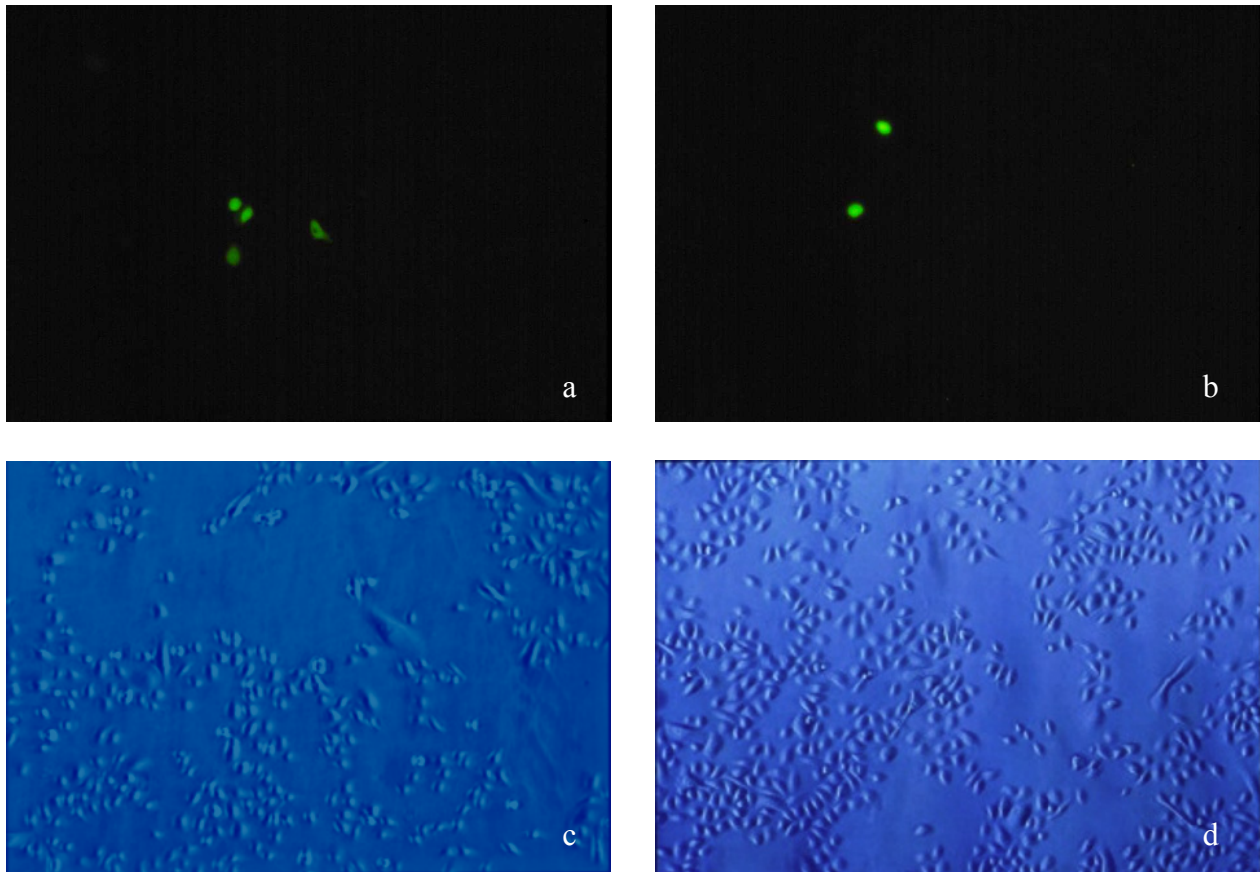


Abbildung 12: Vergleich der mit 5 J/m^2 UVB behandelten Zellen und der Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Abbildung a und c zeigen die mit UVB behandelten Zellen in Passage 1 an Tag 6 nach Transduktion in 100facher Vergrößerung. Abbildung b und d zeigen die Kontrollen ebenfalls in Passage 1 und an Tag 6 nach Transduktion. Es zeigt sich keine relevante Expressionssteigerung.

3.2. MG 132

MG 132 wurde in DMSO mit einer Konzentration von 4mM aufgelöst.

Der Versuchsaufbau orientierte sich an der Veröffentlichung von Duan et al. 2000 (Duan et al. 2000).

Auch mit MG 132 wurden Vorversuche ohne Virus durchgeführt. Es wurden Keratinozyten der ersten Passage trypsiniert und in einer 24-Loch-Platte ausplattiert mit einer Dichte von 4.000 Zellen pro cm^2 . Für einen Tag erfolgte die Kultivierung in voll supplementiertem KSFM und im folgenden eine

III. Ergebnisse

zwölfstündige Inkubation mit MG 132 in Konzentrationen von 100 nM bis zu 4 μ M in EGF freiem Medium. Nach gründlichem Waschen wurde wieder Medium mit EGF zugegeben.

Nach einer Woche erfolgte eine Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop. Dabei wurde die Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle betrachtet, sowie die Morphologie der Keratinozyten. Als Kontrolle wurden jeweils parallel Keratinozyten mitgeführt, die 12 Stunden in reinem serumfreiem Medium inkubiert wurden. Um den Effekt des Lösungsmittels DMSO abzuschätzen, wurden als zweite Kontrolle Keratinozyten kultiviert, die 12 Stunden mit der höchsten bei MG 132 verwendeten DMSO-Konzentration inkubiert wurden.

Konzentrationen über 2 μ M MG 132 führten zum Zelltod noch vor dem ersten Passagieren. Morphologisch fiel mit steigenden Mengen von MG 132 eine Abb. 13 a, b). Gerade bei höheren Konzentrationen adhärten viele Zellen nach dem ersten Passagieren nicht mehr oder stellten ihre Proliferation ein. Nach zwei Passagen waren die mit MG 132 behandelten Keratinozyten im morphologischen Erscheinungsbild und Wachstumsverhalten wieder mit den Kontrollen vergleichbar (Abb. 13 c, d).

III. Ergebnisse

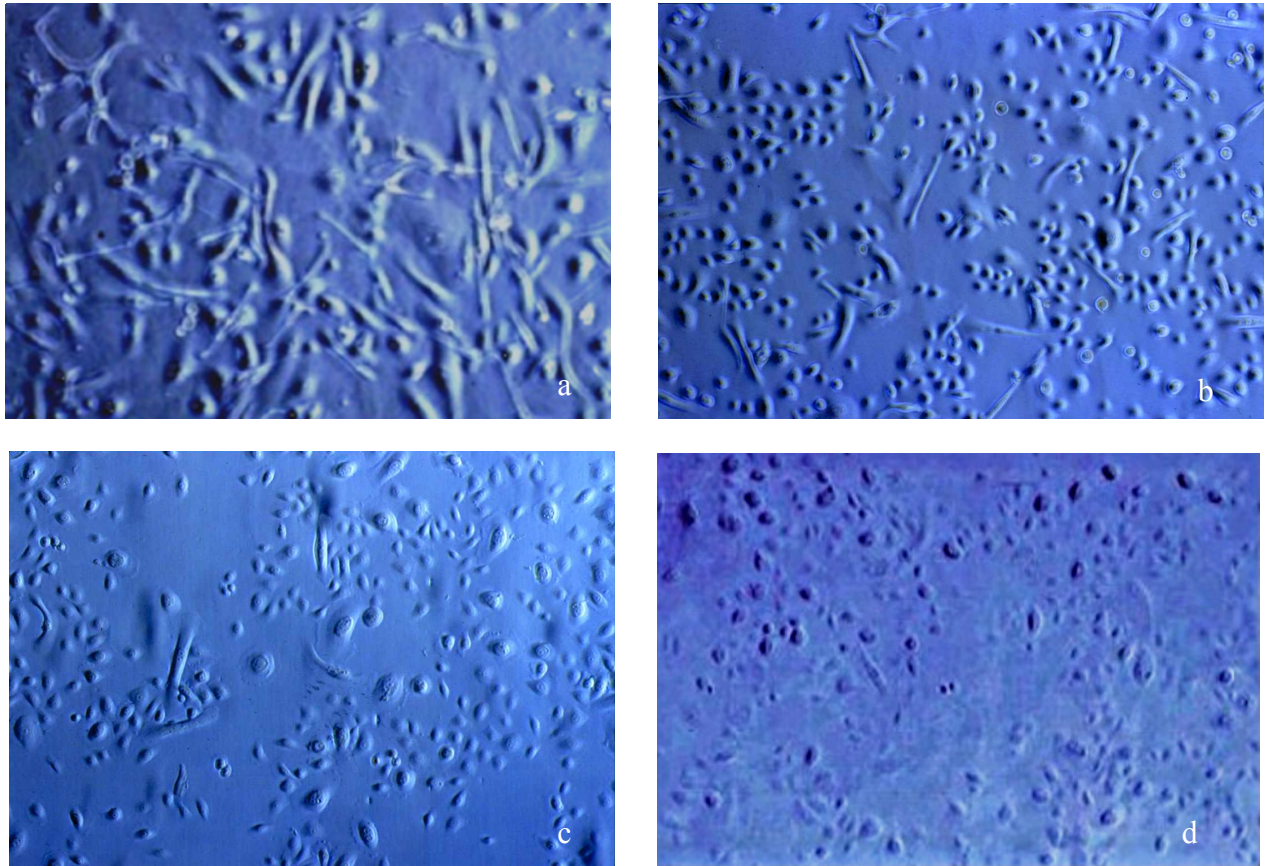


Abbildung 13: Vergleich der Morphologie der mit MG 132 behandelten Zellen und der DMSO Kontrolle im Mikroskop. Abbildung a und c zeigen die mit MG 132 behandelten Zellen in Passage 1 beziehungsweise Passage 3, Abbildung b und d die DMSO Kontrollen der gleichen Passagen. Es zeigt sich vor allem in Passage 1 eine spindelförmige Veränderung der Keratinozytenmorphologie, die sich bis Passage 3 fast vollständig verliert.

Des weiteren wurde bei MG 132 ein Zellviabilitätstest ohne Virus durchgeführt mit MG 132 Konzentrationen von 200, 400, 600 und 1000 nM. Für jede MG 132 Konzentration und für jede Kontrolle waren 4 Ansätze ausplattiert.

Die Zellen wurden in Passage 0 an Tag 1 nach Transduktion sowie in Passage 1 an Tag 6 nach Transduktion in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dabei erfolgten für jeden Ansatz 2 Zählungen.

III. Ergebnisse

An Tag 2 (Abb. 14) ließ sich – dosisabhängig - nur ein geringerer zellschädigender Effekt von MG 132 erkennen. Die etwas geringe Zellzahl bei der Kontrolle entstand, da sich die relativ dichten Kontrollzellen bei der gleichen Inkubationszeit mit Trypsin schlechter lösten und zum Teil in dem alten Well zurückblieben. Bei einer MG 132 Konzentration von 200 nM trat keine Reduktion der Zellzahl auf: es ergaben sich rechnerisch 103% im Vergleich zur Zellzahl der DMSO-Kontrolle, die hier gleich 100% gesetzt wurde. Bei 400 nM ließen sich noch 75% an lebenden Zellen zählen. Bei 600 nM trat eine Reduktion auf 65% und bei 1000 nM überlebten 36%.

Der dosisabhängige zellschädigende Effekt trat sechs Tage nach Inkubation mit MG 132 in Passage eins deutlicher auf (Abb. 15). Es lebten bei einer Konzentration von 200 nM noch 17% an Zellen bezogen auf die DMSO Kontrolle, die wiederum gleich 100% gesetzt wurde, bei 400 nM noch 9,4%, bei 600 nM noch 5,4% und bei 1000 nM 2,5%.

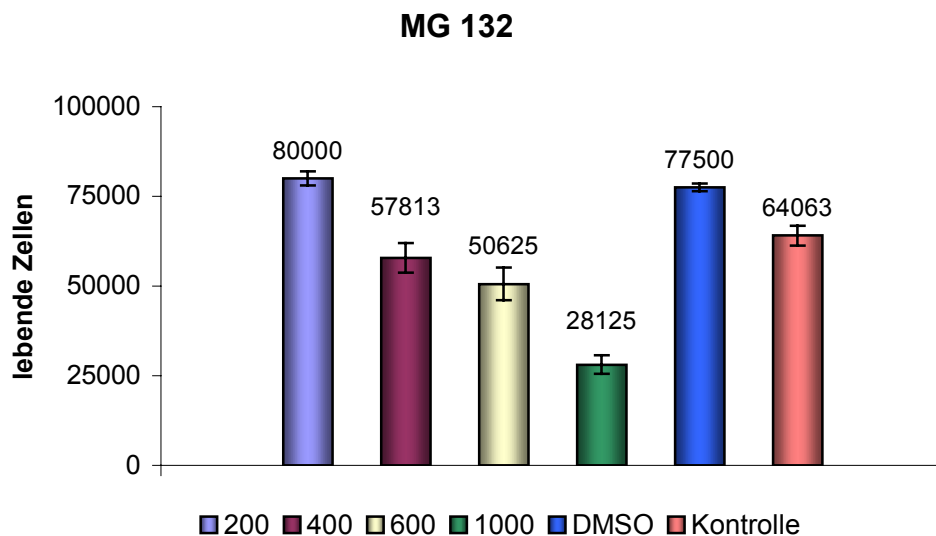


Abbildung 14: Vitalitätsbestimmung nach Mg 132: Zählung an Tag 1 nach Inkubation der Keratinozyten mit MG 132. Es wurden unter dem Mikroskop für jede Konzentration 4 unterschiedliche Wells bestimmt. Daraus ließen sich Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen. Es zeigt sich dosisabhängig ein Rückgang der Zellzahl.

III. Ergebnisse

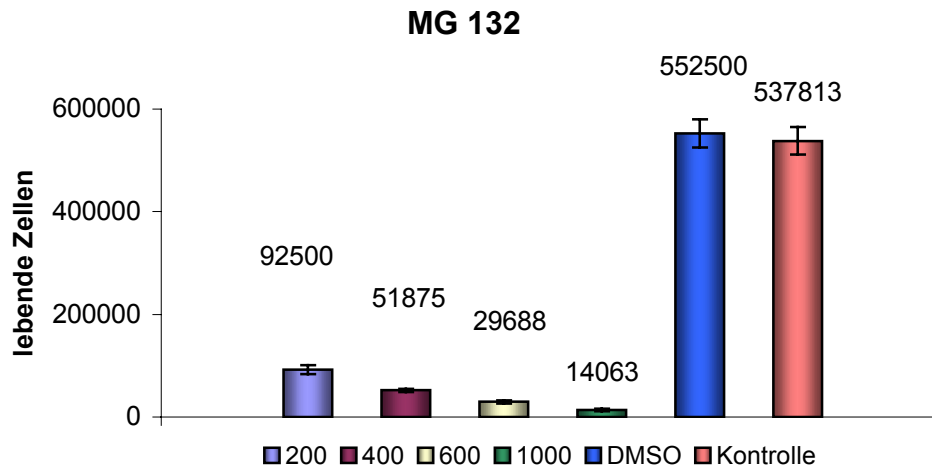


Abbildung 15: Vitalitätsbestimmung nach Mg 132: Zählung an Tag 6 nach Inkubation der Keratinozyten mit MG 132. Erst in der zweiten Passage zeigt sich deutlich die Verminderung der Zellzahl nach Inkubation mit MG 132.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Versuche wurde beschlossen, die Transduktion unter Zugabe von MG 132 in Konzentrationen von 200 nM, 400 nM und 600 nM durchzuführen, da dabei mit 92 500 Zellen, beziehungsweise 51 875 Zellen oder 29 688 Zellen ausreichend Zellen für eine effiziente Expansion der Kulturen zur Verfügung standen - auch auf Grund der Beobachtung, dass in den weiteren Passagen kein vermindertes Wachstum der mit MG 132 behandelten Kulturen mehr feststellbar war.

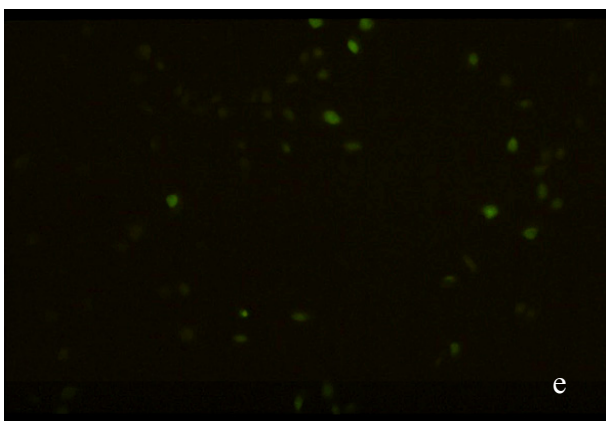
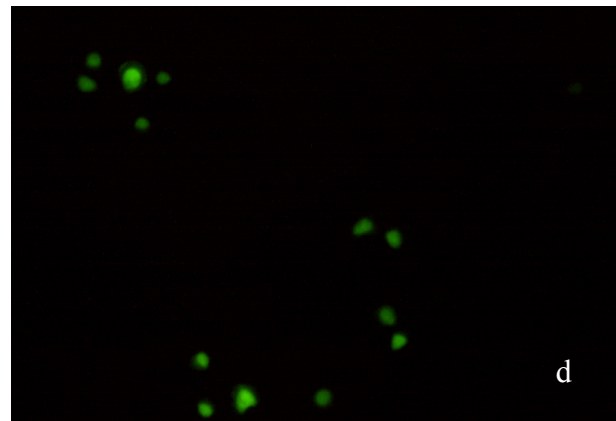
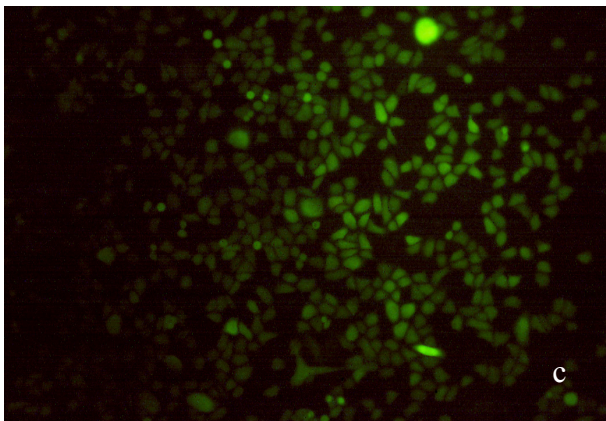
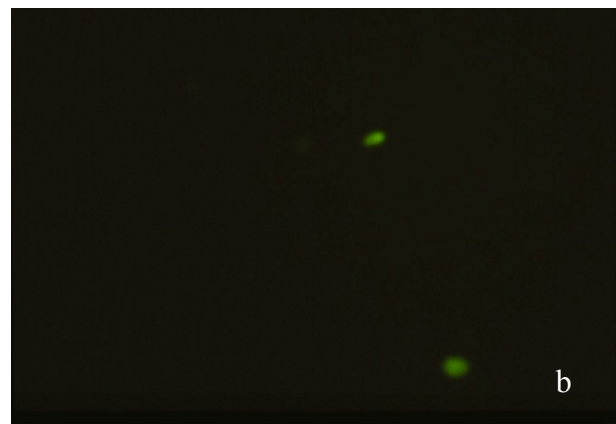
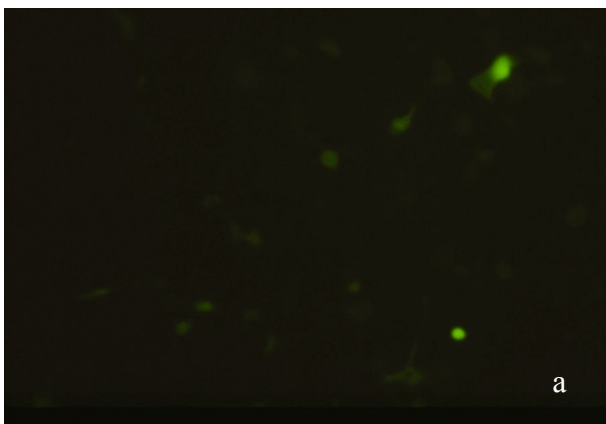
Für die Transduktionsversuche wurden ebenfalls Keratinozyten der ersten Passage wie beschrieben ausplattiert und für zwölf Stunden mit 30µl AAV und MG 132 in Konzentrationen von 200 nM – 600 nM in EGF freiem Medium inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde wieder Medium mit EGF zugegeben.

Durch die Behandlung mit MG 132 während der Transfektion mit rAAV-2 war innerhalb der ersten Wochen nach Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Steigerung der Anzahl fluoreszierender Zellen - im Vergleich zur Kontrolle - zu beobachten (Abb. 16 c, d). Dieses Ergebnis ließ sich in mehreren Versuchen reproduzieren. Dabei waren die transduzierten Zellen ungleichmäßig verteilt, zum Teil einzeln oder in kleinen Gruppen, oft auch in dichteren Ansammlungen von mehr als 10 Zellen. Innerhalb der angewandten

III. Ergebnisse

Konzentrationen von 200 nM, 400 nM und 600 nM ließ sich keine klare konzentrationsabhängige Steigerung der Wirkung erkennen.

