

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

*Herstellung und molekulare Charakterisierung stabil transduzierter
Rattenkardiomyoblasten und humaner epithelialer Vorläuferzellen zum nicht-
invasiven Gene imaging: Vergleich von wildtyp und mutanter Herpes Simplex Virus
Typ I Thymidinkinase*

Kathrin Ilg

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
apl. Prof. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 22.07.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Medizin am 17.12.2008
angenommen.

1	Inhaltsverzeichnis	
1.1	Abbildungsverzeichnis	6
1.2	Tabellenverzeichnis	7
1.3	Abkürzungsverzeichnis	8
2	Vorwort	11
3	Einleitung	13
3.1	Gentherapie	13
3.2	Vektoren in der Gentherapie	16
	3.2.1 Nicht-viraler Gentransfer	18
	3.2.2 Viraler Gentransfer	18
3.3	Retroviren	20
	3.3.1 Überblick über Retroviren	20
	3.3.2 Biologie der Retroviren	21
	3.3.2.1 Viruspartikel	21
	3.3.2.2 Genom und Genomaufbau	22
	3.3.2.3 Replikation	26
3.4	Retroviren als Genvektoren	28
	3.4.1 Übersicht über die Genvektoren	28
	3.4.2 Verpackungssysteme	30
	3.4.3 Der retrovirale Vektor pBullet	32
	3.4.4 Vektordesign	34
	3.4.5 Virushüllen	38
3.5	Verwendete Transgene	39
	3.5.1 Übersicht aktueller Reportergene	39
	3.5.2 Green Fluorescent Protein	42
	3.5.3 HSV1 Thymidinkinase	43
	3.5.4 Kombination von Reportergen	47
3.6	Gentransfer in EPC und H9c2	48
	3.6.1 Verwendung von humanen endothelialen Vorläuferzellen in der Gentherapie	48
	3.6.2 Biologie der endothelialen Vorläuferzellen	49
	3.6.3 Gentransfer in Kardiozyten	50
	3.6.4 Biologie der embryonalen Ratten-Kardiomyoblasten (H9c2)	51
4	Zielsetzung der Arbeit	53

5	Molekularbiologische Materialien und Methoden	55
5.1	Für Klonierungen verwendete Plasmide	55
5.2	Bakterienkultur	57
	5.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen	57
	5.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien	57
	5.2.3 Transformation	58
	5.2.4 Plasmidpräparation	58
	5.2.4.1 Analytische Plasmidpräparation	58
	5.2.4.2 Maxi-Präparation Plasmid-DNA	58
	5.2.4.3 Cäsium-Chlorid-Präparation von Plasmiden	59
	5.2.5 Konzentrationsbestimmung gelöster DNA	61
	5.2.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung	61
	5.2.5.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung	61
	5.2.6 Gelelektrophorese	62
	5.2.7 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	63
	5.2.7.1 Analytischer Restriktionsverdau	63
	5.2.7.2 Präparativer Restriktionsverdau	63
	5.2.8 DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen	63
	5.2.9 Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA Ligation von DNA-Fragmenten	64
5.3	Zellbiologische Materialien und Methoden	64
	5.3.1 Verwendete Zelllinien	64
	5.3.2 Methoden der Zellkultur	65
	Medien und Zusätze	65
	Zellpassage	65
	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer	66
5.4	Retrovirale Methoden	67
	5.4.1 Der retrovirale Vektor pBullet	67
	5.4.2 Die Generierung transienter Retrovirus- Produzentenzellen mittels Transfektion	67
	5.4.3 Die Gewinnung retroviraler Überstände	69
	5.4.4 Retrovirale Transduktion	69
5.5	Analyse der Transgenexpression	70
	5.5.1 Fotodokumentation	70
	5.5.2 Durchflusszytometrie	70

5.6	Western Blot	72
	5.6.1 Herstellung von SDS-Page Gelen	72
	5.6.2 Auftrennung der Proben, Transfer und Blotting	74
	5.6.3 Antikörper-Behandlung und Waschen	75
5.7	Northern Blot	76
	5.7.1 Aufbereitung der Proben	76
	5.7.2 Isolierung der Sonden	77
	5.7.3 Auftrennung der Proben und Blotting	77
	5.7.4 Hybridisierung	78
	5.7.5 Entwicklung des Blots	79
5.8	Radioaktive Aufnahme	80
	5.8.1 Vorbereitung der Proben	80
	5.8.2 Radioaktive Behandlung der Proben	80
5.9	Software	81
6	Ergebnisse	82
6.1	Klonierung der retroviralen Vektoren	82
	6.1.1 Klonierung der Vektoren pBulletwTKIeGFP und pBulletmTKIeGFP	82
6.2	Virusproduktion	86
	Generierung stabiler 293T Zelllinien	86
	6.2.1 Analyse der von 293 T Zellen produzierten Virusüberstände	86
	6.2.2 Titerbestimmung der 293T-Zelllinien	90
	6.2.3 Titerbestimmung der EPC und H9c2 Zelllinien	90
	6.2.4 Transduktionseffizienz der EPC und H9c2 Zelllinien	93
6.3	Nachweis der Genexpression auf RNA Ebene: Northern Blot Analyse	96
6.4	Nachweis der Genexpression auf Protein Ebene: Western Blot Analyse	99
6.5	Radioaktive Aufnahme von (14C)FIAU	102
6.6	Analyse der Wachstumskurve	105

7	Diskussion der Ergebnisse	107
7.1	Diskussion der Verwendung von Reportergenen in der Gentherapie von Herzkrankheiten	107
7.2	Diskussion des Gentransfers mittels retroviraler Vektoren	109
7.3	Diskussion der Verwendung von mutanter und wildtyp HSV1- tk	110
7.4	Diskussion der Verwendung von zwei Markergenen EGFP und HSV1-TK	112
7.5	Diskussion der Transduktionseffizienz retroviraler Vektoren im Vergleich zu adenoviralen Vektoren	114
7.6	Diskussion der Hüllspektren	114
7.7	Diskussion der Verwendung von mutanter und wildtyp HSV1-TK	114
7.8	Diskussion der Verwendung von HSV1-TK in vivo	117
8	Ausblick	118
9	Zusammenfassung	121
10	Literaturverzeichnis	124
11	Danksagung	148

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verteilung der klinischen Phasen in der Gentherapie	14
Abbildung 2	Retrovirus	20
Abbildung 3	Genomorganisation der Retroviren	23
Abbildung 4	retroviraler Replikationszyklus	25
Abbildung 5	Vektor p-Bullet	31
Abbildung 6	Darstellung typischer Vektoren	34
Abbildung 7	Schema FIAU und HSV-tk	40
Abbildung 8	Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt	44
Abbildung 9	Ursprung und Differenzierung der NB 1062	46
Abbildung 10	verwendete Plasmide	52
Abbildung 11	Restriktionsverdau	77
Abbildung 12	Vektor pBullet	85
Abbildung 13	Schematische Darstellung der Plasmide	86
Abbildung 14	FACS Analyse	89
Abbildung 15	Titration der H9C2 und EPC	91
Abbildung 16	Titer der verschiedenen Zelllinien	91
Abbildung 17	Infektion der EPC	92
Abbildung 18	Beispiele für die Transduktionseffizienz	94
Abbildung 19	Sondenpräparation	97
Abbildung 20	Northern Blot Analyse	98
Abbildung 21	Western Blot Analyse	100
Abbildung 22	Diagramme zur radioaktiven Aufnahme	103
Abbildung 23	Wachstumskurve	106
Abbildung 24	Verteilung Gentherapie	108
Abbildung 25	Analyse der endothelialen Vorläuferzellen	111
Abbildung 26	Gentypen in gentherapeutischen Studien	119

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vektoren in der Gentherapie	16
Tabelle 2	Einteilung der Retroviren	19
Tabelle 3	verschiedene Reportergene	37
Tabelle 4	Sequenzunterschiede	41
Tabelle 5	Ablauf des Projekts	50
Tabelle 6	verwendete Plasmide	52
Tabelle 7	Transfektionsschema	64
Tabelle 8	Transduktionsschema	65
Tabelle 9	Titer der verschiedenen Zelllinien und Virushüllen	92

1.3 Abkürzungsverzeichnis:

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CA	Viruskapsid
cAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre Desoxyribonuklease
cfu	colony forming unit
ci	Curie
CMV	Cytomegalie Virus
CMV IE	Cytomegalie Virus intermediate early
Da	Dalton
dATP	desoxy Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy Cytosintriphosphat
DdHO	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTPdesoxy	Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy Thymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
env	envelope, Hüllprotein
ep	externes Glykoprotein
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FKS	fötales Kälberserum
FL 1	Fluoreszenz Kanal 1
FL 2	Fluoreszenz Kanal 2
FL 3	Fluoreszenz Kanal 3
gag	Gruppenspezifische Antigene
GALV	Gibbon ape leukemia virus
GFP	green fluorescence protein

Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperacin-ethanolsulfolsäure
HIV1	human immunodeficiency virus type 1
HSV TK	Herpes Virale Thymidinkinase
IN	Integrase
IP	infektiöse Partikel
IRES	internal ribosomal entry site
IU	international units, Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
LacZ	β -Galaktosidase
LB	Luria Bertani
LTR	long terminal repeat
Luc	Luziferase
Ma	Matrixproteine
MCS	multiple cloning site
MLV	Mouse leukemia virus
MoMLV	Moloney mouse leukemia virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt	mutant
Nc	Nukleokapsid
Ori	origin of replication
p(A)	Polyadenylierungssignal
PB	Primer Bindungsstelle
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
pol	Polymerase
PR	Protease
pro	Gensequenz der viralen Protease
Pro	Promotor

r.t.	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	Simian foamy virus
SIN	selbstinaktivierend
SSC	Saline Sodium Citrate
SV40	Simian Virus 40
SV 40 ori	origin of replication des Simian Virus 40
SV p(A)	Polyadenylisierungssignal des Simian Virus 40
T	Thy
TAE	Tris-Acetat
TM	Transmembranes Protein
TRIS	Trihydroxylmethylaminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
U3	unique 3' Ribonukleinsäuresequenz
U5	unique 5' Ribonukleinsäuresequenz
UV	ultraviolett
VSV	Vesikuläres Stomatits Virus
VSV-G	G-Membranprotein des Vesikulären Stomatits Virus
wt	wildtyp
X-GAL	5-bromo4-chloro3-indoylβ-Dgalaktopyranosid
Λ	Wellenlänge
Ψ	Verpackungssignal
Ψ+	erweitertes Verpackungssignal

2 Vorwort

Gentransfer (ISNER, 2002) und Stammzelltherapie (FORRESTER et al., 2003) sind vielversprechende Ansätze in der Therapie kardialer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und koronarer ischämischer Herzkrankheit. Die Verwendung adenoviraler Vektoren in Phase I klinischer Studien zur Behandlung der ischämischen Herzkrankheit durch Überexpression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF, zeigten ermutigende Ergebnisse (ROSENGART et al., 1999). Auch wenn einige gentherapeutische Ansätze bis in die Phase II Studien (LOSORDO et al., 2002) vorgedrungen sind, liegt oft die einzige Möglichkeit, den Therapieerfolg zu messen, in der Durchführung von Routinetests und Befragungen zur Symptomverbesserung. Deshalb ist es notwendig, geeignete Strategien zu entwickeln um die Effizienz molekulare Gentherapie nachzuweisen. Durch die Verwendung von Biolumineszenz-Verfahren (WU et al., 2002), hat man Erfolge in der optischen Darstellung von Gentherapie - Behandlung erreichen können. Diese Technik ist jedoch auf die Verwendung bei kleinen Tieren beschränkt und bietet keine Möglichkeit einzelne Regionen des Myokards darzustellen. Die Positron-Emissions-Tomographie (PET) ist jedoch sehr gut zur bildlichen Darstellung von biologischen Prozessen geeignet, denn sie weist nicht nur eine hohe Sensitivität für die Marker Detektion auf, sondern sie ist auch geeignet eine quantitativ gute Darstellung der Topographie der untersuchten Regionen zu bieten. Als eine gute Möglichkeit zur nicht- invasiven Darstellung hat sich die Verwendung von Reportergenen gezeigt (BLASBERG et al., 2003). Das Prinzip der Verwendung von Reportergenen wie der Herpes Virus Typ 1 Thymidin Kinase (HSV1- TK) beruht auf Vektor-assoziiertes Überexpression eines Transgens im Zielgewebe welches für ein Protein kodiert, das im normalen Gewebe nicht oder nicht in dieser Häufigkeit vorhanden ist. So können radioaktiv markierte Substrate oder Liganden ausschließlich in Reportergen-exprimierenden Zellen akkumuliert werden. Durch die bildliche Darstellung mittels nuklearmedizinischer Methoden ist es möglich, eine spezifische Anhäufung des Reportergenprodukts festzustellen ohne auf invasive Methoden zurückgreifen zu müssen. Das bildliche Signal spiegelt indirekt auch die Höhe der Expression und die Regulation auf der transkriptionellen Ebene wieder.

Die nicht-invasive bildliche Darstellung mittels PET und radioaktiv markierten Substraten bei adenoviral transfizierten Zellen, welche die Herpes Virus 1 Thymidine Kinase exprimieren, wurde an Kleintieren (INUBUSHI et al., 2003) und Großtieren (BENGEL et al., 2003) verwirklicht. Auch die Kombination eines therapeutischen Gens in diesem Falle der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor mit einem Reporter gen war in vitro erfolgreich (ANTON et al., 2004).

Der Nachteil bei der Verwendung adenoviraler Vektoren zum Nachweis von gentherapeutischen Ansätzen und der Expression von therapeutischen Genen ist die begrenzte Expressionsdauer der Adenoviren (BENGEL et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Verwendung von retroviralen Vektoren zur stabilen Transduktion der endothelialen Vorläuferzellen und der myokardialen Vorläuferzellen zurückgegriffen, da sich in der Tumorthherapie eine stabile Transduktion mit HSV1- TK als möglich und therapeutisch relevant gezeigt hat (MIN et al., 2003).

Als zweites Markergen wurde eGFP verwendet, das die Überprüfung der Transduktionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS im Vorfeld erleichtert, und ein vielverwendetes Reporter gen bzw. ein Platzhalter für das spätere Einbringen von therapeutischen Genen in der Gentherapie darstellt (GAMBHIR et al., 1999).

Vergleichende Studien haben gezeigt, dass der radioaktive Marker 2'- fluoro- 2'- deoxy- β - D- arabinofuranosyl- 5- iodouracil (FIAU) zusammen mit retroviralen Vektoren zu einer höheren radioaktiven Aufnahme führt (MIN et al., 2003, TJUVAJEV et al., 2002). Deshalb wurden in der Arbeit die zwei verschiedenen herpes-viralen Thymidinkinasen HSV1- tk und HSV1- sr39tk miteinander verglichen, da die beiden in unterschiedlichen Zellen eine unterschiedlich hohe Expression gezeigt haben (KANG et al., 2005).

3 Einleitung

3.1 Gentherapie

Zu Beginn der Gentherapie bedeutete dieser Begriff die Behandlung von Krankheiten durch das Ersetzen des defekten Gens. Zum jetzigen Zeitpunkt ist mit Gentherapie das gezielte Einschleusen von genetischem Material in Körperzellen definiert. Voraussetzung hierbei ist die Funktionsfähigkeit dieses Materials, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen. Dabei kann es sich neben dem Ersatz des defekten Gens auch um eine Expressionssteigerung oder -minderung eines vorhandenen Gens oder die Einführung eines völlig neuen Gens handeln. Monogenetische Erkrankungen stellen hierbei die idealen Erfolgskandidaten dar, da sie durch den Defekt nur eines einzelnen Gens zustande kommen. Beispiele hierfür sind die Cystische Fibrose, Hämophilie A und B, ADA-Mangel, Phenylketonurie und familiäre Hypercholesterinämie.

Mit solchen genterapeutischen Ansätzen beschäftigt sich die Wissenschaft schon seit mehreren Jahrzehnten. (TATUM 1966). Doch erst mit den genterapeutischen Erfolgen in Fruchtfliegen in den späten 70er Jahren dieses Jahrhunderts waren solche Ansätze auch realistisch auf humane Projekte anzuwenden (RUBIN und SPRADLING, 1981). Dies sollte erst im Jahre 1990 in einer ersten humanen Phase-1-Studie verwirklicht werden (ANDERSON et al., 1990). Durch den ex-vivo-Genstransfer des ADA-Gens in Lymphozyten und deren Reimplantation konnte die zelluläre und humorale Immunität wieder hergestellt werden (BORDIGNON et al. 1995). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden über 600 klinische Studien mit fast 4000 Patienten durchgeführt (www.WILEY.CO.UK/GENMED).

Doch neben der Therapie von seltenen monogenetischen Erbkrankheiten ist eine weitere Zielsetzung der Gentherapie die Behandlung weitverbreiteter, erworbener Krankheiten wie HIV, maligne Neoplasien, Diabetes mellitus, Alzheimer Syndrom, koronare Herzkrankheit und die erworbene Herzinsuffizienz. Dabei lässt sich feststellen, dass sich die Gentherapie erworbener Krankheiten schneller entwickelt.

Die große Mehrzahl der aktuellen genterapeutischen klinischen Studien bezieht sich auf die Behandlung erworbener Krankheiten. Das hat vor allem folgende Gründe: in der Therapie von monogenetischen Erbkrankheiten ist eine stabile Langzeitexpression von Monaten bis Jahren notwendig.

Außerdem sind die Patientenkollektive von Patienten die akut von lebensbedrohlichen Krankheiten wie AIDS oder malignen Neoplasien betroffen sind, sehr viel höher. Die molekulare Basis der polygenetischen Krankheiten ist jedoch sehr komplex und in vielen Fällen unzureichend verstanden.

Dennoch wird versucht, zum Beispiel mit der Übertragung toxischer Gene wie der Herpes Simplex Virus Typ1 Thymidin Kinase (VILE et al., 1994) selektiv nur Tumorzellen anzugreifen. Ein anderer weitverbreiteter gentherapeutischer Ansatz in der Behandlung erworbener Krankheiten ist die gezielte Überexpression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (LIEBERMANN et al., 2002).

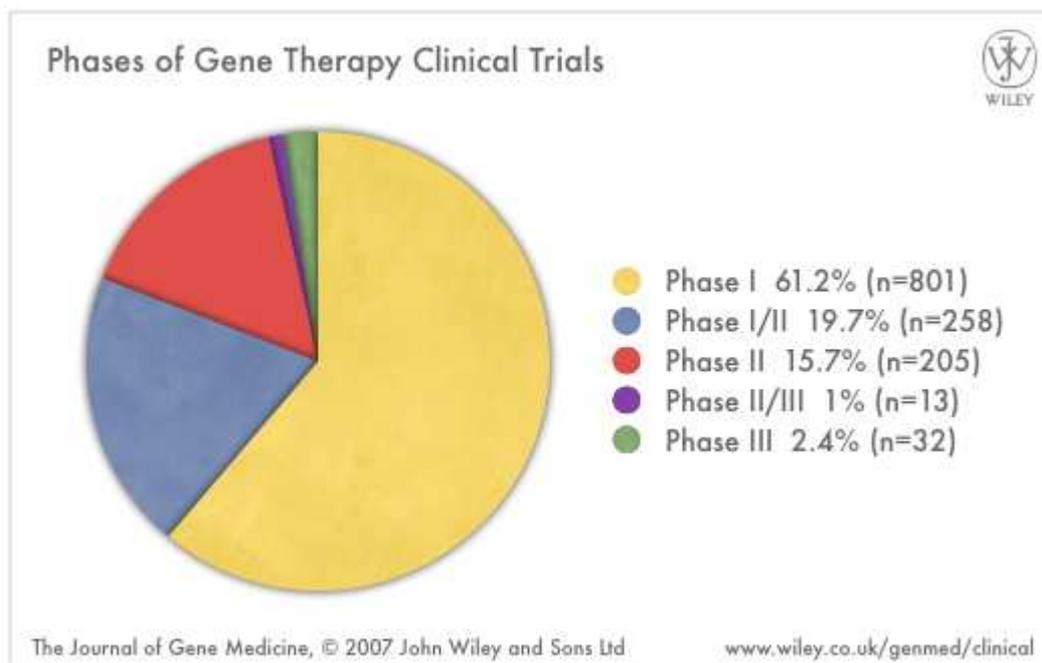


Abbildung 1: Verteilung der klinischen Phasen in der Genterapie
Dargestellt sind die verschiedenen Phasen und deren prozentualer Anteil in der Genterapie
aus: The Journal of Gene Medicine, 2007

Mit einem Anteil von >60% liegt der Schwerpunkt der gentherapeutischen Forschung in der Onkologie wie aus der Abbildung 1 ersichtlich wird. Die Therapie von Herz- Kreislauf- Erkrankungen gewinnt jedoch immer mehr an Bedeutung, denn sie ist in den industriellen Ländern neben onkologischen Erkrankungen die häufigste Todesursache. Auch monogene Erkrankungen, die Therapie von Infektionserkrankungen, insbesondere HIV, liegen im Zentrum der gentherapeutischen Forschung. Während der Gentransfer in der Onkologie in der Hauptsache mittels viraler Vektoren durchgeführt wird, findet in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Verwendung nackter Plasmid- DNA mit einem Anteil von 40% eine große Verbreitung (ISNER et al., 2002).

Der erste Zwischenfall im Rahmen einer Studie mit adenoviralem Gentransfer, der den Tod des Probanden zu Folge hatte, ereignete sich 1999. Dieser Zwischenfall war jedoch auf Unzulänglichkeit der Indikationsstellung und Aufklärung zurückzuführen (GRISHAM, 2000).

Große Hoffnung erzeugten die Erfolge in zwei verschiedenen klinischen Studien im Jahre 2000. Zunächst war es gelungen, bei einem Patienten mit Hämophilie B nach adenoviralem Transfer des Gens für den Gerinnungsfaktor IX eine klinische Besserung zu erreichen (KAY et al., 2000).

Dann war es gelungen bei der Therapie der X- gebundenen humanen Immunschwäche SCID (*severe combined immunodeficiency*) die gamma- c Untereinheit des Interleukin Rezeptors mittels retroviralem Transfer in Blutzellen zu verbringen (CAVAZANA-CALVO et al., 2000, HACEIN-BEY-ABINA et al., 2002). Dennoch wurden im September 2002 alle weiteren klinischen Studien dieser Therapie gestoppt, nachdem zwei der therapierten Kinder eine akute lymphoblastische Leukämie entwickelten (CHECK 2002, HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003).

Der Grund war die monoklonale Vermehrung transgener T-Zellen, bei denen die Integration des retroviralen Vektors in ein Allel des lmo- 2 mit gleichzeitiger Aktivierung der Genexpression festgestellt wurde (SCHMIDT et al., 2002). Dieser Vorgang beschreibt einen Fall von Insertionsmutagenese, was das Auftreten einer Leukämie zur Folge hatte, denn es ist bekannt, dass das Gen lmo- 2 eine Rolle bei der Entstehung von lymphoblastischen Leukämien spielt (BAUM et al., 2003).

Die Bedeutung der Gentherapie bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems liegt zum einen in der Behandlung der koronaren ischämischen Herzkrankheit, zum anderen in der Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion bei Herzinsuffizienz. Hierbei kommen mit viralen Vektoren versehene Stammzellen zum Einsatz, die beispielsweise den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor überexprimieren oder es wird durch verschiedene operative und katheterassoziierte Verfahren ein viraler Vektor direkt in die Myokardzellen eingebracht (ISNER et al., 2002). Eine große Rolle dabei spielt immer die nicht-invasive bildliche Darstellung, was in den meisten Forschungsansätzen mit Hilfe von Reportergenen und radioaktiven Substraten – wie zum Beispiel HSV1-tk und FIAU- verwirklicht wird (BLASBERG et al., 2003).

3.2 Vektoren in der Gentherapie

Um therapeutisches oder diagnostisches genetisches Material in die Zellen des Zielgewebes einzubringen, sind Vektoren notwendig.

Dieser Gentransfer kommt auf verschiedenste Weise in der Natur vor. Zunächst können bakterielle Plasmide mittels Konjugation von einer Donor- in eine Akzeptorzelle eingeschleust werden.

Phagen übertragen virale DNA- oder RNA-Segmente in das Genom der Wirtszelle ein und vervielfältigen diese im Rahmen der Zellteilung.

Auch mittels physikalischer oder chemischer Methoden kann DNA oder RNA durch einen passiven Vorgang in die Zellen gelangen.

An den idealen Vektor knüpfen sich einige Bedingungen: er sollte nicht nur eine hohe Effektivität besitzen, sondern sich auch in großen Mengen produzieren lassen. Eine weitere Anforderung an einen solchen Vektor ist, dass er die Zielzelle einfach erreicht und nur diese selektiv penetriert. Ein Vektor, der alle diese Anforderungen erfüllt existiert aber nicht. Deshalb müssen je nach Aufgabenstellung verschiedene Abstriche akzeptiert werden.

In einigen Fällen ist es wichtig, dass sich der Vektor an einer ganz speziellen Position (site specific) stabil in das Wirtsgenom integriert

Die Regulierbarkeit der Genexpression ist oft eine essentielle Bedingung für die Generierung eines Vektors. Es ist bei den meisten Fragestellungen zu vermeiden, dass der eingebrachte Vektor eine Immunantwort im Wirtsgewebe auslöst.

Die Methoden der Konstruktion viraler Vektoren sind sehr vielfältig. Jedoch werden meist virale Vektoren, im Allgemeinen adenovirale oder retrovirale Vektoren, zum Einbringen des genetischen Materials verwendet. Aber auch die Methoden des nicht-viralen Gentransfers nehmen durch eine ständige Verbesserung der Methoden in einem hohen Maße zu.

Einen Überblick über die hauptsächlich verwendeten Vektoren in der Gentherapie und deren Charakteristika bietet Tabelle 1.

	Retroviren	Lentiviren	Adenoviren	Adeno-assozierte Viren	Vaccinia Viren
Maximale Größe des Transgens	7-8 kb	7-8 kb	7-8 kb	4kb	25 kb
Virustiter (infektiöse Viren /ml)	10(6)-10(7)	10(6)-10(7)	> 10(11)	10(6)	
Weg des Gentransfers	Ex vivo	Ex vivo/ in vivo	Ex vivo/ in vivo	Ex vivo/ in vivo	Ex vivo/ in vivo
Infektion sich nicht teilender Zellen	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Integration	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
Expressionsdauer	+++	+++	+ / +++	+++	+
Expressionsstärke	+	+	+++	++	+++
Nachteile	Insertionsmutagenese Positionsabhängige Expressionsstärke Bildung replikationskompetenter Viren	Insertionsmutagenese Positionsabhängige Expressionsstärke Bildung replikationskompetenter Viren	Bestehende Immunität gegen Adenoviren in vivo/ Immunreaktionen	Helfervirus für die Virusproduktion notwendig	Aufwendige Herstellung

Tabelle 1: Vektoren in der Gentherapie:

Dargestellt sind die meistverwendeten Vektoren, wie Retro-, Lenti-, Adenoviren, sowie adeno-assoziierte Viren und Vaccinia Viren. In der Tabelle sind die wichtigsten Eigenschaften der unterschiedlichen Vektoren besonders im Bezug auf die Unterschiede dargestellt.

Modifiziert nach MODROW und FALKE: molekulare Virologie, 2003

3.2.1 Nicht-viraler Gentransfer

Da sich bei der Verwendung viraler Vektorsysteme nicht zu überwindbare Gefahren und Hindernisse in den klinischen Anwendungen gezeigt haben, gewinnt die Entwicklung geeigneter nicht-viraler Systeme an Bedeutung. Dabei wird die transferierte DNA allerdings fast nie stabil in das zelluläre Genom integriert (LEDLEY, 1995) die führt zu einer transienten Genexpression. Die erste Anwendung nicht-viralen Gentransfers war die Verwendung sogenannter nackter DNA, die von den Zellen in-vivo aufgenommen werden und in Folge dessen das Genprodukt exprimiert wird, was in eine transiente Genexpression resultiert. Im Falle des nicht-viralen Gentransfers wird dieser Vorgang als Transfektion bezeichnet (WOLFF et al., 1990). Obwohl die Expression nur kurzzeitig ist, reicht sie zur Entwicklung und Herstellung von DNA Vakzinen aus (HANLON et al., 2001; GIESE et al., 2002). Durch die Entwicklung physikalischer Methoden konnte der Gentransfer und die Genexpression effizienter gemacht werden. Dabei handelt es sich zum Beispiel um die sogenannte „gene gun“-Methode, bei der man die DNA an Goldpartikel bindet und so versehen in die Zellen oder das Gewebe schießt (YANG et al., 1990). Eine weitere Entwicklung ist die Elektroporation, bei der ein elektrischer Impuls zur Öffnung der Zellmembrane führt. (ROLS et al., 1998). Auch durch biochemische Methoden wurde der nicht-virale Gentransfer weiterentwickelt. Hauptvertreter hierbei ist die Lipofektion. Kennzeichnend für diese Methode des Gentransfers ist die Bindung negativ geladener DNA an positiv geladene Lipide. Da die Komplexe so insgesamt positiv geladen sind, können sie sowohl in vitro als auch in vivo besser in die Zellen aufgenommen werden. Dort verbleiben sie episomal im Zytoplasma, werden sie freigesetzt können sie jedoch auch in den Zellkern gelangen. (FELGNER et al., 1987).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht-virale Gentransfers meist zu einer geringeren Transfektionseffizienz führen und außerdem im Regelfall eine transiente und vergleichsweise schwächere Transgenexpression zeigen.