Nach jeder Passage war zu beobachten, dass viele vor allem stark fluoreszierende Keratinozyten nicht mehr adhärten und sich somit nicht weiter vermehrten. Man sah von Passage 1 auf Passage 3 nach Transduktion einen sehr deutlichen Rückgang in der Expression (Abb. 16 c, e). Nach 30 Tagen war unter dem Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zur DMSO Kontrolle keine signifikante Expressionssteigerung mehr erkennbar, wenn auch noch vereinzelt fluoreszierende Zellen gehäuft erkennbar waren (Abb. 16 e, f).



III. Ergebnisse

Abbildung 16: Vergleich von mit MG 132 behandelten Zellen und DMSO Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 100facher Vergrößerung. A zeigt die mit MG 132 behandelte Zellen in Passage 0 an Tag 2 nach Transduktion, c in Passage 1 an Tag 14 und Abbildung e in Passage 3 an Tag 28. Abbildung b zeigt die entsprechende DMSO Kontrolle ebenfalls in Passage 0 und an Tag 2 nach Transduktion, d Passage 1 an Tag 6 und f Passage 3 an Tag 17. (Durch den Wachstumsstopp der mit MG 132 behandelten Zellen ergeben sich die unterschiedlichen Passagezeiten.) Innerhalb der ersten Passage zeigte sich eine deutliche Expressionszunahme, die sich bis zur dritten Passage wieder verlor.

Die Expression wurde auch im FACS gemessen. Dabei zeigten sich in einem Versuch in der ersten Passage an Tag 7 nach Transduktion bei einer MG 132 Konzentration von 200 nM 21,03% GFP positiver Zellen, bei 400 nM 36,65% und bei 600 nM 30,84%. Es wurden jeweils 10.000 Keratinozyten bestimmt. Die Kontrolle hatte 1,46% GFP positiver Zellen. Es ließ sich also eine temporäre 14 bis 25fache Steigerung GFP exprimierender Zellen erzielen.

3.3. Tyrphostin 1

Tyrphostin 1 wurde in DMSO aufgelöst mit einer Endkonzentration von 50 mM. Der Versuchsaufbau orientierte sich an der Veröffentlichung von Douar (Douar et al. 2001).

Für den Versuch wurden Keratinozyten der ersten Passage trypsiniert und in einer 24-Loch-Platte ausplattiert mit einer Dichte von 2.000 Zellen pro cm². Nachdem die Zellen für zwei Tage in voll supplementiertem KSFM gewachsen waren, erfolgte für weitere zwei Tage eine Umstellung auf EGF freies Medium. Danach wurden die Zellen in ebenfalls EGF freiem Medium für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tyrphostin 1 von 100 µM bis 1000 µM inkubiert. Parallel wurde ein Loch als Kontrolle mit DMSO inkubiert und ein Loch nur mit EGF freiem Medium weitergeführt. Dadurch ließ sich eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel DMSO kontrollieren. Die DMSO

III. Ergebnisse

Konzentration in der Kontrolle entsprach der höchsten bei Tyrphostin 1 verwendeten DMSO Konzentration.

Um auszutesten, bis zu welchen Konzentrationen Tyrphostin 1 bei Keratinozyten anwendbar ist, ohne die Zellen zu stark zu schädigen, erfolgte ein Zellviabilitätstest. Dabei wurden Konzentrationen von 200, 400, 600 und 1000 μM ausgetestet. Der Versuch wurde für jede Konzentration von Tyrphostin 1 sowie für jede Kontrolle 4-fach angesetzt und die zwölfstündige Inkubation mit dem Virus durch eine Inkubation allein mit EGF freiem Medium ersetzt.

Die Zählung der Keratinozyten in der Neubauer-Kammer erfolgte in Passage 0 an Tag 1 nach Transduktion sowie in Passage 1 an Tag 6 nach Transduktion. Dabei erfolgten für jeden Ansatz 2 Zählungen.

An Tag 1 nach Transduktion bei einer Tyrphostin 1 Konzentration von 200 μM überlebten 24% der Zellen, bei 300 μM 17%, bei 400 μM 11% und bei 1000 μM 4,6%. In der nächsten Passage an Tag 6 trat nur mehr ein leichter Rückgang der Zellzahl auf: Bei 200 μM lebten noch 16% der DMSO Kontrolle, bei 300 μM 8,4%, bei 400 μM 5,0% und bei 1000 μM 2,6% (Abb. 17 und 18). Im weiteren vermehrten sich die Keratinozyten normal.

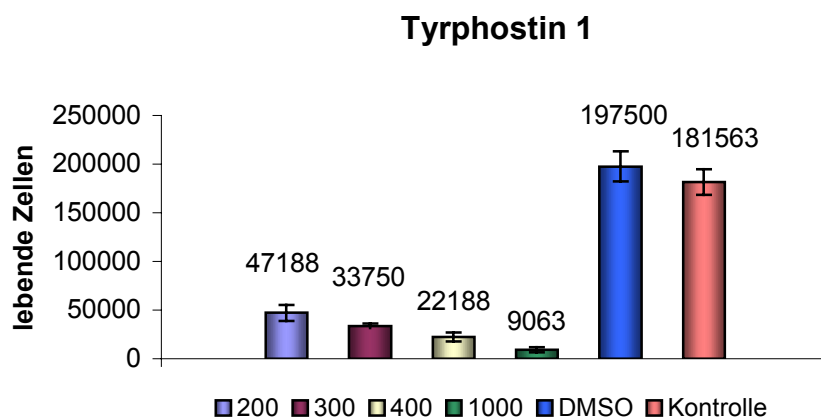


Abbildung 17: Vitalitätsbestimmung nach Inkubation mit T1: Zählung an Tag 1
Es wurden unter dem Mikroskop für jede Konzentration 4 unterschiedliche Wells bestimmt. Daraus ließen sich Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Zellen je nach Konzentration von T1.

III. Ergebnisse

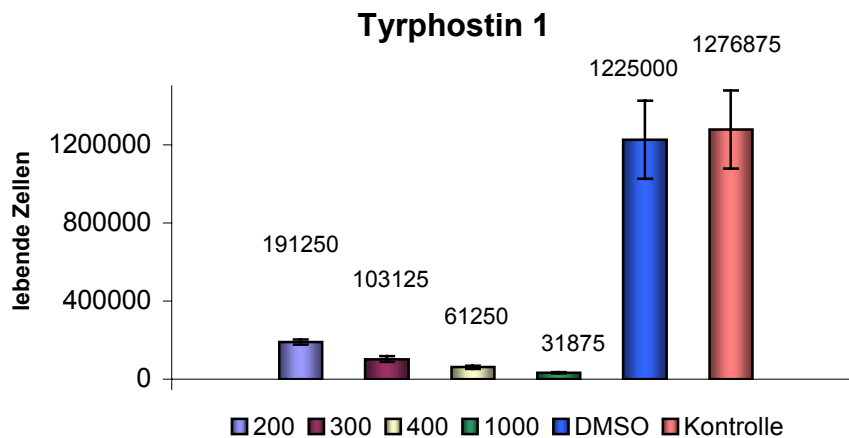


Abbildung 18: Vitalitätsbestimmung nach Inkubation mit T1: Zählung an Tag 6
Es wurden unter dem Mikroskop für jede Konzentration 4 unterschiedliche Wells bestimmt. Daraus ließen sich Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen. Anders als bei MG 132 kam es zu keiner weiteren Zunahme der Zelltoxizität nach dem ersten Passagieren.

Bei den höheren Konzentrationen wirkten einige Zellen unter dem Mikroskop granuliert und zeigten keine Teilungen mehr. Die Zellen erholten sich zum Teil nach dem ersten Splitt und vermehrten sich weiter.

Insgesamt wurde deutlich, dass DMSO in den hier relevanten Konzentrationen keinen schädigenden Einfluss auf die Keratinozyten aufweist. Die Exposition mit Tyrphostin 1 zeigte vor allem in der ersten Passage einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellzahl.

Für die folgenden Transduktionsversuche wurde mit Konzentrationen von 300 μM und 400 μM gearbeitet, da Zellzahlen von 103.125 beziehungsweise 61.250 Keratinozyten für eine effiziente Expansion ausreichend waren.

Für den Transduktionsversuch folgte auf die zweistündige Inkubation mit Tyrphostin 1 in Konzentrationen von 300 μM und 400 μM eine zwölfstündige Inkubation der Zellen mit 30 μl AAV in EGF freiem Medium. Nach einem erneuten Waschen mit PBS wurde wieder voll supplementiertes Medium zugegeben.

Innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Inkubation mit Tyrphostin 1 ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche

III. Ergebnisse

Steigerung der Zahl transduzierter Zellen erkennen. Diese war in Passage 0 nach Transduktion am deutlichsten (Abb. 19). Dabei waren die exprimierenden Zellen gleichmäßig im Well verteilt. Eine vermehrte Expression war regelmäßig zu beobachten, aber schwankend in der Quantität. Es fiel auch kein vermehrtes Sterben der fluoreszierenden Zellen auf. Dennoch verlor sich die Expression im weiteren Verlauf beständig, bis nach 30 Tagen kein relevanter Unterschied mehr zur Kontrolle sichtbar war (Abb. 20).

Innerhalb der angewandten Konzentrationen von 300 μM und 400 μM ließ sich keine konzentrationsabhängige Expressionssteigerung erkennen.

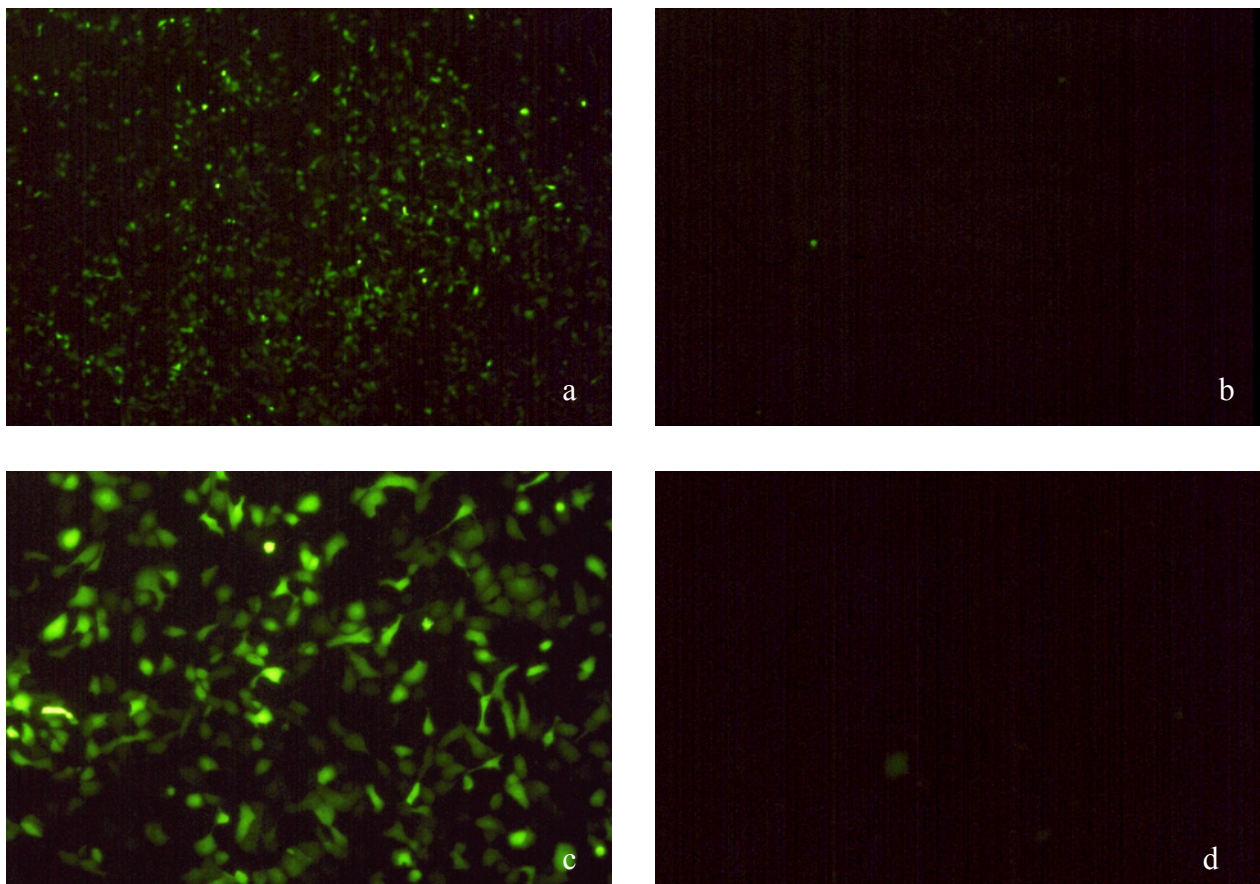


Abbildung 19: Vergleich der mit 400 μM Tyrphostin 1 behandelten Zellen und der DMSO Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dieser Versuch wurde mit dem pAAV/psub/Cep/GFP Virus durchgeführt. A und c zeigen die mit Tyrphostin 1 behandelten Zellen in Passage 0 an Tag 1 nach Transduktion in 40facher beziehungsweise 100facher Vergrößerung. B und d zeigen die DMSO Kontrolle ebenfalls in Passage 0 und an Tag 1 nach Transduktion. Dabei fällt eine Steigerung der Expression in Passage 0 auf.

III. Ergebnisse

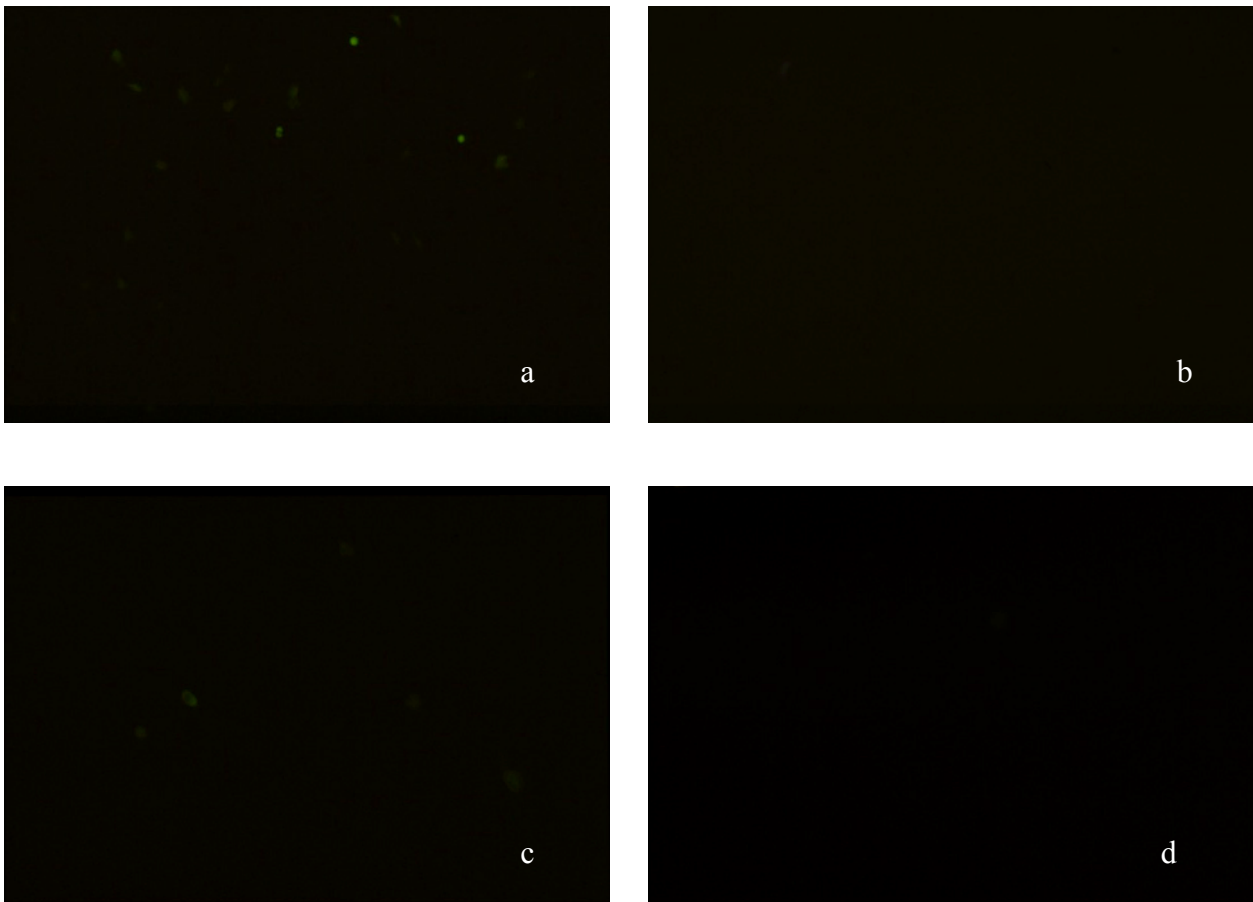


Abbildung 20: Vergleich der mit 400 µM Tyrphostin 1 behandelten Zellen und der DMSO Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dieser Versuch wurde mit dem pAAV/psub/Cep/GFP Virus durchgeführt. A zeigt die mit Tyrphostin 1 behandelten Zellen in Passage 3 an Tag 12 nach Transduktion in 40facher Vergrößerung, c in Passage 5 an Tag 29 nach Transduktion. B und d zeigen die DMSO Kontrolle ebenfalls in Passage 3 und 5 und an Tag 12 und 29 nach Transduktion. Die Expressionssteigerung, die in der ersten Passage zu beobachten war, hatte sich wieder vollständig verloren.

3.4. AG 1478

AG 1478 wurde in DMSO aufgelöst mit einer Endkonzentration von 10 mM. Ausplattieren der Zellen und Versuchsablauf erfolgten genau wie oben für Tyrphostin 1 geschildert, nur dass Tyrphostin 1 durch AG 1478 ersetzt wurde. Für

III. Ergebnisse

den ebenfalls durchgeführten Zellviabilitätstest fanden Konzentrationen von 50, 75, 100 und 150 μM Anwendung wiederum mit je 4 Ansätzen.

Insgesamt ließ sich keine schädigende Wirkung von DMSO erkennen.

Es war in den ersten Passagen ein Rückgang der Zellzahl mit steigender Konzentration von AG 1478 zu beobachten: an Tag 1 betrug die Zellzahl 81% der Kontrolle bei 50 μM , 50% bei 75 μM , 33% bei 100 μM und 15% bei 150 μM . An Tag 6 eine Passage später war die Zellzahl bei einer Konzentration von 50 μM auf 27% der DMSO Kontrolle geschrumpft, bei 75 μM auf 11%, bei 100 μM auf 7,5% und bei 150 μM auf 0,49% (Abb. 21 und 22). Die weitere Vermehrung der behandelten Keratinozyten in den folgenden Passagen verlief jedoch unauffällig verglichen mit den Kontrollen.

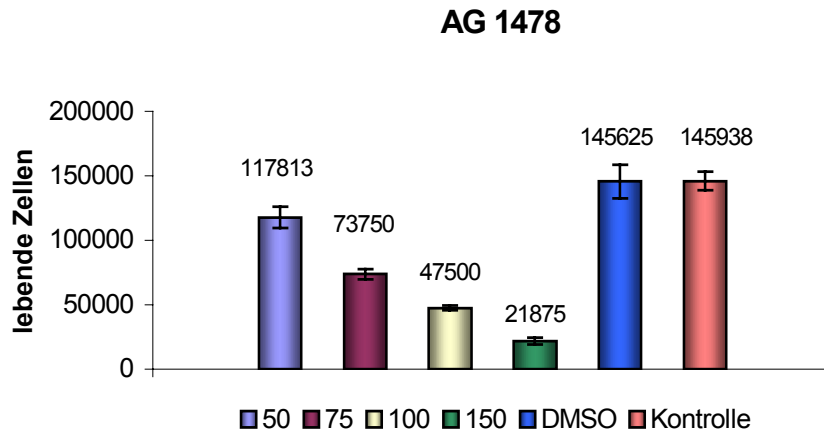


Abbildung 21: Vitalitätsbestimmung nach Inkubation mit AG 1478: Zählung an Tag 1. Es wurden unter dem Mikroskop für jede Konzentration 4 unterschiedliche Wells bestimmt. Daraus ließen sich Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen. Es zeigt sich ein leichter konzentrationsabhängiger Rückgang der Zellzahl nach Inkubation mit AG1478.