3.2.2 Viraler Gentransfer

Der Begriff der Infektion oder Transduktion wird in der molekularen Gentherapie als das Einschleusen von genetischem Material in die Zielzellen bzw. das Zielgewebe via viraler Vektoren. Ein solcher Vektor setzt sich aus einem menschen- oder tierpathogenen Virus zusammen. Dabei wurde dieser virale Vektor insofern modifiziert, dass er ein heterologes Gen trägt.

Bei der Herstellung eines solchen Vektors ist nicht nur die Einführung des zu transportierenden Gens wichtig. Auch die Veränderungen der Pathogenität des Virus sind von großer Bedeutung. In der Regel enthalten virale Vektoren aus Sicherheitsgründen nur das Fremdgen mit den zu transportierenden Informationen, sowie die für die Infektion notwendigen genetischen Informationen.

Die Vermeidung einer möglichen

Immunogenität der eingebrachten Vektoren ist ein weiterer Faktor der bei der Entwicklung retroviraler Vektoren beachtet werden muss. Die lentiviralen Vektoren der neuesten Generation, welche vom HIV-1 viralen Genom abgeleitet sind enthalten zum Beispiel nur noch ungefähr 5% dieser genetischen Information (ZUFFREY et al., 1997). Der Vorteil des viralen Gentransfers liegt in der natürlichen Infektiosität der viralen Partikel. Diesen Umstand nutzt man aus, um die therapeutischen Gene effizient in die Zelle zu bringen. Die Generierung der viralen Vektoren muss in der Zellkultur stattfinden, da die Replikation der Viren nur in menschlichen oder tierischen Zellen stattfinden kann.

3.3 Retroviren

3.3.1 Übersicht über die Retroviren

Eine Übersicht über die Einteilung der Familie der Retroviren wird in Tabelle 2 gegeben

Unterfamilie	Genus	Vertreter
Onkovirinae	Typ B Retrovirus der Säugetiere Typ C Retrovirus der Säugetiere Typ C Retrovirus der Vögel Typ D Retrovirus HTLV-/BLV- Gruppe	Maus-Mamma-Tumor-Virus(MMTV) Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) Rous-Sarkom-Virus (RSV) Mason-Pfizer-Affen-Virus Bovines Leukämie-Virus (BLV) Humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV1/2)
Lentivirinae	Lentivirus	Humane Immundefizienz-Virus (HIV1/2) Felines Immundefizienz-Virus (FIV) Bovines Immundefizienz-Virus (BIV) Virus der Infektiösen Anämie der Pferde (EIAV)
Spumavirinae	Spumavirus	Simian foamy Virus (SFV) Humane Spumaviren

Tabelle 2: Einteilung der Retroviren:

Dargestellt sind die 3 Hauptfamilien der Retroviren, wobei neben dem Typ C Retrovirus der Säugetiere (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) die Lentiviralen Vektoren verstärkt in gentherapeutischen Ansätzen verwendet werden.

Modifiziert nach MODROW und FALKE, molekulare Virologie, 2003

3.3.2 Biologie der Retroviren

3.3.2.1 Viruspartikel

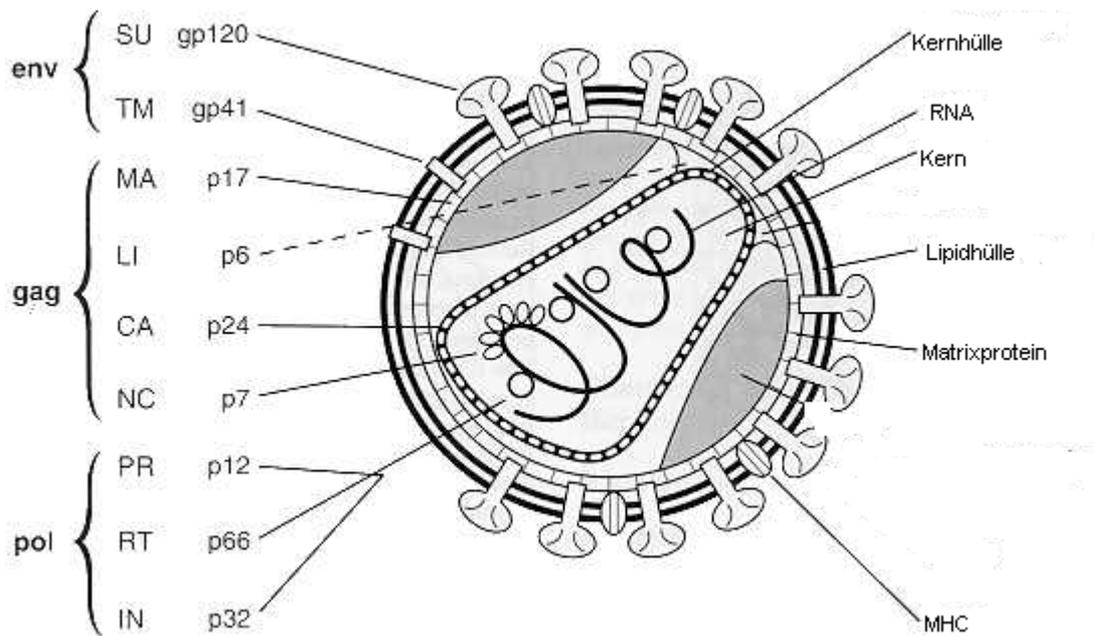


Abbildung 2: schematischer Aufbau eines Retroviruspartikels

Dargestellt sind neben den wichtigen Bestandteilen des Retrovirus wie Kernhülle, MHC-Bindungsstelle oder der Lipidhülle auch welcher Teil der RNA für die verschiedenen Bestandteile des Virus kodiert.

So enthält der env-Anteil der RNA die genetische Information aller Hüllproteine wie z.B. der Lipidhülle. Der gag-Anteil ist zuständig für die Kodierung der Viruskapsidbestandteile wie der reversen Transkriptase. Im pol-Anteil ist die Information des Kernes, also der RNA, verschlüsselt.

Modifiziert aus „RETROVIRUS“, Coffin J.M. 1997

Der Aufbau des Virions (infektiöse Partikel) der unterschiedlichen Retroviren ist sehr ähnlich. Mit einem Durchmesser von 100-120 nm enthält das Virion zwei identischen Kopien von + -Strang-RNA, die als Dimer vorhanden sind (PRATS et al., 1990). Mit den Nukleokapsid Proteinen bildet die virale mRNA einen Komplex, der zu den gruppenspezifischen Antigenen, den sogenannten gag-Proteinen, gehört. Um diesen Komplex befindet sich der Core, oder auch Viruskapsid (CA) genannt, der auch aus gag-Proteinen besteht. Bei Typ C Retroviren besitzt der Core die Form eines Ikosaeders. Im Viruskapsid befinden sich außer dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) auch die Integrase (IN) und die Protease (PR). Matrixproteine, welche an der Außenseite des Core lokalisiert sind, interagieren mit der Innenseite der Hüllmembran. Diese Hüllmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus der Zytoplasmamembran der virusproduzierenden Zelle. Die sogenannten envelope Proteine (env), die zur Gruppe der Glykoproteine gehören, sind in die Hüllmembran integriert. Sie sind zuständig für die Virusinteraktion mit dem spezifischen Rezeptor und die einzigen viralen Proteine auf der Virusoberfläche. Die Untereinheiten dieser Proteine setzen sich folgendermaßen zusammen: das transmembrane Protein (TM), das in der Zellmembran verankert ist, und das externe Glykoprotein (EP), das an die zellulären Rezeptoren bindet (HUNTER und SWANSTROM, 1990).

3.3.2.2 Genom und Genomaufbau

Die virusproduzierenden Zellen stellen das Genom der Retroviren aus Einzelstrang-Ribonukleinsäure her. Dieses enthält die Charakteristika eukaryotischer messenger RNA (mRNA), die sogenannte 5'Cap-Struktur und die 3'-Polyadenylierung. Das Moloney-Leukämie-Virus (Mo-MLV) ist dabei circa 7.000 Basen groß (SHINNNICK et al. 1981). Während der reversen Transkription durch die virale Reverse Transkriptase, sowie der darauffolgenden Integration in das zelluläre Genom als Provirus, sind an beiden Enden der proviralen DNA die long terminal repeats (LTR) angehängt (COFFIN, 1984). Darin lokalisiert sind die viralen Elemente für die Genexpression, reverse Transkription und die Integration ins Wirtsgenom. Man unterteilt diese long terminal repeats weiter in die U3 (unique 3'RNA-Sequenz), R (redundant RNA-Sequenz) und U5 (unique 5'RNA-Sequenz) Abschnitte. In der viralen RNA ist die U3 und U5 nur einfach enthalten. Diese Sequenzabschnitte werden während der reversen Transkription verdoppelt.

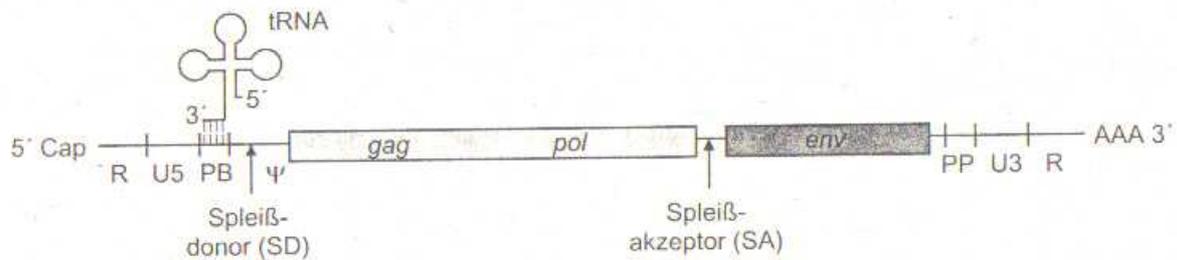
Doppelt liegt hingegen die R Region in der viralen RNA vor. Sie befindet sich in identischer Basenfolge und Orientierung an beiden Enden des Genoms. Dadurch wird die notwendige Homologiesequenz hergestellt um den Strangwechsel im Zuge der reversen Transkription zu gewährleisten.

Die Retroviren können je nach Vorhandensein von akzessorischen Proteinen, die neben den Genen gag (gruppenspezifische Antigene), pro (Protease), pol (Polymerase) und env (Hüllproteine) enthalten sind, in einfache und komplexe Retroviren unterteilt werden (HU und PATHAK, 2000). Der folgende Aufbau ist exemplarisch für die virale RNA eines einfach gebauten Retrovirus, wie das Mo-MLV, gewählt. Die Abbildung 3 zeigt diesen Aufbau in bildlicher Form.

1. Das 5'-Ende und das 3'-Ende ist von der R-Region gebildet. Sie stellt am 5'Ende des viralen Genoms nach der Integration in das zelluläre Genom den Startpunkt der Transkription in DNA dar. Dabei wird von der viralen U3 Region ausgegangen. Enthalten ist weiterhin Polyadenylierungssignal, welches am 3'-Ende des viralen Genoms zum Abbruch der Transkription führt.
2. In der U5 Region, die je nach ihrer Lage am 5'-Ende der viralen RNA ihre Bezeichnung erhält, finden sich die Sequenzen für den Start der reversen Transkription.
3. In der unmittelbaren Folge an die U5 Region ist im Virusbackbone eine Primer-Bindungsstelle (PB) lokalisiert, die eine Sequenz komplementär zum 3'-Ende einer zellulären transfer RNA (tRNA) enthält.
4. Damit eine spezifische Verpackung der viralen RNA gewährleistet ist, besteht das Verpackungssignal (Ψ) aus Sequenzen, welche mit den viralen Proteinen interagieren (LINIAL und MILLER, 1990). Das Verpackungssignal Mo-MLV- Ψ findet sich in der 5'-nichttranslatierten Region zwischen der PB und dem gag Gen. Dieses Signal ist suffizient fremde RNA in virale Partikel verpacken zu können (MANN et al, 1983, ADAM und MILLER, 1988). Als das sogenannte erweiterte Verpackungssignal $\Psi+$ wird diejenige Sequenz beschrieben, in der das Mo-MLV Verpackungssignal und die in das gag Gen hineinreichende Sequenz enthalten ist (BENDER et al., 1987).

5. Nach diesen Gensequenzen folgt die genkodierte Region. Das gag-Polyprotein wird vom gag Gen am 5'-Ende kodiert, das in der Folge durch die virale Protease in verschiedene Proteine, die Matrix-, Kapsid- und Nukleosidkapsidproteine gespalten wird. Die Reverse Transkriptase und die Integrase wird vom pol Gen kodiert. Unter zu Hilfenahme einer als Primer funktionierenden zellulären tRNA katalysiert die reverse Transkriptase die Umschreibung der viralen RNA in eine doppelsträngige DNA. (BALTIMORE, 1976; TEMIN, 1976), Die Integrase wirkt als Katalysator für die Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Zwischen gag und pl
6. liegt die Sequenz, welche für die virale Protease kodiert. Allen Retroviren gemeinsam ist, dass die subgenomische gespleißte mRNA benutzt wird, um die env Gene zu exprimieren. Der Spleißdonor findet sich vor der Ψ-Sequenz, der Spleißakzeptor direkt vor dem env Gen. Dieses env Gen kodiert für ein env-Polyprotein, welches eine Spaltung durch eine zelluläre Protease in das transmembrane Protein und das externe Glykoprotein erfährt.
7. Der sogenannte Polypurintrakt (PPT) findet sich in der Region zwischen env und 3'LTR und wird wegen seines Purin-Reichtums so bezeichnet. Die Bedeutung dieser Region liegt in der Notwendigkeit für die Initiation der Zweitstrangsynthese bei der reversen Transkription.
8. Die viralen Promotor und Enhancer Sequenzen sind in der U3 Region vorhanden. Benannt ist diese nach ihrer Lage im 3'-Ende der viralen RNA (DOUGHERTY und TEMIN, 1987). Nach erfolgter Umschreibung der RNA in doppelsträngige DNA befindet sich diese Region auch in der 5'-LTR und steuert von dort aus die virale Genexpression.

A. RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels



B. Integrierte Provirus-DNA

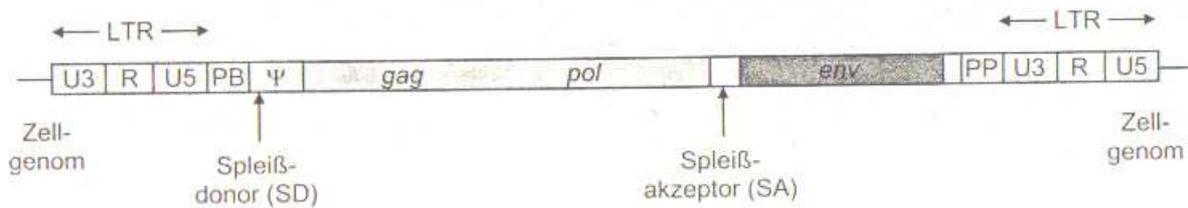


Abbildung 3: Genomorganisation der Retroviren mit

A: RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels

B: Integrierte Provirus DNA

Dargestellt ist das RNA Genom vor und nach Integration der Provirus-DNA. Eine ausführliche Erläuterung des Vorgangs findet sich im Abschnitt Genom und Genomaufbau Punkt 1-7.

Modifiziert aus „RETROVIRUS“, Coffin J.M., 1997

3.3.2.3 Replikation

In der Abbildung 4 sind die Vorgänge bei der Infektion einer Zelle durch ein replikationsfähiges Retrovirus dargestellt. Am Beginn der Infektion interagieren die viralen Hüllproteine mit den zellulären Rezeptorkomplexen (Adsorption). Sobald das Virus mit der Zellmembran fusioniert hat, wird das retrovirale Kapsid aufgenommen und wird dann in der Folge in das Zytoplasma entlassen. Aufgrund von Konformationsänderungen innerhalb des Kapsids wird die Reverse Transkriptase aktiviert, welche das virale Provirus synthetisiert, die doppelsträngige DNA-Kopie der genomischen viralen RNA ist (reverse Transkription). Während der folgenden Abläufe bleibt das virale Provirus immer mit den Kapsidkomponenten verbunden. Schließlich wird es als Komplex mit ihnen und der viralen Integrase in den Zellkern verbracht (BOWERMAN et al, 1989). Bei Maus-Leukämie-Viren (MLV) ist dieser Transport nur bei Auflösung der Kernmembran während der Mitose möglich (ROE et al, 1993). In diesem Falle ist die Infektion auf sich teilende Zellen beschränkt (MILLER et al., 1990). Bei anderen Retroviren wie z.B. Lentiviren sind Kernlokalisierungssignale vorhanden, zum Beispiel im Matrixprotein. Somit können sie auch durch die intakte Kernmembran sich nicht teilender Zellen gelangen (LEWIS und EMERMAN, 1994; NALDINI et al., 1996). Die Integration der viralen Provirus-DNA in das zelluläre Genom ist durch die virale Integrase vermittelt. Dabei ist der Ort der Integration nicht spezifisch, und sie kann prinzipiell in allen Teilen des Genoms stattfinden. Trotzdem werden dabei Orte aktiver Transkription bevorzugt (SCHERDIN et al, 1990), weswegen es die Bezeichnung „hot spots“ und „cold spots“ im Rahmen der Integration gibt (WITHERS-WARD et al, 1994). In den LTRs, welche das integrierte Genom zu beiden Seiten flankieren, sind wichtige Steuerungselemente wie Promotor, Enhancer und Polyadenylierungssignal vorhanden. Diese Steuerungselemente sind für die Initiation und Termination der Transkription durch die zelleigene RNA-Polymerase II verantwortlich (COFFIN, 1984).

Es entstehen während der Transkription zwei verschiedene mRNA-Formen: erstens die gespleißte Form, welche die Matrize für die Translation des env Gens liefert und zweitens eine nicht gespleißte Form die für die Synthese der gag-, pro- und pol-Proteine zuständig ist

Diese nicht-gespleißte Form ist identisch mit der viralen genomischen RNA. Durch zelleigene Strukturen werden im Zuge der Translation im Zytoplasma die viralen Strukturproteine und Enzyme hergestellt.

Durch das Verpackungssignal Ψ ist die spezifische Zusammenlagerung der viralen genomischen RNA mit den synthetisierten viralen Strukturproteinen im Zytoplasma der Zelle möglich. Es kommt zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche aus, mit der Eigenheit, dass die Viruspartikel von der zellulären Membran umhüllt werden. Die Spaltung der gag/pol Vorläuferproteine durch die virale Protease führt zur Reifung von infektiösen Viren (BOLOGNESI et al 1987).

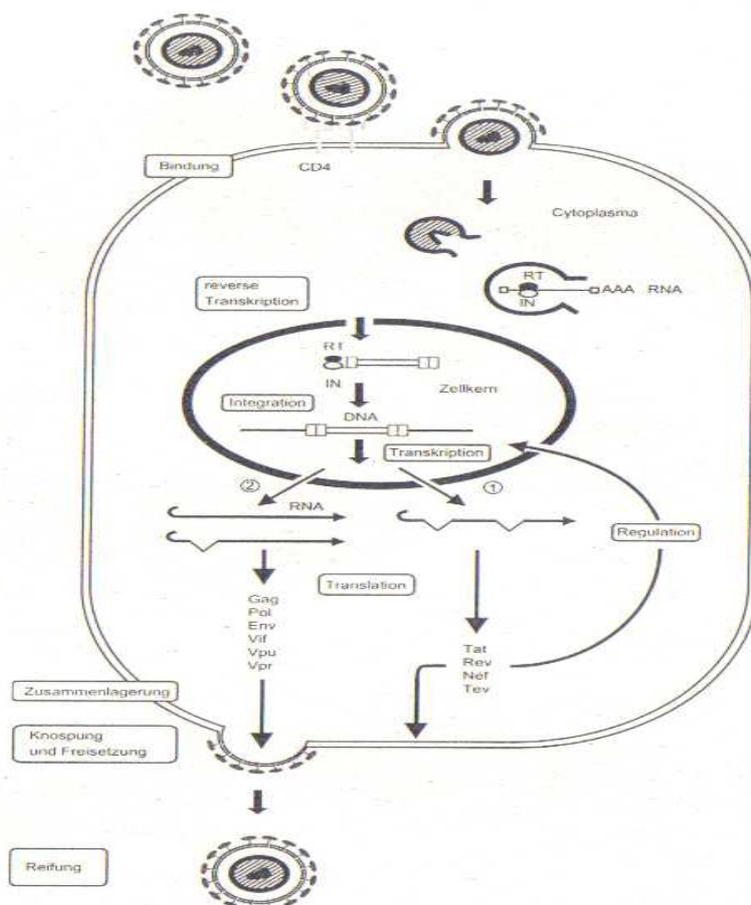


Abbildung 4: Schema des retroviralen Replikationszyklus

Dargestellt ist der komplette virale Zyklus von der Adsorption der Viruskapside bis zur Freisetzung der neu produzierten Viruspartikel.

Nach der Adsorption wird das Kapsid ins Zytoplasma der Zelle aufgenommen. Dort findet die reverse Transkription statt, deren Ergebnis die DNA-Kopie der genomischen viralen RNA ist. Nach Eindringen in den Kern der infizierten Wirtszelle wird die virale DNA-Kopie in das Genom der Zelle integriert. Aufgrund des Vorhandenseins von Steuerungselementen wie Promotor, Enhancer und Polyadenylierungssignal in absoluter Nähe der integrierten Virus-DNA findet im Folgenden die Bildung verschieden gespleißter mRNA Formen statt. Damit können im Zuge der Translation die verschiedenen viralen Strukturproteine und Enzyme hergestellt werden, welche sich dann zum fertigen Viruskapsid vereinigen.

Aus „RETROVIRUS“, Coffin J.M., 1997

3.4 Retroviren als Genvektoren

3.4.1 Übersicht über die Genvektoren

Retrovirale Vektoren wurden entwickelt als vor 20 Jahren festgestellt wurde, dass man mit Hilfe von defekten Viren ein Reportergen stabil in die Zielzellen einbringen konnte. Dabei erwiesen sich besonders MLV abgeleitete Retroviren und Vogel-Viren, als geeignete Vehikel. (PAGÉS und BRU, 2004). Aber auch Vektoren auf Grundlage anderer Virusunterfamilien wurden in letzter Zeit als Träger von Reportergenen entwickelt: lentivirale Vektoren, die auf HIV I (NALDINI et al 1996), FIV (POESCHLA et al 1998) und BIV (MATUKONIS et al., 2002) basieren und Vektoren aus der Gruppe der Spumaviren (RUSSEL und MILLER, 1996, SCHWANTES et al., 2002). Die elementaren Voraussetzungen, die gegeben sein müssen um einen „retroviralen Vektor“ zu erhalten, beschreibt folgende Definition:

Ein mobiler Vektor, der keine viralen Kodierungssequenzen beinhaltet, aber die therapeutischen Gene und die so genannten cis-agierenden Elemente enthält.

Die cis-agierenden Elemente sind retrovirale Sequenzen die notwendig sind, damit die das Reporter-gen enthaltenden Partikel infektiös wirken. Da im Zusammenhang mit Retroviren immer die Möglichkeit der Pathogenität berücksichtigt werden muss, finden bei klinischen Anwendungen fast immer replikationsdefiziente Viren Verwendung.

Der das Reporter-gen tragende Vektor, kann nach Infektion der Zielzellen deswegen auch keine neuen Viruspartikel bilden oder gar virale Gene in das Genom der infizierten Zelle übertragen. Um dies zu erreichen, finden sich die viralen Gene gag, pol und env in den verwendeten Hilfskonstrukten grundsätzlich in trans-Stellung, das heißt ohne räumlichen Bezug zueinander. Da diesen Gensequenzen das virale Verpackungssignal fehlt, findet sich ihre Sequenz auch nicht im gebildeten Virion.

Diese beinhalten die fremden Transgene, können aber nach einer Infektion keine neuen Partikel bilden und keine viralen Gene übertragen. Im Gegensatz dazu beinhaltet der Vektor mit dem therapeutischen Gen die Grundstruktur des viralen Genoms.

Aber auch hier werden nur die notwendigsten regulatorischen Sequenzen für die Verpackung in virale Partikel, reverse Transkription und Integration verwendet (cis-agierende Sequenzen). So besteht die virale mRNA später nur aus der genetischen Information des verwendeten Vektors. Diese Gegebenheit führt dazu, dass der retrovirale Vektor allein die Proteine für die Replikation nicht herstellen kann.

MLV-abgeleitete Viren, infizieren Zellen nur im Zustand der Zellteilung (MILLER, 1990). Wird eine Transduktion von Geweben aus sich nicht-teilenden Zellen gewünscht, ist dies in-vivo beinahe unmöglich. Daher ist die Anwendung retroviralen Gentransfers hauptsächlich auf die Zellkultur beschränkt. Zu diesen nur in vitro transduzierenden Geweben gehören unter anderem Leber- und Muskelgewebe, aber auch Herz und Lunge. Dennoch liegt in dieser Methode ein klarer Vorteil: Es wird eine hohe Effizienz des Gentransfers erreicht (VERMA und SOMIA, 1997).

Eine der gewünschten Eigenschaften des retroviralen Gentransfers ist die stabile Integration des Reporter-gens, was zu einer langdauernden Transgenexpression führt. Hier zeigt sich jedoch das Janus-Gesicht des retroviralen Gentransfers: Benachbarte zelleigene Gene werden durch die viralen Promotor- und Enhancersequenzen aktiviert (TEMIN, 1990; STOCKING et al., 1993, LI et al., 2002).

Dieses Phänomen der Insertionsmutagenese ist allerdings kein rein theoretisches Problem: Bei der erfolgreichen genetischen Korrektur der x-chromosomalen SCID durch einen MLV abgeleiteten retroviralen Vektor traten bei zwei der Patienten T-Zell Leukämien auf. Dies war auf eine Integration des Vektors nahe der LMO2-Sequenz zurückzuführen, welches ein bekanntes Gen im Zusammenhang mit T-Zell Leukämien ist. (PAGÈS und BRU, 2004 auch Kapitel: Einleitung).

Ein weiteres Problem im Bezug auf retrovirale Vektoren, die mehr als einen Promotor aufweisen, ist die sogenannte „promotor interference“, bei der die internen Promotoren des Vektors durch die viralen Promotor- und Enhancersequenzen beeinflusst werden (EMERMAN und TEMIN, 1984, XU et al., 1989; WU et al., 1996).

Schon länger bekannt ist die Beeinflussung der Transgenexpression je nach Integrationsort (JAENISCH et al 1981). Ein limitierender Faktor ist auch die Größe des Transgens. Die Klonierungskapazität retroviraler Vektoren hängt vom ursprünglich vorhandenen Virus ab, wobei 8kb die maximale Größe der Vektoren zu sein scheint. Entgegen früherer Studien scheint die Verpackungskapazität des retroviralen Virions kein limitierender Faktor zu sein.

Bei der Generierung retroviraler Partikel werden zwei Methoden unterschieden:

1. Virusproduktion mittels Verwendung von Verpackungszelllinien
2. transiente Virusproduktion mittels Transfektionist nur in intakten Zellen

3.4.2 Verpackungssysteme

Da Retroviren immer eine potentielle Pathogenität besitzen, ist die Voraussetzung für deren klinischen Nutzen immer die Entwicklung von Vektoren, die zwar die therapeutische Sequenz tragen, aber nicht in der Lage sind, sich zu replizieren oder virale Eigenschaften zu übertragen. Dafür wurden verschiedene Zelllinien entwickelt, welche die genetische Information zur Herstellung infektiöser, aber auch replikationsdefiziter Retroviren enthalten. Allen gemeinsam ist die Anordnung der benötigten Gene in trans des einzufügenden retroviralen Vektors. Durch die genaue Kenntnis des MLV-Virus, ist dieses das am meisten verwendete Virus bei der Herstellung von retroviralen Vektoren, wobei die verschiedenen Systeme in „Generationen von Verpackungssystemen“ eingeteilt wurden (PALU et al., 2000).

1. Bei der ersten Generation von Verpackungszellen wurde die Information mittels eines retroviralen Genoms zur Verfügung gestellt, in dem das Verpackungssignal aus der 5'-Region ausgeschnitten wurde. Dieses sogenannte „one-genom helper virus“ besteht aus der klonierten proviralen DNA ohne Verpackungssignal. Da in dieser Generation die viralen Gene von diesem einzigen Hilfskonstrukt produziert werden, besteht eine hohe Gefahr der Bildung replikationskompetenter Retroviren. Verschiedene Autoren haben beschrieben, dass dazu nur eine Rekombination von Hilfskonstrukt und Vektor zustande kommen muss (CONE und MULLIGAN, 1984; MILLER und BUTTIMORE, 1986). Als Beispiele sollen hier die ecotrope Verpackungszelllinie Ψ -2 (MANN et al., 1983) und die amphotrope Linie PA12 genannt werden (MILLER et al., 1985).
2. In der zweiten Generation von Verpackungszelllinien wurde dann im Hilfskonstrukt die 3'-LTR durch das Polyadenylierungssignal des SV40 ausgetauscht und zusätzlich das 5'-Ende der 5'-LTR entfernt um eine Bildung rekombinanter Retroviren zu erschweren. Dies wurde zum Beispiel bei der amphotropen Linie PA317 angewandt (MILLER und BUTTIMORE, 1986).