III. Ergebnisse

AG 1478

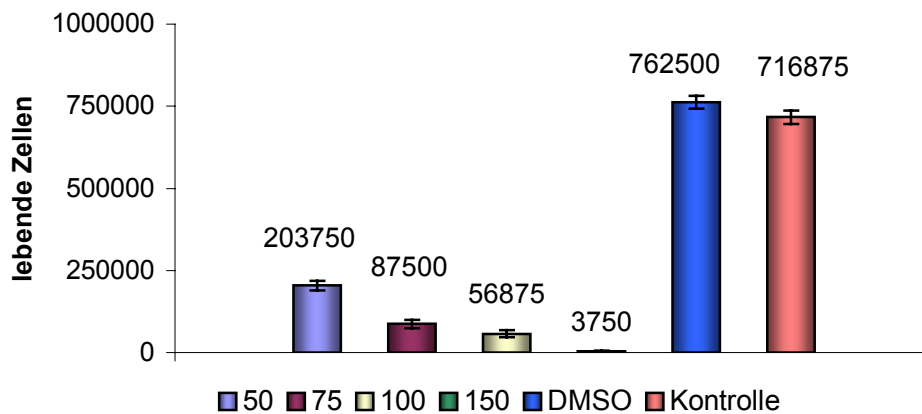


Abbildung 22: Vitalitätsbestimmung nach Inkubation mit AG 1478: Zählung an Tag 6 Es wurden unter dem Mikroskop für jede Konzentration 4 unterschiedliche Wells bestimmt. Daraus ließen sich Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen. Es bleibt ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Zellzahl zu beobachten.

In den Toxizitätsversuchen zeigten sich Konzentrationen von 50 μM bis 100 μM für die Keratinozyten tolerierbar, da mit Zellzahlen von 203.750, beziehungsweise 87.500 oder 56.857 eine erfolgreiche Expansion der Kulturen möglich war, vor allem da in den folgenden Passagen das Wachstum der behandelten Keratinozyten nicht eingeschränkt war.

Bei Behandlung von Keratinozyten mit AG 1478 vor der Transfektion mit AAV sah man unter dem Fluoreszenzmikroskop zunächst nur eine geringe Steigerung der GFP-Expression im Vergleich zur Kontrolle. In den folgenden 4-5 Passagen vermehrte sich die Zahl der fluoreszierenden Zellen bei den mit AG 1478 behandelten Keratinozyten, während die Expression der mit DMSO behandelten Kontrolle sich langsam reduzierte (Abb. 23 und 24). Dieses Ergebnis ließ sich in mehreren Versuchen reproduzieren.

III. Ergebnisse

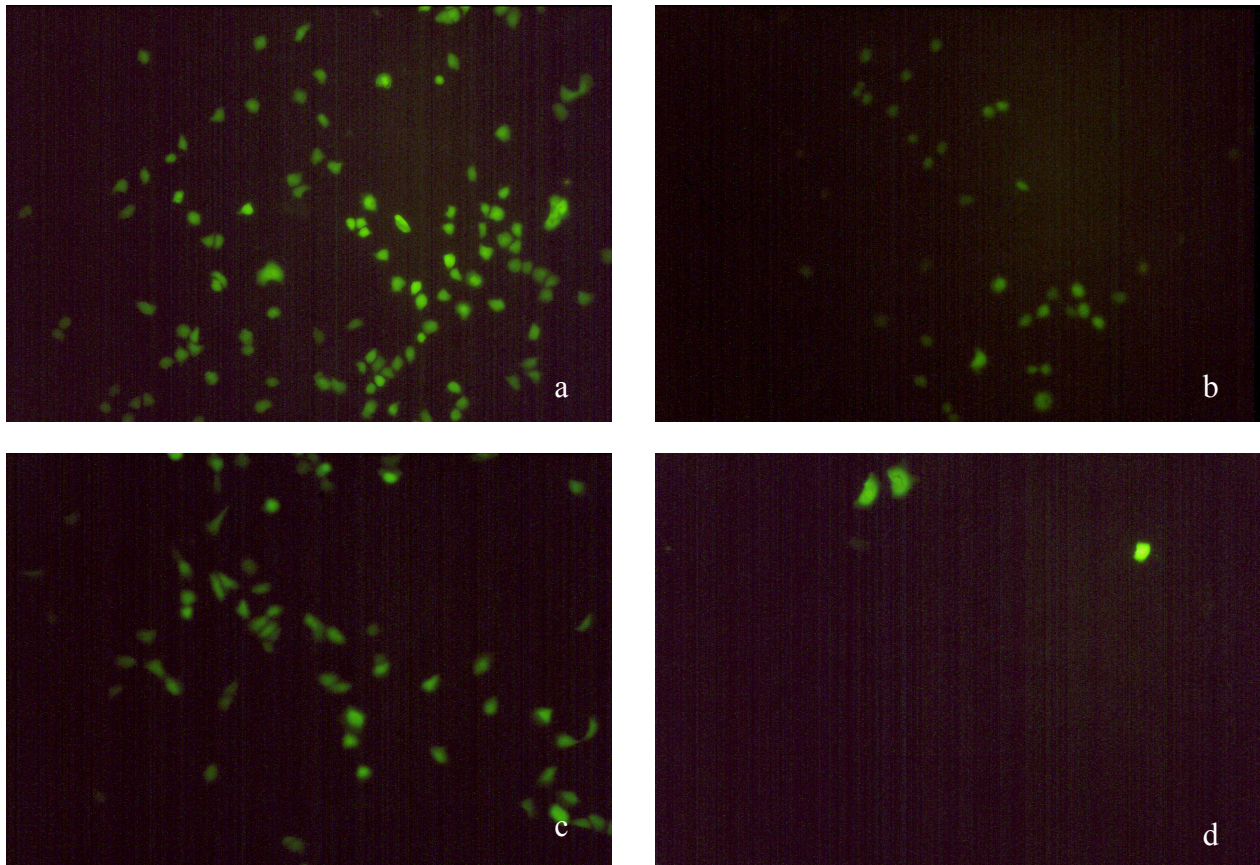


Abbildung 23: Vergleich von mit 100 μM AG 1478 behandelten Zellen und parallel kultivierter DMSO Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 100facher Vergrößerung. A zeigt die mit AG 1478 behandelte Zellen in Passage 1 an Tag 10 nach Transduktion, c in Passage 3 an Tag 21. B und d zeigen die dazugehörigen DMSO Kontrollen. Es fällt die gleichbleibend hohe Expression der mit AG 1478 behandelten Zellen auf im Vergleich zur DMSO Kontrolle, deren Expression rasch abnimmt.

Der Effekt war am stärksten bei einer AG 1478 Konzentration von 100 μM . Bei einer Konzentration von 75 μM ist ebenfalls eine Steigerung zu beobachten, jedoch eine deutlich geringere als bei 100 μM . Die Expression blieb bis zum Ende der Kultur zum Beispiel in einem Versuch 75 Tage nach Transduktion deutlich sichtbar, während zu diesem Zeitpunkt in den Kontrollen keine fluoreszierenden Zellen mehr zu entdecken waren (Abb. 24 a-d).

Zellwachstum und Zellmorphologie der mit AG 1478 behandelten Zellen unterschieden sich nach den ersten beiden Passagen nicht von den Kontrollen (Abb. 24 e, f).

III. Ergebnisse

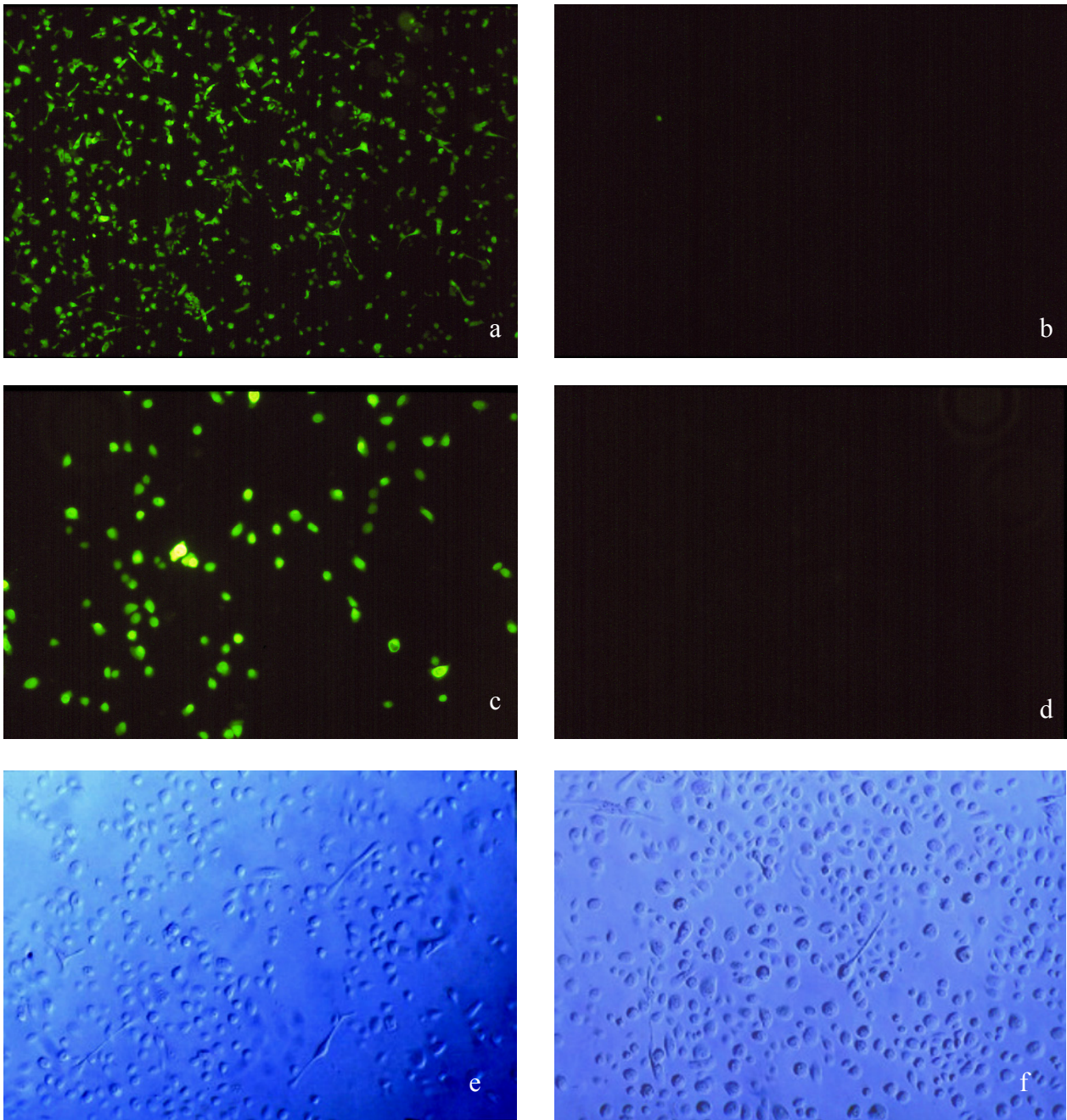


Abbildung 24: Vergleich von mit 100 μ M AG 1478 behandelten Zellen und parallel kultivierten DMSO Kontrolle. A und c zeigen die mit AG 1478 behandelten Zellen in Passage 7 an Tag 45 nach Transduktion in 40facher beziehungsweise 100facher Vergrößerung. In e sieht man dieselben Zellen im Durchlicht ohne Fluoreszenz. B, d und e zeigen die dazugehörigen DMSO Kontrollen. Es bleibt die beständige Expression der mit AG 1478 behandelten Zellen zu beobachten, während die Expression in der DMSO Kontrolle verschwunden ist.

III. Ergebnisse

Die mit DMSO behandelten Zellen hatten weder unter dem Mikroskop noch in der FACS Analyse eine höhere Transduktion zu verzeichnen als die Kontrolle ohne DMSO.

In zwei Versuchen wurden zusätzlich zu der Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellen im FACS analysiert. Dabei ließ sich die Steigerung der Expression durch AG 1478 ebenfalls nachweisen. Der Prozentsatz GFP positiver Zellen betrug in Passage 7 nach 45 Tagen 11,25% im Vergleich zu 0,17% in der DMSO Kontrolle, beziehungsweise in dem zweiten Versuch in Passage 8 nach 52 Tagen 14,53% im Vergleich zu 0,88% in der DMSO Kontrolle (Abb. 25). Berechnete man die Expression der mit AG 1478 behandelten Keratinozyten als Vielfaches der Expression der DMSO Kontrolle war eine bis zu 66fache Expression nach 45 Tagen nachweisbar (Abb. 26).

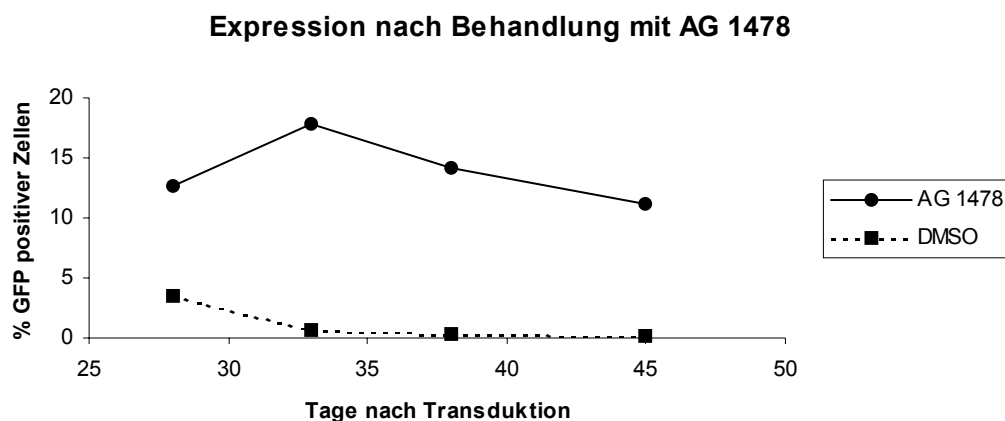


Abbildung 25: Messung der GFP positiven Zellen in Passage 4, 5, 6 und 7 nach Transduktion. Es wurden jeweils mindestens 10.000 Zellen ausgezählt. Die DMSO Kontrolle zeigte eine wesentlich geringere Expression als die mit 100 μ M AG 1478 behandelten Zellen. Die Konzentration der mit AG1478 behandelten Zellen blieb durchgehend erhalten, während die Expression der unbehandelten Zellen rasch gegen 0 ging.

III. Ergebnisse

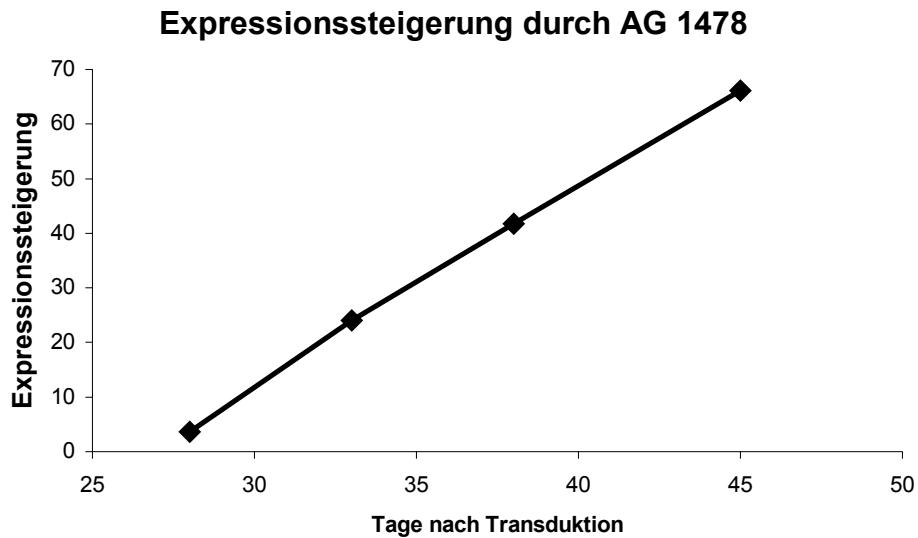


Abbildung 26: Aus der Messung der GFP positiven Zellen in Passage 4, 5, 6 und 7 nach Transduktion ließ sich die Expressionssteigerung im Vergleich zur DMSO Kontrolle errechnen. Dazu wurde die Anzahl GFP-exprimierender Zellen, die mit AG 1478 behandelt worden waren, durch die Anzahl GFP-exprimierender Zellen der DMSO Kontrolle dividiert.

Es zeigt sich, dass gerade im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen die Expression der mit AG1478 behandelten Zellen nach Wochen weiter zunimmt.

4. Expansionsverhalten der transduzierten Zellen

4.1. Klonales Wachstum

Im klonalen Essay der mit AG 1478 behandelten Keratinozyten zeigte sich, dass die transduzierten Zellen fähig sind, Klone zu bilden (Abb. 27). Diese waren von unterschiedlicher Größe, ebenso wie die Klone nicht transduzierter Zellen.

In der Expression zeigten sich unter dem Fluoreszenzmikroskop ebenfalls verschiedene Muster: Die Expression erstreckte sich entweder nur auf bestimmte Bereiche eines Klons oder auf den gesamten Klon.

III. Ergebnisse

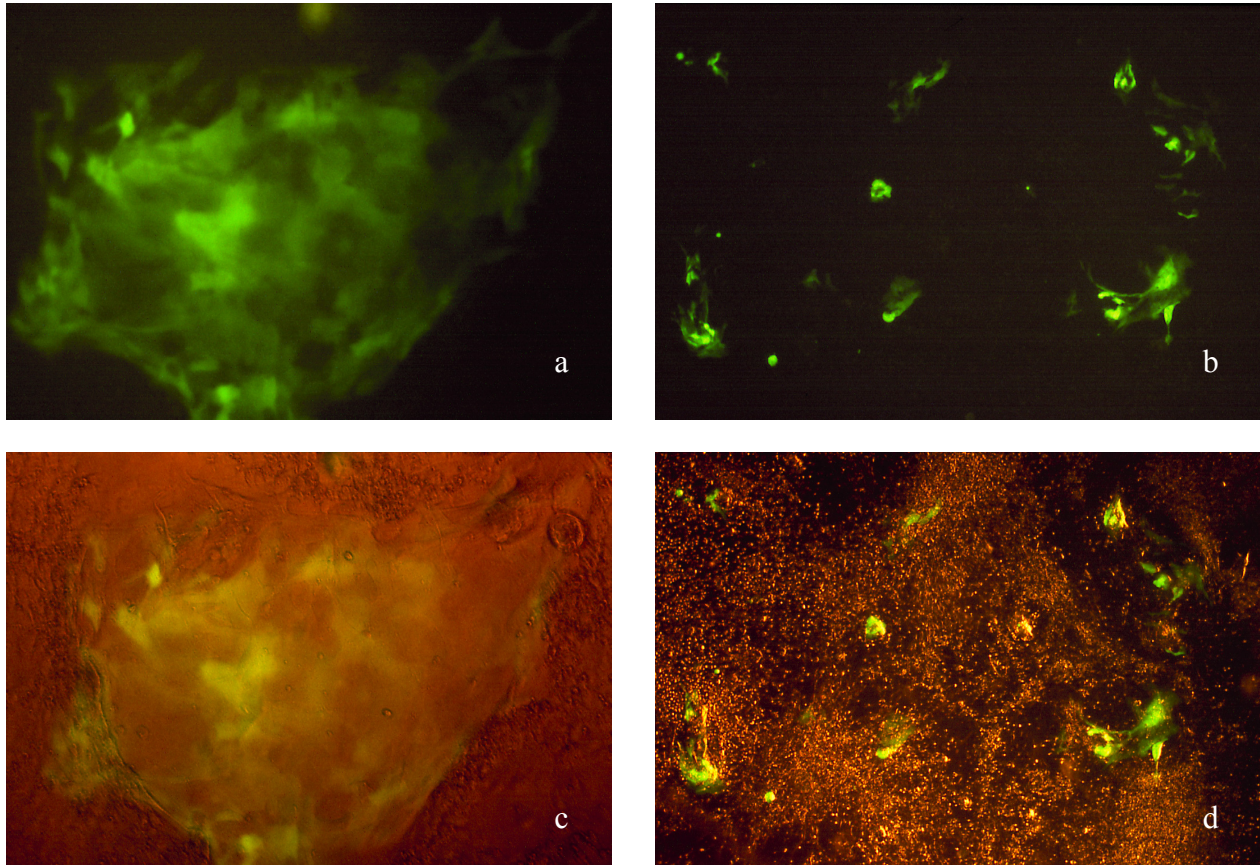


Abbildung 27: Die mit 100 μM AG 1478 behandelten Zellen wurden in Passage 7 nach Transduktion an Tag 45 auf Feederzellen ausplattiert und für 11 Tage kultiviert. A und c zeigen einen Klon mit GFP Expression in 100facher Vergrößerung, b und d mehrere Klone in 40facher Vergrößerung. Es zeigt sich die Bildung von vollständig GFP-exprimierenden Klonen und von teilweise GFP-exprimierenden Klonen. Damit ist nachweisbar, dass die transduzierten Zellen weiter zur Klonbildung fähig sind.