3. Bei der dritten Generation von Verpackungszelllinien wurde versucht, durch die Aufteilung der viralen Gene auf zwei voneinander unabhängige Hilfskonstrukte die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Viren zu minimieren (HU und PATHAK, 2000). Diese „split genome“ Hilfskonstrukte enthalten auf einem Konstrukt die Gene für gag und pol, auf dem zweiten Konstrukt die Information für das env Gen. Obwohl somit drei Rekombinationen erforderlich sind, ein Retrovirus zu bilden, das die Fähigkeit der Replikation besitzt, wurde auch bei diesen Verpackungssystemen das Vorkommen genau solcher Retroviren beschrieben (CHONG und VILE, 1996; CHONG et al., 1998). Die wichtigsten Vertreter dieser Zelltypen sind die Linien ΨCRIP (DANOS und MULLIGAN, 1988), GP+envAM12 (MARKOWITZ et al., 1988) und die Zelllinie Phoenix-Ampho.
4. Die transiente Produktion retroviraler Partikel hängt vor allem von der Anwendung eines effizienten Transfektionssystems ab, wie der Calcium-Phosphat Methode.

Die Verwendung von Verpackungssystemen der dritten Generation, also die Verwendung von zwei unterschiedlichen unabhängigen Hilfskonstrukten ist die Regel bei transienten Systemen. Das gag-pol-Plasmid führt zur Expression der viralen Enzyme und Strukturproteine, das env-Plasmid zur Expression der Hüllproteine. Zusammen mit diesen beiden Hilfskonstrukten wird das retrovirale Vektorplasmid in die Zelle transfiziert.

Wenige Tage nach der Transfektion können dann die Zellüberstände, die den Retrovirus enthalten, geerntet werden. Wichtig für die Sicherheit dieser Systeme ist, dass die Hilfskonstrukte nur geringe Sequenzhomologien enthalten und außerdem so wenig als möglich an viralen Sequenzen. Dieses System wurde erfolgreich für MLV-abgeleitete Vektoren, lentivirale Vektoren und Spumavirus-Vektoren etabliert (SONEOKA et al., 1995; TROBRIDGE und RUSSEL, 1998; YANG et al., 1999).

Vorteile dieses Schemas sind, dass es vor allem in viel kürzerer Zeit zur Etablierung einer stabilen Virusproduzentenzelllinie führt und zudem auch weniger arbeitsintensiv ist. Ein weiterer Vorteil ist die Generierung der Retroviren ohne die Notwendigkeit eines eukaryotischen Selektionsmarkers, der unter Umständen immunogen wirken kann. (RIDDEL et al., 1996). normalerweise toxisch ist. (YEE et al., 1994).

Ein weiteres Charakteristikum für die Verwendung dieses Systems ist das Erzielen sehr hoher viraler Titer von mehr als 10^7 IP/ml (YANG et al., 1999). Zuletzt ist es außerdem möglich, die Plasmide verschiedener Virushüllen einsetzen zu können, obwohl die Expression solcher Hüllen wie z.B. die des Vesikulären-Stomatitis Virus (VSV-G),

3.4.3 Der retrovirale Vektor pBullet

Als Weiterentwicklung des von WEIJTENS beschriebenen Vektors pSTICH wurde in der vorliegenden Arbeit eine leicht modifizierte Version des Vektors pBullet verwendet, der vom Moloney- Maus- Leukämie-Virus (Mo-MLV) abgeleitet ist (WEIJTENS et al. 1998 WILLEMSSEN et al., 2003). Der Unterschied zum pSTITCH-Vektor ist der Austausch der U3 Region der 5'LTR durch den humanen intermediate early Cytomegalievirus Promotor (CMV IE Promotor). Im Gegensatz dazu entspricht die 3'LTR der wildtyp Mo-MLV LTR.

Dadurch initiiert der CMV IE Promotor nach Transfektion die Genexpression in eukaryotischen Zellen. Dies hat zur Folge, dass bei der nachfolgenden viralen Transduktion der oben genannte Promotor aufgrund der reversen Transkription und Integration durch die retrovirale U3 Region ersetzt wird, in der Promotor- und Enhancersequenzen enthalten sind. Damit lenkt die so gebildete vollständige LTR die Genexpression. Um die virale mRNA zu verpacken, ist das erweiterte Verpackungssignal Ψ^+ vorhanden, welches eine bessere Verpackung durch den 5'-nicht-translatierten Anteil des gag Gens möglich macht (BENDER et al., 1987).

Der Spleißdonor und -akzeptor des Vektors ist dem des wildtyp Mo-MLV identisch, und ist in diesem Falle Voraussetzung für die Synthese der env-mRNA. Die Bildung der Mo-MLV env-RNA verläuft analog; das heißt es entsteht genomische mRNA. Zusätzliche Schnittstellen im Anschluss an die NcoI Schnittstelle, die dem Vektor pSTITCH zugefügt wurden, machen einen ordnungsgemäßen Spleißvorgang möglich.

vorhanden, im bakteriellen Plasmidanteil ist das SV40 ori (Origin of replication des Simian virus) aktiv. Der CMV IE Promotor wird in der Zelllinie 293T durch Proteine der adenoviralen E1A Region tätig. Die Plasmidkopienzahl pro Zelle erhöht sich durch die Wirkung des SV 49 large T Antigen auf das SV40 ori, das dadurch eine Amplifikation der kompletten Plasmide bewirkt.

Der Grundgedanke der Entwicklung von pSTITCH bzw. pBullet war die Generierung retroviraler Zellüberstände mit hohen viralen Titern. Zusammen mit den Verpackungsplasmiden pHIT60 (SONEOKA et al., 1995) und pCOLT-GALV (WEIJTENS et al., 1998) konnte dies innerhalb von sieben Tagen durch transiente Transfektion von 293T Zellen realisiert werden. Vor allem durch zwei Veränderungen kann eine sehr starke Plasmidexpression, und in dessen Folge sehr hohe virale Titer erreicht werden: In allen Plasmiden ist der CMV IE Promotor

Da in der vorliegenden Arbeit neben dem envelope-Plasmids, welches für die Hüllproteine des Gibbonaffen Leukämievirus kodiert (pCOLT-GALV), auch das Plasmid, welches für die Hüllproteine des Vesikulären-Stomatitis-Virus kodiert (pHCMV-G), verwendet wurde, musste das in der von Willemsen publizierte System verändert werden. Das Plasmid pCOLT-GALV wurde durch pHCMV-G ersetzt. Dieses enthält jedoch ebenso den CMV IE Promotor für die Genexpression (YEE et al., 1994, vgl. Abbildung 5).

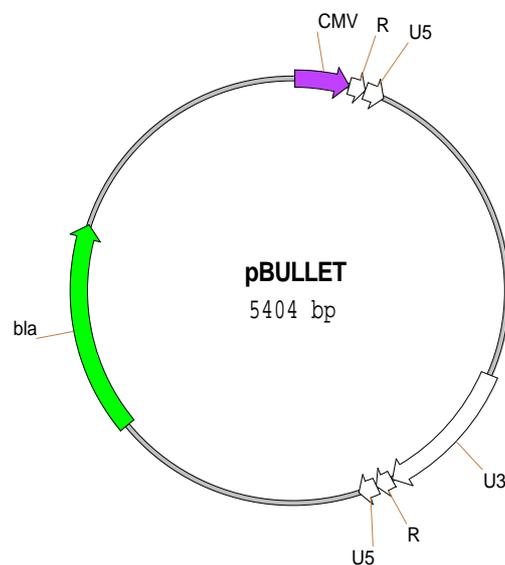


Abbildung 5: pBullet

Dargestellt ist der retrovirale Vektor pBullet mit einer Größe von 5404 Basenpaaren. Angezeichnet sind sowohl die U3 als auch die U5 Region und der CMV-Promotor. Modifiziert nach WILLEMSEN und WEIJTENS (1998, 2003).

3.4.4 Vektordesign

Die retroviralen Vektoren liegen in bakterieller Plasmidform vor, um in Bakterien amplifiziert werden zu können. Dazu besitzen sie ein bakterielles „origin of replication“ (ori), welches aus dem Startpunkt der bakteriellen Replikation und einem Resistenzgen besteht.

Um retrovirale Vektoren in Gruppen aufzuteilen, kann man verschiedene Unterscheidungskriterien anwenden. Als sehr einfaches Unterscheidungsmerkmal kann die Anzahl der enthaltenen Transgene (Cistrone) herangezogen werden. Je nachdem bezeichnet man die Vektoren dann monocistronisch (1 Transgen), dicistronisch (2 Transgene), usw.

Dabei findet in den meisten dicistronischen Vektoren eines der verwendeten Transgene Verwendung als eukaryotischer Selektionsmarker, um die infizierten Zellen schon in-vitro zu selektionieren.

Als Beispiele sollen an dieser Stelle der dicistronische Vektor pLXSN (MILLER und ROSMAN, 1989) und das Neomycin Resistenzgen von SOUTHERN und BERG, 1982 genannt werden.

In der Abbildung 6 sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Konstruktion retroviraler Vektoren abgebildet, die mehrere Transgene oder Proteine exprimieren:

1. Die verschiedenen Proteine werden mittels unterschiedlich gespleißter mRNA von einem einzelnen Promotor exprimiert.
2. Die verschiedenen Gene werden mit Hilfe mehrerer Promotoren exprimiert.
3. Es wird eine internal ribosomal entry site-Sequenz (IRES) für die Expression verschiedener Proteine von einer mRNA verwendet.

Während des Replikationszyklus von Retroviren kommt es in einem Zwischenschritt zur Synthese einer mRNA, welche die Länge des gesamten viralen Genoms umfasst. Aus diesem Grund müssen alle Vektorkonstruktionen die Synthese dieser mRNA erlauben. In Transkriptionsrichtung des viralen Promotor, also in „sense Orientierung“, ist es daher nicht möglich, zusätzliche Polyadenylierungssignale (p(A)-Signale) zwischen die R-Regionen der LTRs einzufügen. Denn eine Anordnung in dieser Weise führt zu verkürzten, subgenomischen mRNA Transkripten und es resultieren keine infektiöse Virionen (SHIMOTOHNO und TEMIN, 1981; MILLER et al., 1983).

Im Gegensatz dazu müssen Transgene, die entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung des viralen Promotors 5'LTR („antisense“ Orientierung) eingefügt werden, mit einem p(A)-Signal ausgestattet werden. Die Polyadenylierungssignale verhindern die Entstehung von Transkripten, die sich bis zur R-Region der 5'LTR erstrecken, was die gesamte Länge des für die virale mRNA kodierenden Abschnitts umfassen würde. Diese Transkripte würden an die gegenläufig orientierte virale mRNA binden, was zu einer verminderten Virusproduktion führt, denn die so gebundene mRNA stellt das virale Genom des Retrovirus dar („antisense inhibition“).

SIN-Vektoren, so genannte „selbstinaktivierenden Vektoren“ (SIN-Vektor) enthalten in ihrem Provirus keinen Promotor in der 5'LTR. Die Transgenexpression wird in diesem Beispiel nur vom internen Promotor aus gesteuert (DOUGHERTY und TEMIN 1987).

Ein weiterer Ansatz bei der Einteilung retroviraler Vektoren ist die Gruppierung in Single- und Double-copy Vektoren. Dieser Ansatz bezieht sich auf die Vorgänge während der retroviralen Replikation.

Bei den Single-copy-Vektoren findet sich das Transgen nach Replikation als einzelne Kopie im integrierten Provirus. Sind dann noch außerordentliche Spleißdonor- und -akzeptorsequenzen vorhanden, führt dies zu mehrfachen Kopien der Transkripte. Dadurch erhöht sich die Expression der Transgene erheblich (KRALL und KOHN, 1996).

Vektoren vom Double-copy-Typ enthalten im Provirus nach der Integration zwei Kopien des Transgens. Dies kommt durch die Verdopplung der LTR-Sequenzen retroviraler Vektoren während der reversen Transkription zustande und führt ebenfalls zu einer höheren Transgenexpression (HANTZOPOULOS et al. 1989). Eine weitere Art des Vektordesigns ist die Platzierung des Transgens vor den viralen Promotor in die U3 Region der 3'-LTR (das heisst in 5'-Richtung) (HANTZOPOULOS et al., 1989).

Diese U3 Region wird bei der Infektion in die 5'-LTR des Provirus eingefügt. Hierbei muss aber das Transgen über einen eigenen Promotor verfügen, weil an dieser Position keine Möglichkeit der Expression von dem vorhandenen viralen Promotor besteht. Bei dieser Strategie ist die Orientierung der Expressionskassette ohne Auswirkung.

ADAM et al, 1995 haben das Transgen in die R Region der 3'LTR eingefügt, wodurch die Notwendigkeit eines weiteren Promotors hinfällig wird: Der virale Promotor kann in dieser Position das Transgen exprimieren. Durch die beschränkte Verpackungskapazität retroviraler Partikel zeigt sich jedoch ein klarer Nachteil dieser Methode auf. Das Transgen liegt später auch zweifach im retroviralen Vektor vor.

Ein Vorteil der Double-copy-Vektoren besteht darin, dass es möglich ist, unabhängig voneinander zwei unterschiedliche Transgene in den Vektor zu insertieren. Damit können dicistronische Vektoren gebildet werden. (PAULUS et al., 1996). Der Virustiter ist bei dieser Art des Vektordesigns normalerweise aber geringer (HANTZOPOULOS et. al., 1989; ADAM et al., 1995; PAULUS et al., 1996).

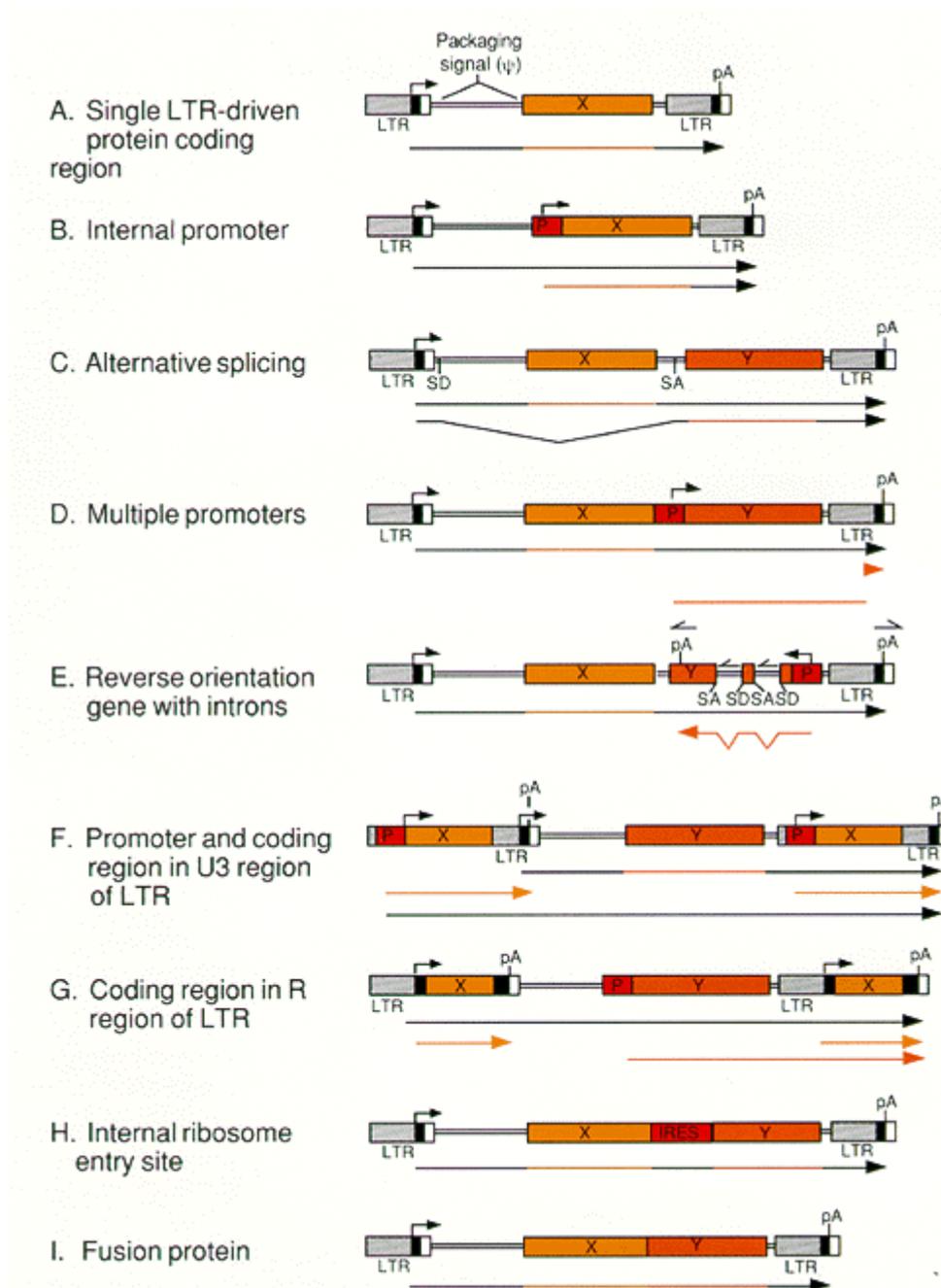


Abbildung 6: typische Vektoren nach Integration in das zelluläre Genom (Provirus).

Dargestellt sind die unterschiedlichen Methoden des Vektor-Aufbaus von der einfachen long-terminal-repeat (LTR) gesteuerten Region bis zu multiplen Promotoren und zuletzt Vektoren mit internal ribosomal entry site (IRES).

Aus Coffin JM. et al 1997

3.4.5 Virushüllen

Retroviren können eine Vielzahl von Zelloberflächenproteinen benutzen, um in die Zelle einzudringen (MILLER, 1996). Die env-kodierten Glykoproteine legen hierbei den Tropismus der Viren fest. Durch den Einbau viraler Glykoproteine verschiedener Zellarten ändert sich die Wechselwirkung der Hüllproteine mit den korrespondierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Somit wird durch die Auswahl der env-Glykoproteine ihr Art- und Gewebetropismus festgelegt (WEISS et al., 1977).

Das Ziel der Kombination der retroviralen Partikel mit verschiedenen Virushüllen, auch Pseudotypisierung (ZAVADA, 1972) genannt, ist die effiziente Transduktion bestimmter Zelltypen durch retrovirale Vektoren. Zum Beispiel beschränkt sich die Infektionskapazität von Retroviren, welche über die Hüllproteine des ecotropen Maus-Leukämie-Virus verfügen, auf die Zellen von Nagetieren. Der Rezeptor für die retroviralen Partikel ist der Transporter für kationische Aminosäuren mCAT-1 (KIM et al, 1991).

Das Phosphat-Transporterprotein Pit2 ist Rezeptor für virale Partikel mit amphotroper Hülle, wie die des Moloney- Maus- Leukämie-Virus (KAVANAUGH et al., 1994). Da dieser Rezeptor sehr weit verbreitet ist, können solche Viren ein breites Spektrum an Zelltypen infizieren (CONE und MULLIGAN, 1984; DELOUIS et al., 1990).

Ein dem Pit2 verwandtes Phosphattransportersystem, das PIT1 kann mittels Vektoren mit der Hülle des Gibbonaffen-Leukämie-Virus (GALV) sein Reporter gen in die Zielzellen einbringen. Trotz einiger Ähnlichkeiten mit PIT2 weist PIT1 ein unterschiedliches gewebespezifisches Expressionsmuster (KAVANAUGH et al., 1994). Myeloide und lymphoide Zellen werden durch die Verwendung von Viren mit GALV- Hülle zu höheren Raten transduziert, als durch amphotrope Viren (BAUER et al., 1995; BUNNELL et al., 1997). Eine Ausnahme stellen Zellen der Maus dar: diese sind durch GALV umhüllte Viren nicht infizierbar.

Das Hüllspektrum der anwendbaren env-Glykoproteine ist ein sehr breites, da zur Pseudotypisierung nicht nur die Hüllproteine von Retroviren verwendet werden müssen. Als Ersatz der retroviralen Hüllproteine kann zum Beispiel das G-Protein des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV.G), eines Rhabdovirus, dienen (EMI et al., 1991). (MASTROMARINO et al., 1987). Ein weiterer Vorteil gegenüber anderweitig pseudotypisierten Retroviren ist die Möglichkeit der Konzentration durch

Verschiedene Studien in denen die retroviralen Vektoren mit VSV-G pseudotypisiert wurden, haben deren Funktion gut untersucht (BURNS, 1993 YEE, 1994 ARAI,1999). Diese Viren weisen eine breite Akzeptanz und eine hohe Transduktionseffizienz auf, was darauf zurückzuführen ist, dass der VSV-G Rezeptor, der bisher jedoch noch nicht identifizierbar ist, ubiquitär vorkommende Phospholipide enthält, in die er mittels Membranfusion eintritt. Ultrazentrifugation (BURNS et al., 1993). Nachteilig wirkt sich jedoch die relativ hohe Toxizität auf die Zielzellen bei der Verwendung von VSV.G aus (YEE et al., 1994). Die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie, welche VSV.G als Hüllprotein exprimiert, ist deshalb nur mittels regulierbarer VSV.G- Expression realisierbar. (CHEN et al., 1996; ORY et al., 1996). Verwendet man zur Virusgenerierung die transiente Transfektion, treten keine Probleme auf (YEE et al., 1994).

3.5 Verwendete Transgene

3.5.1 Übersicht aktueller Reportergene

Reporter- oder Markergene sind Gene, die zur Kontrolle des Gentransfers in Zielzellen eingebracht werden. Neben der Lokalisation des eingebrachten Gens können auch Höhe und Dauer der Genexpression durch unterschiedliche Assays dargestellt werden. Verschiedene Kombinationen ermöglichen die Verwendung eines Genvektors mit einem oder mehreren Transgenen. (KAIN und GANGULY, 2001):

1. Im normalen Zustand der Zelle soll das Markergen entweder nicht vorhanden sein oder durch seine Eigenschaften leicht von der endogenen Version zu trennen sein.
2. Wichtig ist eine sensitive, einfache und schnelle Detektion des Reportergens.
3. Es muss ein sicherer Nachweis einer Änderung des Expressionslevels vorhanden sein.
4. Eine Toxizität des Reportergens muss ausgeschlossen sein.

Die verschiedenen Reportersysteme, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, erfüllen diese Anforderungen meist nur bis zu einem gewissen Grad. Um einen Überblick über verschiedene Markergene zu gewinnen und deren Vor- und Nachteile beurteilen zu können, sind die wichtigsten aktuellen Reportergene in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben. In den nächsten Kapiteln folgt eine nähere Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Reportergene *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* und *herpes simplex virus1 thymidine kinase (HSV1-TK)*.

Die Tabelle 6 gibt eine schematische Zusammenfassung der am häufigsten verwendeten Reportergene.

Genprodukt	Nachweismöglichkeit	Eigenschaften
Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)	<u>Chromatographisch:</u> nach Umsetzung radioaktiv markierten Acetyl-Coenzym A durch Zelllysate	+ Minimale endogene Aktivität + Stabiles Protein - aufwendig und teuer - Verwendung radioaktiver Substanzen - Nachweissensitivität gering
β -Galaktosidase (LacZ)	<u>Histochemisch:</u> X-Gal-Substrat (5-Bromo-4-Chlor-3-indoyl β -D-galactopyranosid) (In-vitro und in vivo Assay) <u>Kalorimetrisch:</u> Substrat o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, ONPG <u>Fluoreszenz:</u> FACS-Analyse isolierter Zellen	+ breite Anwendung durch verschiedene Nachweismöglichkeiten - Endogene Galaktosidaseaktivität in einigen Zelltypen - Relativ großes Gen (< 3 kb), dadurch limitierte Verwendung in einigen Vektorsystemen - Immunogenität nachgewiesen

		Einleitung
Natrium-IodidSymporter System (hNIS)	Aufnahme von radioaktiem Iodid im (Micro-)PET oder Gammakamera (In-vivo Assay)	+Nicht immunogen im Mensch +Nicht invasiv +Gamma-Kamera einsetzbar - Akkumulation nicht gesichert nachweisbar - Kurze Halbwertszeit des radioaktiven Substrats -
Norepinephrin Transporter (NET)	Aufnahme von MIBG im Gamma-Counter (in-vitro Assay)	+Hintergrundaktivität gering - Kurze Halbwertszeit
Leuchtkäfer-Luziferase (Luc)	<u>Biolumineszenz</u> nach Umsetzung des Substrates Luziferin (in-vitro und in-vivo Assay)	+endogene Aktivität minimal +Kostengünstiger Nachweis mit guter Sensitivität - Kurze Halbwertszeit - Messungen sind schwer reproduzierbar -

<p>Green Fluorescent Protein (GFP)</p>	<p><u>Fluoreszenz</u>: Fluoreszenz-Mikroskopie, FACS-Analyse (in-vitro Assay) In-vivo-Assay: <u>Fluoreszenz</u>: UV-Licht, optische Kamera, FACS-Analyse isolierter Zellen (in-vivo Assay)</p>	<p>+Nachweismöglichkeit in lebenden Zellen +Nachweis ohne zusätzliche Behandlung - Fluoreszenz in vivo schlecht messbar</p>
<p>Herpes Simples Virus 1 Thymidin Kinase (HSV1-TK)</p>	<p>Aufnahme von radioaktivem FIAU oder FHBG und Darstellung im <u>Counter</u> (in-vitro Assay) Aufnahme von radioaktivem FIAU oder FHBG und Darstellung im (Micro-)<u>PET</u> (in-vivo Assay)</p>	<p>+Nachweismöglichkeit in lebenden Zellen +Anreicherung des radioaktiven Substrats nur in der Zelle +Nicht invasiver Nachweis - FHBG nur an speziellen Zentren herstellbar - Toxisch in Kombination mit Ganciclovir Therapie - immunogen</p>

Tabelle 3: aktuelle Reportergene

Dargestellt sind alle aktuellen Reportergene wie zum Beispiel β -Galaktosidase, Green Fluorescent Protein oder Herpes Simplex Virus 1 Thymidin Kinase. In der Tabelle beschrieben sind die jeweiligen Nachweismöglichkeiten in vitro und in vivo, sowie die jeweiligen Vor- und Nachteile eines solchen Systems.

Tabelle modifiziert nach KAIN und GANGULY, 2001 FORG et al., 1998 HOERR et al., 2000

3.5.2 Green Fluorescent Protein

Green fluorescent Protein (GFP), das natürlicherweise in der Qualle *Aequorea Victoria* vorkommt, wurde 1992 das erste mal kloniert um sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Systemen Verwendung zu finden (PRASHER, 1992).

Durch Mutationen in der GFP-Sequenz wurde eine große Anzahl verschiedener Varianten mit unterschiedlichen Emissionsspektren oder Unterschieden in der Stabilität hergestellt. Eine dieser Varianten, die enhanced version of green fluorescent protein, ist im Augenblick der am meisten verwendete Fluoreszenz-Reporter in der Evaluation von Gentransfer Vektoren (BELL, 2007).

eGFP wurde aus dem wildtyp GFP entwickelt um durch die Verwendung alternativer Kodons seine Expression in Säugetierzellen zu verbessern und somit zu einer höheren Lichtemission zu führen (CORMACK et al., 1996 ZHANG et al., 1996).

Die Bildung der GFP Fluoreszenzemission geht ohne die Notwendigkeit eines Kofaktors oder eines anderen Substrates einher, da das GFP-Chromophor in einer autokatalytischen Reaktion gebildet wird. Daher kann der direkte Nachweis in verschiedenen Species für Experimente in lebenden Zellen und Organismen genutzt werden. (HEIM, 1994).

Die erfolgreiche Anwendung in GFP-exprimierenden transgenen Tieren (HADJANTONAKIS et al., 1998, 2002) bildet die Grundlage eines weit gefächerten Anwendungsgebietes in in vivo Experimenten, obwohl hohe Konzentrationen des GF-Proteins toxisch wirken (LIU, 1999).

Die Bindung von Calcium-Ionen an Aequorin, eines der zwei in *Aequorea Victoria* vorhandenen Biolumineszenz Proteinen, bringt eine intramolekulare Reaktion in Gange, die zur Bildung des blue fluorescent protein führt, wobei als Produkte UV-Licht und blaues Licht ($\lambda_{\max} = 395$ und 470 nm) entstehen. Durch in vitro zugabe von GFP, emittiert ein blau-grünes Licht ($\lambda_{\max} = 508$ nm), das identisch ist zu dem von der Qualle produzierten Licht (INOUYE und TSUJ, 1994).

Dieses von wtGFP emittierte Licht kann durch Fluoreszenzmikroskopie, UV-Licht oder Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. (KAIN et al., 1995).

Durch die gegebenen Wellenlängen des GFP besteht eine einfache und effiziente Möglichkeit, mittels FACS-Analyse die Expression des verwendeten Proteins nachzuweisen.

Um den Nachweis der Fluoreszenz zu verbessern wurden verschiedene Mutanten des GFP entwickelt, die Licht einer Wellenlänge von 395nm bis 490nm emittieren, welche näher am Absorptionsmaximums des verwendeten Argon-Lasers (488nm) liegen. (HEIM et al., 1996 CORMACK et al., 1996).

Am besten geeignet dafür hat sich das enhanced green fluorescent protein (EGFP) erwiesen, welches eine 35fach stärkere Fluoreszenz aufweist, als das wt GFP Protein und das für die Expression in Säugetierzellen optimiert worden ist. (CORMACK et al., 1996, ZHANG et al., 1996).

Das EGFP erweist sich außerdem auch bei Temperaturen von bis zu 65°C als stabil und ist durch einen großen pH-Bereich (7-12,2) weitgehend pH unabhängig. (ZIMMER, 2002). Da das Protein eine lange Halbwertszeit von mehr als 24h besitzt, akkumuliert es in der Zelle und kann so in Experimenten, für die Beobachtung des Expressionslevels benutzt werden. (CHALFIE et al., 1994)

3.5.3 Herpes Simplex Virus 1 Thymidin Kinase HSV1 TK

Die Herpes virale Thymidin Kinase ist sowohl ein therapeutisches Gen, als auch ein Markergen, das zum nicht-invasiven Imaging verwendet wird. In der Abbildung 7 dessen Funktionsweise auf bildliche Art dargestellt.

Zunächst wurde es in der molekularen Onkologie als sogenanntes Suizid-Gen zusammen mit Ganciclovir angewandt und findet hier auch heute noch weite Verbreitung (ROBYN et al., 1998; JACOBS et al., 2001). Die Thymidin-Kinase phosphoryliert das Prodrug Ganciclovir, welches dann von endogenen Kinasen zu GCV-Triphosphat phosphoryliert wird und so in der DNA zu Strangabbrüchenführt (REID et al., 1988). Die DNA-Replikation ist damit gehemmt. Im folgenden kommt es zu einer Häufung von p53 und zur verstärkten Expression von Apoptose induzierenden Signal Komplexen (DISC, CD95) auf der Zellmembran, was zum Zelltod führt (BELTINGER et al., 1999). Bei der Anwendung als Reporter gen findet nur in den Zellen, die aufgrund viraler Infektion die Herpes virale Thymidinkinase enthalten, eine erhöhte Verstoffwechselung des zugegebenen radioaktiven Substrates statt. Somit können die Zielzellen oder Gewebe durch geeignete Nachweisverfahren wie zum Beispiel dem β -Counter oder dem PET identifiziert werden.

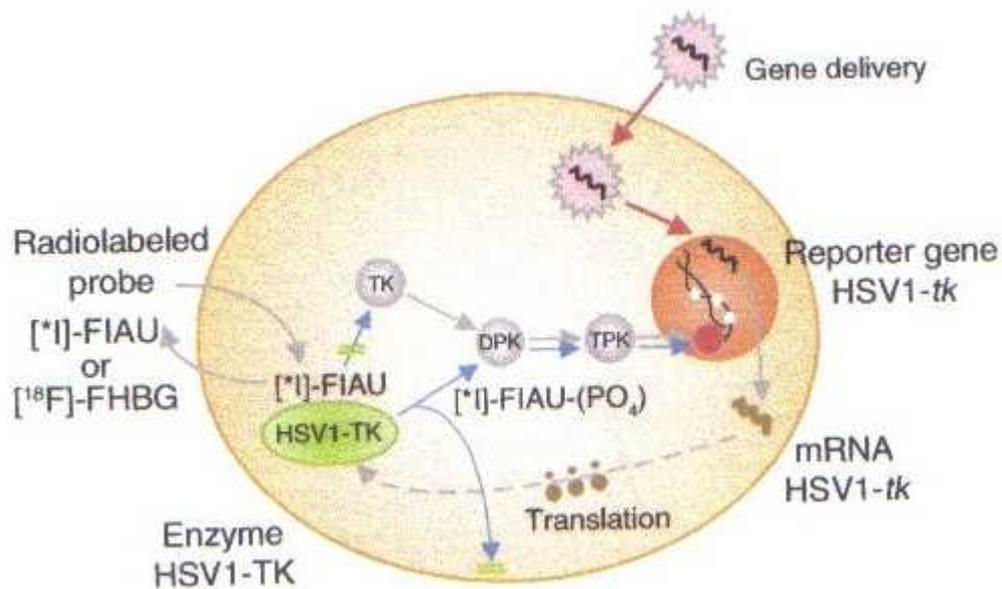


Abbildung 7: Schema FIAU, HSV1-tk

Schema zur Darstellung der HSV1-tk Reporterexpression mit verschiedenen Reportersubstrat. Der HSV1-tk Gen-Komplex wird durch einen Vektor in die Zielzelle gebracht.

In der transfizierten Zelle wird das HSV1-tk Gen in HSV1-tk m-RNA umgeschrieben, dann wird es mit Hilfe der Ribosomen als Protein HSV-TK translatiert. Nach Zugabe einer radioaktiv-markierten Sonde und deren Transport in die Zelle, phosphoryliert HSV-TK die Sonde.

Die phosphorylierte radioaktive Sonde kann die Zellmembran nicht mehr überwinden und verbleibt in der Zelle. Deswegen markiert die Menge der akkumulierten Sonden die Aktivität des Enzyms HSV-TK und die Höhe der HSV-tk Genexpression

aus Blasberg und Tjuvajeve, 2003

Basenpaarposition	785	790	811
HSV1-tk Aminosäure	C T C L	A T C I	T T C F
HSV1-sr39tk Aminosäure	A T C I	T T C F	C T C L
			T T C F
			A T G M

Tabelle 4: Sequenzunterschiede

Dargestellt sind die Unterschiede in der Sequenz von wildtyp und mutanter Herpes viraler Thymidinkinase.

Als Markergene zum indirekten molekularen Nachweis mittels radioaktiver Aufnahme im PET werden in der Hauptsache wildtyp HSV1-tk und mutant HSV1-tk (HSV1-sr39tk) (GAMBHIR et al., 1999) verwendet. Nach Zugabe des radioaktiven Substrates und dessen Transport in die Zelle wird es durch HSV1-TK (Genprodukt) phosphoryliert.

Somit kann durch Messung der Substratanreicherung in der Zelle auf die TK-Enzym Aktivität und auf die Genexpression geschlossen werden (TJUVAJEV et al., 1995). Die in Säugetieren vorhandene Thymidininkinase und deren virales Gegenstück unterscheiden sich in der Weise, dass die virale Thymidininkinase eine niedrigere Substratspezifität aufweist.

Sie phosphoryliert neben 2'-fluoro-Nukleosid-Analoga (z.B. FIAU) auch verschiedene Acylguanoside, wie Aciclovir, Ganciclovir und FHBG (BLASBERG et al., 2002). In mehreren Studien wurden die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen radioaktiven Substrate in Bezug auf dieses Markergen herausgearbeitet.

Man konnte an HSV1-tk transduzierten Tumoren in Tieren zeigen, dass die Genexpression und die Aufnahme von radioaktiven FIAU eng korrelieren (TJUVAJEV et al., 1999).

Auch zum molekularen Imaging in der Gentherapie am Herzen konnte HSV1-tk erfolgreich eingesetzt werden. Zunächst wurden Ratten-Kardiomyoblasten mit HSV1-tk enthaltenem Adenovirus transduziert und die radioaktive Aufnahme nach Zugabe von FIAU gezeigt (BENGEL et al., 2000).

Danach wurden Studien mit ähnlichem Vektordesign an Ratten und Schweinen durchgeführt (WU et al., 2002; WU et al., 2003, INUBUSHI et al., 2003, BENGEL et al., 2003)

In einer weiteren in vivo Anwendung mit Epstein-Barr-Virus spezifischen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass nach Injektion von stabil transduzierten T-Zellen mit HSV1-tk deren Akkumulation mittels PET nachgewiesen werden konnte (KOEHNE et al., 2003)

Mehrere Studien zeigen, dass bei adenoviraler Transfektion wt HSV1-tk zusammen mit FIAU und mt HSV1-tk zusammen mit FHB gute Ergebnisse erzielen (TJUVAJEV et al., 2002; MIYAGAWA et al., 2004, ANTON et al. 2004). Bei der Verwendung von retroviralen Vektoren ergibt FIAU die besseren Ergebnisse (MIN et al., 2003). Die Sequenzunterschiede der wildtyp und mutanter Thymidininkinase sind in der Tabelle 4 abgebildet.

3.5.4 Kombination von Markergen und therapeutischem Gen

Die moderne rekombinante DNA Technologie hat zu einer Vielzahl von viralen und nichtviralen Vektorsystemen geführt. Schon 2001 befanden sich mehr als zweitausend Patienten in klinischen Phase 1 und 2 Studien.

Um die Wirksamkeit der durchgeführten Gentherapie zu evaluieren versucht man Markergen und therapeutisches Reporteragen zu koppeln. Zunächst hat man HSV1-tk mit eGFP fusioniert und dann die radioaktive Aufnahme von FIAU gemessen. Durch die Verwendung als Fusionsprotein kann eGFP allerdings nicht durch ein sekretorisches therapeutisches Gen ersetzt werden, da das Genprodukt mit HSV1-tk intrazellulär verbleibt (JACOBS et al., 1999, PASANEN et al., 2003) Um die gleichzeitige Expression von zwei Genen im retroviralen Vektor zu ermöglichen wird ein Gen upstream der internal ribosomal entry site (IRES) kloniert (FLASHOVE, 2000). Dieser bicistronische Vektor erlaubt die funktionsfähige Produktion von zwei unterschiedlichen Genen auf dem gleichen Transkript (HSIEH, 1995). Mehrere Studien haben gezeigt, dass sowohl in retroviralen Vektorkonstrukten (IANNI et al., 1997; ZHANG, 2003) als auch in adenoviralen Vektoren (CHEN et al., 2004) durch eine Kombination der zwei Gene mit IRES eine gleichwertig hohe Effizienz erreicht werden konnte.

Eine weitere Entwicklung war die Anwendung von HSV1-tk als Markergen zusammen mit LacZ unter der Kontrolle eines einzelnen Promotors innerhalb einer bicistronischen Einheit (TJUVAJEV et al., 1999). Der Erfolg dieses Ansatzes führte dann zur gemeinsamen Verwendung von HSV1-tk zusammen mit VEGF (ANTON et al., 2004).

3.5.5 Positronen Emissions Tomographie (PET)

In der Medizin ist das PET als nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren das Pendant zur Computertomographie in der Röntgendiagnostik.

Mit Hilfe der Positronen Emissions Tomographie kann eine schichtweise Darstellung von Radioaktivitätsverteilungen im jeweiligen Organismus erreicht werden. Der Zerfall eines Positronen Elektronen Paares kann entweder durch Koinzidentenauswertung oder Flugzeitmessung von zwei Gammaquanten registriert und lokalisiert werden. Durch Anordnung der Detektoren in einen oder mehreren Ringen können durch geeignete Verfahren transversale Schichten rekonstruiert werden.

Die Vorteile des PET gegenüber den anderen Schnittbildverfahren sind außer der großen räumlichen und zeitlichen Auflösung, die Möglichkeit einer absoluten Quantifizierung mit Angabe von Fluss- oder Stoffwechselraten. Weiterhin kann durch die Verwendung der Positronen Emissions Tomographie eine nichtinvasive Darstellung biochemischer Prozesse im lebenden Organismus erzielt werden. Dabei werden die physikalischen oder chemischen Eigenschaften dieses Organismus nicht verändert. Verwendet werden hierzu kurzlebige Positronenstrahler wie ^{11}C , ^{13}N , I^{131} oder ^{15}O .

Die Nachteile sind insbesondere der hohe apparative und logistische Aufwand vor allem bei der Herstellung und Markierung der Positronenstrahler.

Eingesetzt wird das PET routinemäßig in der Kardiologie, der Onkologie und der Neurologie. Die Indikation für ein Herz-PET besteht derzeit in der Prognoseerstellung nach Revaskularisation bei Patienten mit stark eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion. Im Onko-PET dagegen nutzt man die Möglichkeit der Ganzkörperdarstellung zum Staging der neoplastischen Erkrankung. Dadurch kann der Ausbreitungsgrad erkannt werden und eine Rezidivdiagnostik betrieben werden. Zuletzt findet das Neuro-PET Anwendung in der Differentialdiagnostik des Morbus Alzheimer, verschiedener Multi-System-Erkrankungen, der Huntington-Erkrankung, primärer Demenzen oder der Lokalisation epileptogener Foci.

In der Zukunft wird durch entsprechende Studien die Ausweitung der PET Diagnostik zum Beispiel bei Schilddrüsenkarzinomen, Hirntumoren oder auch dem kolorektalem Karzinom und weiteren klinischen Fragestellungen erwartet.

3.6 Gentransfer in endothelialen Vorläuferzellen & Rattenkardiomyoblasten

3.6.1 Verwendung von endothelialen Vorläuferzellen in der Genterapie

Die Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt oder Ballonkatheterisierung gewinnt zunehmend an klinischem Interesse. Die möglichen positiven Ergebnisse nach einer solchen Therapie zeigt Abbildung 8.

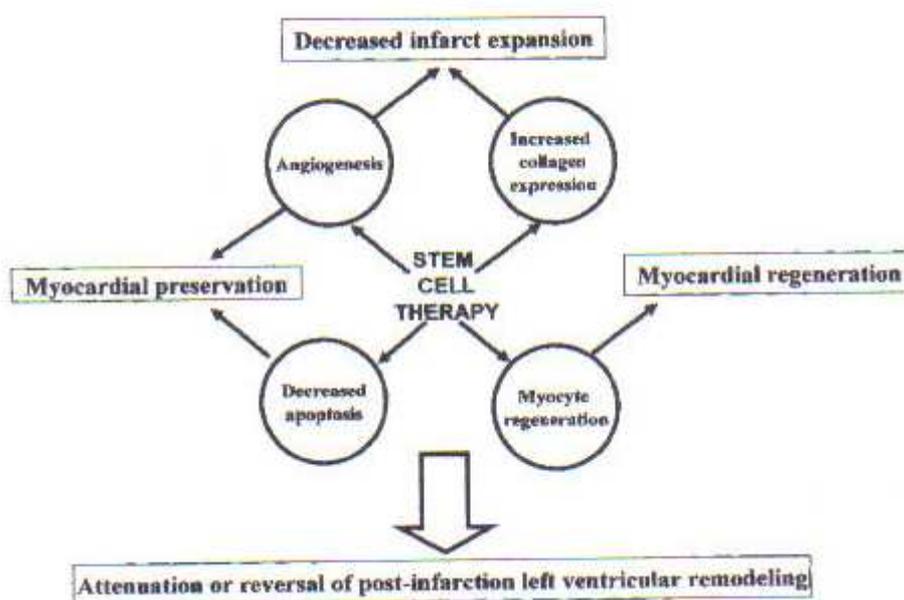


Abbildung 8: Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt

Dargestellt sind die verschiedenen Möglichkeiten der Stammzelltherapie im Zusammenhang mit akutem Koronarsyndrom. Zum einen kann eine Stammzelltherapie die Regeneration des Myokards beschleunigen, zum anderen verhindern, dass sich der Infarkt weiter ausbreitet. Bei jedem Infarkt gehen Myokardzellen unwiderbringlich zugrunde. Diese können durch Stammzelltheapie ersetzt werden und zur Erholung der linksventrikulären Funktion beitragen. Als letztes kann eine Stammzelltherapie auch als Schutz vor einem drohenden oder wiederholten Myokardinfarkt beitragen.

Aus FORRESTER et al., 2003

Die Therapie mit endothelialen und hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark kann zu einer Verbesserung der Gewebsdurchblutung nach ischämischen Ereignissen führen (RAFII et al., 2003). Die intramuskuläre Injektion von vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor führt zu einer verstärkten Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe mittels Erhöhung der lokalen EPC Anzahl (KALKA et al., 2000).

Durch Isolierung und Transduktion mit einem retroviralen Vektor, der gefäßprotektive Faktoren überproduziert (eNOS und HO-1) konnte nach Re-Injektion eine Verminderung der unerwünschten Neointima in verletzten Gefäßen beobachtet werden (KONG, 2004). Endotheliale Vorläuferzellen sollen indirekt die Funktion des geschädigten Endothels verbessern können (OTT et al., 2005).

Diese Behauptung ist jedoch wegen fehlender in vivo Darstellungsmethoden (wie z.B. stabile Transfektion mit HSV1-TK) und fehlender Langzeitstudien nicht abschließend beweisbar.

3.6.2 Biologie der endothelialen Vorläuferzellen (EPC)

Endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark führen sowohl in der embryonalen als auch in der postnatalen Phase zu Revaskularisierung (RAFII et al., 2003).

Die Mobilisierung und Neovaskularisierung durch endotheliale Stammzellen ist vielen Einflüssen unterworfen. Stimulatorische Faktoren wie z.B. Statine und inhibitorische Faktoren wie z.B. Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit regulieren die Anzahl der Vorläuferzellen (URBRICH und DIMMELER, 2004).

Die wichtigste Eigenschaft bei der Isolierung der EPC ist, dass sie zunächst einmal CD34+ sein müssen (ASAHARA et al., 1997). Weiterhin wurde gefunden, dass diese Zellen vermehrt endotheliale Markerproteine wie den von-Willebrand-Faktor (vWF) aufweisen und Dil- Ac- LDL in ihr Zytoplasma aufnehmen. Weitere wichtige Markerproteine sind VEGFR2 und CD133 (PEICHEV et al., 2000, GEHLING et al., 2000).

Bei der Isolierung von endothelialen Stammzellen aus dem peripheren Blut wird zur Charakterisierung der Zellen die LDL Aufnahme und die Lectinbindung gemessen, dann die oben genannten Markerproteine neben anderen wie CD31, CD3, CD14 und CD45 gemessen (FADINI et al., 2005). Eine weitere Selektionsmöglichkeit ist die Bindung an Fibronectin (BELLIK et al., 2005).

Eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen EC und EPC wurden von OTT et al., 2005 publiziert: Der Marker AC 133, endotheliale Vorläuferzellen sind positiv für diesen Marker, der eine hohe Zellteilungsfähigkeit anzeigt. Die klinische Therapie mit endothelialen Vorläuferzellen birgt große Chancen.

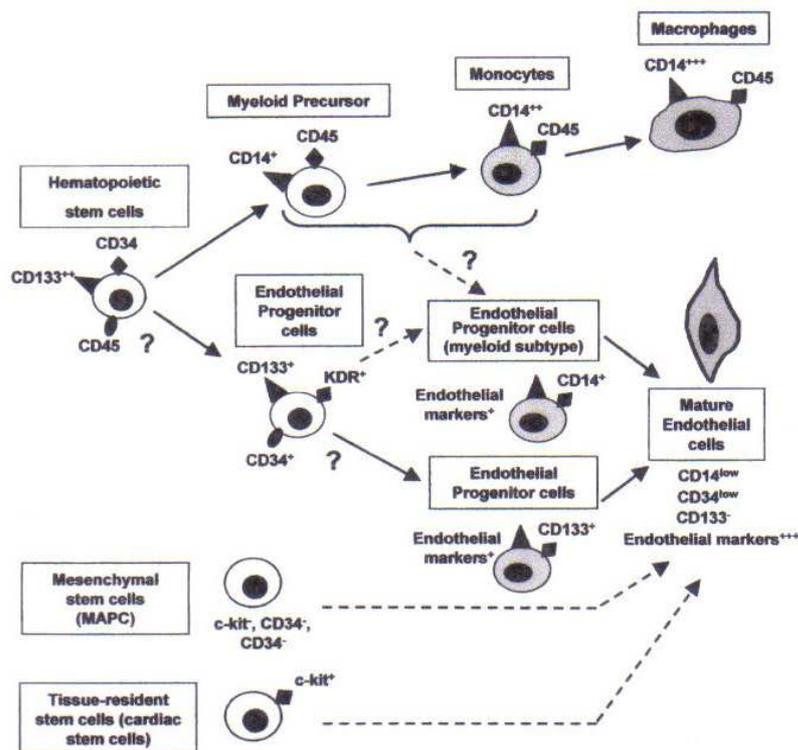


Figure 1. Origin and differentiation of endothelial progenitor cells. Scheme depicts the potential origin and differentiation of endothelial progenitor cells from hematopoietic stem cells and nonhematopoietic cells.

Abbildung 9: Ursprung und Differenzierung der humanen endothelialen Vorläuferzellen.

Dargestellt ist der mögliche Ursprung und die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus hämatopoetischen Stammzellen und nicht hämatopoetischen Zellen.

aus Urbich und Dimmeler, 2004

3.6.3 Gentransfer in Kardiomyozyten

1976 wurden von KIMES et al. zum ersten Mal Kardiomyoblasten für in vitro Versuche an Herzzellen isoliert. Die von dieser Forschungsgruppe publizierten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die isolierten Zellen so wenig Ähnlichkeit mit Kardiomyozyten haben, dass sie für in vitro Versuche nicht sinnvoll sind.

Erst 1991 wurde in der Arbeitsgruppe von HESCHELER et al., mit neuen Selektionsmethoden entdeckt, dass sich die Rattenkardiomyoblasten nicht in dem Maße von adulten Herzzellen unterscheiden, so dass sie in den folgenden Jahren wieder verstärkt zur in vitro Forschung mit Herzzellen zum Einsatz kamen.

Der Umstand, dass sich Kardiomyozyten in vivo nicht teilen, macht einen retroviralen Gentransfer unmöglich. Der erfolgreiche in-Situ Transfer von Markergen und therapeutischem Gen wurde durch die Verwendung adenoviraler Viren erreicht (BENGEL et al., 2000, ROSENGART et al., 1999).

Auch bei stabilen Kardiomyozyten Zelllinien wie H9c2 wurden bisher ausschließlich adenovirale Vektoren verwendet (WU et al., 2003; WU et al., 2004).

3.6.4 Biologie der embryonalen Rattencardiomyoblasten (H9c2)

Stabile Zelllinien dienen als Modell für die Durchführung von in vitro Studien. Die Generierung einer stabilen Myokardiozyten-Linie erwies sich lange Zeit als schwierig, da frisch isolierte Zellen sich in Kultur nicht vermehren können und kardiale Tumore sehr selten sind. Die beschriebene Zelllinie ist ein Subklon der originalen Klon-Zelllinie auf embryonalem BDIX Ratten-Myokard Gewebe (HESCHELER et al., 1991).

H9c2 Zellen haben keine morphologische Ähnlichkeit zu frisch entnommenen Kardiomyozyten. Sie enthalten keine gap junctions, T-Tubuli oder Myofibrillen mit Sarcomeren, aber sie sind reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum und bilden zur Vergrößerung ihrer Oberfläche Mikrovilli aus.

Länger in Kultur gehalten, zeigen sich verschiedene Veränderungen in adulten, neonatalen oder embryonalen Kardiomyozyten, welche im Folgenden beschrieben werden:

1. Zunächst formen sie sich zu runden Zellen, deren Sarkomer nicht mehr vorhanden ist, die Z-Linie erscheint als fokale dichte Masse und die Mitochondrien haben kompakte Christae. Außerdem bilden diese Zellen Mikrovilli aus.
2. Ab dem 5. Tag fangen die Zellen an ihre Ultrastrukturen neu zu organisieren. Die Zellen wachsen in die Länge und bilden neue Myofibrillen mit kompletten Sarkomeren. Auch T-Tubuli werden ausgebildet. Während dieser Phase zeigen sich bei embryonalen Kardiomyozyten sogenannte „stress fibers“, die im Verlauf durch Myofibrillen ersetzt werden können (HESCHELER, 1991).

Abgesehen von diesen Unterschieden zwischen H9c2 und frisch gewonnenen kardialen Zellen zeigt sich, dass die Oberfläche der Zellen zum Großteil erhalten bleibt:

1. H9c2 und adulte Rattenkardiomyozyten waren negativ für „lectins soybean agglutinin“ und „Dolichos biflorus agglutinin“, welches bevorzugt an Meerschweinchen Kardiozyten bindet.
2. „peanut agglutinin“ war ebenfalls bei H9c2 und adulten Rattenkardiozyten negativ (STEGEMANN, 1990).

Weitere Zelltyp-spezifische Parameter sind die Spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, die in Herzzellen eine langsame Inaktivierungszeit aufweisen und durch Ca^{2+} -Kanal-Blocker zu blockieren sind. Durch β -Adrenozeptoragonisten lässt sich deren Offenheitswahrscheinlichkeit erhöhen. H9c2 Zellen weisen diese typischen Eigenschaften der Ca^{2+} -Kanäle auf (TSIEN, 1988; BEAN 1989; TRAUTWEIN, 1990).

Untersuchungen der 1,4-Dihydropyridine Bindungsstelle an H9c2 Zellen zeigten alle herz-spezifischen Eigenschaften (GLOSSMANN, 1988).

Einige Studien berichteten, dass sich die H9c2 in vitro zu konfluenten, multinuklearen Zellen dedifferenzierten (KIMES, 1976).

SIPIDO und MARBAN postulieren die Ähnlichkeit der Ca^{2+} -Kanäle zwischen adulten Kardiozyten und H9c2, zeigen jedoch eine signifikante Differenz in den restliche Ionenkanälen der Zellen. Weiterhin wurde ein unspezifischer Ionenkanal entdeckt, dessen Funktion jedoch unklar ist (SIPIDO, 1991).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass H9c2 Zellen morphologische Eigenschaften ähnlich derer von immortalisierten embryonalen Kardiozyten zeigen. Dennoch haben sie große Ähnlichkeit in den elektrischen und hormonellen Signalwegen, die sich in adulten Herzzellen finden (HESCHELER et al., 1991).

4 Zielsetzung der Arbeit

Die zur Zeit verfügbaren Ansätze zur nicht-invasiven bildlichen Darstellung in der Gentherapie kardialer Erkrankungen beschränken sich auf die Verwendung von adenoviralen Vektoren. Da jedoch die Expression des verwendeten Markergens zeitlich limitiert ist, sind bis dato keine Langzeitstudien über den Verbleib der gentherapeutisch veränderten myokardialen Zellen verfügbar. Durch die Verwendung retroviraler Vektoren bietet sich die Möglichkeit, Zellen mit hoher Effizienz in vitro stabil zu transduzieren und so den Langzeitverlauf der infizierten Zellen zu beobachten.

Ziel der Arbeit war daher die Herstellung und molekulare Charakterisierung stabil transduzierter Rattenkardiomyoblasten und humaner endothelialer Vorläuferzellen zur nicht-invasiven bildlichen Darstellung. Es gibt zwei unterschiedliche herpesvirale Thymidinkinasen als Reportergene. Zum einen die HSV1-tk wildtyp Variante, zum anderen die HSV1-sr39-tk.

Als Zielzellen wurden Rattenkardiomyoblasten (H9c2) verwendet, die in verschiedenen Studien sowohl als in vitro Beispiel im Vorfeld von Tierversuchen gedient haben, zum anderen auch nach viralem Vektortransfer direkt in das Myokard injiziert werden. Eine zweite Zelllinie sind humane endotheliale Vorläuferzellen (EPC), da einige therapeutische Ansätze mit genetisch veränderten Stammzellen zur Therapie der koronaren ischämischen Herzkrankheit arbeiten.

Eine kurze Übersicht über den Ablauf des Projekts wird in Tabelle 5 gegeben

<p>Herstellung und molekulare Charakterisierung stabil transduzierter Ratten kardiomyoblasten und humaner endothelialer Vorläuferzellen zum nicht- invasiven Imaging: Vergleich von wildtyp und mutanter Herpes simplex Virus Typ1 Thymidinkinase</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Klonierung von IRES-eGFP zusätzlich zur wildtyp oder mutanten TK 2. Herstellung der Viren mit unterschiedlichen Hüllen GALV und VSV.G unter Verwendung von 293T- Zellen 3. Titration der 293T mittels eGFP und FACS 4. Stabile Transduktion von H9c2 und EPC 5. Titration der Zielzellen mittels eGFP und FACS 6. Nachweis der Genexpression durch Northern- Blot 7. Nachweis auf Proteinebene durch Western- Blot 8. radioaktive Aufnahme von FIAU und Messung im β-Counter 9. Wachstumskurve

Tabelle 5: Ablauf des Projekts

5 Molekularbiologische Materialien und Methoden

5.1 Für die Klonierung verwendete Plasmide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 6 mit einer kurzen Angabe des Verwendungszweckes und der Bezugsquelle (Herkunft) aufgelistet.

Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau dieser Plasmide mit der Angabe der für Klonierungen verwendeten Restriktionsenzym-Schnittstellen.

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pBullet	Mo-MLV-retroviraler Vektor	R.Willemsen, Rotterdam, Niederlande (WILLESEM et al., 2003)
pBulletIRESeGFP	Modifizierter pBullet Vektor mit Markergen	M. Anton , Institut für exp. Onkologie und Therapieforschung, TU München, Deutschland (unveröffentlicht)
pDC316TK pDC316srTK	Markergen Herpes Virus 1 Thymidine Kinase Reportergergen	M. Anton , Institut für exp. Onkologie und Therapieforschung, TU München, Deutschland (unveröffentlicht)
pHIT60	Verpackungsplasmid Kodiert für die Hüllproteine des vesikulären Stomatitis Virus	M. Anton , Institut für exp. Onkologie und Therapieforschung, TU München, Deutschland (SONEOKA et al., 1995)
pCOLT-Galv	Verpackungsplasmid Kodiert für die Hüllproteine des Gibbon-Affen-Leukämievirus	M. Anton , Institut für exp. Onkologie und Therapieforschung, TU München, Deutschland (WEJTENS et al., 1998)

Tabelle 6: verwendete Plasmide. Dargestellt sind die für die Arbeit benötigten Plasmide, deren Verwendung und Herkunft.