4.2. Dreidimensionale Hautkultur

Des Weiteren wurde aus den Zellen ein dreidimensionales Hautbild gezüchtet. In Kryoschnitten ließen sich nach einer Kultur von zwei Wochen exprimierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich erkennen, die teils im Stratum corneum lagen, teils in den tieferen Hautschichten (Abb. 28).

III. Ergebnisse

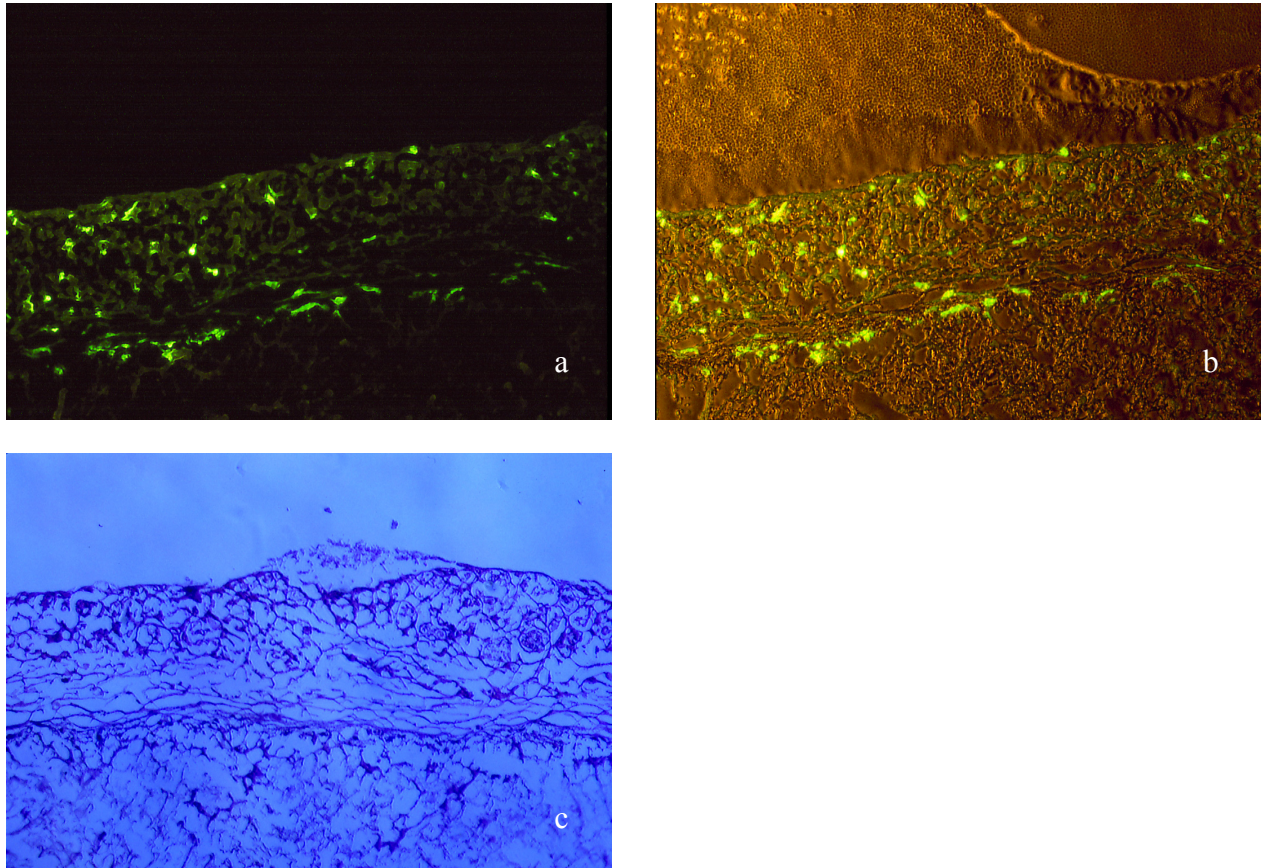


Abbildung 28: Die mit 100 μ M AG 1478 behandelten Zellen wurden in Passage 3 nach Transduktion an Tag 21 auf toter Dermis ausplattiert und für 10 Tage kultiviert. Anschließend wurde das dreidimensionale Hautmodell im Kryoverfahren geschnitten und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (a und b). C zeigt das dreidimensionale Hautmodell im Durchlicht.

Es zeigen sich GFP exprimierende Zellen in allen Hautschichten, auch in den basalen Abschnitten.

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Methoden untersucht, um den Gentransfer mittels rAAV-2 in primäre humane Keratinozyten *in vitro* zu steigern.

Die Bestrahlung mit UVB zeigte bei den Keratinozyten in Kultur schon bei niedrigen Dosen toxische Effekte und ließ keine Steigerung der Transduktionseffizienz erkennen. Damit erwies sich UVB Licht als nicht geeignet für die Verstärkung der Transduktion von Keratinozyten mit rAAV-2.

Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit MG 132 eine deutlich sichtbare Expressionssteigerung. Es ergab sich in der ersten Passage eine Steigerung der GFP exprimierenden Zellen um mehr als das zehnfache im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Nachdem die Expression aber im Verlauf der nächsten Wochen zurückging, ist mit MG 132 keine dauerhafte Expressionssteigerung zu erreichen. Damit wäre MG 132 gut für die unterstützende Therapie in Wundheilungsverfahren geeignet, wenn zum Beispiel epidermaler Wachstumsfaktor über mehrere Tage oder Wochen verstärkt exprimiert werden soll. Der Rückgang der Expression über die Zeit wäre in dieser Anwendung durchaus erwünscht.

Mit AG 1478 ließ sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Transduktionseffizienz erzielen. Die FACS Analyse zeigte in einem Versuch nach 45 Tagen die 66fache Anzahl GFP exprimierender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Während des ganzen Versuchs bis Tag 75 nach Transduktion exprimierten konstant mehr als 10 % der Keratinozyten GFP. Das die transduzierten Keratinozyten weiterhin zur Expansion fähig sind und eine Epidermis aufbauen können, zeigen die Versuche zur Klonbildung und die dreidimensionale Hautkultur. Die Dauer der GFP-Expression und die Klonbildung weisen darauf hin, dass die Transduktion von Stammzellen gelungen ist. Damit eröffnet sich die Möglichkeit einen über lange Zeit stabilen Gentransfer mit rAAV-2 in Keratinozyten zu erreichen.

Nachdem eine ausreichend hohe Transduktionseffizienz eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden in der Gentherapie ist, zeigen diese Ergebnisse verbesserte Möglichkeiten auf, rAAV-2 in Zukunft zur Gentherapie an der Haut einzusetzen.

2. Keratinozyten als Zielzellen für die Gentherapie mit rAAV-2

Die Haut bietet sich – wie schon in der Einleitung erwähnt - für Gentherapien aus mehreren Gründen an (Braun-Falco 1998, Ghazizadeh und Taichman 2000): Sie ist leicht erreichbar und kontrollierbar, die Stammzellen sind gut identifizierbar und viele der kutanen Genodermatosen sind mittlerweile in Hinblick auf ihren Gendefekt charakterisiert.

Desweiteren exprimieren Keratinozyten sowohl Heparansulfatproteoglycanrezeptoren, an die rAAV-2 bindet, als auch die als Hilfsrezeptoren identifizierten $\alpha_v\beta_5$ -Integrinrezeptoren und Fibroblastenwachstumsrezeptoren (Kim et al. 1994, Marchese et al 1997, Lundquist und Schmidtchen 2001). Damit sind die Voraussetzungen für eine Infektion durch rAAV-2 gegeben.

Trotz der ebenerwähnten Vorteile der Hautgentherapie bestehen kaum Arbeiten, die sich mit der Transduktion von Hautzellen durch rAAV-2 befassen. Hengge et al. haben 2000 gezeigt, dass durch die *in vivo* Injektion von rAAV-2 mit einem Markergens eine Transgenexpression zu beobachten war. Dabei ließen sich auch Haarfollikel und ekkrine Schweißdrüsen transduzieren (Hengge et al. 2000). Aber die Expression verlor sich nach 6 Wochen. Damit ist die Möglichkeit einer *in vivo* Transduktion nachgewiesen, ohne dass sich genauer die Transduktionseffizienz bestimmen läßt.

Eine genauere Auskunft über die Transduzierbarkeit der Keratinozyten lässt sich in Versuchen zur *in vitro* Transduktion gewinnen. Daher wurde erst die prinzipielle Transduktionseffizienz von Keratinzyten *in vitro* durch rAAV-2 bestimmt. Keratinozyten erwiesen sich in dieser Arbeit im Vergleich zu HeLa-Zellen als relativ schwierig durch rAAV-2 zu transduzieren. Ohne den Versuch einer Transduktionssteigerung zeigten die HeLa-Zellen im Mittel eine 24fach höhere Transduktionseffizienz. Bei den Keratinozyten ließen sich im Durchschnitt etwas über 3% der Zellen transduzieren (vgl. III.1.4.).

Die Transduktionseffizienz von rAAV-2 in Keratinozyten liegt damit deutlich hinter der von Retroviren. Deshalb ist es wichtig, Methoden zu finden, um die Effizienz von rAAV-2 zu steigern. Erst dadurch kann rAAV-2 bei der Hautgentherapie mit anderen Vektorsystemen konkurrieren.

IV. Diskussion

Neben der Verbesserung des Vektorsystems wollten wir eine möglichst risikoarme Methode der Keratinozytengewinnung etablieren.

Die Haut bietet die einfache Möglichkeit, durch eine kleine Biopsie an Keratinozyten zu kommen. Noch risikoärmer ist die Kultivierung von Keratinozyten aus Haarwurzeln (Limat et al. 1996).

Es blieb aber noch die Frage offen, ob die so gewonnene Keratinozyten sich auch gleich gut durch rAAV-2 transduzieren ließen. Nachdem sich in dieser Arbeit im Vergleich der Transduktion von Keratinozyten aus Vorhaut und Keratinozyten aus Haarschäften keine Unterschiede zeigten, ist die Kultivierung aus Zellen der Haarwurzeln für die Gentherapie *in vitro* eine attraktive Alternative.

3. Transduktionssteigerung durch UV-Bestrahlung

3.1. Wirkung auf die Transduktionseffizienz von rAAV-2

Um Möglichkeiten zur Steigerung der Transduktionseffizienz von rAAV-2 in Keratinozyten zu finden, ist es zunächst wichtig, das Verhalten des Virus in einer Wirtszelle zu kennen. rAAV-2 baut sich leichter innerhalb von Bruchstellen der DNS ein als in intakte Chromosome (McCarty et al. 2004). Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich durch die Behandlung von Zellen mit DNS-schädigenden Stoffen auch die Transduktionseffizienz für rAAV-2 erhöht (Alexander et al. 1994, Russel et al. 1995).

Russel et al. zeigten 1995, dass sich durch eine Behandlung von Fibroblasten mit Hydroxyurea an Tag 2 nach Infektion mit rAAV-2 eine mehr als 300-fache Transduktionssteigerung erzielen lässt (Russel et al. 1995). Auch nach 12 Tagen war dieser Effekt noch deutlich sichtbar. Hydroxyurea stört die DNS-Synthese, indem es die Ribonucleotid-Reduktase inhibiert und die für den Aufbau der DNS nötigen Desoxynucleotide vermindert.

Auch bei Anwendung von Etoposid zeigte sich nach 12 Tagen ein vergleichbarer Effekt. Etoposid hemmt Topoisomerasen, die als Enzyme an der Replikation, Rekombination und Reparatur von DNS beteiligt sind.

Das entscheidende Mechanismus für die Steigerung der Transduktionseffizienz hier in der DNS-Schädigung liegt, zeigten schon

IV. Diskussion

Alexander et al. 1994 (Alexander et al. 1994): Cisplatin, ein Zytostatikum, das sich an Basen der DNS bindet und durch Bildung von Quervernetzung die DNS schädigt, führte zu einer Transduktionssteigerung von rAAV-2 in Fibroblasten. Im Gegensatz dazu ließ sich weder bei Nocadazole, das die Bildung des Spindelapparates und damit die Mitose hemmt, noch bei Methotrexat, das als Folsäureantagonist die Synthese von Nucleotiden und Proteinen inhibiert, ein transduktionssteigernder Effekt feststellen.

Eine andere Möglichkeit durch DNS-Schädigung die Transduktion zu erhöhen, besteht in der Bestrahlung mit Gamma-Strahlen oder UV(Ultraviolett)-Licht. Bei Fibroblasten verwendete dabei Alexander et al. eine UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm und einer Energie von bis zu 50 J/m². An Tag 2 nach Infektion ließ sich eine mehr als 40-fache Steigerung nachweisen. Dabei erhöhte sich sowohl die Transduktion ruhender Zellen sowie die sich vermehrender Zellen. Die Steigerung war also unabhängig von der Phase des Zellzyklus, indem sich die Zelle gerade befand.

3.2. UV-Bestrahlung in der Hautgentherapie mit rAAV-2

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass innerhalb des Dosisbereichs, der für *in vitro* kultivierte Keratinozyten tolerierbar ist, keine relevante Steigerung der Expression zu erreichen ist. Damit scheidet diese Methode – so verlockend sie theoretisch erscheint - für die Transduktionssteigerung von rAAV-2 bei Keratinozyten *in vitro* aus.

Das ist besonders zu bedauern, da für die Methode der UV-Bestrahlung bei Keratinozyten bereits viele Erfahrungen bestehen. Schließlich wird eine UV-Behandlung der Haut therapeutisch seit langem bei mehreren Krankheiten eingesetzt wird. So wird UVB-Strahlung von 311 nm bei Psoriasis, chronischen Ekzemen oder Pruritus angewandt. UVA-Strahlung findet vor allem als Photochemotherapie Anwendung in Kombination mit 8-Methoxypsoralen. Sowohl Psoriasis vulgaris als auch Mycosis fungoides, Urticaria pigmentosa und Sklerodermie sprechen auf diese Therapie an.

Auch wenn die Wirkungsweise der Phototherapie noch nicht ganz geklärt ist, scheint die Elimination von Immunzellen, die Reduktion überschießender

IV. Diskussion

Proliferationsvorgänge und die Induktion von Apoptose eine Rolle zu spielen (Fritsch 2004).

4. Transduktionssteigerung durch MG 132

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Proteasomeninhibitoren. Deren Wirkweise auf die Transduktionseffizienz von rAAV-2 wird wiederum klar, wenn man sich überlegt, dass rAAV-2 sobald es aus dem Endosom ins Zytosol entlassen wird, dem Abbau durch zelleigene Proteasomen ausgesetzt ist (Douar et al. 2001).

4.1. Physiologische Funktion des Proteasoms

Proteasomen sind in eukaryontischen Zellen sowohl im Zellkern als auch im Zytosol zu finden. Das aktive enzymatische Zentrum des Proteasoms hat die Form eines Zylinders, der von vier heptamerischen Ringen umschlossen wird. Die α -Untereinheit bildet dabei einen engen Kanal, der nur falsch gefalteten oder ungefalteten Proteinen den Eintritt in das katalytische Zentrum erlaubt. Dadurch werden fehlerhafte Proteine gezielt abgebaut und eine Anhäufung funktionsloser Fehlprodukte vermieden (Lowe 1995, Groll 1997, Adams 2002).

Andererseits werden nicht nur denaturierte Proteine im Proteasom abgebaut, sondern auch inaktive Vorstufen von Transkriptionsfaktoren durch partielle Degradation in ihre funktionsfertige Form umgewandelt. Als Beispiel wäre der κ B-Transkriptionsfaktor zu nennen, dessen p50 Untereinheit erst im Proteasom aktiviert wird (Liu et al. 2003). Durch diese Prozesse beeinflusst das Proteasom viele Stoffwechselfvorgänge in der Zelle.

Es existieren 2 Variationen des Proteasoms: eine ruhende Form, das 20s Proteasom und eine aktive Form, das 26s Proteasom (Coux et al 1996). Letztere enthält auf dem 20s-Partikel noch eine Kappe mit regulatorischen Sequenzen, das sogenannte PA700. Neben Bindungsstellen für falsch gefaltete Proteine finden sich darin Polyubiquitine und Adenosintriphosphatasen, die mitbeteiligt sind am Entfalten der Proteine.

4.2. Experimentelle Auswirkungen von MG 132

Entsprechend der vielfältigen Funktionen der Proteasomen haben auch Proteasomeninhibitoren wie MG 132 zahlreiche Effekte. Sie aktivieren dosisabhängig in eukaryontischen Zellen Stresskinasen und induzieren die Transkription von Hitzeschockproteinen. Des Weiteren steigern sie die p53-Expression (Magae et al. 1997; Meriin et al. 1998; Kim et al. 1999). All diese Veränderungen schädigen die Zelle und können bis zum Zelltod führen. Liegen Proteasomeninhibitoren nur in geringer Konzentration vor, so bilden sich die Effekte nach Entzug der Inhibitoren in kurzer Zeit zurück, so dass die Zelle keinen bleibenden Schaden nimmt.

Douar et al. zeigten 2001, dass durch die Gegenwart von MG 132 im Kulturmedium während der zweistündigen Transduktion mit rAAV-2 sowohl die Anzahl der Zellen gesteigert werden kann, die das Transgen exprimieren, als auch die Intensität der Expression pro Zelle (Douar et al. 2001). Dieser Effekt wurde in Tumorzellreihen wie 293-, HepG2- und Hela-Zellen nachgewiesen. Die Transduktionssteigerung fiel desto stärker aus, je schlechter der Zelltyp unbehandelt durch rAAV-2 zu transduzieren war. Die Expressionssteigerung stieg im Laufe der ersten 2 Tage nach Transduktion weiter an. In den Zellen wurde dabei eine Vermehrung der Anzahl an einzelsträngiger DNS nachgewiesen.

Dieser Effekt lässt sich damit erklären, dass viele Viruspartikel, nachdem sie aus dem Endosom ins Zytosol entwichen sind, durch Proteasomen abgebaut werden. MG 132 blockiert diesen Prozess (Abbildung 7). Damit unterscheidet sich der Effekt von MG 132 fundamental von der Transduktionssteigerung durch einen Helfervirus. Denn dieser greift wie schon beschrieben vor allem im Nukleus an und fördert dort die Bildung von rAAV-2-DNS und -RNS.

Der Effekt des Proteasomeninhibitors zeigte sich allerdings nur in bestimmten Geweben, wie der Leber. In Herz- oder Skelettmuskelzellen war keine relevante Steigerung zu erreichen, wie Duan et al. 2000 gezeigt haben (Duan et al. 2000).

Diese untersuchten auch die Transduktion von respiratorischem Epithel. Dabei zeigte sich bei unbehandelten Zellen, dass bei Applikation von rAAV-2-Vektoren über die basolaterale Membran des Epithels eine bis zu 200fach höhere Transduktion zu erzielen war als bei Applikation über die apikale Oberfläche. Durch die Inkubation mit Proteasomeninhibitoren während der Infektion mit

IV. Diskussion

rAAV-2 ließ sich die Effizienz des Gentransfers durch die apikale Epitheloberfläche stark steigern - mit einer Expressionsspitze an Tag 22 nach Transduktion. Im Gegenteil dazu führte die gleiche Behandlung bei den basalen Schichten nur zu einer schwachen transienten Steigerung, die nach 22 Tagen verschwunden war.

Dies zeigt, dass nicht nur der Zelltyp für ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Proteasomeninhibitoren wichtig ist, sondern auch der Differenzierungsgrad der jeweiligen Zelle.

4.3. Ansätze für therapeutische Anwendungen

Wie schon erwähnt greift das Proteasom in viele Stoffwechselprozesse der Zelle regulierend ein. Daher ergeben sich verschiedenste therapeutische Anwendungsmöglichkeiten.

Boudjelal et al. zeigten 2000, dass Proteasomen nach UV-Bestrahlung verstärkt Retinoid-Rezeptoren abbauen (Boudjelal et al. 2000). Die Funktion der Retinoide ist aber wichtig, um die Haut vor vorzeitiger Alterung und Tumoren zu schützen. Aus dem selben Grund werden auch synthetische Retinoide in der Therapie zahlreicher Hautkrankheiten benutzt, zum Beispiel bei Psoriasis, Ichthyosen, Lichen ruber planus oder auch Akne. Durch den Einsatz von Proteasomeninhibitor MG132 kann der Abbau von Retinoid-Rezeptoren verlangsamt und damit die Zahl der zur Verfügung stehenden Rezeptoren signifikant erhöht werden (Boudjelal et al. 2000). Damit wäre es denkbar, MG 132 in Kombination mit Retinoiden therapeutisch einzusetzen.

Als neuer Ansatz in der Chemotherapie bei verschiedenen Tumoren scheinen Proteasomeninhibitoren ebenfalls vielversprechend und werden gegenwärtig untersucht. Dabei lösen sie in den Zellen Apoptose aus, indem sie zunächst eine Ansammlung kurzlebiger Proteine wie p53, p27 oder solcher der Bcl 2-Familie herbeiführen. Diese bewirken eine Störung der Mitochondrienfunktion. Durch die Aktivierung unterschiedlicher Caspasen werden schließlich biochemische und morphologische Veränderungen hervorgerufen, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führen (Almond et al. 2002). Nachdem Proteasomeninhibitoren Apoptose vor allem in proliferierenden Zellen auslösen, schädigen sie Tumorzellen mehr als

IV. Diskussion

normales Gewebe. Des weiteren verstärken sie den zytotoxischen Effekt anderer Zytostatika und wären daher auch für eine Kombinationstherapie gut geeignet.

Hochwald et al. zeigten 2003 speziell für das Kolonkarzinom, dass eine MG 132 Behandlung der Karzinomzellen *in vitro* deren Wachstum hemmt und zur Apoptose führt (Hochwald et al. 2003).

Mit dem Proteasomeninhibitor PS-341 werden bereits klinische Phase 2 und 3 Studien durchgeführt zur Behandlung hämatologischer und solider Tumore, in denen sich eine gute Verträglichkeit des Medikaments zeigte (Adams 2002, Lenz 2003, Richardson 2003).

Für eine zurückhaltende Anwendung von MG 132 - zumindest systemisch – spricht der *in vitro* nachgewiesene Effekt auf Mäuse-Oozyten: MG 132 kann zu einer gesteigerten Anzahl von Eizellen mit vermehrter Chromosomenanzahl oder zur Aneuploidie führen (Mailhes et al. 2002).

4.4. Chancen für einen Einsatz in der Hautgentherapie mit rAAV-2

Die klinischen Erfahrungen, die eine gute Verträglichkeit von MG 132 zeigen, machen gemeinsam mit den experimentellen Nachweisen für eine Steigerung der Transduktionseffizienz von rAAV-2 MG 132 zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Transduktionssteigerung von rAAV-2 bei Keratinozyten *in vitro*.

Dieser Effekt ließ sich in dieser Arbeit auch bei Keratinozyten bestätigen: Es kann durch die Behandlung mit MG 132 eine deutliche Expressionssteigerung in den ersten Wochen nach Transduktion erzielt werden, dabei lassen sich bis zu 35 % der Keratinozyten mit rAAV-2 transduzieren, im Vergleich zu 3 % bei Versuchen mit dem selben Virus ohne MG 132. Die Expression des Transgens lässt dann im Laufe der folgenden Wochen langsam nach, bis nur mehr eine Restaktivität erhalten bleibt.

Durch die Inkubation von Keratinozyten mit MG 132 bietet sich also die Möglichkeit einer verstärkten Genexpression über mehrere Tage, die sich dann langsam verringert. Diese Expressionsmuster ist zum Beispiel in der Therapie chronischer Wunden, einem weiteren Einsatzfeld der Gentherapie, von Vorteil (Braun-Falco 2002).

IV. Diskussion

Die Behandlung chronischer Wunden zeigt sich oft äußerst langwierig und schwierig. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 1,5% der Bevölkerung darunter leiden (Yao and Eriksson 2000).

Nachdem immer neue Erkenntnisse zum Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen in der Wundheilung entdeckt werden, erweitern sich auch die Möglichkeiten durch gezielte Behandlung mit zellulären Botenstoffen in die Regulation einzugreifen (Harding et al. 2002). Dadurch soll die Aktivität einzelner Zellarten gesteigert und somit der Wundverschluss schneller ermöglicht werden.

Bei der topischen Applikation von Wachstumsfaktoren wie EGF zeigten sich mehrere Probleme: Zum einen wiesen die Faktoren selbst nur eine kurze Halbwertszeit auf, zum anderen wurden sie durch das Wundsekret zum Teil inaktiviert (Davidson et al. 2000). Vor allem die Penetration in die Tiefe des Granulationsgewebes erwies sich bei topischer Applikation als gering (Cross and Roberts 1999).

Daher scheint die Gentherapie hier manche Vorteile zu bieten: Wenn das gewünschte Gen in eine Zelle eingebracht ist, ist es möglich über einen längeren Zeitraum gleichmäßig Wachstumsfaktoren in die Wunde zu sekretieren. Durch die Einwanderung der Zellen in das Granulationsgewebe wäre auch eine Versorgung der tieferen Schichten mit Wachstumsfaktoren zu erreichen.

Um weitere Erkenntnisse über das Proliferationsverhalten der mit Hilfe von MG 132 transduzierten Zellen zu erhalten und die Weitergabe des Markergens an Tochterzellen zu untersuchen, wäre es sinnvoll, das Wachstums- und Expressionsmuster im dreidimensionalen Hautbild zu untersuchen. Im weiteren wären sicher Versuche mit durch rAAV-2 transduzierten EGF-exprimierenden oder Wachstumsfaktoren bildenden Kerationozyten auf Wunden interessant.

5. Transduktionssteigerung durch EGF-R Inhibitoren

5.1. Physiologische Funktionen des EGF-R

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) ist ein Transmembran-Rezeptor, der eine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, so wird über die Tyrosinkinase eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt. Dadurch kommt es zu Veränderungen in der Transkription zahlreicher Gene und im weiteren zum Beispiel zu einer Hochregulation antiapoptotischer Proteine. Durch seine vielfältigen Effekte spielt der EGF-Rezeptor eine zentrale Rolle in der Autoregulation von Keratinozyten und beeinflusst die Zellproliferation, die endgültige Differenzierung und die Ausbildung epidermaler Strukturen (Rheinwald und Green, 1977; Coffey et al. 1987; Pittelkow et al. 1993).

Die Keratinozyten bilden selbst manche der Liganden für den EGF-R wie zum Beispiel den transformierenden Wachstumsfaktor α (Coffey et al. 1987), Amphiregulin (Cook et al. 1991) und Heparin bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Hashimoto et al. 1994). Damit erklärt sich auch die Beobachtung des „autonomen“ Wachstums von Keratinozyten ohne externe EGF Zugabe durch Pittelkow et al. 1993, das aber erst bei einer ausreichenden Dichte der Zellen auftritt (Pittelkow et al. 1993).

Wie stark der EGF-R die Zelle beeinflusst, lässt sich besonders deutlich erkennen, wenn durch eine Rezeptorblockade seine Funktionen ausgeschaltet werden. Dabei beobachtete man in den Experimenten einen Anstieg der Expression von Keratin 1 und 10 in den Zellen (Peus et al. 1997). Diese sind beide frühe Marker einer Differenzierung von Keratinozyten. Damit übereinstimmend zeigte sich auch ein Verlust des Potentials, Klone zu bilden (Rodeck et al. 1997). Auch die DNS-Synthese war in den behandelten Keratinozyten erniedrigt und die Zellen sammelten sich vermehrt in der G₀/G₁ oder G₂ Phase (Jost et al. 1999). Je nach Dauer der Rezeptorblockade waren diese Effekte reversibel oder irreversibel. Weder bei Melanozyten noch bei Fibroblasten waren diese Auswirkungen zu beobachten, obwohl beide ebenfalls den EGF-Rezeptor exprimieren. Eine weitere wichtige Kaskade, die durch die EGF-R-Blockade ausgelöst wird, führt zu einer

IV. Diskussion

Reduzierung von Bcl-x_L in der Zelle (Jost et al. 1999). Dieses gehört zu einer Gruppe intrazellulärer Proteine, welche die Steuerung des programmierten Zelltods beeinflussen. Es schützt die Zelle vor Apoptose und ist auch in hyperproliferativen oder maligne entarteten Keratinozyten verstärkt exprimiert. Der EGF-R schützt die Zelle also vor einer Differenzierung und Apoptose, und sorgt damit für die Vermehrung und das Überleben der Keratinozyten.

Daraus erklärt sich auch, warum der Rezeptor am stärksten in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert wird, in denen die Keratinozyten mit dem größten Proliferationspotential sitzen (Nanney et al. 1984, 1990).

5.2. Experimentelle Wirkungen der EGF-R-Inhibitoren

Tyrphostine stellen effektive Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors dar. Sie werden nach ihrer chemischen Struktur eingeteilt in 4 verschiedene Untergruppen. Nachdem wir in unseren Versuchen nur mit Tyrphostinen der Gruppe 1 und 2 gearbeitet haben, beschränken sich die Erklärungen hier auf diese beiden. Für beide wurde von Peus et al. 1997 gezeigt, dass sie den Zellzyklus unterbrechen und zu einer Anhäufung von Zellen in der G₁ Phase führen zu Lasten der S und G₂ Phase (Peus et al. 1997). Gleichzeitig führen sie dosisabhängig zu Einschränkungen der Proliferation und der DNS-Synthese. Dabei zeigte sich für AG 1478 als Tyrphostin der Gruppe 2 eine inhibitorische Wirkung auf die Autophosphorylierung von EGF-R (Peus et al. 1997). Alle gerade geschilderten Effekte sind dosisabhängig und zunächst reversibel.

Des Weiteren wurde für AG 1478 eine Inhibition der Casein-kinase-2 nachgewiesen (Liu et al. 2002). Diese spielt eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung von ungefähr 200 Proteinen und hat damit Auswirkungen auf eine Unzahl zellulärer Prozesse, wie der DNS-Synthese und –Transkription, Zellproliferation und Differenzierung sowie auf die Regulation von Onko- und Suppressorgenen.

Je nach Dosis beeinflussen sie dadurch das Überleben der Keratinozyten, die Proliferation und die Morphologie. Die Zellen zeigen sich nach Behandlung zum Teil spindelförmig beziehungsweise vergrößert oder es sind Granula im

IV. Diskussion

Zytoplasma zu beobachten (Ben-Bassat et al. 1999). In durch humane Papilloma-Virus 16 immortalisierten Keratinozyten, wie sie beim Zervixkarzinom vorkommen, lösen Tyrphostine schon in geringeren Konzentration neben den morphologischen Änderungen auch Differenzierung und Apoptose aus.

Aber auch andere Zelltypen reagieren auf Tyrphostine. Zum Beispiel wurde an Gefäßen eine Inhibition der α_1 -Adrenorezeptoren nachgewiesen und damit die Gefäßkonstriktion unterdrückt (Yan et al. 2002).

Die Steigerung der Transduktionseffizienz von rAAV-2 wird ebenfalls über die EGF-R-Blockade erreicht. Durch die Hemmung der Tyrosinkinase des Rezeptors wird das sogenannte Einzelstrang-D-Sequenz-bindende Protein (Single-stranded D-sequence-binding Protein oder ssDBP) dephosphoryliert. In seiner dephosphorylierten Form fördert dieses Protein die virale Doppelstrangsynthese, während es die selbe in seiner phosphorylierten Form hemmt. Damit wird über die Tyrphostine die Doppelstrangsynthese beschleunigt. Diese ist auch deshalb so wichtig, weil sie als eine der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte für eine erfolgreiche Infektion einer Zelle durch rAAV-2 angesehen wird (Mah et al. 1998).

Smith et al. zeigten weiterhin, dass durch die Behandlung mit Tyrphostin speziell die DNS-Transkription und damit die mRNA-Synthese gesteigert wird (Smith et al. 2003). Dies führen sie auf Stressreaktionen der Zelle zurück, die durch die Behandlung mit Tyrphostin ausgelöst werden.

5.3. Ansätze für therapeutische Anwendungen

Wie schon erwähnt, wurde durch Ben-Bassat et al. 1999 gezeigt, dass unter einer Behandlung mit Tyrphostinen durch das humane Papilloma-Virus 16 immortalisierte Zervixkarzinomzellen früher geschädigt und zur Apoptose getrieben werden als normale Keratinozyten (Ben-Bassat et al. 1999). Dadurch ergibt sich eventuell ein Ansatz für die zukünftige Behandlung des Zervixkarzinoms.

Ein anderer Versuch ist die Behandlung der Psoriasis. Diese weist eine Hyperplasie der Epidermis auf, gekoppelt mit einer Aktivierung des lokalen Immunsystems und einer veränderten Vaskularisierung der Haut. Es wurde eine beständige autokrine Stimulation der Keratinozyten beobachtet durch den

IV. Diskussion

transformierenden Wachstumsfaktor α , der von kranken Zellen verstärkt gebildet wird. Daneben sind auch EGF-R anders verteilt: Während sich der Rezeptor in gesunder Haut auf die basalen Schichten beschränkt, ist er bei Psoriasis auch in suprabasalen Zellschichten nachweisbar (Powell et al. 1999, Fritsch 2004).

In mehreren Versuchen zeigte sich durch Tyrphostine, wie AG 1478 oder AG 1517, eine deutliche Einschränkung der Proliferation bei Keratinozyten von Patienten mit Psoriasis. Wurden die Tyrphostine in einer Lösung auf Petroleumbasis auf die Haut aufgetragen, zeigten sich nach 24 Stunden ausreichend hohe Konzentrationen, um das Wachstum der Keratinozyten zu hemmen. Damit ergibt sich ein neuer, medikamentöser Ansatz, um die Hautveränderungen bei Psoriasis vulgaris zu behandeln (Powell et al. 1999).

5.4. Chancen für einen Einsatz in der Hautgentherapie mit rAAV-2

Tyrphostin 1 zeigte zwar in den ersten Passagen eine verstärkte Expression, die aber innerhalb der nächsten Woche zurückging. Damit ähnelt seine Wirkung der von MG 132, zeigt aber einen schnelleren Rückgang der Expression.

Durch die Behandlung mit AG 1478 ließ sich sowohl die Anzahl der GFP exprimierenden Zellen steigern als auch ihre Expressionsintensität. Auch mehr als 45 Tage nach Transduktion exprimierten noch über 10% der Keratinozyten GFP. Dies entsprach einer 66fachen Steigerung im Vergleich zu der nur mit DMSO behandelten Kontrolle. Die Kontrollen zeigten zu diesem Zeitpunkt im Fluoreszenzmikroskop höchstens noch vereinzelt eine schwache GFP-Expression. Dabei fällt gleich nach Transduktion noch keine signifikante Steigerung der GFP Expression durch die Behandlung mit AG 1478 auf. In den ersten Wochen aber steigt die Anzahl GFP exprimierender Zellen beträchtlich.

Im weiteren Verlauf zeigt sich dann eine beständige relative Zunahme der Expression der mit AG 1478 inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 27). Dies erklärt sich dadurch, dass die Expression der mit AG 1478 behandelten Zellen in etwa konstant bleibt, während die ohne Zusatz transduzierten Zellen einen beständigen Rückgang in der Anzahl exprimierender Keratinozyten zeigen.

IV. Diskussion

Ein etwas verzögerter Anstieg der Expression nach Transduktion mit rAAV-2 wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet und mit dem Wirkungsmechanismus der EGF-R Inhibitoren erklärt. Diese fördern eine Umwandlung der einzelsträngigen Virus DNS in doppelsträngige DNS (Manning et al. 1997, Grimm et al. 1999, Samulski et al. 1999). Qing et al. zeigten 1998, dass die Expression von EGF-R positiv mit der Transduktionseffizienz für rAAV-2 in verschiedenen Zelltypen korreliert, während der Phosphorylierungszustand des single-stranded D sequence-binding protein (ssD-BP) eine negative Korrelation zeigt. Nachdem der Phosphorylierungszustand durch EGF-R Inhibitoren beeinflusst wird (Mah et al. 1998), würde sich dadurch ein verstärkter Anstieg der GFP Expression in diesem Zeitfenster erklären, da die Umwandlung in doppelsträngige DNS unter Behandlung mit AG 1478 verstärkt abläuft.

Aus diesem Prinzip könnte man schlussfolgern, durch AG 1478 nicht nur die von Mah et al. 1998 dargestellte Steigerung der Expression nach 48 Stunden erreichen zu können, sondern eine längerfristige Expression durch stabilen Einbau der DNS. Dafür liefert diese Arbeit weitere Hinweise, indem sie zeigt, dass die Expression nach Behandlung mit AG 1478 über mehr als 75 Tage bis zum Ende der Kultur stabil blieb.

Damit eröffnet sich hier eine neue Möglichkeit, die Effizienz einer Transduktion mit rAAV-2 in Keratinozyten langfristig zu steigern.

Auch Zellen in Passage 7, 39 Tage nach Transduktion zeigten weiterhin eine mit der Kontrolle vergleichbare Klonbildung. Daher ist keine Veränderung im Wachstumspotential der Keratinozyten nachweisbar. Nachdem einige Klone vollständig GFP exprimierten, andere nur in Teilbereichen, stellt sich die Frage, ob das Transgen in diesen Klonen eventuell nicht in das Genom integriert wird sondern nur episomal vorliegt. Die Erkenntnisse über die Integration von rAAV-2 sind noch nicht weit fortgeschritten und den Diskussionen fehlt oft noch eine ausreichende Grundlage an Fakten. McCarty et al. geben in ihrem Review einen Überblick über die Häufigkeit mit der rAAV-2 in verschiedenen Studien sich in das Wirtsgenom integriert. Sie kommen dabei auf Raten von 0,1 bis 0,5 Integrationen pro infektiösem Viruspartikel (McCarty et al. 1997). Die Effizienz wird dabei nicht durch die Gegenwart von viruseigenen Rep Proteinen beeinflusst. Diese Integrationsrate scheint zwar auf den ersten Blick nicht all zu hoch, ist aber für einen Virus, der nicht auf Integration angewiesen ist, wie die Retroviren,

IV. Diskussion

vergleichsweise hoch. Wenn durch den Wirkungsmechanismus von den EGF-R Inhibitoren, der Einbau in das Wirtsgenom erhöht wird, wäre das ein großer Fortschritt hin auf eine Langzeittransduktion mit rAAV-2.

Immerhin weisen in diesen Versuchen sowohl die Dauer der Transgenexpression als auch die Bildung GFP-exprimierender Klone auf eine relevante Transduktion von Stammzellen hin.

Im Dreidimensionalen Hautbild ließ sich ein Teil der GFP-exprimierenden Zellen in den suprabasalen Schichten nachweisen. Aber immerhin zeigten sich nach 14 Tagen Kultur auch noch exprimierende Zellen in den basalen Schichten. Eine Aussage über die Proliferation dieser Zellen und die Weitergabe der GFP-Expression an Tochterzellen ließ sich in den vorliegenden Schnitten nur schlecht treffen. Auch hier wäre also noch Bedarf, in weiteren Experimenten genauer die Proliferation der transduzierten Keratinozyten zu beobachten. Zum Beispiel wäre es möglich, eine Xenotransplantation des herangezüchteten Hautmodells durchzuführen um die mögliche Beobachtungsdauer zu verlängern.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Transduktionseffizienz von rAAV-2 in Keratinozyten gesteigert werden. Durch Behandlung mit dem EGF-R Inhibitor AG 1478 wurde eine dauerhafte über die gesamte Kultur nachweisbare Expressionssteigerung erzielt, die sich auch im dreidimensionalen Hautbild darstellen ließ. Dabei zeigte sich durch die langfristige Expressionsteigerung, sowie durch die erfolgreiche Bildung GFP-exprimierender Klone, dass zumindest einige Stammzellen transduziert wurden. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für jede Gentherapie mit rAAV-2.

Bei einer Ausgangstransduktionsrate von 3 % wäre rAAV-2 als Vektor bei der Hautgentherapie kein vielversprechender Kandidat. Ganz anders ist die Situation nachdem sich in dieser Arbeit eine stabile Transduktionsrate über 45 Tage mit 10 % nachweisen ließ. Obwohl die Expression in Keratinozyten noch hinter der durch Retroviren erzielbaren liegt, wird durch die effizientere Transduktion die Anwendung von rAAV-2 auch bei Keratinozyten sinnvoll.

IV. Diskussion

Durch MG 132 war eine kurzfristige aber ebenfalls deutliche Expressionssteigerung zu erreichen, die sich innerhalb weniger Wochen zurückbildete.