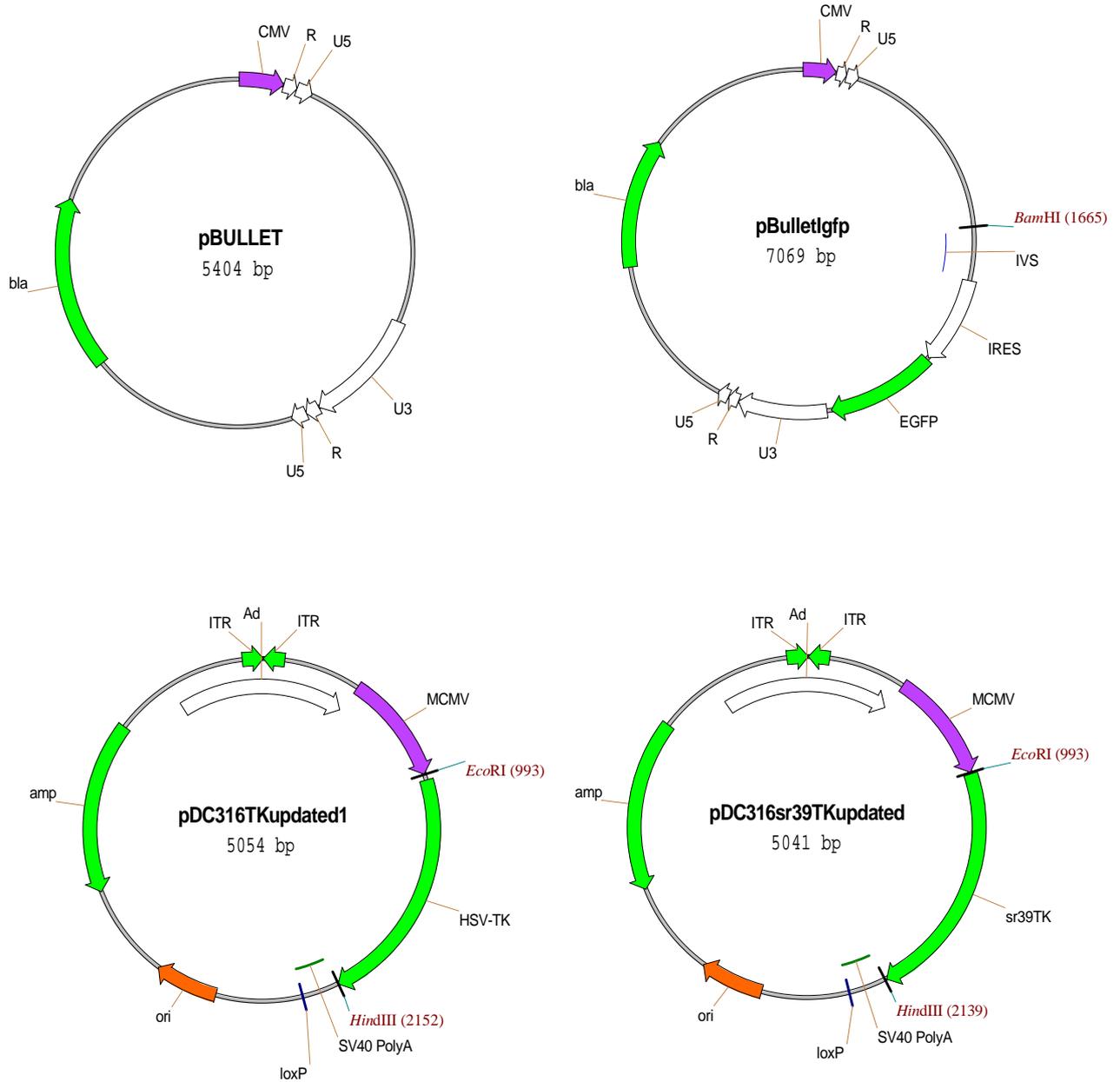


Abbildung 10: die verwendeten Plasmide

ITR	inverted terminal repeat	amp	Ampicillin Resistenz
ori	Origin	CMV	Cytomegalievirus
SV40	Polyadenylierungssignal		

In der Abbildung gezeigt sind die Plasmide als sogenannte Plasmid-Maps mit allen relevanten Schnittstellen.

5.2 Bakterienkultur

5.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Es wurden zur Amplifikation der Plasmid –DNA *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH10B (Fa. Invitrogen, La Jolla, USA) Bakterien verwendet. Diese kultivierte man als Flüssigkultur in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) bzw auf LB-Agarplatten. Um eine Selektion der plasmidtragenden Bakterien in Anwesenheit von β -Laktam Antibiotika zu ermöglichen, enthalten alle verwendeten Plasmide das Gen für die Ampicillin-Resistenz (*amp*). Dazu setzte man dem Kulturmedium AmpicillinG (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in einer Endkonzentration von **100 $\mu\text{g/ml}$** zu.

Luria-Bertani-Medium:

- 10 g Tryptone Peptone (Fa. BD Diagnostic Systems, Sparks, USA)
- 5 g Yeast Extract (Fa. BD Diagnostic Systems, Sparks, USA)
- 10 g NaCl (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- bidestilliertes H²O (dd H²O) ad 1 l
- Sterilisation bei 120 °C und 1 bar für 20 min
- die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur (r.t.)

Agarplatten :

- 15 g Agar (Bacto™ Agar, Fa. BD Diagnostic Systems, Sparks, USA)
- 1 l LB-Medium
- Sterilisation bei 120 °C und 1 bar für 20 min
- Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin G nach Abkühlen der Lösung auf ca 60 °C
- Die Lagerung der Platten erfolgt bei +4 °C

5.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden mit Hilfe von Calcium Chlorid chemisch zur Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht, da die *E. coli* diesen Vorgang spontan nicht ausführen können. Spontan nehmen die *E. coli* Bakterien keine Fremd-DNA auf. Dies geschah nach der von SAMBROOK und Mitarbeitern, 1989a veröffentlichten Methode.

5.2.3 Transformation

Das Einbringen genetischen Materials in Form bakterieller Plasmide nennt man Transformation von Bakterien. Im Zuge dieses Vorgangs ändern sich auch deren genetische Eigenschaften.

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit der gewünschten DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz für 90 s im Heizblock (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf, Hamburg) auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Überführung der Bakterien in 1 ml LB-Mediumvorlage ohne Antibiotikum erfolgte eine 60 min lange Inkubation bei 37 °C und 150 U/min im Bakterenschüttler (New Brunswick, Fa. Edinon, New Jersey, USA). 200 µl dieser Kultur wurden auf einer das Selektionsantibiotikum enthaltenden LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Wärmeschrank, Fa. Wtb Binder, Tuttlingen). Bis zum folgenden Morgen bildeten sich klonale Bakterienkolonien.

5.2.4 Plasmidpräparation

Allen im Folgenden beschriebenen Methoden liegt das gleiche Prinzip zugrunde. Nach der Anzucht in geeignetem Selektionsmedium erfolgt die Lyse der Bakterien in NaOH/SDS haltigem Puffer. Durch die Zerstörung der Zellen werden Proteine und DNA freigesetzt und denaturiert. Dann gibt man dem Lysat eine Lösung mit hoher Salzkonzentration zu, wobei chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer als Präzipitat ausfallen und die Plasmid-DNA und RNA in Lösung verbleibt. Am Ende wird die Plasmid-DNA durch Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) entsalzt und gefällt.

5.2.4.1 Analytische Plasmidpräparation

Die Analyse der Plasmide einzelner Bakterienkolonien nach Transformation eines Ligationsansatzes erfolgte mittels Minipräparationen. Verwendet wurde das Wizard™ Plus Minipreps Purification System der Firma Promega (Madison, USA) nach Angaben der Hersteller.

5.2.4.2 Maxipräparation zur Präparation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmiden für weitere Klonierungen erfolgte mit Hilfe des QUIAGEN Plasmid-Maxi Kit der Firma Quiagen GmbH, Hilden, nach Angaben des Herstellers.

5.2.4.3 Cäsium-Chlorid-Präparation von Plasmiden

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels Cäsium-Chlorid-Präparation (modifiziert nach BIRNBOIM und DOLY, 1979) erfolgte für die weitere Verwendung der DNA für Transfektionen in der Zellkultur. Hierbei weist die auf diese Art aufgereinigte DNA einen höheren Reinheitsgrad auf als nach Maxipräparation.

Zunächst erfolgte die Zentrifugation der Bakterien-Übernachtskultur (500 ml Volumen) bei 4000 U/min (Zentrifuge J-2HS Zentrifuge, Rotor JA-10 und JA-20 Fa. Beckmann, Palo Alto, USA). Nach Resuspension des Pellets in 40 ml Lyse-Puffer erfolgte eine Inkubation von 20 min bei r.t.

Durch Zugabe von 80 ml alkalinem Natriumdodecylsulfat (SDS) schloss sich die alkalische Lyse an. Nach Inkubation auf Eis (5-10 min) und anschließender Zugabe von 60 ml 5 M K-Acetat-Lösung folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15-30 min. Danach erfolgte die Zugabe von 10 ml ddH₂O, an die sich ein Zentrifugationsschritt von 30 min, 10 000 U/min (J-21 B Centrifuge, Rotor JA-20, Fa. Beckmann, Palo, USA) anschloss.

Der Zentrifugationsüberstand wurde durch ein Stück Verbandsgaze filtriert und in ein neues 500 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 ml Isopropanol folgte eine Inkubation von 30 min bei r.t.

Der Ansatz wurde danach 30 min bei 10 000 U/min (r.t.) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknen des Pellets an der Luft erfolgte dessen Auflösung in 8 ml 0,1× Saline-Sodium Citrate (SSC).

Je Ansatz wurden 8 g Cäsium-Chlorid (CsCl, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in ein 50 ml Röhrchen (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) eingewogen und das gelöste Pellet zugegeben. Nach dem Lösen des CsCl und anschließender 30 min Inkubation des Ansatzes auf Eis, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3800 U/min für 15 min (Varifuge 3.0, Fa. Heraeus, Hanau).

Der Überstand wurde abgenommen und mit 200 µl Ethidium-Bromid (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 8,9 ml Optisealtubes (Beckmann, Palo Alto, USA) gegeben. Nach Auffüllen mit 0,1× SSC folgte über Nacht eine 14- bis 16-stündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Optima Le 80K Ultracentrifuge, Rotor 80Ti, Fa. Beckmann, Palo

Alto, USA) mit 55 000 U/min bei 14 °C.

Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA-Bande mit einer Kanüle und Spritze abgesaugt und in ein 50 ml Falcon Tube mit 1,5 ml CsCl gesättigtem Isopropanol gegeben und dann im Volumen 1:1 mit Isopropanol (CsCl gesättigt) versetzt. Nach Abnahme der oberen Phase erfolgte die erneute Zugabe von CsCl gesättigtem Isopropanol, bis nach mehrmaliger Wiederholung die untere plasmidhaltige Phase farblos (d.h. frei von Ethidium-Bromid) war.

Zu der gereinigten unteren Phase wurden 3 Volumina Ethanol (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) zugegeben. Es schlossen sich 30 min Zentrifugation bei 4000 U/min an. Das entstandene DNA-Pellet wurde einmal mit 100%igem Ethanol und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Dann folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4000 U/min. Nach Trocknen des Pellets bei r.t. wurde dieses je nach Größe in 200-500µl 0,1× SSC gelöst.

Lysozym-Puffer:

- 5 mg Lysozym (Fa. Roche) pro 1 ml Lysepuffer

Lysepuffer:

- 10 mM EDTA (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 50 mM Glucose
- 25 mM Tris, pH 8.0 (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- in ddH₂O gelöst

Alkalines SDS:

- 1 % (v/v) SDS (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 0,2 N NaOH
- in ddH₂O

5 M K-Acetat-Lösung:

- 147 g K-Acetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 300 ml ddH₂O lösen und autoklavieren (20 min, 120 °C, 1 bar)
- 57,5 ml Eisessig (Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 142.5 ml ddH₂O

0,1× Saline-Sodium Citrate (SSC):

- 0,5 % (v/v) 20× SSC in ddH₂O

20× SSC:

- 175,3 g Natriumchlorid
- 88,2 g Natriumcitrat
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
- mit ddH₂O auf 1 l Volumen auffüllen

TE-Puffer:

- 10 mM Tris, pH 7,4
- 1 mM EDTA
- in ddH₂O gelöst

5.2.5 Konzentrationsbestimmung gelöster DNA

5.2.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA mit zu erwartender hoher Konzentration (aus Maxipräparation oder Cäsiumchlorid Präparation) erfolgte photometrisch (Beckmann DU 600 Spektrophotometer, Fa. Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

$$A_{260}/A_{280} = 1,7-1,9$$

5.2.5.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Waren geringe Mengen Nukleinsäure vorhanden, wurde deren Konzentration mittels Gelelektrophorese geschätzt. Hierbei wurden ein Aliquot zu messender Probe und ein Marker bekannter Konzentration (λ -HindIII Marker der Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA) aufgetragen. Die Konzentration der Probe wurde durch den Vergleich der Intensität der Bande unter UV-Licht mit der Bande bekannter Konzentration des Markers bestimmt. Grundlage hierfür ist, dass die Intensität der Fluoreszenz der Nukleinsäuren mit Ethidium-Bromid unter UV-Licht proportional zu ihrer Menge ist.

Konzentrationsbestimmung:

Probenkonzentration (C) = Basenpaare / 48,5 x Verdünnungsfaktor $\mu\text{l}/\mu\text{g}$

5.2.6 Gelelektrophorese

Die Standardmethode für die Separation, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten ist die Elektrophorese durch Agarosegele. Im Folgenden wird das zugrunde liegende Prinzip beschrieben:

An ein in salzhaltigem Puffer liegendes Agarosegel wird ein elektrisches Feld angelegt, woraufhin DNA, welche bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist, zur Anode wandert. Die Geschwindigkeit dieser Wanderung hängt unter anderem von der Größe der entstandenen Fragmente ab.

Grundsätzlich gilt, dass kleine Fragmente schneller wandern als große. Für die Analyse und Präparation von DNA wurden Agarosegele je nach Größe der DNA-Fragmente mit einem Gehalt von 0,8% bis 2% (w/v) Agarose (peqGold Universal Agarose, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in Tris-Acetat-Puffer (TAE-Puffer) mit 2 µl Ethidium-Bromid (Konzentration 10mg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet.

Die Elektrophorese fand in einer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit Elektrophoresekammer (Fa. Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) in TAE-Puffer bei 80-90 V statt. Die Dauer betrug je nach Versuchsbedingungen 1-2h.

Die DNA-Proben wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung im Verhältnis 1:6 mit 6× Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker dienten der 1 kb DNA Marker und der λ -HindIII Marker der Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA. Die Dokumentation der Elektrophoresegele erfolgte mittels Fotografie des Gels in einer Dunkelkammer mit UV-Leuchttisch (Gerät Bio-Print®, Fa. Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich) und nachfolgender Auswertung durch die zugehörige Software Bio-Capt® (Fa. Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich).

Durch den Zusatz von Ethidium-Bromid, einem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, stellen sich DNA-Fragmente einer Größe als eine in UV-Licht fluoreszierende Bande dar.

TAE-Puffer:

- 4,84 g Tris-Acetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 1.1 ml 100 % Essigsäure (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- mit ddH₂O auf 1 l Volumen auffüllen.

6× Ladepuffer:

- 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (3`3`5`5``-Tetraphenolsulfonephtalein) (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 30 % (v/v) Glycerol (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- in ddH₂O

5.2.7 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

5.2.7.1 Analytischer Restriktionsverdau

Zur Analyse von Plasmiden aus Minipräparationen nach Ligation oder zur Kontrolle eines bereits etablierten Plasmids wurde eine analytische Spaltung der Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) durchgeführt. Diese Enzyme schneiden DNA an für sie spezifischen Restriktionsstellen und führen so zu einer Linearisierung oder Fragmentierung der DNA. 0,2-1 µg Plasmid-DNA wurden hierfür mit 5-10 U Restriktionsenzym (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim oder Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA) und dem dazugehörigen Puffer in 1x Konzentration für ein bis zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Thermostat (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 10 µl. Danach folgte die gelelektrophoretische Analyse.

5.2.7.2 Präparativer Restriktionsverdau

Zur Präparation von DNA-Fragmenten für die weitere Klonierung wurden 4-10 µg DNA mit 10-20 U des benötigten Restriktionsenzym verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente bei 45 V und Visualisierung wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

5.2.8 DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen

Die Isolation von DNA aus Agarose erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit™ der Firma Qiagen GmbH, Hilden nach Angaben des Herstellers.

5.2.9 Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA

Je nach verwendetem Enzym entstehen beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen glatte Enden (*blunt ends*), Enden mit 5'-Überhang oder Enden mit 3'-Überhang (*sticky ends*). In den beiden letzten Fällen ergibt sich im Rahmen von Klonierungen bzw. Subklonierungen unter Umständen das Problem, dass DNA-Fragmente mit inkompatiblen Enden miteinander verknüpft werden müssen.

Es besteht hierbei die Möglichkeit, solche Enden zu glätten und die DNA-Fragmente mittels *blunt end* Ligation zu verknüpfen. Mittels Klenow Enzym wurden die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt. Klenow Enzym besitzt 5'-3'-Polymerase und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität.

In Anwesenheit von desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTP) und Magnesiumionen zu Auffüllen der 5'-überhängenden Enden kann man die Exonukleaseaktivität nutzen um glatte DNA-Enden (*blunt ends*) zu erhalten. Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität werden 3'-überhängende Enden geglättet. DNA aus Restriktionsverdauansätzen kann direkt für die Auffüllreaktion verwendet werden, da Klenow Enzym praktisch in allen Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist.

Verwendet wurden Klenow Enzym und eine dNTP-Stammlösung (mit je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Die Konzentration der dNTP's für die Reaktion betrug je nach Konzentration der DNA 20-40 µl. Dabei wurde beachtet, dass der Ansatz die entsprechende Menge Restriktionspuffer enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 bis 3 U Klenow Enzym gestartet und nach einstündiger Inkubation bei 37°C durch Erhitzen auf 75°C für 10 min gestoppt.

5.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Verwendet wurde die T4-DNA-Ligase (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) des Bakteriophagen T4. Diese katalysiert eine Ligation in Form von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Enden. Voraussetzung ist, dass die zu verbindenden Enden kompatibel sind. Für eine Ligation wurde das zu klonierende Insert mit dem linearisierten Vektor (in der Regel dephosphoryliert) in 10 bis 20fachem molaren Überschuss zusammengegeben. Die Gesamtmenge eingesetzter DNA sollte dabei 200 ng nicht überschreiten. Zu diesem Gemisch wurde ATP haltiger 10× Ligase Puffer (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gegeben und der Reaktionsansatz mit sterilem ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C.

5.2 Zellbiologische Materialien und Methoden

5.3.1 Verwendete Zelllinien

- 293T: Es handelt sich hierbei um eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch stabile Transfektion der adenoviralen E1A-Region immortalisiert wurde. Zusätzlich enthält sie das SV 40 large T Antigen (DUBRIDGE et al., 1987). Die Zellen wurden freundlicherweise von R.Willemsen, Niederlande zur Verfügung gestellt.
- EPC: Dies sind endotheliale Vorläuferzellen, die im Knochenmark produziert werden. Diese Stammzellen werden bei Verletzung durch Mediatorausschüttung an die verletzte Gefäßstelle gelockt, wo sie sich zu
- Endothelzellen ausdifferenzieren. Diese Zelllinie ist nicht immortalisiert. Verwendet wurden aus Nabelschnur isolierte Zellen NB1276 (Robert Ostedorp, III. Med., Klinikum Rechts der Isar, München) H9c2: Es handelt sich um Rattenkardiomyoblasten, die zwar eine sehr geringe morphologische Ähnlichkeit mit adulten Herzzellen hat, aber dennoch einige molekulagenetische Marker wie Myozyten aufweist. Auch diese Zelllinie besitzt eine begrenzte Zellteilungsfähigkeit. (ATCC, Wesel, Deutschland)

5.3.2 Methoden der Zellkultur

5.2.3.1 Medien und Zusätze

- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM): mit 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-gutamine der Fa. Biochrom, Berlin
- Foetales Kälberserum (FKS): Sera Plus der Fa. Pan Biotech GmbH, Aidenbach
- Phosphate buffered saline (PBS)-Dulbecco (1×): ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Fa. Biochrom, Berlin)
- Trypsin/EDTA: 0,25% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS (Fa. Biochrom, Berlin)
- Glutamin: 200 mM Glutaminlösung der Fa. Biochrom, Berlin
- (HEPES-Puffer: Solution 1M (Fa. Invitrogen, La Jolla, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) : Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Polybrene (PB) 0,8 mg/ml
- EGM- Medium und Zusätze (Fa. Lorna EGM Bullet Kit)
- EPC Trypsin 0,05%, EDTA-Natrium 0,53 mM (Fa. Invitrogen,)
- 1 % Gelatine in 1× PBS, Autoklaviert (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

5.3.2.2 Zellkulturbedingungen

Die Zelllinien 293T und H9c2 wurden in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 1 % Glutamin in einem Inkubator (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Fa. Thermo Life Sciences, Staufien) bei 37 °C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die EPC wurden in EGM-Medium mit spezifischen Zusätzen (s.o.) kultiviert. Verwendet wurden Kulturschalen der Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz. Das Kulturvolumen in einer 6 cm Durchmesser Schale betrug 4-5 ml, das einer 10 cm Schale 8-10 ml. Die Schalen für die EPC-Kultur wurden mit 1 % Gelatine in 1× PBS mit ½ Kulturvolumen aufgefüllt, für 10 min im Inkubator aufbewahrt und danach 3× mit PBS gewaschen

5.3.2.3 Zellpassage

In der Regel wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen etwa 80% konfluent. Hierfür wurden die Zellen mit Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich ablösten. Die Reaktion wurde mit komplementiertem Medium gestoppt und der benötigte Teil der Zellen in einer neuen Kulturschale ausplattiert.

Die Split-Ratio 1:3 der unterschiedlichen Zelllinien war bei den 293T Zellen alle drei Tage. Die EPC und H9c2 wurden je nach Wachstum alle vier bis sechs Tage passagiert.

5.3.2.4 Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer

Die Zellen wurden trypsiniert und in komplementiertem Medium aufgenommen. 100 µl Trypanblau (Fa. Biochrom, Berlin) wurden mit 100 µl Zellsuspension gemischt und 5 min inkubiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Während durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann und diese dann unter dem Mikroskop blau gefärbt erscheinen. Eine Kammer eines Hämocytometers wurde mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Zwei der jeweils gegenüberliegenden Eckquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) ausgezählt, wobei nur nicht angefärbte Zellen berücksichtigt wurden

Bestimmung der Zellzahl:

Ein Eckquadrat der Kammer hat eine Fläche von 10^{-4} cm² und eine Höhe von 10 µm. Die Zellsuspension ist 1:2 verdünnt wobei zwei Eckquadrate gezählt wurden. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10 = \text{Zellzahl/ ml Zellsuspension}$$

5.4 Retrovirale Methoden

5.4.1 Der retrovirale Vektor pBullet

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vektor pBullet (WILLEMSEN et al, 2003) ist eine Weiterentwicklung des Vektors pSTITCH (WEIJTENS et al. 1998), welcher vom Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) abgeleitet ist. Das ursprünglich publizierte System wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich noch so verändert, dass teilweise an Stelle des envelope-Plasmids pCOLT-GALV, welches für die Hüllproteine des Gibbonaffen Leukämievirus kodiert, das Plasmid pHCMV-G (YEE et al., 1994, vgl Abb.9 C) verwendet wurde. Das Plasmid pHCMV-G kodiert für die Hüllproteine des Vesikulären-Stomatitis-Virus und enthält ebenfalls den CMV IE Promotor für die Genexpression und das SV40 ori.

5.4.2 Die Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen mittels Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen mit nicht-viralen Methoden. Eine Transfektion ist zunächst einmal nur transient, d.h. die DNA wird nicht in das Genom integriert, sondern verbleibt extrachromosomal. Ohne eine weitere Selektion geht solche DNA mit der Zeit verloren und die Transgenexpression kommt zum Erliegen. Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, die in der Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion angewandt (WIGLER et al., 1977).

Um virale Partikel zu generieren wurden 293T Zellen verwendet, welche transient mit drei Plasmiden co-transfiziert wurden:

1. ein auf pBullet basierender retroviraler Vektor
2. das für gag und pol kodierende Hilfsplasmid pHIT 60
3. ein für die viralen Hüllproteine kodierendes env-Plasmid (pCOLT-GALV, oder pHCMV-G).

Der schematische Aufbau der für eine Ko-Transfektion verwendeten Plasmide mit pBulletEGFP als Beispiel für einen retroviralen Vektor sind in der Abbildung 12 wiedergegeben.

Wenn alle drei Plasmide in ein und dieselbe 293T Zelle transfiziert werden, werden hier alle viralen Proteine exprimiert, durch welche die ungespleißte mRNA des retroviralen Vektors als virale mRNA verpackt wird.

Auf diese Weise werden infektiöse virale Partikel gebildet, die in den Zellüberstand abgegeben werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll für eine transiente Transfektion für die Retrovirusproduktion ist in Tabelle 6 aufgeführt

Tag1		2x 10 ⁶ 293T Zellen auf eine 10 cm Schale ausplattieren
Tag2	24h später: Transfektion	Transfektion der 293T Zellen mit CaCl ² , Mg ⁻² Verwendeter DNA-Mix: 10 µg pBullet Vektor mit Transgen 10 µg gag-pol Plasmid 10 µg env-Plasmid, pCOLT-GALV oder pHCMV-g
Tag 3	16-18h nach Transfektion	Mediumwechsel mit 5 ml komplementiertem Medium
Tag4	40- 42 h nach Transfektion	Abnahme des virushaltigen Zellüberstandes

Tabelle 7: Transfektionsschema

Dargestellt sind die Arbeitsschritte an den unterschiedlichen Tagen der Transfektion vom Auslegen der Zellen bis zur Abnahme des virushaltigen Überstandes

5.4.3 Die Gewinnung retroviraler Überstände und Kryokonservierung

Für die weitere Verwendung wurden die retroviralen Überstände zunächst durch einen Filter mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ filtriert. Hierdurch werden virusproduzierende Zellen und Zellreste entfernt. Das Filtrat wurde direkt für eine Transduktion verwendet oder kryokonserviert.

Für die Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt wurden retrovirale Überstände bei $-80\ \text{°C}$ kryokonserviert. Die filtrierten Überstände wurden in bedarfsgerechten Volumina (1 ml) in Eppendorftubes (1,5ml) aliquotiert und dann sofort bei $-80\ \text{°C}$ gelagert. Für eine spätere Transduktion wurde der benötigte Überstand auf Eis aufgetaut und sofort verwendet.

5.4.4 Retrovirale Transduktion

Das Protokoll für retrovirale Transduktion ist in Tabelle 8 wieder gegeben.

Tag1		Zielzellen auf 6 cm Platten ausplattieren <ol style="list-style-type: none"> 1. 293T: 1×10^6 2. EPC: $1,5-2 \times 10^5$ 3. H9c2: $1,5-2 \times 10^5$
Tag2	16-18h später	Transduktion der Zielzellen: <ol style="list-style-type: none"> 1. Zellen mit 1x PBS waschen 2. Zugabe von 0,4-0,7 ml unverdünntem Virusüberstand dem zuvor $8 \mu\text{g/ml}$ Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aus einer Polybrene-Stammlösung von $800 \mu\text{g/ml}$ (gelöst in ddH₂O) zugesetzt wurden 3. Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank für 2 h, alle 20 min schwenken 4. Zugabe von 4 ml komplementiertem Medium
Tag3		Kultur der Zellen
Tag4	~ 48 h nach Transduktion	Passage der Zellen für weitere Kultur oder Analyse der Genexpression der transduzierten Zellen

Tabelle 8: Transduktionsschema

Dargestellt sind die verschiedenen Arbeitsschritte bei der Transduktion vom Auslegen der Zellen am ersten Arbeitstag bis zur Zugabe des Virusüberstandes und der Kultur der Zellen. Diese stabil transduzierten Zellen können entweder in Kultur gehalten werden oder zur weiteren Analyse verarbeitet werden.

5.5 Analyse der Transgenexpression

5.5.1 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation in der Zellkultur erfolgte durch eine Nikon Cool Pix 990 Digitalkamera, welche mittels Adapter an das Mikroskop Axiovert 135 angeschlossen ist.

5.5.2 Durchflusszytometrie

Die Messung physikalischer oder chemischer Charakteristika von Zellen bezeichnet man als Zytometrie. Bei der Durchflusszytometrie findet diese Messung an Zellen statt, die sich in einer Suspension befinden.

Die Analyse findet an Einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom werden innerhalb eines so genannten Durchflusszytometers oder *Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)* analysiert.

Dadurch ist es möglich Zellcharakteristika wie Zellgröße (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) und die Fluoreszenzstärke einer Zelle (Messung in den Kanälen FL1, FL2 oder FL3) festzustellen. Bei der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse werden die Einzelzellen einem Argon Laserstrahl ausgesetzt.

Die Werte für die Zellgröße und Granularität werden dadurch gemessen, dass der Argon-Laser durch die Zellen gestreut wird. Außerdem werden durch die definierte Wellenlänge des Argonstrahls in den Zellen vorhandene Fluorochrome (wie z.B. eGFP) angeregt.

Das hat wiederum die Emission von Fluoreszenz charakteristische Wellenlänge zur Folge. Zur Dokumentation wird die spezifische Fluoreszenz in ein elektrisches Signal umgewandelt. Voraussetzung für eine fehlerfreie Messung ist das Beziffern einer Negativkontrolle:

Verwendet werden hierbei die Ausgangszelllinien. In der vorgelegten Arbeit umfasste eine Messung 20.000 im FACS detektierte Ereignisse.

Gemessen wurde mit dem Gerät FACS-Vantage der Fa. Beckton Dickinson, San Jose, USA. Die Auswertung erfolgte durch die zugehörige Software Cell Quest Version 3.1f.

Da eGFP keine zusätzliche Probenbehandlung erfordert, konnten die dafür positiven Zellkulturen einfach gemessen werden. Eine etwa 80% konfluente 6 cm Schale wurde wie beschrieben trypsiniert und abzentrifugiert (1.000 rpm, 4 min, r.t., Varifuge 3.0 R, Fa. Heraeus, Hanau). Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert, 100 µl dieser Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1,5 µM Propidiumiodid (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen) für die Markierung toter Zellen wurde die Probe im Durchflusszytometer analysiert.

Da eGFP nach Anregung durch einen Argonlaser (488 nm Wellenlänge) Fluoreszenz einer Wellenlänge von etwa 510 nm emittiert, erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Kanal FL1. Für die Auswertung wurde eine von KANDEL und Mitarbeitern 1997 publizierte Methode angewandt: Es wird der Wert der so genannten „relativen Fluoreszenz“ (RF) gebildet. Die Definition dieses Wertes lautet: Ratio zwischen dem Medianwert der Fluoreszenz der GFP-positiven Zellen und dem Medianwert der Fluoreszenz der negativen Zellen (Eigenfluoreszenz der Zellen). Berechnungen mit dieser Methode ermöglichen es, die Ergebnisse verschiedener Tage miteinander zu vergleichen.

5.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine. Hierbei werden die Zelle lysiert, die Proteine denaturiert und die Proben mittels SDS-Polyacrylamid aufgetrennt. Nach Transfer auf eine positiv geladene Membran wird diese mit Antikörpern inkubiert um die Anwesenheit des gesuchten Proteins darzustellen.

5.6.1 Herstellung von SDS-Page Gelen

Vorbereitung der Proben:

Die Zellen, die für die Proben verwendet werden sollten 70-80 % konfluent sein und auf 60mm Platten ausgesät sein. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

500µl RIPA-Puffer mit Aprotinin versetzt wurden auf jede Platte gegeben.

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in einem Eppendorf Tube 30 min auf Eis gelagert.

Danach wurde die Zellsuspension 30 min bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge, Biofuge Heraeus, München)

Von der abzentrifugierten Lösung wurden 100µl Aliquots in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C tiefgekühlt. Dabei ist es wichtig die Lösung von oben zu pipettieren, da sich durch die Zentrifugation die DNA unten im Gefäß befindet.

RIPA:

5 ml 1M TrisHCL pH 7,2 (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

3ml 5M NaCl (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

0,5ml 20 % SDS (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

1g Natriumdeoxycholate (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

1ml Triton X 100 (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)

57 µl/ 5 ml Aprotinin 1:87 (5,2 TIU/mg) (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
wird jeweils frisch dazugegeben

auf 100ml mit H₂O auffüllen und bei 4°C aufbewahren.

Zur Auftrennung der Proben wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt.

Bei angelegter Spannung wandert das negativ geladene Protein innerhalb des Gels der Spannung folgend in Richtung des Pluspols. Die logarithmische Auftragung der Mobilität von Proteinen gegen ihr Molekulargewicht liefert innerhalb eines gewissen Bereiches eine lineare Abhängigkeit. Der Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Gels und damit seine Porengröße kann über einen weiten Bereich der Größe der aufzutrennenden Proteine angepasst werden.

Man kann zum einen den Acrylamid-Gehalt des Gels ändern, zum anderen die Menge des Quervernetzer Bisacrylamid. Für sehr große Proteine benötigt man niedrig konzentrierte Gele, sehr kleine Proteine werden in stark vernetzten Gelen aufgetrennt. Standardmäßig werden 12%ige Gele eingesetzt.

Trenngel:

2,67 ml	37,5:1 Bisacrylamid (Karl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Germany)
2,54 ml	TRIS pH 8,8, 1M (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
1,45 ml	ddH ² O
50 µl	10 % SDS (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
33,4 µl	10% APS Karl Roth, Karlsruhe
6,65 µl	TEMED Sigma Aldrich, Steinheim

Sammelgel:

0,57 ml	30 % Bisacrylamid (Karl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Germany)
2,2 ml	TRIS pH 6,8, 0,5M (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
1,34 ml	ddH ² O
50 µl	10 % SDS (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
26,3 µl	10% APS Karl Roth, Karlsruhe
8,8 µl	TEMED Sigma Aldrich, Steinheim

Zuerst wurde das Sammelgel zwischen die Gel Glasplatten in der Gießvorrichtung von BioRad pipettiert und mit Isopropanol bedeckt. Nach 30 min wurde das Isopropanol abgegossen und zweimal mit ddH²O waschen. Danach wurde das Sammelgel aufgetragen, der Probenkamm eingesteckt und das Gel zum Härten 20-30 min in der Gießvorrichtung belassen.

5.6.2 Auftrennung der Proben, Transfer und Blotting

Im Prinzip ist eine Elektrophoresekammer ein Resistor (das Gel), der zusammen mit einer Spannungsquelle einen einfachen Stromkreis bildet. Die negativ geladenen Puffer und Proteinionen werden durch den Stromfluss durch das Gel getrieben.

Indem man zusätzlich zu den Proben eine Größenstandart aufträgt wird das gesamte Gel kalibriert.

Die immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot erfolgt nach dem Prinzip der Epitop-Erkennung. Eine wenige Aminosäuren umfassende Struktur wird durch spezifische Antikörper gebunden.

Um Proteine mit Antikörpern zu detektieren, müssen diese fest gebunden und auf offener Fläche exponiert sein. Dies erreicht man durch den Transfer der Proteine auf eine Membran.

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte von der Verarbeitung der frischen Proben bis zur Behandlung der mit den Proteinen beladenen Membran, dem sogenannten Blocken, beschrieben:

1. Die Proben vorbereiten (entweder frisch oder auftauen)
2. das Gel und 1fach Laufpuffer in die Kammer geben (BioRad Laboratories Hercules, USA)
3. die Proben 15µl + 4fach loading dye 5µl bei 100°C 10 min kochen, danach kurz zentrifugieren
4. Marker: 10 µl High Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences, Freiberg, Germany)
+ 2µl 4 fach Puffer auf Eis

5. Die Proben in die Slots geben und ca 1 Stunde bei 40mV laufen lassen bis die Laufmittelfront des Bromphenolblaus vollständig unten zu sehen ist. Der Rainbow Marker sollte zu sehen sein. Immer wieder die Spannung nachregulieren. Nach einer Stunde nicht ausschalten, fall sich die weiteren Arbeitsschritte verzögern, sondern auf 5 mA weiterlaufen lassen.

6. Aufbau der Transfer-Kammer: 3 Stück 4fach Whatmann Paper (.Whatman int. Ltd., Baldstone, GB) ausschneiden 1 Milipore PVDF Membran (Millipore Corporation Bedford, GB) ausschneiden.
Die Membran durch 15 s in Methanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) und 2 min in einer Schale mit ddH²O aktivieren
Die Kammer und das Whatman Paper in Transferpuffer wässern.Das Gel auf die schwarze Boxenseite (Plus) legen und die Kammer (Hoefler Pharmacies, San Francisco, USA)einstecken
Mit Transferpuffer auffüllen und einen Rührfisch zugeben
45 min auf 100 mA

7. Blocken: 3 g BSA (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) in 100ml PBST (Phosphate buffered soline +0,1% Tween 20) auflösen (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)
In eine Schale 50ml davon mit der Milipore Membran geben und mit Alufolie bedecken
Über Nacht in Schüttler bei 4°C blocken

5.6.3 Antikörper-Behandlung und Waschen

Die Antikörper werden meist durch die Chemilumineszenz Methoden sichtbar gemacht.

Horse-Radish-Peroxidase (HRP) katalysiert die Reduktion von H²O² zu H²O.

Dafür benötigte Elektronen werden aus Luminol gewonnen, es entstehen oxidierte Luminol-Radikale.

Diese reagieren mit O_2 , es entsteht O_2^- (Superoxid-Anion), welches mit einem weiteren Luminol-Molekül reagiert.

Dabei entsteht Luminol-Endo-peroxid welches sofort unter Abstrahlung von Licht zerfällt.

Dieser Prozess wird in der im Kapitel 3.6.2 begonnenen Beschreibung der praktischen Ausführung des Western Blots fortgesetzt.:

1. Am nächsten Morgen 3 mal für 10 min in 100ml PBST' auf dem Schüttler waschen.
2. Die Membran ausmessen: pro cm^2 0,15 ml PBST'+3% BSA.
3. 1. Antikörper (polyklonaler HSV-Tk Antibody, William Summers, Yale University, New Haven, USA) 1:500 in die ausgerechnete Menge PBST'+3% BSA geben und die Membran zuschweißen. 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler lassen. Danach den AK absaugen, da er wieder verwendbar ist und die Membran 7 mal für 10 min in 100ml PBST' waschen.
4. Mit dem 2. Antikörper (Peroxidase Goat Anti Rabbit IgG, Oncogene research products) 1:2000 in der gleichen Weise verfahren. Ebenfalls nach einer Stunde 7 mal Waschen.
5. Die Entwicklung erfolgt nach dem modifizierten Protokoll des ECL Kit (Amersham Biosciences UK limited, GB).

5.7 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode zur Identifizierung von spezifischen RNA-Sequenzen. Dabei wird die RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert („Blotting“). Durch Hybridisieren mit einer 32-Phosphor-markierten einzelsträngigen DNA-Sonde kann ein RNA-Strang nachgewiesen werden.

5.7.1 Aufbereitung der Proben

Zunächst wurde die gesamte RNA aus den Zellen isoliert. Dies erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen). Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte im Photometer (Beckmann DU 600 Spektrometer, Fa. Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Adsorption -1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 10 μg RNA wurden in einer Speedvac Zentrifuge (SVC 100, Fa. Eppendorf, Hamburg) eingedampft und anschließend in 20 μl Denaturierungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 65°C für 15 Minuten. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit 5 μl „Blue Loading Dye“ versetzt.

Denaturierungspuffer:

- 500 μl Formamid (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- 50 μl 10x Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- 175 μl Formaldehyd 37% (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- 275 μl DEPC-H₂O

10x Morpholinopropansulfonsäure (MOPS):

- 83,72g MOPS (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- 8,2g Natriumacetat (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen)
- 20 ml 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung pH 8,0
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

„Blue Loading Dye“:

- 35% Glycerol in DEPC-H₂O
- mit Bromphenolblau Pulver (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen) einfärben

5.7.2 Isolierung der Sonden

Als Sonden werden radioaktiv markierte, zur mRNA komplementäre DNA Fragmente eingesetzt. Die Sonden werden mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus Plasmiden ausgeschnitten und isoliert

5.7.3 Auftrennung der Proben und Blotting

Der Northern Blot wurde modifiziert nach SAMBROOK et al., 1989b durchgeführt.

Die Proben wurden in einem 1%igem Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Gelherstellung erfolgte durch Erhitzen von 0,6g Agarose (peq GOLD Universal Agarose, Fa. Peqlab Biotechnologie GmgH, Erlangen) in 2ml 20x MOPS mit 48ml ddH₂O bis zum Siedepunkt und anschließendes Abkühlen auf ca. 65°C. Es wurden nach Abkühlen noch 3µl Ethidiumbromid zugefügt.

Danach wurden 3,2 ml 37%iges Formaldehyd dazu pipetiert und zu einem Gel gegossen. Nach ca. 40 Minuten war das Gel ausgehärtet. Nach Auftragen der Proben auf das Agarosegel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (Biorad Powerpac 30, Fa. Biorad Laboratories GmbH, München) für zwei bis drei Stunden bei 50 Volt.

Das Blotting, d.h. der Transfer der aufgetrennten Proben von dem Gel auf eine Membran wurde über Nacht mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Fa. Schleicher und Schuell BioScience GmbH, Dassel) durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Membran für 20s UV-vernetzt (Stratalink 1800, Fa.Stratagene, La Jolla USA).

5.7.4 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die Membran mindestens eine Stunde bei 65°C in Church-Puffer im Hybridisierungssofen (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die DNA-Sonde wurde durch Austausch nicht-radioaktiver Nukleotide gegen 32-P-markierte Nukleotide radioaktiv markiert. Hierfür wurde der Prime-It®II Random Primer Labeling Kit (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Mindestens 50ng Sonde (in einem Gesamtvolumen von 24µl) wurden mit 10µl Random 9-mer Primer versetzt und fünf Minuten gekocht. Zu der zwei Minuten auf Eis gekühlten Probe wurden 10µl 5x dCTP Primer Buffer, 4µl Nukleotid (α -32-P-dCTP, spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol, Fa. ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) und 1µl Exo-Klenow (5U/µl) (Fa. Roche) gegeben und zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Die nicht in die Sonde eingebauten Nukleotide wurden anschließend durch Aufreinigung in einer MicroSpin™G25 Column (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) entfernt. Die DNA-Sonde wurde zu der prähybridisierten Membran gegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Um die nicht gebundene radioaktive Sonde von der Membran zu entfernen wurde die Membran am folgenden Tag dreimal mit Waschlösung bei 65°C für je 13 Minuten gewaschen. Die Detektion der markierten Sonde ist im Kapitel 3.7.5 beschrieben.

Die erneute Hybridisierung einer Membran mit einer neuen Sonde ist nach Entfernung der zuvor verwendeten Sonde durch sogenanntes Strippen der Membran möglich. Dafür wurde diese bei 72°C über Nacht mit Stripping-Lösung im Hybridisierungssofen gewaschen. Anschließend wurde der Blot in 2x SSC und ddH₂O gewaschen. Die nachfolgende Hybridisierung mit einer neuen Sonde erfolgte wie bereits beschrieben.

Church-Puffer :

- 300ml ddH₂O
- 70g SDS
- 500ml 0,5 M Natriumphosphat pH 7,2
- 2 ml 0,5 M EDTA
- 10g Bovines Serum Albumin

Waschlösung:

- 1% SDS-Lösung
- 0,04 M diNatriumhydrogenphosphat-Lösung

Stripping-Lösung:

- 1% SDS
- 0,1x SSC
- 40mM Tris-HCl pH 7,5-7,8

5.7.5 Entwicklung des Blots

Die Visualisierung der hybridisierten Proben erfolgte mittels Autoradiographie im Phosphor-Imager (Fluorescent Image Analyser FLA-2000, Fa. Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Verwendet wurde das Programm AIDA, Version 2,0, derselben Firma.

5.8 Radioaktive Aufnahme

Bei der Messung der radioaktiven Aufnahme wird die Fähigkeit der stabil transduzierten Zellen getestet das gewünschte Stoffwechselprodukt in geeigneter hoher Menge herzustellen und dabei als Substrat radioaktiv markierte Nukleotide zu verstoffwechseln. Im Falle der HSV1-Thymidinkinase befindet sich das phosphorylierte Endprodukt in der Zielzelle und somit kann die Höhe der Substratverstoffwechslung im β -Counter gemessen und analysiert werden.

5.8.1 Vorbereitung der Proben

Am Vortag werden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen ausgelegt. Dabei werden vier Platten a 60 mm pro Probe benötigt, wobei immer auch eine Negativkontrolle dabei sein muss. Von den vier Platten verbleibt je eine in der Zellkultur um kurz vor oder nach dem Versuch ausgezählt zu werden.

5.8.2 Radioaktive Behandlung der Proben

Pro Platte werden 5ml warmes DMEM Medium vorgewärmt.

14C FIAU: 10 μ l / 100ml Medium

3H-Thymidin: 10 μ l / 100ml Medium

1. Tag.

Die Platten absaugen und auf jede 5ml Medium mit den radioaktiven Markern geben. Die Zellen eine Stunde im Inkubator aufbewahren. Danach absaugen, mit eiskaltem PBS waschen und 1 ml PBS daraufgeben. Dieses mit den Zellschabern abkratzen und in Scintillation vials überführen, dasselbe noch einmal mit 0,5 ml.

Die Standardmesswerte setzen sich aus 100 μ l warmes Medium mit 1,5 ml PBS zusammen

1 ml Soluene (..NuklMed) hinzugeben und über Nacht bei 4°C stehen lassen.

2. Tag

2,5 ml Lumasafe Scintillation fluid (Lumasafe plus, P. Elmer, Niederlande) darauf geben und für 4 h im Kühlraum belassen.

Danach im β Counter (Haubner, 14C/3H 1 min /sample) (Walles C, Finnland) messen. Als Standard unbehandeltes Medium einsetzen.

Die Meßergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle bearbeitet und als Grafik dargestellt

5.8 Software

Als Software zur Messung und Bearbeitung wurde Microsoft Excel verwendet. Zur Auswertung der Northern und Western Blot Analyse wurde das Programm AIDA (Raytest, Straubenhardt, Deutschland), für die Messung der radioaktiven Aufnahme das Programm Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

6 Ergebnisse

6.1 Klonierung konstitutiv exprimierender retroviraler Vektoren

Der verwendete Vektor enthält den CMV Promotor für die Transgenexpression, welcher ohne Regulationsmechanismen, also konstitutiv, exprimiert. Die Lokalisation dieses Promotors ist die U3 Region der 5'LTR. Ist die Zellinfektion bzw. -transduktion durch Viren der genannten Plasmide erfolgreich, so tritt an die Stelle des CMV Promotors der Promotor der U3 Region. Dieser wird im Verlauf der reversen Transkription an diese Stelle kopiert.

6.1.1 Klonierung der Vektoren pBulletwTKIeGFP und pBulletmTKeGFP

Um die Zellen in vitro leicht zu identifizieren wurde das Reportergen eGFP verwendet. Dadurch ist ein Monitoring einzelner Zellen (in vivo und in vitro) möglich.

Die Amplifikation der Plasmid-DNA fand in DH10B Zellen statt.

Das Plasmid pBulletIeGFP lag schon fertig kloniert vor.

Als zweites Markergen wurde HSV1-TK bzw. HSV1-sr39TK verwendet.

Das Einbringen einer internal ribosomal entry site zwischen die beiden Reportergenen führt dazu, dass von einer einzigen gebildeten mRNA verschiedene Proteine gebildet werden können.

Isolierung von HSV1wTK:

Der DNA Verdau von pDC316TK bzw pDC316srTK erfolgte mit EcoRI und HindIII. Der das HSV1-TK bzw HSV1sr39-TK enthaltenden Vektor von 1.1 kb wurde isoliert und die überhängenden Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt.

Das HSV1-TK bzw HSV1sr39TK Insert wurde mittels blunt-end Ligation in 5'-3'Orientation in den vorbereiteten Vektor ligiert. Die daraus resultierenden Vektoren sind 8169 bp groß.

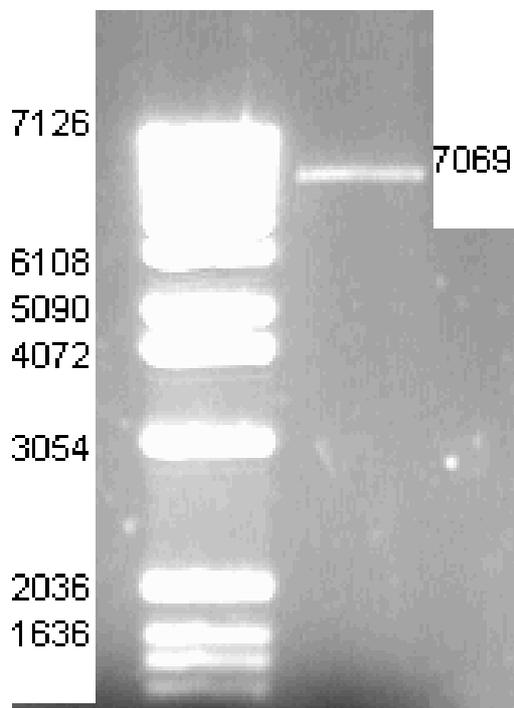


Abbildung 11: Vektor pBulletIeGFP

Dargestellt ist das Plasmid pBulletIeGFP im Plasmidverdau. Die Größe des Plasmides lässt sich anhand der aufgetragenen DNA-Leiter bestimmen.

Präparation des retroviralen Vektors pBulletIeGFP:

Der Vektor pBulletIeGFP wurde mit BamHI an der Stelle 1665bp linearisiert und die Enden durch Klenow Enzym aufgefüllt. In der Abbildung 11 ist das Ergebnis der Klonierung schematisch dargestellt. 7 Klone wiesen ein Insert auf, wovon 4 Klone das Insert in der korrekten Orientierung enthielten. Es wurde mit Klon B aus Abb. 13 weiter gearbeitet. Das Plasmid wurde in *E. coli* amplifiziert und die DNA durch Qiagen-Maxi-Kit aufgereinigt.

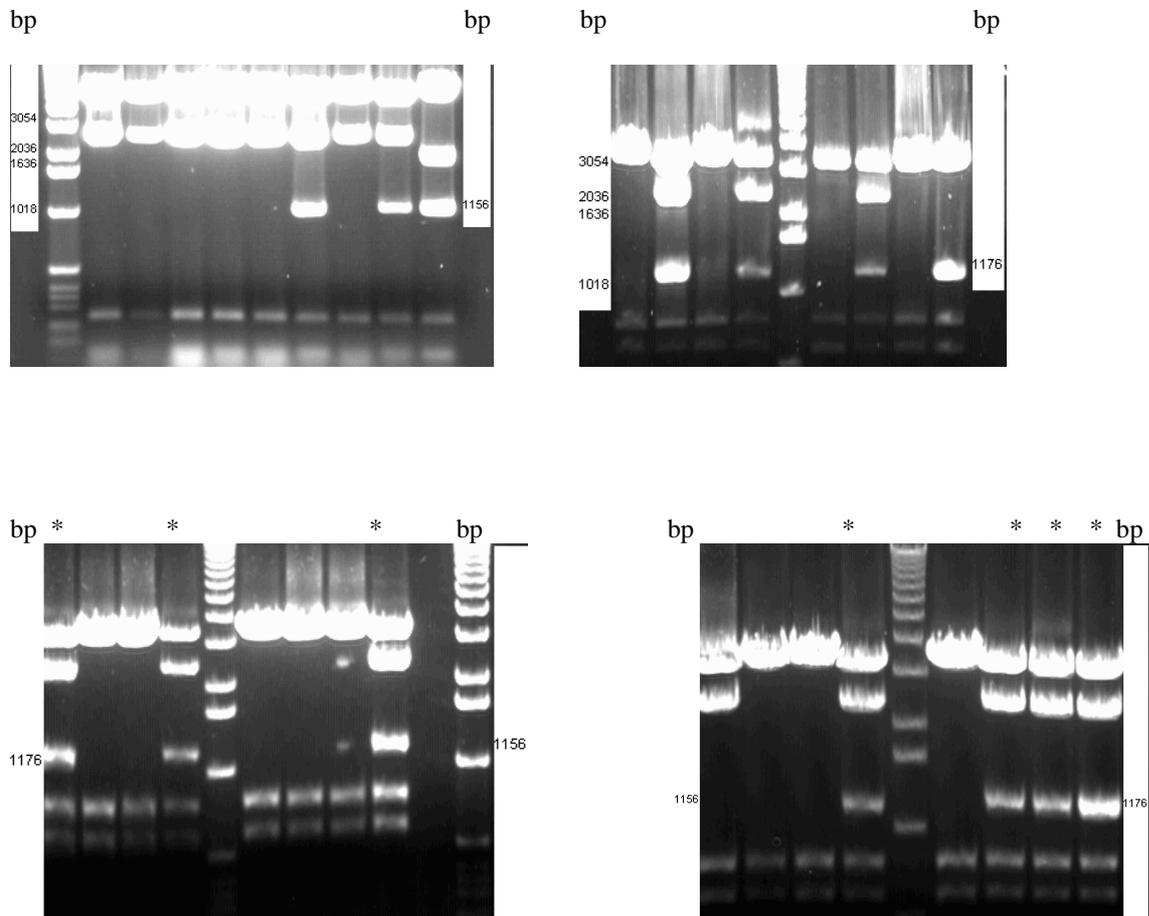


Abbildung 11: Plasmidverdau

Dargestellt sind der analytische Plasmidverdau der 1156 bp und 1176 bp Fragmente, das jeweilige Insert HSV1-TK bzw. HSV1sr39-TK. Die Größe der einzelnen Plasmidfragmente lässt sich anhand der mit aufgetragenen DNA-Leiter bestimmen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Verdau konnten jeweils an der 1176 bzw. 1156 kb Bande als richtig identifiziert werden.

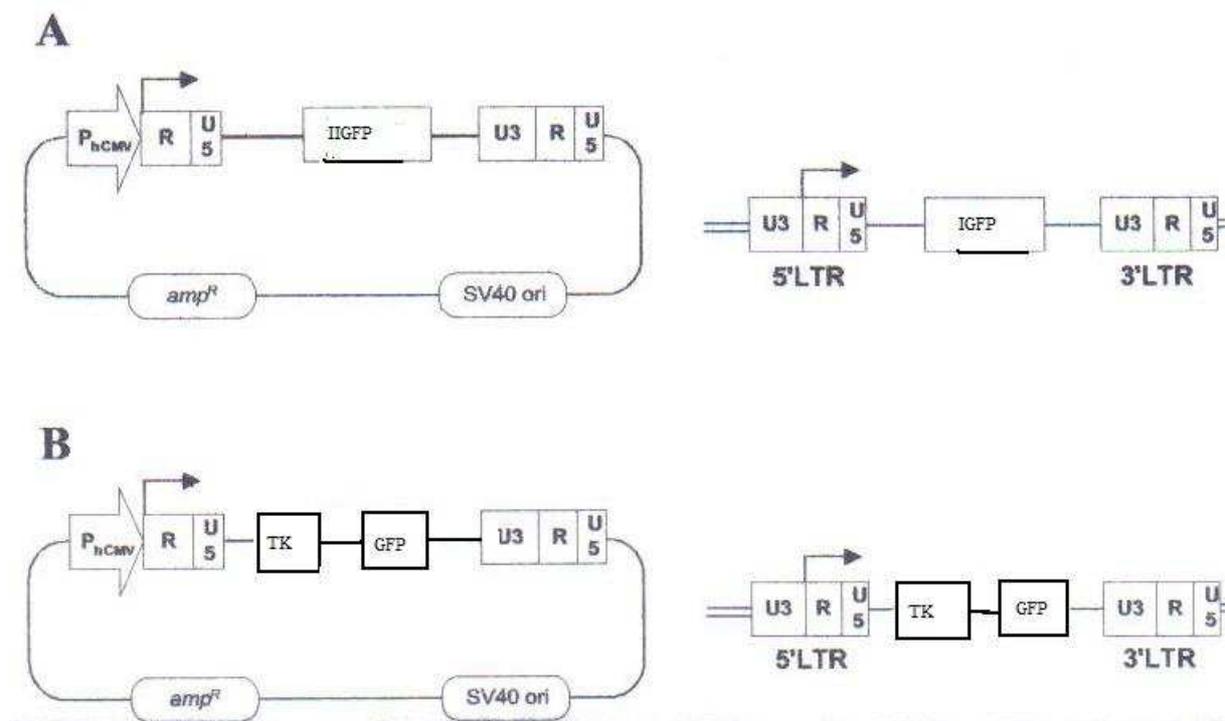


Abbildung 13: schematische Darstellung der Plasmide

Dargestellt sind die Plasmide:

A pBulletIeGFP

B pBulletIeGFPTK (wildtyp oder mutant)

Beide Plasmide enthalten den CMV-Promotor sowie die SV40ori.

Nach Translation zeigt sich ein mRNA Konstrukt, bei welcher durch die zwischengeschaltete IRES die beiden verschiedenen Proteine von einer mRNA abgelesen werden können.

6.2 Virusproduktion

6.2.1 Generierung transienter und stabiler 293T Zelllinien

Die verwendeten amphotropen Retroviren besitzen ein Infektionsspektrum, das sich sowohl auf humane Zellen, als auch auf Rattenzellen erstreckt. Deshalb war anzunehmen, dass derartig umhüllte Viren geeignet sind, endotheliale Vorläuferzellen und Rattenkardiomyoblasten zu infizieren. Gleichzeitig wurde mit VSV.G pseudotypisierten Viren gearbeitet, da diese ein sehr viel breiteres Zellspektrum infizieren können.

Denn während die Infektion von Retroviren mit amphotropen Wirtsspektrum durch die Bindung an einen spezifischen zellulären Rezeptor eingeleitet wird, interagiert VSV.G mit weit verbreiteten Phospholipid-Komponenten der Zellmembran. VSV.G-pseudotypisierte Zelllinien zeigen daher ein breites Spektrum infizierbarer Zelltypen (ARAI et al., 1999; LEE et al., 2001), darunter auch solche, die sich mit den herkömmlichen retroviralen Vektoren nicht oder nur schwer transduzieren lassen (EMI et al., 1991).

Es ist daher anzunehmen, dass derartig umhüllte Viren auch in der Lage sind, Rattenkardiomyoblasten zu transduzieren, obwohl eine derartige Anwendung bisher nicht beschrieben wurde.

Die langanhaltende Expression des VSV.G Proteins ist toxisch für die Zellen. Deshalb wurden die retroviralen Überstände mittels transienter Transfektion von 293T Zellen gewonnen. Als Kontrolle wurde der retrovirale Vektor pBulletIeGFP aufgrund seiner guten Transduktionseigenschaften verwendet.

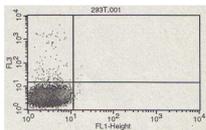
Die Verpackungszelllinie 293T wurde nicht nur zur transienten Produktion verwendet, um die Transduktionseffizienz und Transgenexpression der infizierten Zellen leichter beurteilen zu können, sondern auch zur Titerbestimmung. Als env-Plasmide wurden pCOLT-GALV und pHCMV-G eingesetzt, was zur Bildung GALV- und VSV-G-pseudotypisierter Retroviren führt.