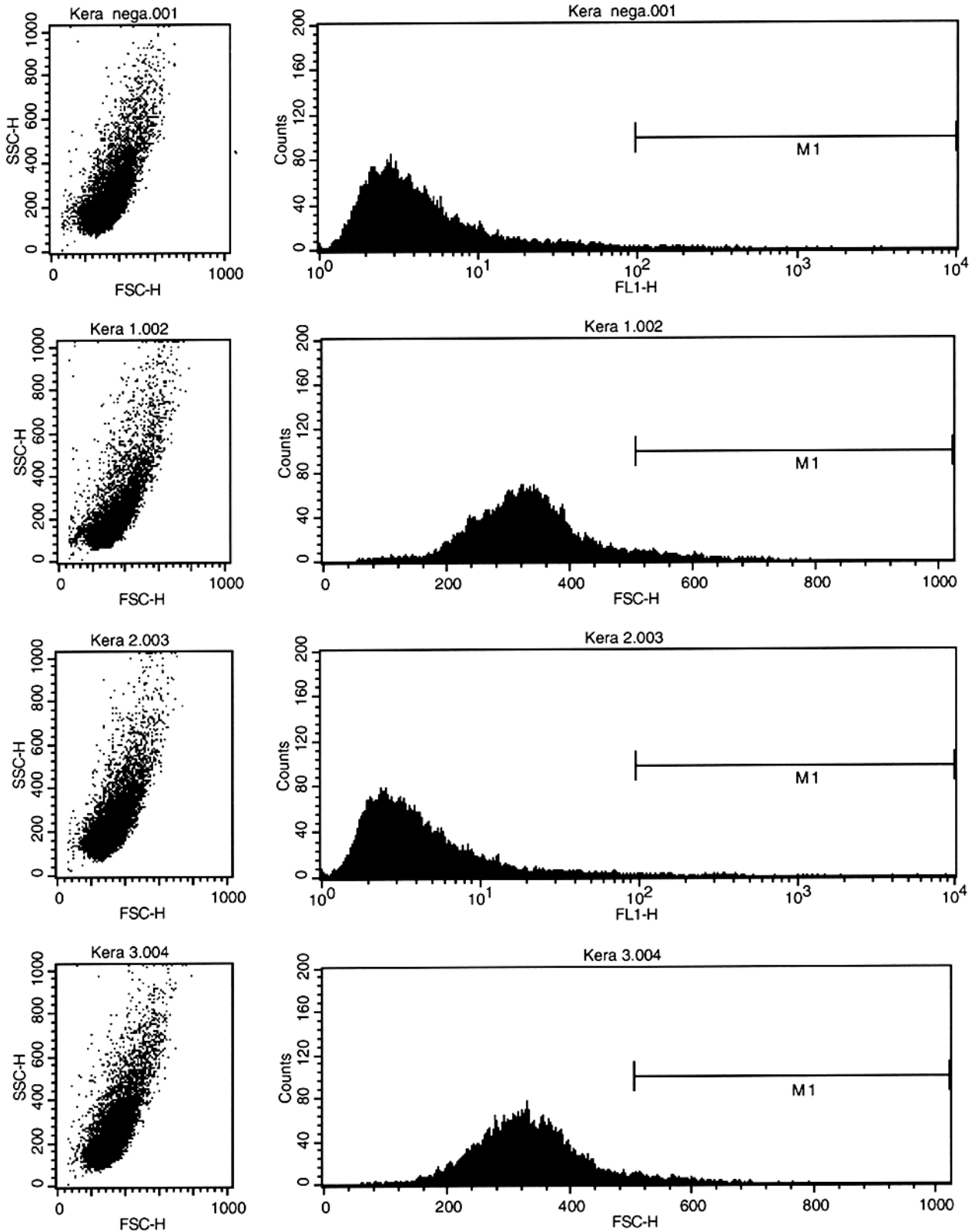
In weiteren Versuchen wäre zu klären, ob die Kombination von MG 132 und AG 1478 zur Transduktionssteigerung anzuwenden ist. Durch die unterschiedlichen Ansatzpunkte beider Stoffe könnten sich ihre Wirkungen eventuell gegenseitig verstärken.

Es wäre auch angebracht, genauer zu untersuchen, ob MG 132 oder AG 1478 die Integration der viralen DNS fördern oder den Anteil an episomaler DNS erhöhen. Dadurch würden sich weitere Hinweise auf die Stabilität der Transduktion ergeben.

Um das weitere Verhalten der mit AG 1478 behandelten Keratinozyten zu untersuchen wäre es sinnvoll, die Versuch in der dreidimensionalen Hautkultur auszuweiten und idealerweise auch im Xenotransplantationsmodell zu testen. Dabei ließe sich leicht die Stabilität der Genexpression verfolgen und die Lokalisation der GFP exprimierenden Zellen. Gleichzeitig könnte man erkennen, ob die mit rAAV-2 transduzierten und mit MG 132 oder AG 1478 behandelten Zellen ein onkogenes Potential zeigen, worauf bisher nichts hindeutet, oder sich andere Pathologien gehäuft zeigen.

V. FACS-Analysen

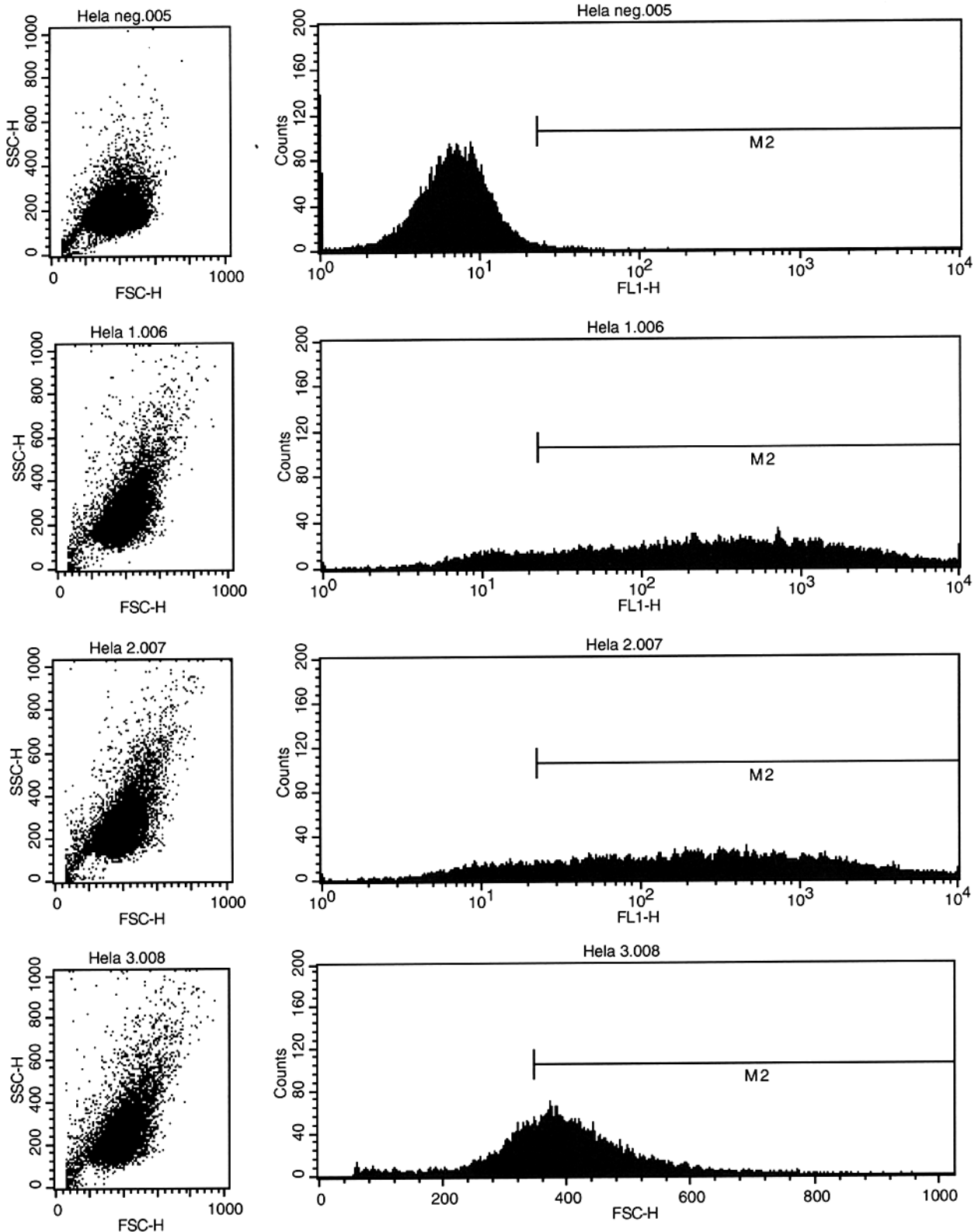
Transduktion von HeLA-Zellen und Keratinozyten



Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 7 nach Transduktion:
In der ersten Messung ist die Negativkontrolle gezeigt, die anderen 3 Messungen zeigen drei mit rAAV-2 transduzierte Keratinozytenkulturen

V. FACS-Analysen

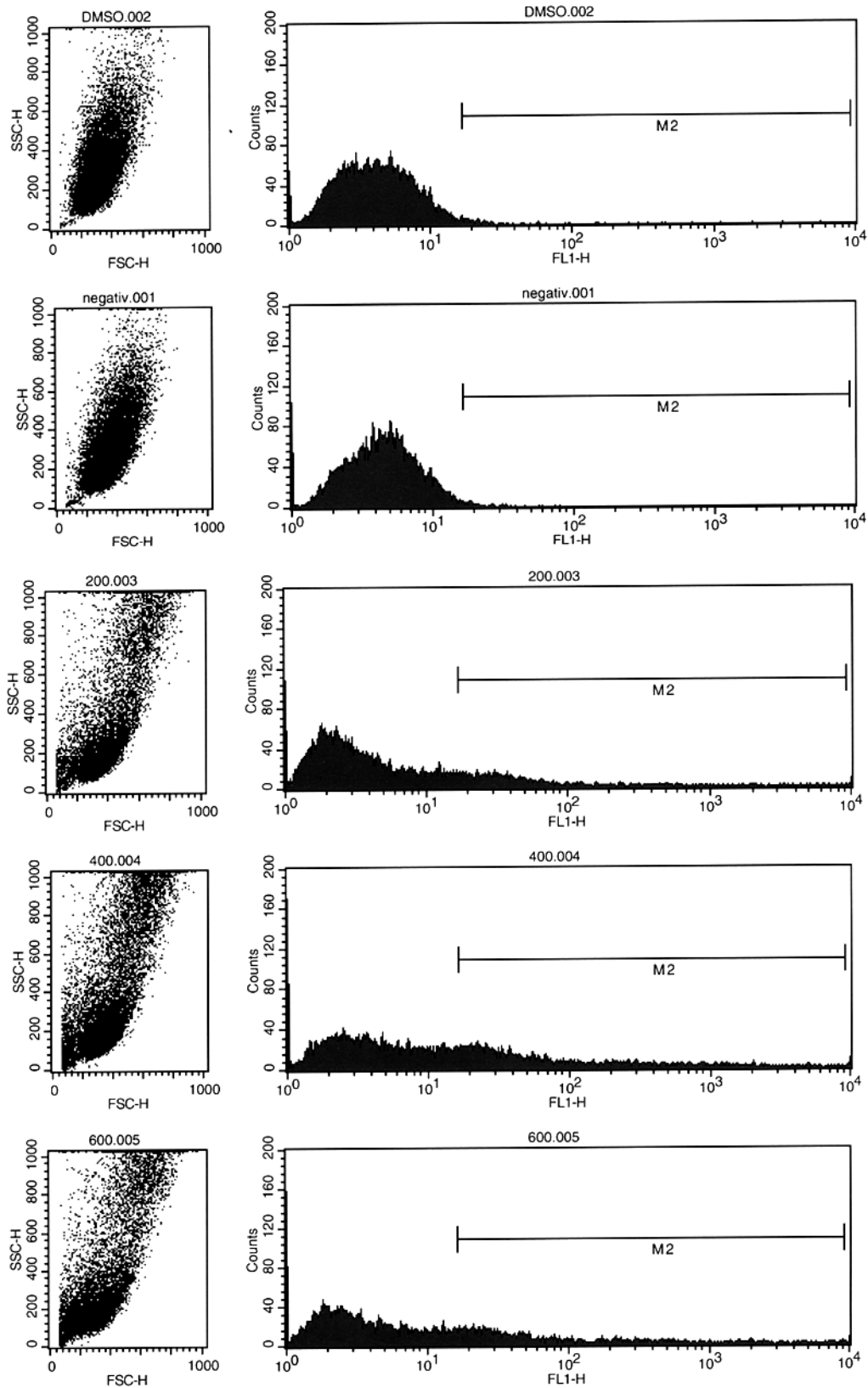
Transduktion von HeLa-Zellen und Keratinozyten



Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 7 nach Transduktion:
In der ersten Messung ist die Negativkontrolle gezeigt, die anderen 3 Messungen zeigen drei mit rAAV-2 transduzierte HeLa-Zellkulturen

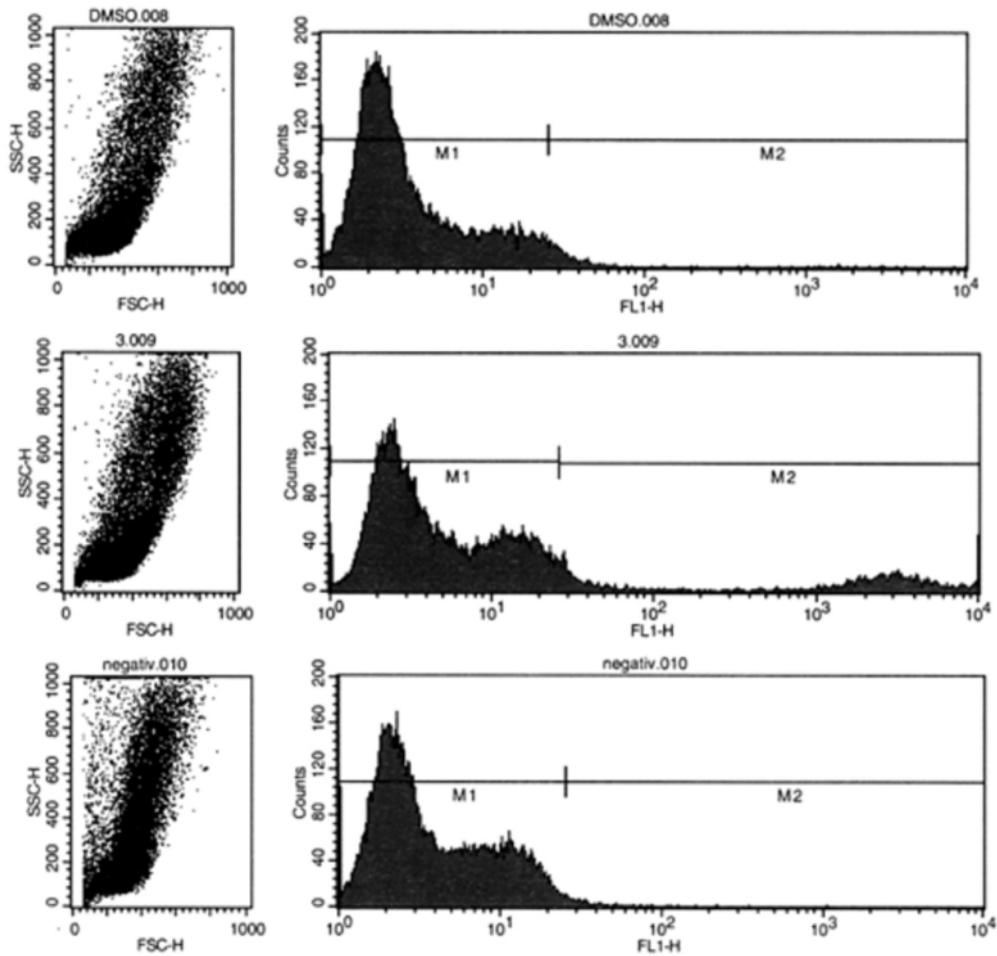
V. FACS-Analysen

Transduktionssteigerung durch MG 132



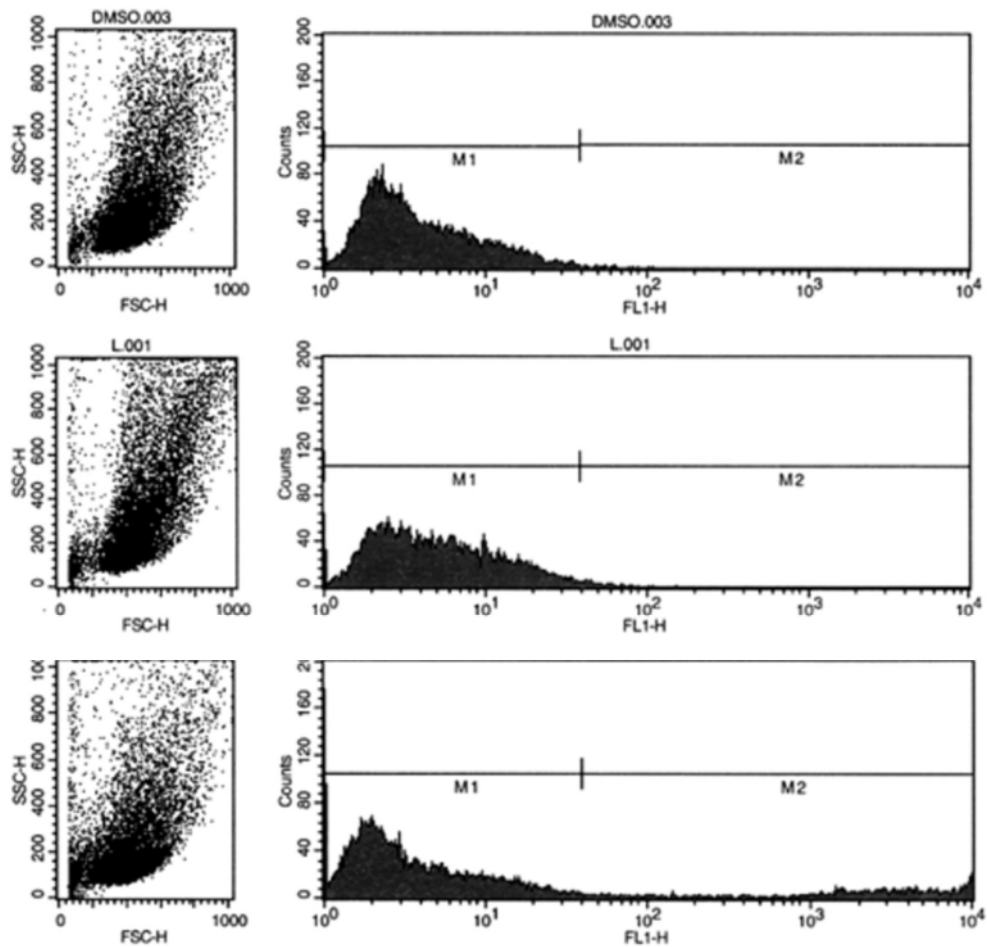
In den ersten beiden Messung sind die Negativkontrollen ohne MG132 Behandlung gezeigt, die anderen 3 Messungen zeigen drei mit MG 132 in Konzentrationen von 200 bis 600 nm behandelte Keratinozytenkulturen

Transduktionssteigerung durch AG 1478



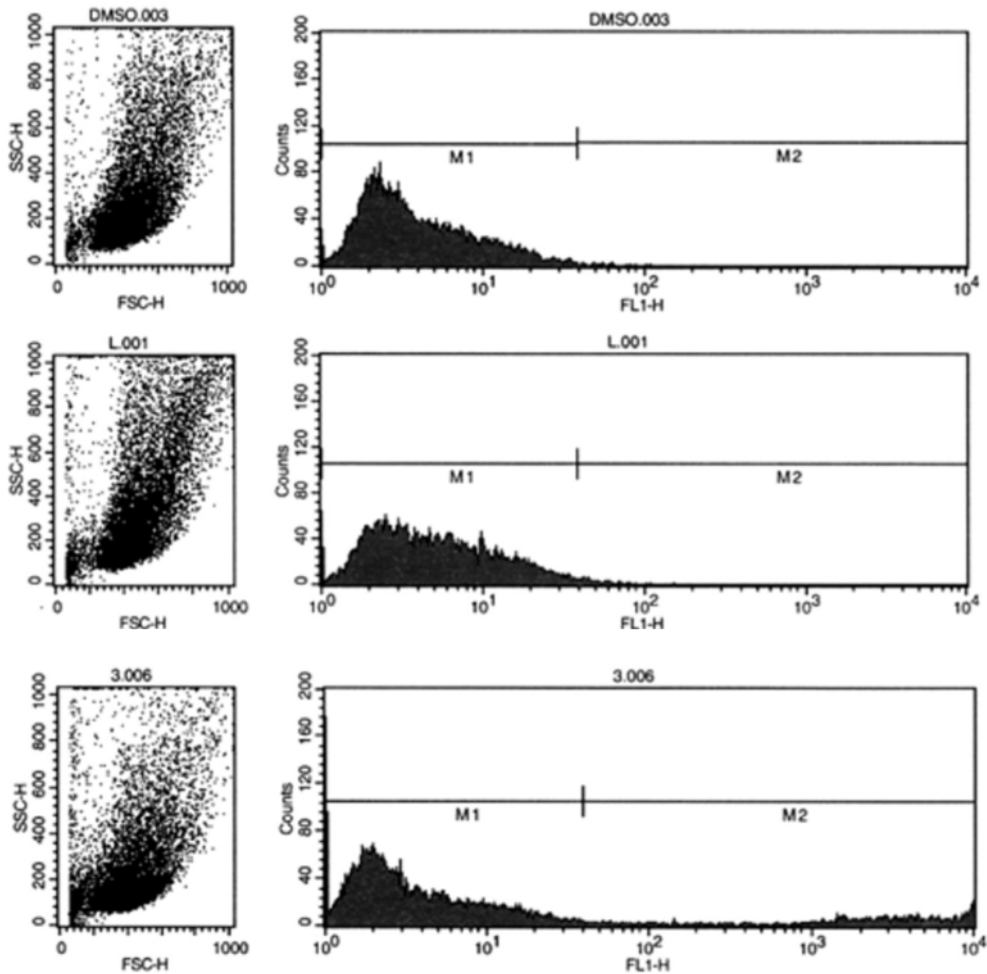
**Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 28 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen**