6.2.2 Analyse der von 293T-Zellen produzierten Virusüberstände

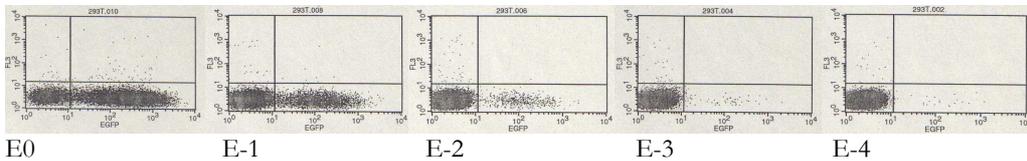
Nach Gewinnung der rekombinanten retroviralen Vektoren, wurden 293T-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Vektoren infiziert. Dazu wurden 293T Zellen mit dem jeweiligen Transferplasmid, dem Gag-Pol exprimierenden Plasmid und einem der Env-Plasmide kotransfiziert.

Dadurch, dass die transduzierten Zellen die im rekombinanten Virus enthaltenden Transgene exprimieren, konnten sie mittels FACS-Analyse identifiziert und transfiziert werden. In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse der FACS-Titrationen gezeigt.

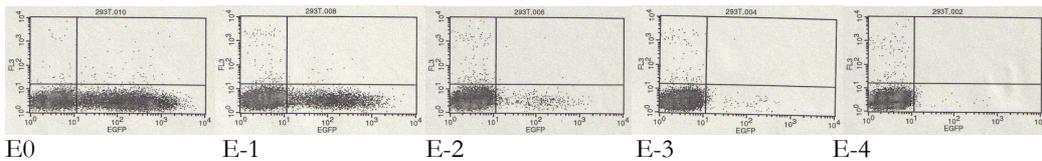
A: untx



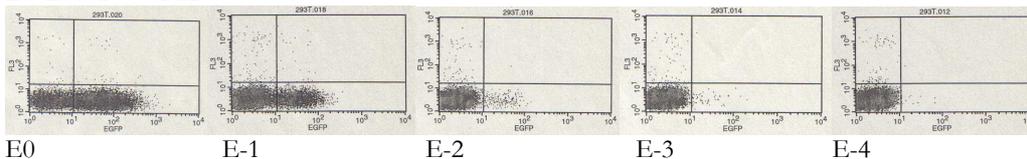
293T eGFP-VSV-G



C: 293T eGFP-GALV



D: 293T-wtTK-VSV-G



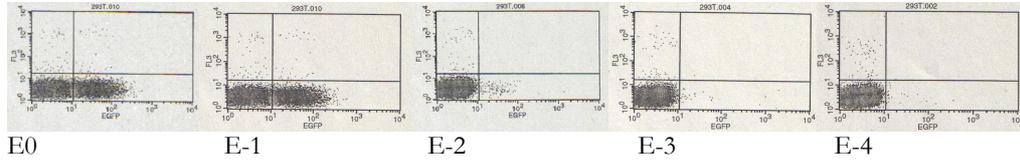
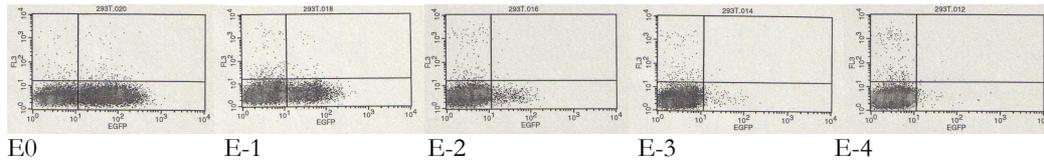
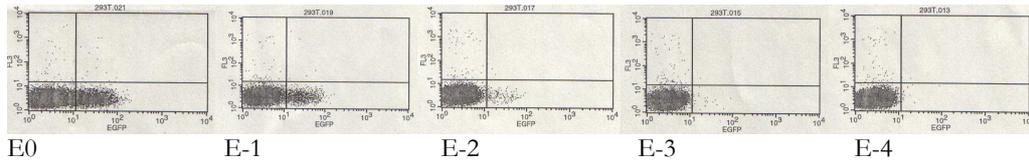
E: 293T-mtTK-VSV-G**F: 293T wtTK-GALV****G: 293TmtTK-GALV**

Abbildung 14: FACS-Analyse der 293T-Titration

Dargestellt ist exemplarisch eine Analyse der 293T-Zellen im Doppelansatz.

Infektionen wurden mit unverdünntem Vektor (0) und seriellen 10-fach Verdünnungen (-1 bis -4) durchgeführt.

A: untransfizierte 293T Zellen

B: 293T eGFP-VSV-G

C: 293T eGFP-GALV

D: 293T wtTK-VSV-G

E: 293T mtTK-VSV-G

F: 293T wtTK-GALV

G: 293T mtTK-GALV

Die Analyse zeigt für 293Tzellen die folgenden Prozentzahlen an positiven Zellen in der FACS-Analyse:

eGFP-VSV.G: 88%

wTK-VSV.G: 71%

mTK-VSV.G: 45%

eGFP-GALV :57%

wTK-GALV: 60%

mTK-GALV: 20%

6.2.3 Titerbestimmung der 293T Zelllinien

Nach Co-Transfektion wurden die retroviralen Überstände gewonnen, welche zunächst bei -80°C tiefgefroren und dann für eine Infektion verwendet wurden. Aus den in Abbildung 14 gewonnenen Daten wurden folgende Virustiter mittels Titration auf 293T Zellen und FACS-Bestimmung der positiven Zellen auf ermittelt:

eGFP-VSV.G: $4,96 \times 10^6$ IP/ml
wTK-VSV.G: $2,6 \times 10^6$ IP/ml
mTK-VSV.G: $2,7 \times 10^6$ IP/ml

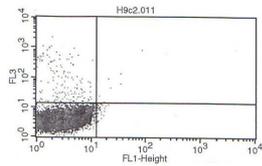
eGFP-GALV: $4,7 \times 10^6$ IP/ml
wTK-GALV: $4,1 \times 10^6$ IP/ml
mTK-GALV: $2,3 \times 10^6$ IP/ml

Dabei zeigte sich, dass die GALV-pseudotypisierten Viren eine bessere Infektiosität auf 293T Zellen zeigten, als die VSV.G pseudotypisierten Viren.

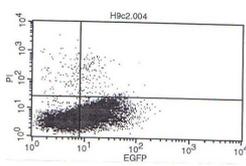
6.2.4 Titerbestimmung der EPC und H9c2 Zelllinien

Um die Infektiosität der retroviralen Partikel an den Zielzellen zu bestimmen wurde eine Titration mit EPC und H9c2 durchgeführt (siehe Abbildung 15). Dabei wurden bei den EPC Zellen nur die GALV-pseudotypisierten Zellen verwendet, da sich gezeigt hat, dass VSV.G-pseudotypisierten Viren endotheliale Zellen mit einer geringeren Effizienz infizieren. (siehe nachfolgendes Kapitel).

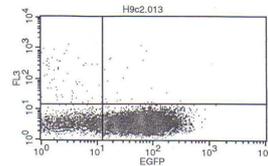
A: H9c2 untransfiziert



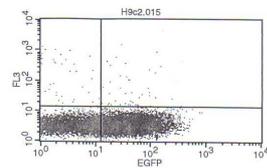
B: H9c2 eGFP-VSV-G



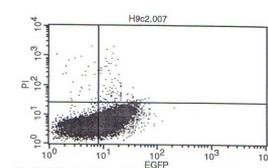
C: H9c2 wtTK-VSV-G



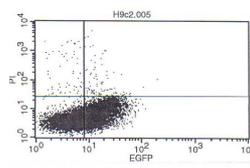
D: H9c2 mtTK-VSV-G



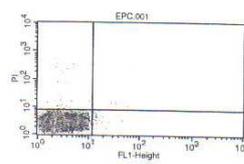
E: H9c2 wtTK-GALV



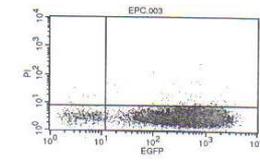
F: H9c2 mtTK-GALV



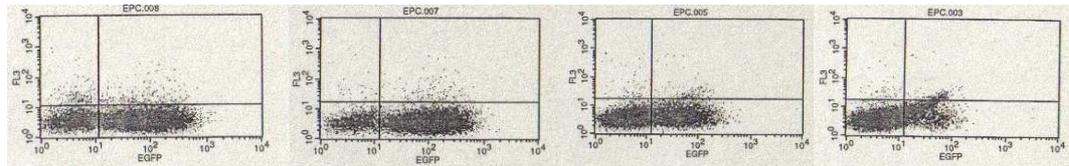
G: EPC untx



H: EPC eGFP-GALV



I: EPC wtTK-GALV



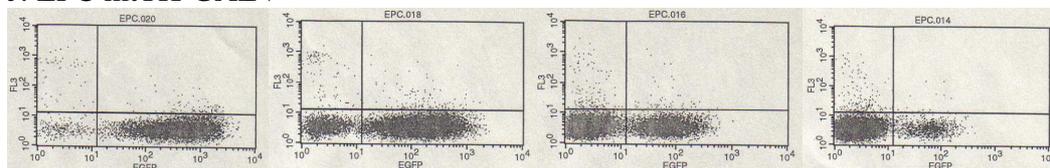
E0

E-1

E-2

E-3

J: EPC mtTK-GALV



E0

E-1

E-2

E-3

Abbildung 15: Titration der H9c2 und EPC Zellen

Dargestellt sind die mit den unterschiedlich pseudotypisierten Viren stabil transfizierte Zellen H9c2.

Eine Titration ist exemplarisch mit den endothelialen Vorläuferzellen (NB1276) gezeigt. Dabei wurden die mit GALV-pseudotypisierten Viren verwendet.

- | | |
|------------------------|--------------------|
| A: H9c2 untransfiziert | D: H9c2 mtTK-VSV-G |
| B: H9c2 eGFP-VSV-G | E: H9c2 wtTK-GALV |
| C: H9c2 wtTK-VSV-G | F: H9c2 mtTK-GALV |
| G: EPC untransfiziert | I: EPC wtTK-GALV |
| H: EPC eGFP-GALV | J: EPC mtTK-GALV |

Dabei zeigte sich, dass sich die endothelialen Vorläuferzellen mit einer höheren Effizienz infizieren lassen, als die Rattenmyokardioblasten (siehe Tabelle 10 und Abbildung 16). Die schlechte Infektiosität der VSV-G-pseudotypisierten H9c2 Zellen lässt sich durch einen Messfehler erklären. Die Titration wurde im Doppelansatz an je zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt mit dem Mittelwert aus diesen Daten wurde weitergearbeitet. Dabei gibt es eine Infektion, die eine im Vergleich mit den anderen identischen Messungen sehr niedrige Effizienz zeigt.

Zelllinie	HSV1 TK	Virushülle	MOI	% positive Zellen	Titer IP/ml
293T	wildtyp	VSV-G	2,6	71,1	$2,6 \times 10^6$
		GALV	4,1	60	$4,1 \times 10^6$
	mutant	VSV-G	2,7	45	$2,7 \times 10^6$
		GALV	2,3	20	$2,3 \times 10^6$
H9c2	wildtyp	VSV-G	0,85	86,25	$1,7 \times 10^5$
		GALV	0,65	64,87	$1,3 \times 10^5$
	mutant	VSV-G	0,35	62,68	$0,7 \times 10^5$
		GALV	0,85	33,45	$1,7 \times 10^5$
EPC		GALV	3,2	87,07	$3,2 \times 10^6$
		GALV	1,5	76,78	$1,5 \times 10^6$

Tabelle 10: Titer der verschiedenen Zelllinien und Virushüllen
 Dargestellt sind die MOI, die %positive Zellen und die Titer der unterschiedlich pseudotypisierter Zellen.

Titer der verschiedenen Zelllinien

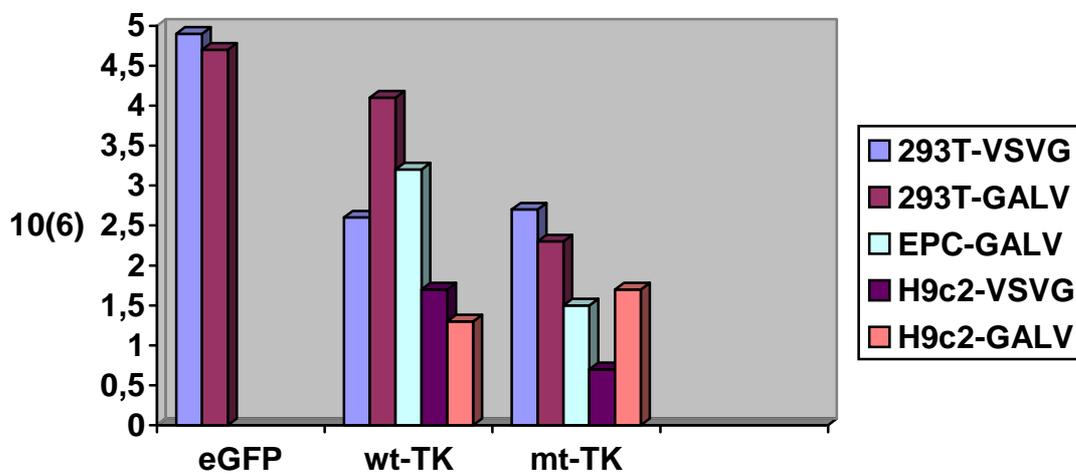


Abbildung 16: Titer der verschiedenen Zelllinien

Dargestellt sind die Titer der verschiedenen Zelllinien der unterschiedlich pseudotypisierten Zelllinien in Diagrammform.

6.2.5 Transduktionseffizienz der EPC und H9c2 Zelllinien

Eine Übersicht über die Transduktionseffizienz geben zunächst einmal mikroskopische Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Effizienz der Transduktion wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierbei war bemerkenswert, dass bei ähnlich hoher Effizienz der Transduktion im FACS die Fluoreszenz in den mikroskopischen Bildern schwächer ausgeprägt ist. Die gemeinsame Verwendung von eGFP und HSV1-TK schwächt demnach die Grünlichtemission der eGFP Proteine ab. Die Produktionsmenge bleibt jedoch gleich, was die Messungen im FACS zeigen.

Die Infektion von endothelialen Vorläuferzellen mit VSV.G-pseudotypisierten Viren zeigt eine niedrige Transduktionseffizienz, so dass mit diesen im Folgenden nicht mehr gearbeitet wurde (s. Abbildung 19).

Prozentzahl positive Zellen: 21%

EPC wtTK-VSV-G

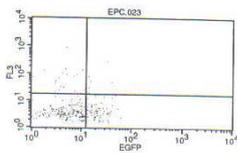


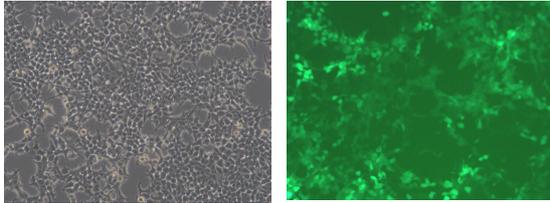
Abbildung 19:

Infektion der EPC mit VSV.G pseudotypisierten Viruspartikeln

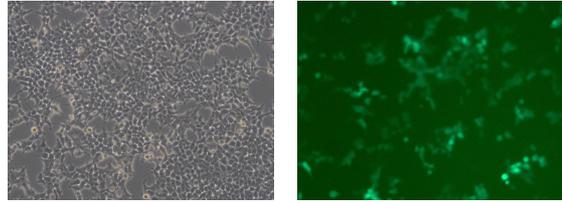
Dargestellt ist exemplarisch eine Infektion. Der prozentuale Anteil positiver Zellen ist 21%, weshalb im weiteren mit diesem Ansatz nicht mehr gearbeitet wurde.

Beispiele für eGFP und wTKIeGFP bzw. mTKIeGFP transduzierte Zellen zeigen Abbildung 20. Der Mittelwert der Transduktionseffizienz bei EPC und H9c2 betrug bei eGFP-transduzierten Zellen 84%, bei HSV1-wTKIeGFP transduzierten Zellen 76% und bei HSV1-mTKIeGFP transduzierten Zellen 70%.

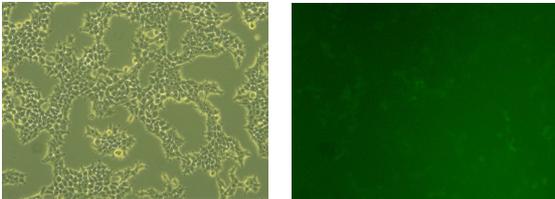
293T eGFP VSV-G



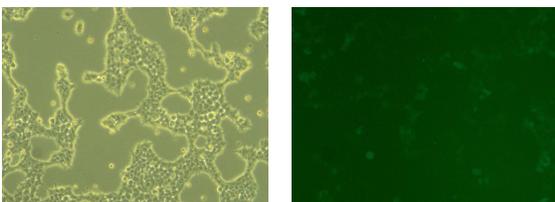
293T eGFP GALV



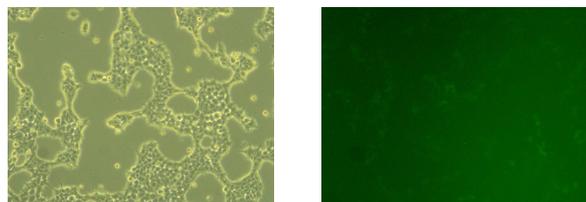
293T wtTKIeGFP VSV-G



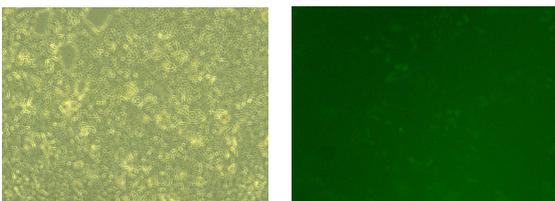
293T wtTKIeGFP GALV



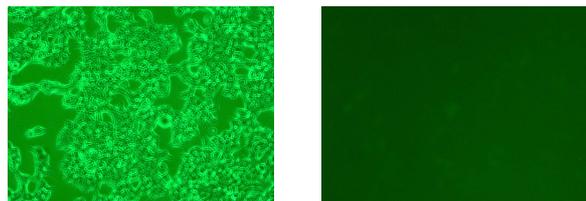
293T wtTKIeGFP GALV



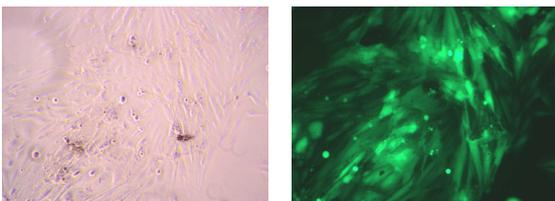
293T mtTKIeGFP VSV-G



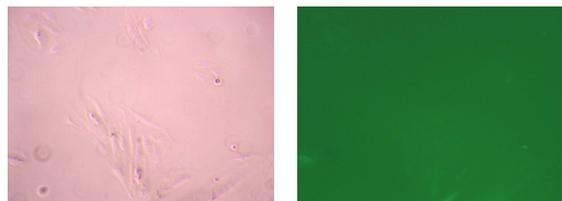
293T mtTKIeGFP GALV



H9c2 eGFP VSV-G



H9c2 wtTKIeGFP VSV-G



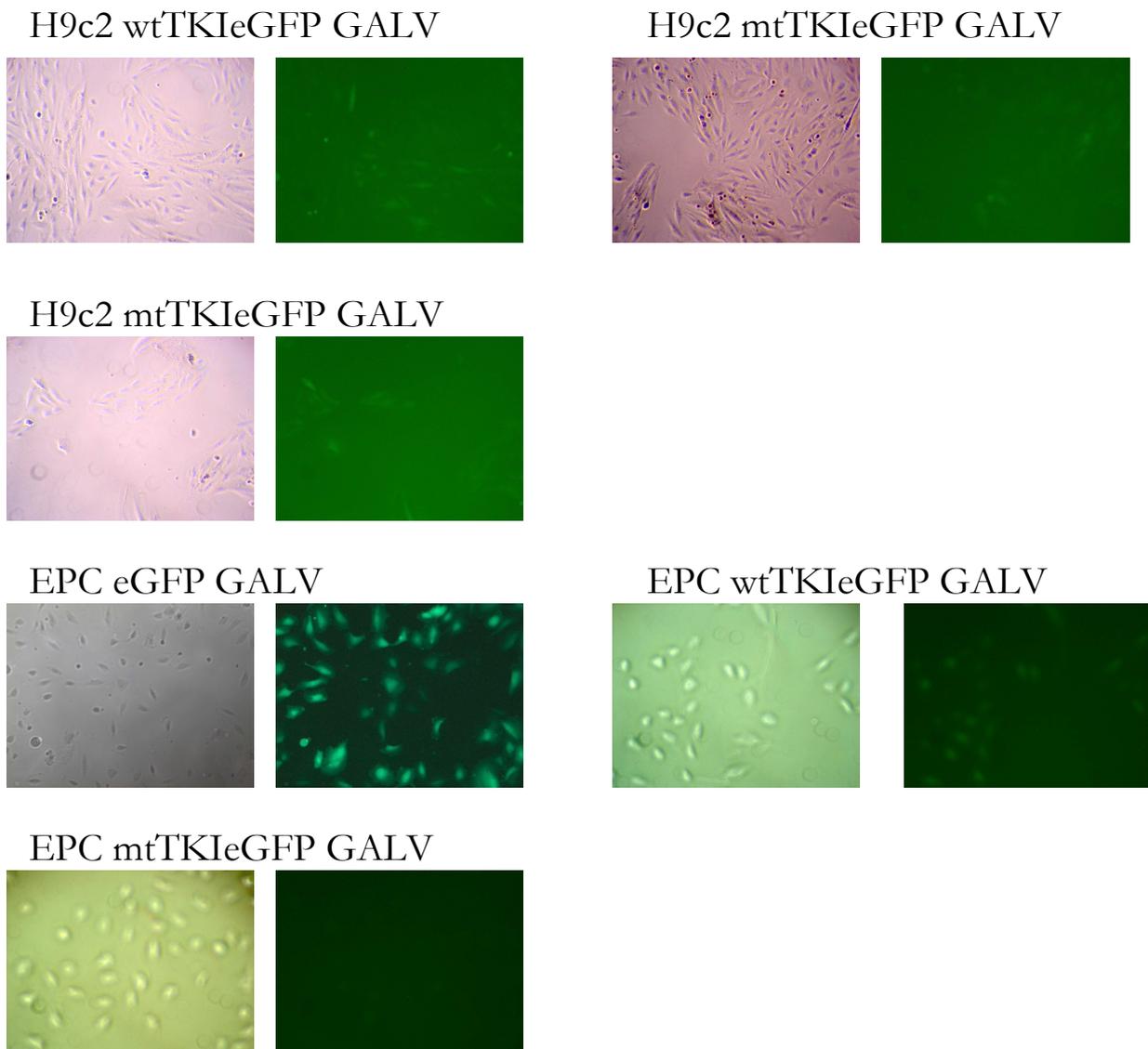


Abbildung 18 : Beispiele für die Transduktionseffizienz

Dargestellt ist die Transduktionseffizienz in den verschiedenen Zelllinien im Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt ist jeweils zunächst eine Aufnahme der Zellen ohne Fluoreszenz. Es folgt jeweils die gleiche Aufnahme unter Fluoreszenz Filter

6.3 Nachweis der Genexpression auf RNA-Ebene: Northern Blot Analyse

Da HSV-TK durch Durchflusszytometrie nicht direkt nachweisbar ist, wurde die Transduktion zunächst auf RNA-Ebene nachgewiesen.

Es entstehen unterschiedliche mRNA Transkripte, nachdem sich das Provirus in das zelluläre Genom integriert hat. Deren Lage und Anzahl sind abhängig von den enthaltenden Promotoren und vom Vorhandensein funktionsfähiger Spleißdonor und Akzeptorstellen.

Um die Aktivität der Markergene eGFP und HSV1TK bzw HSV1sr39TK nach Integration als Provirus zu überprüfen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Zunächst wurde die gesamte RNA von stabil transduzierten Zellen isoliert. Dabei handelte es sich um die beiden Zelllinien EPC und H9c2, welche mit GALV- bzw VSV.G-pseudotypisierten viralen Überständen der Plasmide

pBulleteGFP
 pBulletTKIeGFP
 pBulletI sr39Tk eGFP

transduziert wurden. Der Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation wurde mittels FACS Analyse ermittelt (Ergebnisse siehe Kapitel 2.4.2).

Für die Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde verwendet, die die gesamte Länge des HSV1-TK-Gens umfasste. Dadurch wurden die mRNA Transkripte detektiert, die das HSV-1TK Gen in der gleichen Orientierung wie der transkribierende Promotor enthalten. Wie zu erwarten war nach dieser Hybridisierung nur ein Spleißprodukt mit einer Größe von circa 5kb.

Nach Abwaschen der HSV1-TK Sonde erfolgte eine Hybridisierung mit der eGFP Sonde. Wie erwartet, sind bei Zellen, die das Provirus pBulletIeGFP enthalten zwei Transkripte enthalten. Diese zeigen sich in einer Größe von ca. 3,3kb.

Um das Auftragen vergleichbarer RNA Mengen auf den verschiedenen Bahnen zu überprüfen, erfolgte nach Abwaschen der eGFP Sonde eine Hybridisierung mit 18S RNA. Diese radioaktiv markierte Probe enthält ubiquitär vorkommende RNA, die sogenannte 18S RNA.

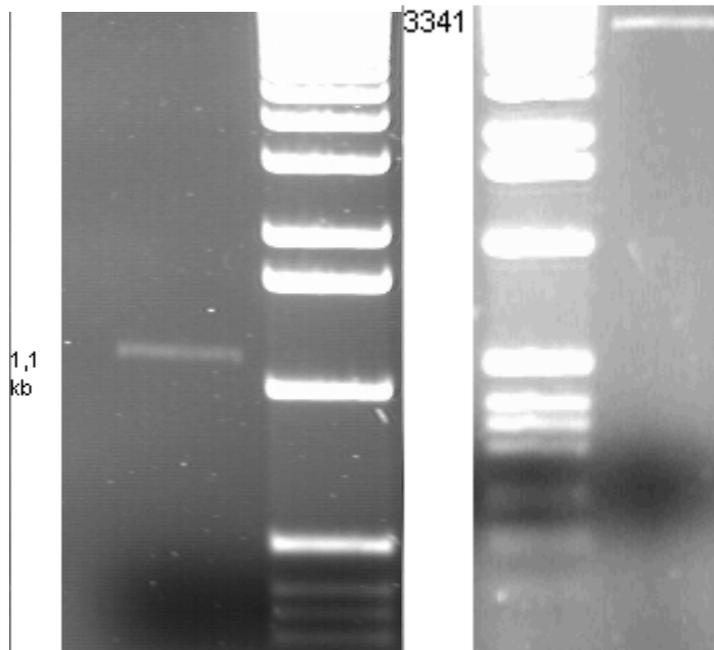
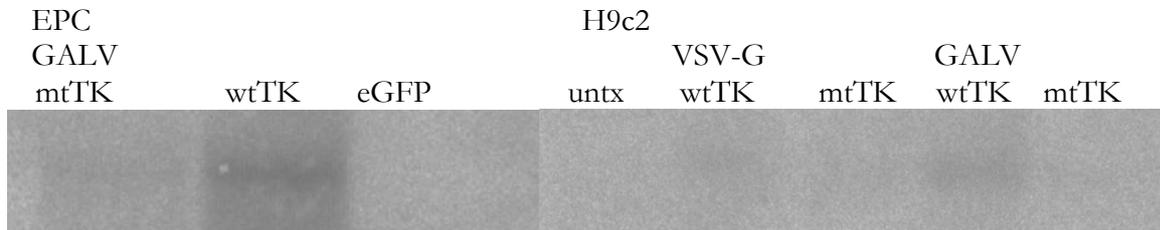


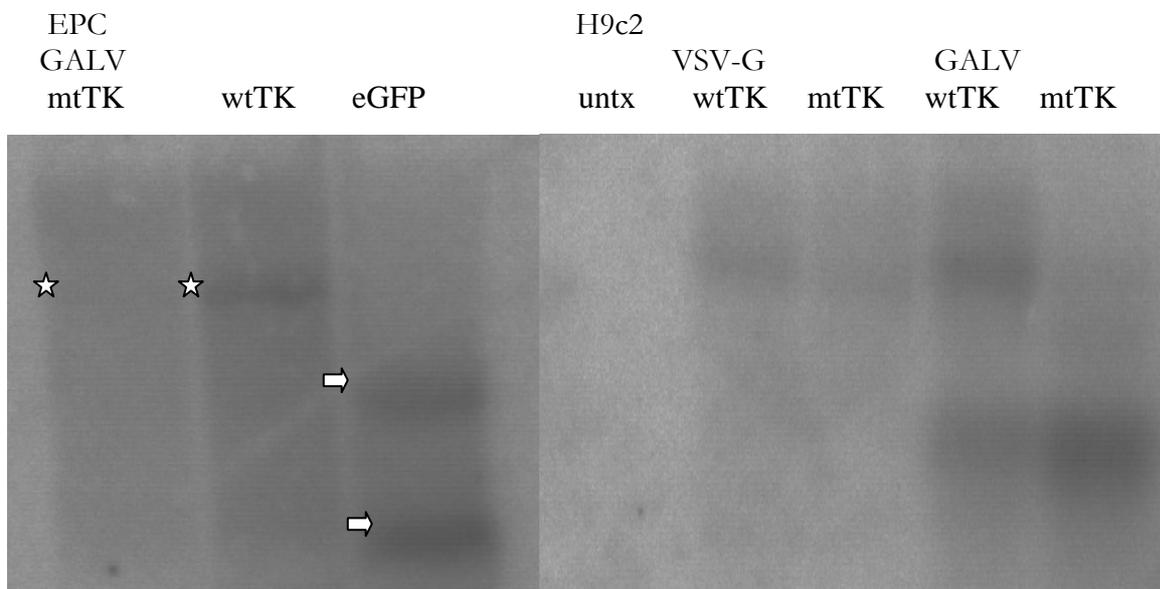
Abbildung 19: Sondenpräparation

Dargestellt sind die isolierten DNA Sonden:
A: HSV1-TK bzw. HSV1-sr39TK (1,1kb)
B: eGFP (3,3kb)

⇒
A: HSV1-TK



B: eGFP



C:18S

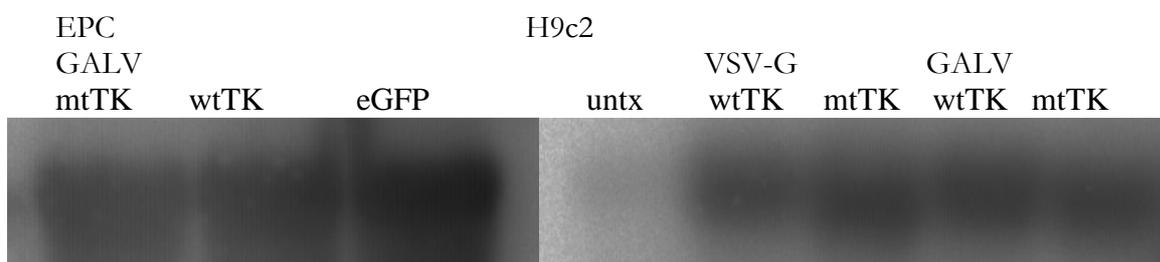


Abbildung 20: Northern Blot Analyse

Dargestellt sind:

A: das mit HSV1-TK markierte hybridisierte Ergebnis B: Hybridisierung mit eGFP

C: Kontrolle der Hybridisierung mit 18S

☆: ungespleißte Form des eGFP

⇨ : gespleißte Form des eGFP

6.4 Nachweis der Genexpression auf Proteinebene: Western Blot Analyse

Beim Western Blot werden in einer SDS-Page aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Das Wiedererlangen der Quartärstruktur ist jedoch nicht möglich.