Transduktionssteigerung durch AG 1478



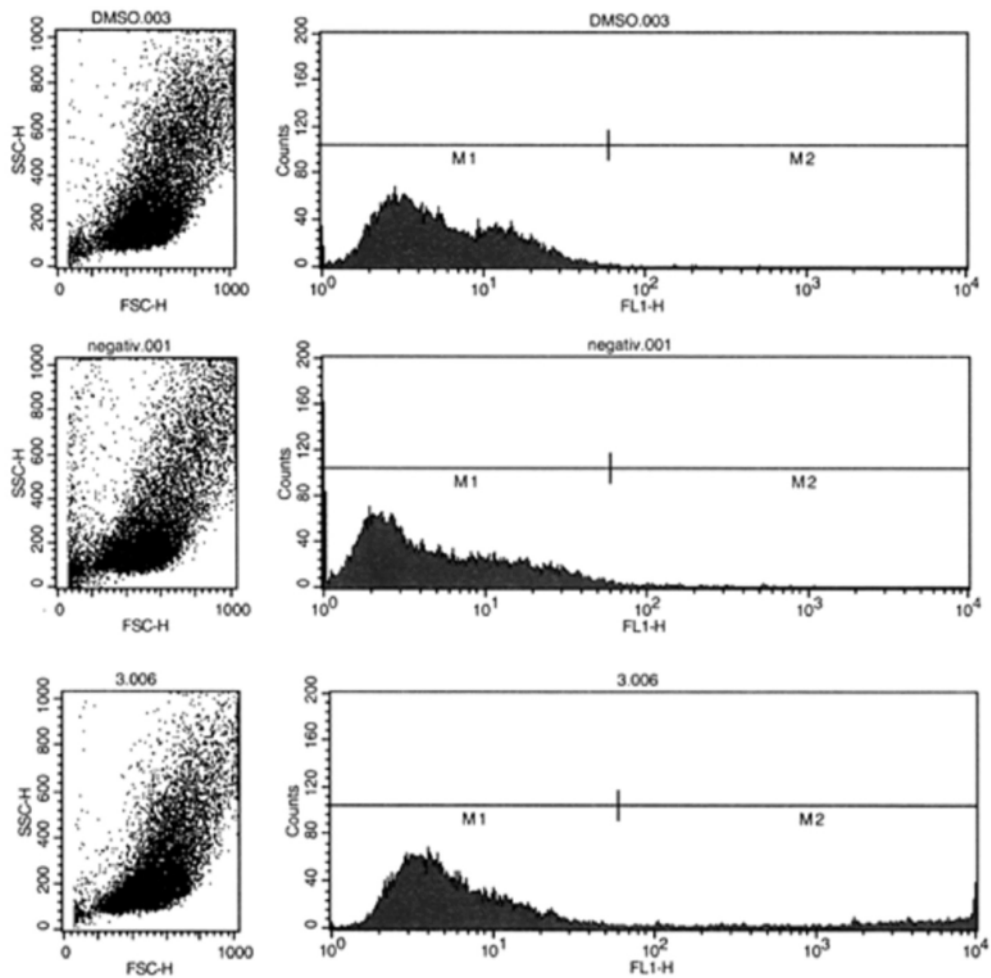
Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 38 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen

Transduktionssteigerung durch AG 1478



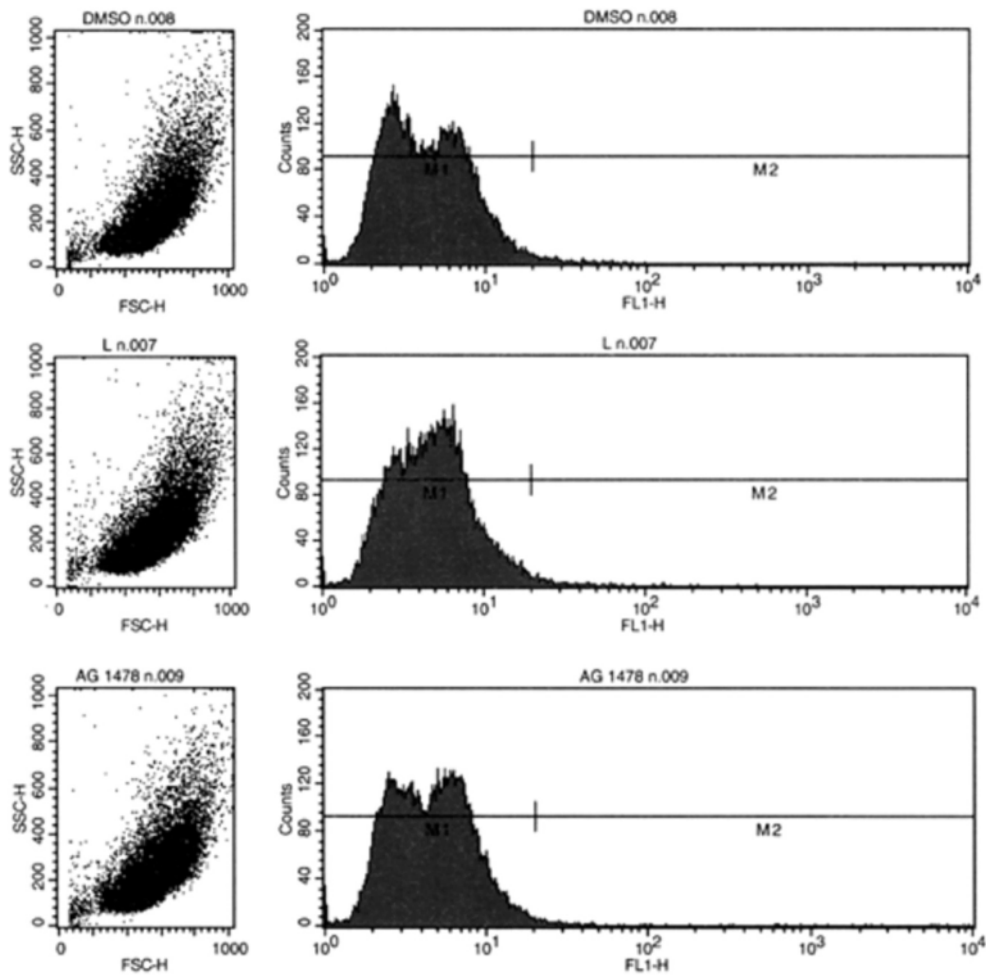
**Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 38 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen**

Transduktionssteigerung durch AG 1478



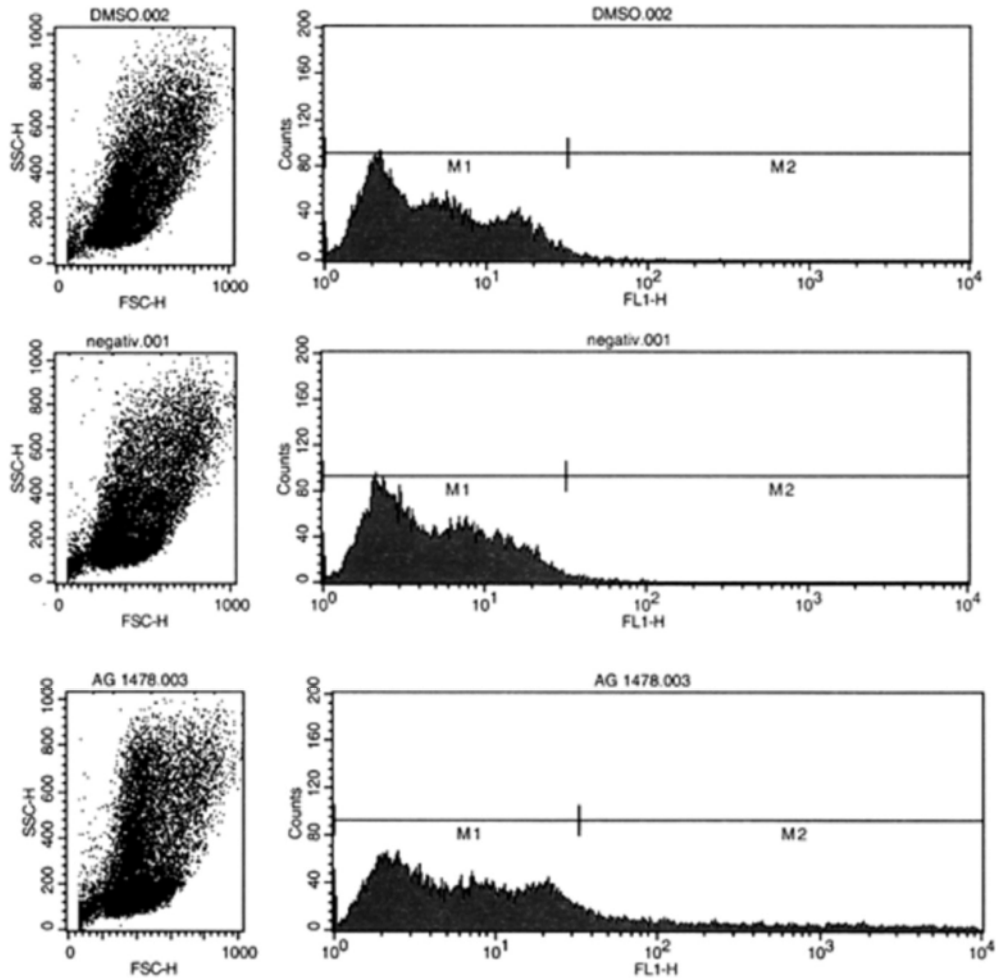
**Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 45 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen**

Transduktionssteigerung durch AG 1478



**Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 17 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen**

Transduktionssteigerung durch AG 1478



**Messung der Anzahl GFP exprimierender Zellen an Tag 52 nach Transduktion:
In der ersten Messung sind die mit 100µm AG 1478 behandelten Keratinozyten gezeigt,
in den folgenden die beiden Negativkontrollen**

VI. Literaturverzeichnis

- Adams J (2002) **Development of the proteasome inhibitor PS-341.** The Oncologist 7: 9-16
- Albers KM, Setzer RW, Taichman LB (1986) **Heterogeneity in the replicating population of cultured human epidermal keratinocytes.** Differentiation 31: 134-140
- Alexander IE, Russel DW, Miller AD (1994) **DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors.** J Virol 68: 8282-8287
- Allen C, Miller CA, Nickoloff JA (2003) **The mutagenic potential of a single DNA double strand break in a mammalian chromosome is not influenced by transcription.** DNA Repair 2: 1147-1156
- Almond JB, Cohen GM (2002) **The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy.** Leukemia 16: 433-443
- Anson DS (2004) **The use of retroviral vectors for gene therapy – what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery.** Genet vaccines ther 2: 9-24
- Atchison RW, Casto BC, Hammond WMcD (1965) **Adenovirus-associated defective virus particles.** Science 149: 754-756
- Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) **Current protocols in molecular biology.** Jon Wiley & Sons, New York, USA
- Barrandon Y, Green H (1987) **Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication.** Proc Natl Acad Sci USA 84: 2302-2306
- Ben-Bassat H, Rosenbaum-Mitrani S, Hartzstark Z, Levitzki R, Chaouat M, Shlomai Z, Klein BY, Kleinberger-Doron N, Gazit A, Tsvieli R, Levitzki A (1999) **Tyrphostins that suppress the growth of human papilloma virus 16-immortalized keratinocytes.** J Pharmacol Exp Ther 290: 1442-1457
- Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC (2004) **Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanism.** Gene Ther 11 Suppl 1: 10-17
- Berns KI, Giraud C (1996) **Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy.** Springer Verlag Berlin Heidelberg 1996
- Birnboim HC, Doly J (1983) **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** Nucleic Acids Res 7: 1513-1522
- Blacklow NR, Hoggan Md, Rowe WP (1968) **Serological evidence for human infection with adenovirus-associated viruses.** JNCI 40: 319-327
- Blacklow NR, Hoggan MD, Sereno MS, Brandt CD, Kim HW, Parrot RH, Chanock RM (1971) **A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infections in infants and children.** Am J Epidemiol 94: 359-366

VI. Literaturverzeichnis

- Blaese RM (1993) **Development of gene therapy for immunodeficiency: Adenosin Deaminase Deficiency.** Ped Res 33: 49-55
- Boudjelal M, Wang Z, Voorhees JJ, Fisher GJ (2000) **Ubiquitin/Proteasome pathway regulates level of retinoic acid receptor γ and retinoid x receptor α in human keratinocytes.** Cancer Res 60: 2247-2252
- Boyce ST, Ham RT (1983) **Calcium-regulated differentiation of normal human keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture.** J Invest Dermatol 81: 33-40
- Boyce ST (1994) **Epidermis as a secretory tissue.** J Invest Dermatol 102: 8-10
- Braun-Falco M, Hallek M (1998) **Hautgentherapie – Perspektiven des Gentransfers in Keratinozyten.** Hautarzt 49: 536-544
- Braun-Falco M, Doenecke A, Smola H, Hallek M (1999) **Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors.** Gene Ther 2: 291-297
- Brocksted D, Podsakoff G, Fong L, Kurtzmann G, Mueller-Ruchholtz W, Engleman E (1999) **Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration.** J Appl Biomat 92: 67-75
- Buller RML, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981) **Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication.** J Virol 40: 241-247
- Casto BC, Goodheart CR (1972) **Inhibition of adenovirus transformation in vitro by AAV-1.** Proc Soc Exp Biol Med 140: 72-78
- Chang L-S, Shy J, Shenk T (1989) **Adeno-associated virus p5 promoter contains an adenovirus E1A inducible element and a binding site for the mayor late transcription factor.** J Virol 63: 3479-3488
- Chang L-S, Shenk T (1990) **The adenovirus DNA binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters.** J Virol 64: 2103-2109
- Check E (2003) **Second cancer case halts gene therapy trials.** Nature 421: 305
- Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, Barcova M, Cannon PM, Mazurek C, Woodley DT (2002) **Restoration of Type VII Collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa.** Nat Genet 32: 670-675
- Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell M, Hughes J, Zoltick P, Wilson J (2000) **Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle.** J Virol 74: 2420-2425
- Choate KA, Khavari PA (1997) **Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo.** Hum Gene Ther 8: 895-901

VI. Literaturverzeichnis

- Coffey R Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR (1987) **Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes.** Nature 328: 817-820
- Cook PW, Pittelkow MR, Shipley GD (1991) **Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes.** J Cell Physiol 146: 277-289
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) **Structure and functions of the 20s and 26s proteasoms.** Annu Rev Biochem 65: 801-807
- Cross SE, Roberts MS (1999) **Defining a model to predict the distribution of topically applied growth factors and other solutes in excisional full thickness wounds.** J Invest Dermatol 112: 36-41
- Crystal RG (1995) **Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.** Science 270: 404-410
- Cukor G, Blacklow NR, Kibrick S, Swan IC (1975) **Effects of adeno-associated virus on cancer expression by herpesvirus-transformed hamster cells.** JNCI 55: 957-959
- Davidson JM, Krieg TH, Eming S (2000) **Particle mediated gene therapy of wounds.** Wound Repair Regen 8: 452-459
- De la Maza LM; Carter BJ (1981) **Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA.** JNCI 67: 1323-1326
- De Luca M, Pellegrini G (1997) **The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy.** Gen Ther 4: 381-383
- Descamps V, Blumenfeld N, Bcuzard Y, Perricaudet M (1996) **Kerainocytes as a target for gene therapy. Sustained production of erythropoietin in mice by human keratinocytes transduced with an adenoassociated virus vector.** Arch Dermatol 132: 1207-1211
- Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T, Sands MS (2001) **Observed incidence in tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors.** Gene Ther 8: 1343-1346
- Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O (2001) **Intracellular trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation.** J Virol 75: 1824-1833; 1824
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF (2000) **Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus.** J Clin Invest 105: 1573-1587
- During MJ, Samulski RJ, Elsworth JD, Kaplitt MG, Leone P, Xiao X, Li J, Freese A, Taylor JR, Roth RH, Sladek Jr. JR, O'Malley KL, Redmond Jr. De (1998) **In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector.** Gene Ther 5: 820-827

VI. Literaturverzeichnis

- Erles K, Rohde V, Thaele M, Roth S, Edler L, Schlehofer JR (2001) **DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples.** Hum Reprod 16: 2333-2337
- Felts K, Rogers B, Chen K, Ji H, Sorge J, Vaillancourt P (2001) **Recombinant *Renilla Reniformis* GFP displays low toxicity.** Stratagene Strategies 13: 85-87
- Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM (1997) **Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy.** Nat Med 3: 306-312
- Flint J, Shenk T (1989) **Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator.** Annu Rev Genet 23: 141-161
- Fox JL (2003) **FDA panel recommends easing gene therapy trials limits.** Nat Biotechnology 21: 344-345
- Fritsch P (2004) **Aufbau und Funktionen der Haut.** Dermatologie Venerologie 2. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Kapitel 1: 4-42, Kapitel 13
- Gallico GGI, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H (1984) **Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium.** N Engl J Med 311: 448-451
- Gambardella L, Barrandon Y (2003) **The multifaceted adult epidermal stem cell.** Curr Opin Cell Biol 15: 771-777
- Ghazizadeh S, Harrington R, Taichman LB (1999) **In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: Implications for cutaneous gene therapy.** Gene Ther 6: 1267-1275
- Ghazizadeh S, Taichman LB (2000) **Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy.** Hum Gene Ther 11: 2247-2251
- Ghazizadeh S, Kalish RS, Taichman LB (2000) **Immune-mediated loss of transgene expression in skin: implications for cutaneous gene therapy.** Mol Ther 7: 296-303
- Gibbs S, Vicanovà J, Valstar D, Kempenaar J, Ponc M (1997) **Culture of reconstructed epidermis in a defined medium at 33°C shows a delayed epidermal maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum.** Arch Dermatol Res 289: 585-595
- Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R (1977) **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** Gen Virol 36: 59-74
- Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt J (1998) **Novel tools for production and purification of recombinant AAV vectors.** Hum Gene Ther 9: 2745-2760
- Grimm D, Kern A, Pawlita M, Ferrari F, Samulski R, Kleinschmidt J (1999) **Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2.** Gene Therapy 6: 1322-1330

VI. Literaturverzeichnis

- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) **Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution.** Nature 386: 463-471
- Gruss CJ, Satyamoorthy K, Berking C, Lininger J, Nesbit M, Schaidler H, Liu ZJ, Oka M, Hsu MY, Shirakawa T, Li G, Bogenrieder T, Cameliet P, El-Deiry WS, Eck SL, Rao JS, Baker AH, Bennet JT, Crombleholm TM, Veazquez O, Karmacharya J, Margolis DJ, Wilson JM, Detmar M, Skobe M, Robbins PD, Buck C, Herlyn M (2003) **Stroma formation and angiogenesis by overexpression of growth factors, cytokines and proteolytic enzymes in human skin grafted to SCID mice.** J Invest Dermatol 120: 683-692
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay J-P, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2002) **Sustained Correction of X-linked sever combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy.** New Eng J Med 346: 1185-1193
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier FBS, Bouneaud C, Hue C, De Villartay J-P, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003) **A serious adverse event after successful gene therapy for x-linked severe combined immunodeficiency.** New Eng J Med 348: 255-256
- Halbert CL, Standaert TA, Aitken ML, Alexander IE, Russel DW, Miller AD (1997) **Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: Efficiency, persistence, and readministration.** J Virol 71: 5932-5941
- Harding KG, Morris HL, Patel GK (2002) **Healing chronic wounds.** BMJ 324: 160-163
- Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, Damm D, Yoshikawa K, Taniguchi N (1994) **Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes.** J Biol Chem 269: 20060-20066
- Hengge UR, Mirmohammadsadegh A (2000) **Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis.** Mol Ther 3: 188-194
- Hermonat PL, Labow MA, Wright R, Berns KI, Muzyczka N (1984) **Genetics of adeno-associated virus: Isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants.** J Virol 51: 329-339
- Hermonat PL, Muzyczka N (1984) **Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells.** Proc Natl Acad Sci USA 81: 6466-6470
- Hermonat PL (1989) **The adeno-associated virus REP78 gene inhibits cellular transformation by bovine papillomavirus.** Virology 172: 253-261
- Hochwald SN, Lind DS, Malaty J, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, MacKay SL (2003) **Antineoplastic therapy in colorectal cancer through proteasome inhibition.** Am Surg 69: 15-23

VI. Literaturverzeichnis

Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966) **Studies of small DNA viruses found in adenovirus preparations: physical, biological and immunological characteristics.** Proc Natl Acad Sci USA 91: 8915-8919

Hoggan MD (1970) **Adeno-associated viruses.** Progr Med Virol 12: 211-239

Holley, RW (1968) **Alanine Transfer RNA.** Nobel lectures, Physiology or Medicine 1963-1970, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1972

Holzmann H, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J, Bernd A (1994) **Zell- und Gewebekulturmodelle in der Dermatologie.** Hautarzt 45: 304-312

Im DS, Muzyczka N (1990) **Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats.** J Virol 63: 2011-2015

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ (1969) **Murine sarcoma and leukaemia viruses: Assay using clonal lines of contact inhibited mouse cells.** J Virol 4: 549-553

Jones PH, Watt FM (1993) **Separation of human epidermal stem cells from transient amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression.** Cell 73: 713-724

Jones PH, Harper S, Watt FM (1995) **Stem cell patterning and fate in human epidermis.** Cell 80: 83-93

Jost M, Class R, Cari C, Jensen PJ, Rodeck U (1999) **A central role of Bcl-X_L in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands.** J Invest Dermatol 112: 443-449

Kaiser J (2003) **Gene Therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial.** Science 299: 495

Kay MA, Russel DW (2001) **Gene Therapy.** Harrison's Principles of Internal Medicine 15th Edition, Mc Graw Hill Companies: 413-414

Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ (1996) **Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein.** Proc Natl Acad Sci USA 93: 14082-14087;

Khavari PA (2000) **Genetic correction of inherited epidermal disorders.** HumGene Ther 11: 2277-2282

Kim JP, Zhang K, Chen JD, Kramer RH, Woodley DT (1994) **Vitronectin-driven human keratinocyte locomotion is mediated by the alpha v beta 5 integrin receptor.** J Biol Chem 269: 26926-26932

Kim D, Kim SH, Li GC (1999) **Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression.** Biochem Biophys Res Commun 254: 264-268

VI. Literaturverzeichnis

- Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC (2003) **Occurrence of leukaemia following gene therapy of x-linked SCID.** Nat Rev Cancer 3: 477-488
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocci M, Berns KI (1990) **Site-specific integration by adeno-associated virus.** Proc Natl Acad Sci USA 87:2211-2215
- Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI (1991) **Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter.** Genomics 10: 831-834
- Kotin RM, Linden RM, Berns KI (1992) **Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination.** EMBO J 11: 5071-5078
- Labow MA, Hermonat PL, Berns KI (1986) **Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome.** J Virol 60: 251-258
- Laughlin CA, Jones N, Carter BJ (1982) **Effects of deletion in adenovirus region 1 genes upon replication of adeno-associated virus.** J Virol 41: 868-876
- Leigh IM, Watt FM (1994) **Keratinocyte Methods.** Cambridge University Press, Cambridge Great Britain
- Lenz HJ (2003) **Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors.** Cancer Treat Rev 29: 41-48
- Limat A, Hunziker T (1996) **Cultivation of keratinocytes from the outer root sheath of human hair follicles.** Methods in Molecular Medicine 21-31, Human Cell Culture Protocols, edited by Jones GE, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA
- Liu CW, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ (2003) **Endoproteolytic activity of the proteasome.** Science 299: 408-411
- Liu XG, Liang NC (2002) **Inhibitory effect and kinetic analysis of tyrphostin AG 1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme.** Acta Pharmakol Sin 23: 556-561
- Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R (1995) **Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution.** Science 268: 533-539
- Lu B, Federoff HJ, Wang Y, Goldsmith LA, Scott G (1997) **Topical application of viral vectors for epidermal gene transfer.** J Invest Dermatol 108: 803-808
- Lundquist K, Schmidtchen A (2001) **Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers.** Br J Dermatol 144: 254-259
- Magae J, Illenye S, Tejima T, Chang YC, Mitsui Y, Tanaka K, Omura S, Heintz NH (1997) **Transcriptional squelching by ectopic expression of E2F-1 and p53 is alleviated by proteasome inhibitors MG-132 and lactacystin.** Oncogene 15: 759-769

VI. Literaturverzeichnis

- Magnaldo T, Sarasin A (2004) **Xeroderma Pigmentosum: From Symptoms and Genetics to Gene-Based Skin Therapy.** *Cells Tissues Organs* 177: 189-198
- Mah C, Qing K, Khuntirat B, Ponnazhagan S, Wang XS, Kube DM, Yoder MC, Srivastava A (1998) **Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Role of epidermal growth factor receptor protein tyrosin kinase in transgene expression.** *J Virol* 72: 9835-9843
- Mailhes JB, Hilliard C, Lowery M, London SN (2002) **MG-132, an inhibitor of proteasomes and calpains, induced inhibition of oocyte maturation and aneuploidy in mouse oocytes.** *Cell Chromosome* 1: 2
- Manning WC, Paliard X, Zhou S, Pat Bland M, Lee AY, Hong K, Walker CM, Escobedo JA, Dwarki V (1997) **Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus typ 2 glycoproteins B and D.** *J Virol* 71: 7960-7962
- Manning WC, Zhou S, Bland M, Escobedo JA, Dwarki V (1998) **Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors.** *Hum Gene Ther* 9: 477-485
- Marchese C, Sorice M, De Stefano C, Frati L, Torrisi MR (1997) **Modulation of keratinocyte growth factor receptor expression in human cultured keratinocytes.** *Cell Growth Differ* 8: 989-997
- Marshall E (1999) **Gene therapy death prompts review of adenovirus vectors.** *Science* 286: 2244-2245
- Marshall E (2002) **Gene Therapy: What to do when clear success comes with an unclear risk?** *Science* 298: 510-511
- Marshall E (2003) **Gene Therapy: Second Child in French trial is found to have leukaemia.** *Science* 299: 320
- Mathor MB, Ferarri G, Dellambra E, Cilli M, Mavilio F, Cancedda R, De Luce M (1996) **Clonal Analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture.** *Pro Natl Acad Sci USA* 93: 10371-10376
- Mayor HD, Houlditch GS, Mumford DM (1973) **Influence of adeno-associated virus on adenovirus induced tumors in hamsters.** *Nature New Biol* 214: 44-46
- McCarty DM, Ryan JH, Zoltukhin S, Zhou X, Muzyczka N (1994) **Interaction of the Adeno-associated virus rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat.** *J Virol* 68: 4998-5006
- McCarty DM, Young Jr SM, Samulski RJ (2004) **Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and recombinant AAV Vectors.** *Annu Rev Genet* 38: 819-845
- McLaughlin SK, Collins P, Hermonat PL, Mucyczka N (1988) **Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures.** *J Virol* 62: 1963-1973
- McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA (1985) **Human cytomegalovirus completely helps adenovirus-associated virus replication.** *Virology* 147: 217-222

VI. Literaturverzeichnis

- Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY (1998) **Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce HSP72. Diverse effects on apoptosis.** *J Biol Chem* 273: 6373-6379
- Meyers C, Mane M, Kokorina N, Alam S, Hermonatt PL (2000) **Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model.** *Virology* 272: 338-346
- Miao CH, Nakai H, Thompson AR, Storm TA, Chiu W, Snyder RO, Kay MA (2000) **Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction.** *J Virol* 74:3793-803
- Miller HI (2000) **Gene therapy on trial.** *Science* 287: 591-592
- Miller DG, Rutledge EA, Russel DW (2002) **Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration.** *Nat Genet* 30: 147-148
- Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982) **The catalog of human cytokeration: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 31: 11-24
- Monahan PE, Samulski RJ (2000) **AAV vectors: is clinical success on the horizon?** *Gene Ther* 7: 24-30
- Morgan RA, Anderson WF (1993) **Human gene therapy.** *Annu Rev Biochem* 62: 191-217
- Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, Carter CS, Garabedian EK, Alleyne M, Brown M, Bernstein W, Schurmann SH, Fleisher TA, Leitman SF, Dunbar CE, Blaese RM, Candotti F (2003) **Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial.** *Blood* 101: 2563-2569
- Muzyczka N. (1992) **Use of Adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells.** *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129
- Nanney LB, Mc Kanna JA, Stoscheck CM, Carpenter G, King LE (1984) **Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis.** *J Invest Dermatol* 82: 165-169
- Nanney LB, Stoscheck CM, King LJr, Underwood RA, Holbrook KA (1990) **Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin.** *J Invest Dermatol* 94: 742-748
- Nevins JR (1982) **Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A product.** *Cell* 29: 213-220
- Nicklin SA, Büning H, Dishart KL, de Alwis M, Girod A, Hacker U, Tharsher AJ, Ali RR, Hallek M, Baker AH (2001) **Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells.** *Mol Ther* 4: 174-181

VI. Literaturverzeichnis

Onodera M, Ariga T, Kawamura M, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese MR, Sakiyama Y. (1998) **Successful peripheral T-Lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immunodeficiency caused by adenosin deaminase deficiency.** Blood 91: 30-36

Onodera M, Nelson DM, Sakiyama Y, Candotti F, Blaese MR (1999) **Gene therapy for severe combined immunodeficiency caused by adenosin deaminase deficiency: Improved retroviral vectors for clinical trials.** Acta Haematol 101: 89-96

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y (2001) **Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells.** Cell 104: 233-245

Ostrove JM, Duckworth DH, Berns KI (1981) **Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus.** Virology 113: 521-533

Parks WP, Boucher DW, Melnick JL, Taber LH, Yow MD (1970) **Seroepidemiological ecological studies of the adenovirus-associated satellite viruses.** Infect Immun 2: 716-722

Peus D, Hamacher L, Pittelkow MR (1997) **EGF-Receptor tyrosin kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation.** J Invest Dermatol 109: 751-756

Pittelkow MR, Cook PW, Shipley GD, Derynck R, Coffey RJr (1993) **Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor occupancy.** Cell Growth Differ 4: 513-521

Ponnazhagan S, Wang XS, Woody MJ, Luo F, Kang LY, Nallari ML, Munshi NC, Zhou SZ, Srivastava A (1996) **Differential expression in human cells from the p6 promoter from human Parvovirus B19 following plasmid transfection and recombinant adeno-associated virus 2 (AAV) infection: human megakaryocytic leukaemia cells are non-permissive for AAV infection.** J Gen Virol 77: 1111-1122

Ponnazhagan S, Mukherjee P, Wang XS, Qing K, Kube DM, Mah C, Kurpad C, Yoder MC, Srour EF, Srivastava A (1997) **Adeno associated virus type 2-mediated transduction in primary human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells: donor variation and correlation of transgene expression with cellular differentiation.** J Virol 71 : 8262-8267

Ponnazhagan S, Weigel KA, Raikwar SP, Mukherjee P, Yoder MC, Srivastava A (1998) **Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes.** J Virol 72: 5224-5230

Powell TJ, Ben-Bassat H, Klein BY, Chen H, Shenoy N, McCollough J, Narog B, Gazit A, Harzstark Z, Chaouat M, Levitzki R, Tang C, McMahon J, Shawver L, Levitzki A (1999) **Growth inhibition of psoriatic keratinocytes by quinazoline tyrosine kinase inhibitors.** Br J Dermatol 141: 802-810

Qing K, Khuntirat B, Mah C, Kube DM, Wang XS, Ponnazhagan S, Zhou S, Dwarki VJ, Yoder MC, Srivastava A (1997) **Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-**

binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissue in vivo. J Virol 72: 1593-1599

Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki VJ, Srivastava A (1999) **Human fibroblast growth factor receptor 1 is a coreceptor for infection by adeno-associated virus type 2.** Nat Med 5: 71-77

Rabinowitz JE, Samulski RJ (2000) **Building a better vector: the manipulation of AAV virions.** Virology 278: 301-308

Redemann BE, Mendelson E, Carter BJ (1989) **Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection.** J Virol 63: 873-882

Rheinwald JG, Green H (1975) **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes.** Immunol Today 15: 464-469

Rheinwald JG, Green H (1975) **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.** Cell 6: 331-334

Rheinwald JG, Green H (1977) **Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes.** Nature 265: 421-424

Richardson P (2003) **Clinical update: proteasome inhibitors in hematologic malignancies.** Cancer Treat Rev 29: 33-39

Rikamura K, Molès J-P, Watt FM (1997) **Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture.** Exp Dermatol 6: 214-221

Rodeck U, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL, Jensen PJ (1997) **EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival.** J Cell Sci 110: 113-121

Russel DW, Miller AD, Alexander IE (1994) **Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase.** Proc Natl Acad Sci USA 91: 8915-8919

Russel DW, Alexander IE, Miller AD (1995) **DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus.** Proc Natl Acad Sci USA 92: 5719-5723

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) **Molecular cloning: A laboratory manual.** 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA

Samulski RJ, Chang L-S, Shenk T (1987) **A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its cause to study viral replication.** J Virol 61: 3096-3101

Samulski RJ, Chang L-S, Shenk T (1989) **Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression.** J Virol 63: 3822-3828

VI. Literaturverzeichnis

- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA (1991) **Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19.** *Embo J* 10: 3941-3950
- Samulski RJ, Sally M, Muzyczka N (1999) **Adeno-associated viral vectors: The development of Human Gene Therapy.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 131-172
- Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF (2000) **Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation.** *J Virol* 74: 9184-9196
- Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, Engelhardt JF (2001) **Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy.** *Curr Gene Ther* 1: 137-147
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) **Studies of the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma from the cervix.** *J Exp Med* 97: 695-710
- Schlehofer JR, Ehrbar M, zur Hausen H (1986) **Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus.** *Virol* 152: 110-117
- Sekiya T, Takeya T, Brown EL, Belagaje R, Contreras H, Fritz HJ, Gait MJ, Lees RG, Ryan MJ, Kohrana HG, Norris KE (1979) **Total synthesis of a tyrosine suppressor transfer RNA gene. XVI. Enzymatic joinings to form the total 207-base pair-long DNA.** *JBC* 254: 5787-5801
- Smith AD, Collaco RF, Trempe JP (2003) **Enhancement of recombinant adeno-associated virus type 2-mediated transgene expression in a lung epithelial cell line by inhibition of the epidermal growth factor receptor.** *Nature* 77: 6394-6404
- Snyder RO, Flotte TR (2002) **Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors.** *Cur Opin Biotech* 13: 418-423
- Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown MA, Winther B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA (1997) **Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors.** *Nat Genet* 16: 270-276
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983) **Nucleotide sequence and organisation of the adeno-associated virus 2 genome.** *J Virol* 45: 555-564
- Summerford C, Samulski R (1998) **Membrane-associated Heparan Sulfate Proteoglycan is a receptor for Adeno-associated virus type 2 virions.** *J Virol* 72: 1438-1445
- Summerford C, Samulski R (1999) **Viral receptors and vector purification: new approaches for generating clinical grade reagents.** *Nature Med* 5: 587-588

VI. Literaturverzeichnis

- Tani H, Morris RJ, Kaur P (2000) **Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype.** Proc Natl Acad Sci USA 97: 10960-10965
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM (2000) **Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis.** Cell 104: 233-245
- Tratschin D, Tal J, Carter BJ (1986) **Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product.** Mol Cell Biol 6: 2884-2894
- Trent RJA, Alexaneder IE (2004) **Gene therapy: applications and progress towards the clinic.** Intern Med J 34: 621-625
- Verma IM, Somia N (1997) **Gene therapy – promises, problems and prospects.** Nature 389: 239-242
- Watt FM (1988) **Proliferation and terminal differentiation of human epidermal keratinocytes in culture.** Proc Asoc Am Physicians 111: 206-210
- Watt FM (1989) **Terminal differentiation of epidermal keratinocytes.** Curr Opin Cell Biol 1: 1107-1115
- Weber M, Möller K, Welzeck M, Schorr J (1995) **Effect of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eucaryotic cells.** Bio Techniques 19: 930
- Wiley and Sons Ltd (2005) **Clinical Trial Web site.** www.wiley.co.uk/genmed/clinical
- Wu BJ, Hurst HC, Jones NC, Morimoto RJ (1986) **The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcription of the cellular human HSP70 gene.** Mol Cell Biol 6: 2994-2999
- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1996) **Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector.** J Virol 70: 8098-8108
- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) **Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.** J Virol 72: 2224-2232
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM (1999) **Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1.** J Virol 73: 3994-4003
- Xiao W, Chirmule N, Schnell M, Tazelaar J, Hughes J, Wilson J (2000) **Route of administration determines induction of T-cell-independent humoral responses to adeno-associated virus vectors.** Mol Ther 1: 323-329
- Yan M, Liu DL, Chua YL, Chen C, Lim YL (2002) **Tyrosin kinase inhibitors suppress α_1 -adrenoceptor mediated contraction in human radial, internal mammary arteries and saphenous vein.** Neurosci Let 333: 171-174
- Yacobson B, Koch T, Winocour E (1987) **Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus.** J Virol 61: 972-981

VI. Literaturverzeichnis

Yalkinoglu AO, Heilbronn R, Burkle A, Schlehofer JR, zur Hausen H (1988) **DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress.** Cancer Res 48: 3123-3129

Yao F, Eriksson E (2000) **Gene therapy in wound repair and regeneration.** Wound Rep Reg 8: 443-451

Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N (1999) **Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield.** Gene Ther 6: 973-985

VII. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2001 bis April 2004 am Zentrum für Allergie und Umwelt an der Dermatologischen Klinik am Biederstein erstellt.

Herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. H. Behrendt und Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring für die Möglichkeit am Zentrum für Allergie und Umwelt zu forschen und für die freundliche Unterstützung während der Arbeit.

Herrn PD. Dr. M. Braun-Falco möchte ich danken für die Anleitung und beständige freundliche und unkomplizierte Unterstützung vor allem bei allen Problemen im Laufe der Forschungsarbeit und natürlich bei der Ausarbeitung.

Frau A. Rizos möchte ich ganz besonders danken für die geduldige Einweisung in die verschiedenen Arbeitstechniken im Labor und für die Freundschaft, dank derer die Arbeit im Labor trotz aller Rückschläge Freude bereitete.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern am Zentrum für Allergie und Umwelt danken, die durch Ihre Tipps einen immer wieder weiterhalfen, wenn die Probleme scheinbar unlösbar waren.

Danken möchte ich auch Frau Dr. H. Büning für ihre Ratschläge und Hilfe vor allem bei der Virusherstellung.

Keinesfalls zu vergessen ist hier die freundliche Hilfe von Dr. Th. Angerpointner ohne dessen bereitwillige Unterstützung diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre.

VIII. Lebenslauf

Name: Angelika Maria Eisenried
Geburtstag: 30.09.1978
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Heinz Richard Eisenried, MDgt.
Waltraud Maria Theresia Eisenried, geb. Mehlsteibl, OstRin
Geschwister: 2 Brüder

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule an der Manzostr., München
1989 – 1998 Wittelsbacher Gymnasium, München (humanistischer Zweig)
1998 **Abitur mit der Gesamtnote 1,0**
in den Leistungskursen Deutsch und Biologie sowie den Grundkursen Religion
und Latein

Studium

WS 1998/99 Studienbeginn in der Humanmedizin an der Technischen Universität München
08. 2000 Physikum mit der Note 3,0
08. 2001 **1. Staatsexamen mit der Note 2,0**
03. 2004 **2. Staatsexamen mit der Note 2,0**
05. 2005 **3. Staatsexamen mit der Note 1,0**

Praktikas

1998 *Pflegepraktikum* als Health Care Assistant im Pembury Hospital, Pembury,
England (2 Monate)
2001 Famulatur in der *Anästhesiologie* im LKH Villach, Österreich (1 Monat)
2001 Famulatur in der *Inneren Medizin* im Hospital Rosario Vera Zurita, Santa Elena de
Uairen, Venezuela (2 Wochen)
2002 Famulatur in *Allgemeinmedizin* in der allgemeinmedizinischen Praxis Dr. med.

VIII. Lebenslauf

Hanel in München (1 Monat)

- 2002 Famulatur in der *Dermatologie* in der dermatologischen Klinik am Biederstein (1 Monat)
- 2003 Famulatur als Unterassistentin in der *Psychiatrie* im Sanatorium Kilchberg, Schweiz (2 Monate)
- 2003 Famulatur in der *Radiologie* am Universitätskrankenhaus von Cambridge, Großbritannien (1 Monat)

Praktisches Jahr

- 26.04.2004 - *Innere Medizin* im Kenyatta National Hospital, University of Nairobi, Nairobi, Kenia (16 Wochen)
- 16.08.2004 - *Chirurgie* im Hospital Centro de Salud, Universidad Nacional de Tucuman, Tucuman, Argentinien (16 Wochen)
- 03.12.2004 - *Chirurgie* im Hospital Centro de Salud, Universidad Nacional de Tucuman, Tucuman, Argentinien (16 Wochen)
- 06.12.2004 - *Dermatologie* in der Dermatologischen Klinik am Biederstein, München (16 Wochen)
- 25.03.2005

Beruf

Seit 06.2005 Assistenzärztin in der Inneren Medizin am Klinikum Dachau

Angelika Eisenried