Deshalb kann die Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch nur ein Epitop erkennen Probleme bereiten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper, der gegen *HSV1-Thymidine-Kinase Antibody* gerichtet ist, als Primärantikörper verwendet. Bislang wurde noch keine Arbeit veröffentlicht, die einen Proteinnachweis von HSV1-TK in stabil transduzierten endothelialen Vorläuferzellen (EPC) oder Rattenmyokardioblasten (H9c2) dargestellt hat.

Als zweiter Antikörper wurde der *Horse-Radish-Peroxidase-Anti-Goat-Anti-Donkey Antibody* verwendet

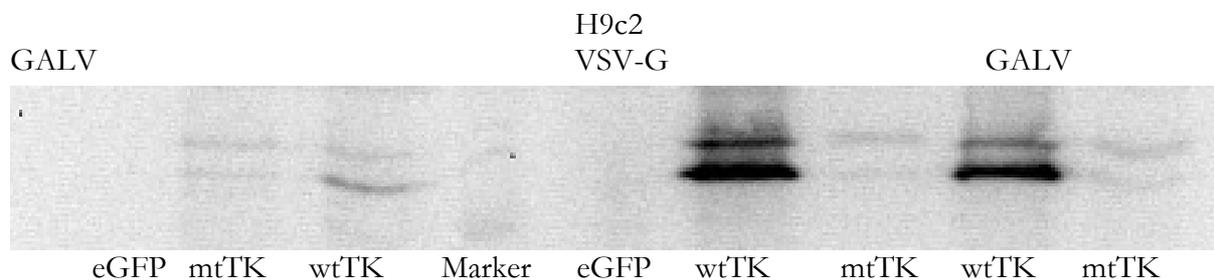
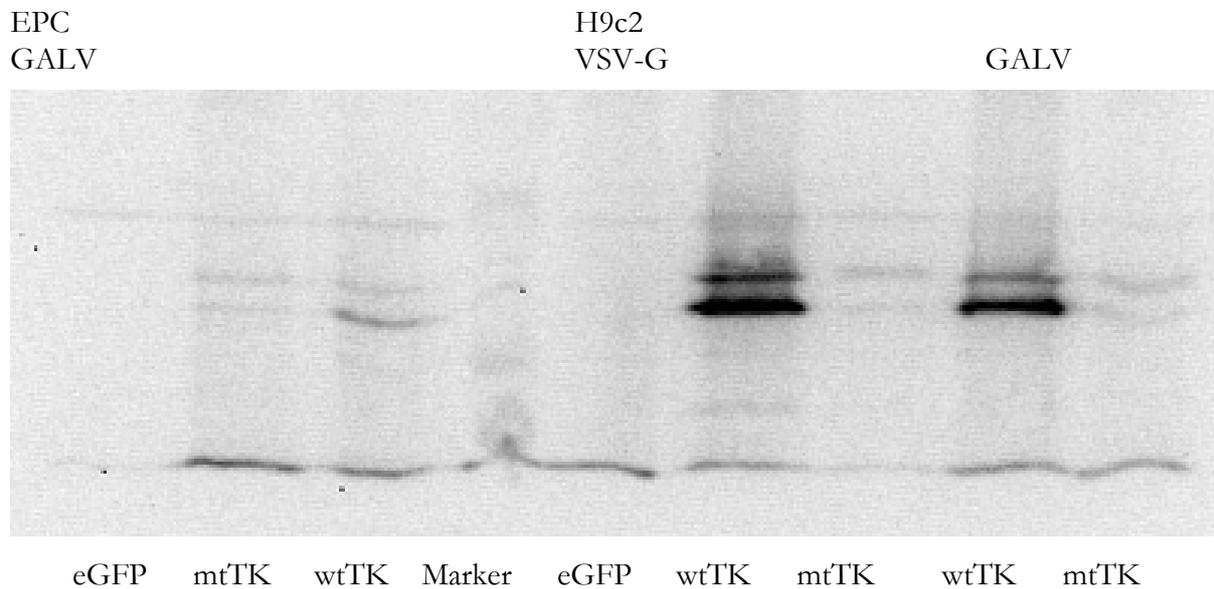
Die Thymidinkinase Expression wurde auf Proteinebene durch den Western Blot analysiert. Es wurden pro Probe 15µg Protein in die Geltaschen geladen.

Es zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien die Wildtyp-Form der Herpes Virus1-TK ein stärkeres Signal in der 32 bzw. 40 kb Bande bei gleich großer geladener Proteinmenge ergab.

Die eGFP-VSV.G bzw. eGFP-GALV pseudotypisierten Zelllinien dienten zur Negativkontrolle. Die Überprüfung der Proteinmenge erfolgte im BCA Proteinessay der Firma Pierce nach deren Protokoll.

Auf den entwickelten Membranen ist bei den als negativ Kontrolle aufgetragenen Zellen, die mit eGFP VSV-G oder Galv pseudotypisierten Viren stabil transduziert wurden keine Bande im Bereich der Thymidinkinase zu sehen. Die Herpes virale Thymidinkinase ist als Doppelbande bei 32kb und 40kb zu sehen.

Die mit wildtyp Thymidinkinase pseudotypisierten Viren zeigen starke Banden in der oben genannten Basengröße. Dieses Ergebnis korreliert mit der Northern Blot Analyse, bei der ebenfalls die wtTK-exprimierenden Zellen eine stärkere Aktivität aufwiesen.



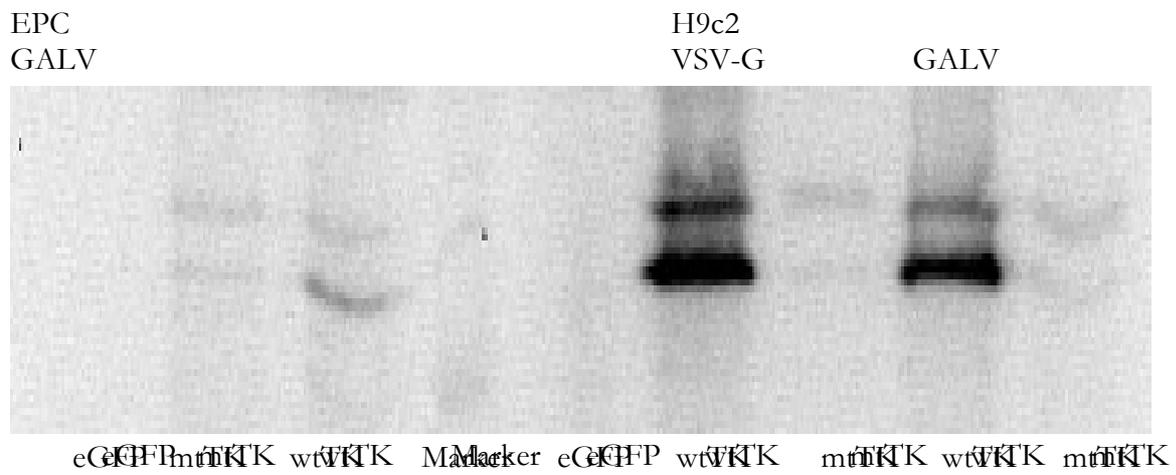


Abbildung 21: Western Blot Analyse

Dargestellt ist der Western Blot nach Chemilumineszenz Entwicklung. Als Negativkontrollen wurden mit eGFP pseudotypisierte Viren verwendet. Die Banden von 40 kb ist vor allem in den Zelllysaten stark ausgeprägt, die mit wTK pseudotypisierten Viren stabil transduziert wurden EPC

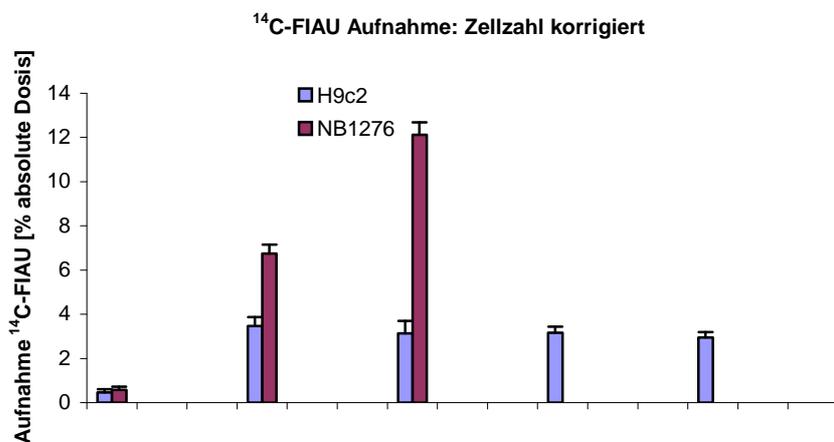
6.5 Radioaktive Aufnahme von (¹⁴C) FIAU

Die stabil transduzierten Zellen wurden vor Beginn des Versuchs mit einer definierten Zellzahl ausgesät. Nachdem sie eine ausreichende Dichte von 80% erreicht hatten, wurden sie zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit [¹⁴C] FIAU und zur Normalisierung auf Replikation gleichzeitig mit [³H]-Thymidin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit wurde die Aufnahme des radioaktiven Substrates im β -Counter gemessen.

Die gemessene Aufnahme von [¹⁴C] FIAU war in den H9c2 Zellen im Vergleich zu den NB1276 Zellen mit 3,5% im Gegensatz zu 10% bei den endothelialen Zellen niedriger. Auch bei der Aufnahme von [³H]-Thymidin zeigte sich bei den NB1276 Zellen mit 4-8% eine höhere Aufnahme als bei den H9c2 mit in etwa 2,5%. Insgesamt zeigen sowohl die H9c2, als auch die NB1276 eine vergleichbar hohe Aufnahme in der Prolifertion korrigierten Analyse der radioaktiven Aufnahme von 7%.

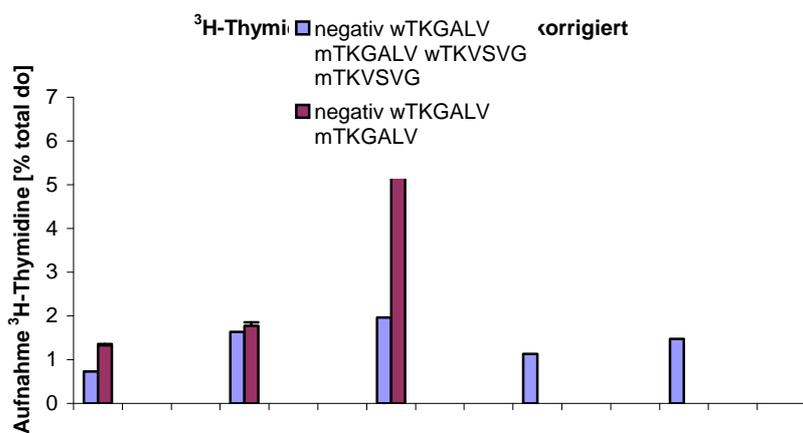
Ein signifikanter Unterschied zwischen mit wildtyp Herpes viraler Thymidinkinase oder mutanter Herpes viraler Thymidinkinase stabil transduzierter Zellen zeigte sich innerhalb der gleichen Zelllinien nicht. Da jedoch sowohl in der Proteinanalyse im Western Blot, als auch in der Analyse im Northern Blot die Expression des Proteins bzw. der RNA bei den mit mutanter HSV1TK transfizierten Zellen schwächer zu beobachten war, lässt diese Beobachtung auf eine im Context gesehene höhere Aktivität der mutanten TK schließen, da sich mit weniger Protein die gleich hohe Aufnahme des Radioaktiven [¹⁴C] FIAU zeigt.

Die unbehandelten nativen Zellen der beiden Zelllinien zeigten jeweils die gleiche niedrige Aufnahme des radioaktiven Materials.



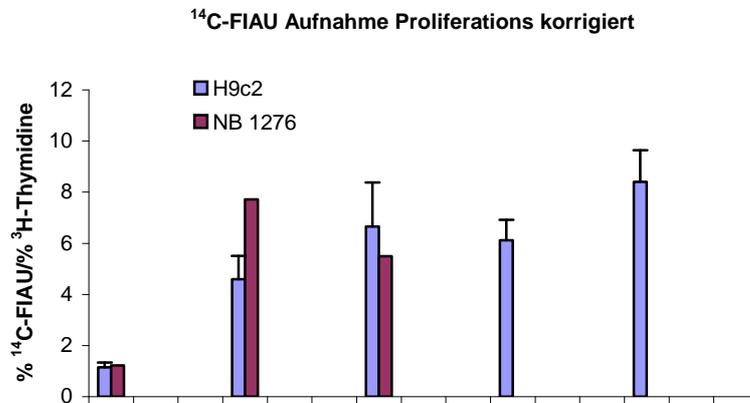
A:

nativ	wtTKIeGFP GALV	mtTKIeGF GALV	wtTKIeGFP VSV-G	mtTKIeGFP VSV-G
-------	----------------	---------------	-----------------	-----------------



B:

nativ	wtTKIeGFP GALV	mtTKIeGFP GALV	wtTKIeGFP VSV-G	mtTKIeGFP VSV-G
-------	----------------	----------------	-----------------	-----------------



C:

nativ	wtTK1eGFP GALV	mtTK1eGFP GALV	wtTK1eGFP VSV-G	mtTK1eGFP VSV-G
-------	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------

Abbildung 22: Diagramme zur radioaktiven Aufnahme

Gezeigt wird ein repräsentativer Versuch.

Dargestellt sind drei verschiedene Analysen zunächst der Aufnahme von [¹⁴C] FIAU (A), danach von [³H]-Thymidin (B) in die verschiedenen pseudotypisierten Zellen. In (C) wird das Verhältnis der beiden radioaktiven Substanzen in der Proliferations korrigierten Aufnahme analysiert.

6.6 Analyse des Wachstumsverhaltens stabil transduzierter EPC

Die CD34+ Zelllinie NB1276 (OTT et al.) besteht aus nicht immortalisierten endothelialen Vorläuferzellen.

Um die Passagefähigkeit der Zellen zu überprüfen, wurden im Doppelansatz je 5×10^4 Zellen ausgesät und je nach Wachstumsgeschwindigkeit nach einigen Tagen gezählt und wieder 5×10^4 Zellen pro 10cm Schale weiterpassagiert.

Da die beiden Reportergene HSV1-TK und eGFP potentiell toxisch auf die Zellen und damit deren Mitosezyklus wirken, wurden neben den mit wTK bzw mTK stabil transduzierten NB1276 als Negativkontrolle untransfizierte endotheliale Vorläuferzellen verwendet.

In verschiedenen Ansätzen (exemplarisch sind in der Abbildung 28 zwei Wachstumskurven dargestellt) zeigte sich, dass die Teilungsrate der Zellen nach ca. 10 Tagen bzw. drei Passagen ihren Höhepunkt erreicht, um dann kontinuierlich abzunehmen. Nach 30-40 Tagen- im Mittel sechs bis acht Passagen- war kein Wachstum der Zellen mehr zu beobachten.

Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den untransfizierten und transfizierten Zellen, was darauf schließen lässt, dass kein zytotoxischer Effekt bei den beiden Reportergenen existiert und dies somit nicht der limitierende Faktor in der Passage der endothelialen Vorläuferzellen darstellt.

Auch die Tatsache, dass das Reportergen mittels eines retroviralen Vektors in die Zelle verbracht wurde spielte in der Wachstumskurve der Zellen keine Rolle.

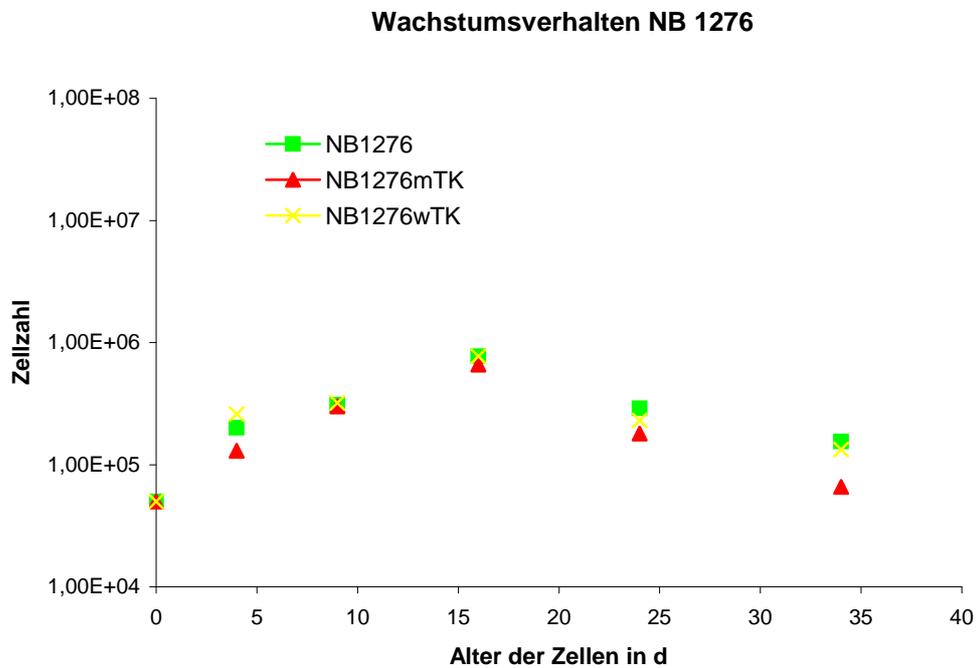


Abbildung 23: Diagramme zur Wachstumskurve der NB1276

Dargestellt ist exemplarisch 1 Analyse des Wachstumsverhaltens untransfizierter und transfizierter NB 1276 Zellen. Nach einem Wachstumshöhepunkt bei ungefähr 10 Tagen nach Transduktion sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit beständig um nach in etwa 40 Tagen völlig zum Stillstand zu kommen.

7 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen anhand der Reportergene eGFP und HSV1-tk den effizienten Gentransfer in humane endotheliale Vorläuferzellen und Rattenkardiomyoblasten mittels retroiraler Vektoren. Dabei wurde ohne Einsatz zusätzlicher Selektionsverfahren durch Verwendung von GALV- und VSV.G- pseudotypisierten Retroviren eine Transduktionseffizienz von bis zu 75% erreicht. Den Weg des Gentransfers zum Proteinprodukt wurde im Western Blot und Northern Blot überprüft und schließlich die Funktionalität mit der radioaktiven Akkumulation von (C14) FIAU gezeigt.

7.1 Diskussion der Verwendung von Reportergenen in der Gentherapie von Herzkrankheiten

In der Verwendung von Reportergenen zur nicht- invasiven Darstellung von Gentransfer liegt der größte Anteil der Forschung in der Tumorthherapie. Dennoch bildet die Gentherapie von kardialen Erkrankungen mit 9,1% den zweitgrößten Anteil. In der Abbildung 24 sind die verschiedenen aktuellen Studien nach Indikationen gelistet.

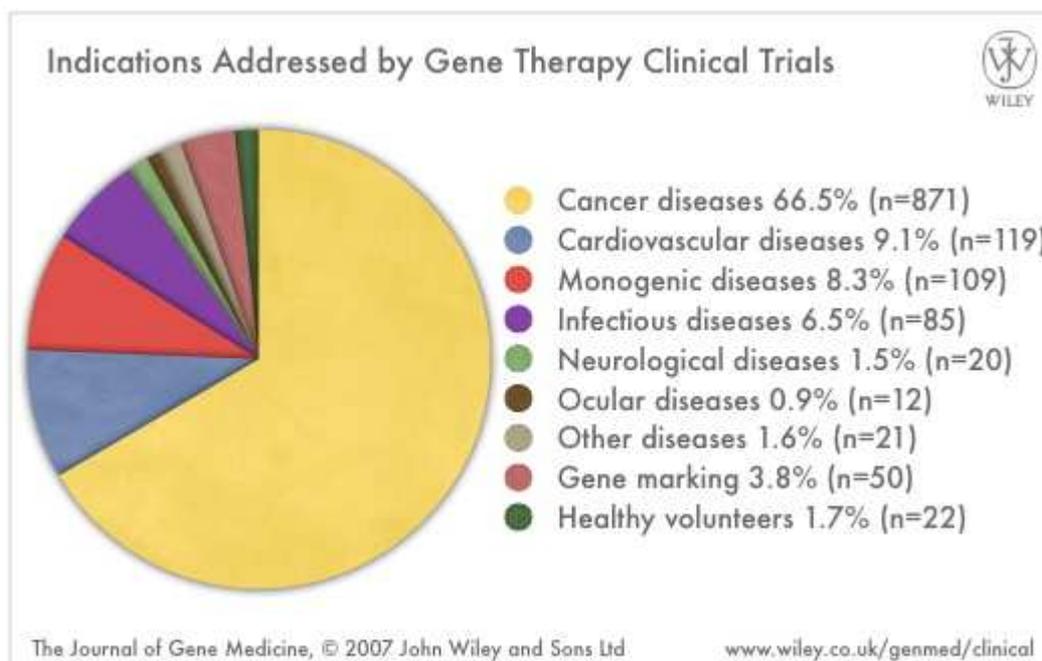


Abbildung 24: Verteilung Gentherapie (aus The Journal of Gene Medicine, 2007)

Dargestellt sind die unterschiedlichen Indikationen, die zur Etablierung von gentherapeutischen klinischen Studien geführt haben. Mit einem Anteil von 66,5% werden zur besseren Behandlung und Erforschung neoplastischer Erkrankungen klinische Studien geleitet. Gentherapeutische Studien in der Klinik im Zusammenhang mit kardiovaskulären, monogenetischen oder infektiösen Erkrankungen finden mit einem Prozentsatz von 6-9% an allen gentherapeutisch ausgerichteten klinischen Studien

Die nicht- invasive bildliche Darstellung von Reporter genen beinhaltet ein Reporter Transgen, das unter die Kontrolle eines „upstream promotor/ enhancer“ Elements gestellt ist. Diese Promotor/ Enhancer Elemente können durch konstitutive Promotoren wie LTR, Rous Sarkoma Virus oder CMV aktiviert werden, oder sie können sensitiv auf bestimmte endogene Transkriptionsfaktoren reagieren.

Ein Vorteil von Reporter genen ist die Möglichkeit Verfahren zur indirekten Darstellung schnell und zu geringeren Kosten als direkte Visualisierungsmethoden zu entwickeln und zu validieren. Dies ist möglich, da ein einziges Reporter gen/ Substrat- Paar in vielen verschiedenen Konstrukten verwendet werden kann um viele unterschiedliche biologische und molekulargenetische Prozesse darzustellen. Dies ist umso wichtiger, da in vielen klinischen Studien zur Anwendung von Gentherapie folgende Probleme zunächst ungelöst sind:

1. War der Gentransfer erfolgreich?
2. Ist die Verteilung des transduzierten oder transfizierten Gens im Zielorgan lokalisiert und ist die Verteilung im Zielorgan optimal?
3. Ist die Höhe der Transgen Expression ausreichend um einen therapeutischen Effekt zu erzielen?
4. Akkumuliert das Transgen in einem Organ oder Gewebe, in dem eine ungewollte Toxizität auftreten könnte?

5. Falls eine kombinierte Transgen/Prodrug Studie stattfindet: Wann ist die Transgenexpression am höchsten und wann ist der beste Zeitpunkt für die Gabe der Prodrugs?
6. Wie lange wird das Transgen im Zielgewebe exprimiert?

Durch die Anwendung von Techniken zur nicht invasiven Darstellung erfolgreichen Gentransfers und Expression bei Patienten, die sich einer gentherapeutischen Behandlung unterziehen, sind invasive Methoden wie die Biopsie des Zielorgans oder Analyse des Patientenblutes nicht mehr notwendig.

Denn die bildliche Darstellung offeriert einige klare Vorteile wie die Möglichkeit zur wiederholten Durchführung des viralen Gentransfers, keine Störfaktoren wie das umgebende Gewebe und die Möglichkeit 3D Bilder zu erhalten (BLASBERG et al., 2003).

In der Gentherapie kardialer Erkrankungen wird entweder durch die Infektion von Myokardzellen mit einem viralen Vektor, der zur Überexpression von z.B dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor führt oder zur vermehrten Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie NO versucht eine Besserung der Symptome zu erreichen. Oder es werden in vitro transduzierte Zellen wie zum Beispiel endotheliale Vorläuferzellen oder frisch isolierte Kardiomyoblasten direkt ins Myokard injiziert, wo sie dann zu einer Reduzierung der Mortalität führen sollen.

7.2 Diskussion des Gentransfers mittels retroviraler Vektoren

In der Vergangenheit entwickelte sich ein gesteigertes Interesse an der nicht-invasiven Darstellung des Gentransfers bei der Therapie kardialer Erkrankungen (ISNER et al., 2002).

Um eine stabile Langzeitexpression zu erreichen stellt der Gentransfer durch retrovirale Vektoren in diesem Zusammenhang eine mögliche Strategie dar. Im Rahmen von therapeutischen Ansätzen können Wachstumsfaktoren oder andere gefäßaktive Faktoren transferiert werden, um die Neovaskularisierung ischämischen Myokards zu untersuchen und zu fördern.

Außerdem ist es durch den stabilen Transfer von Markergenen möglich, Verbleib und Vitalität der injizierten Zelltransplantate *in vivo* zu verfolgen. Bisherige Arbeiten haben zur viralen Transduktion myokardialer oder endothelialer Zellen adenovirale Vektoren verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Zielzellen mit Retroviren transfiziert, die entweder ein amphotropes Wirtsspektrum aufwiesen oder VSV.G pseudotypisiert waren. In diesen Zellen wurde die Genexpression auf RNA-Ebene, Protein Ebene und als funktionelles Endprodukt im radioaktiven Aufnahmeversuch nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass VSV.G pseudotypisierte Zellen eine geringe Transduktionseffizienz in humanen endothelialen Vorläuferzellen zeigen, wobei die Rattenkardimyoblasten durch beide pseudotypisierte Viren gleich gut transduzierbar waren. Die Effizienz dieses Gentransfers erlaubte die weitere Verwendung der transduzierten Zellen für die Behandlung mit radioaktivem FIAU und nachfolgender Messung der Aufnahme in einem definierten Zeitraum.

Das von WEIJTENS und Mitarbeitern (1998) beschriebene Vektorsystem für die transiente Transfektion von 293T Zellen für die Herstellung retroviraler Überstände wurde dahingehend modifiziert, dass nicht nur das GALV-Hüllprotein als Virushülle verwendet wurde, sondern auch VSV.G als Virushülle eingesetzt wurde. In der Literatur sind transient hergestellte VSV.G-pseudotypisierte Überstände mit Titern von $4,6 \times 10^6$ IP/ml (PEAR et al., 1993) bis zu 1×10^7 IP/ml (SONEOKA et al., 1995, YANG et al., 1999) beschrieben.

Die Arbeitsgruppe von TJUVAJEV (2001) hat bei der Herstellung von retroviralen Vektoren mit HSV1-tk als Reporter gen eine Arbeit vorgelegt in der die Verwendung eines CMV Promotors zur Herstellung von hohen Virustitern empfohlen wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Virustiter waren teilweise deutlich niedriger als in den oben genannten Arbeiten von PEAR, SONEOKA und YANG, wobei frische Überstände den höchsten Titer zeigten. Die Abnahme des Virustiters durch Kryokonservierung um etwa 50% ist dagegen bekannt (PEAR, 2001). Da die Transduktionseffizienz unter anderem von dem Virustiter abhängig ist, was auch durch die gezeigten Daten belegt wird, sollten für eine optimale Transduktionseffizienz in erster Linie frische Überstände verwendet werden.

Da die verwendeten Zelllinien keine immortalisierten Zellen sind, war damit zu rechnen, dass die Passagenzahl einen negativen Einfluss auf die Transduktionseffizienz haben wird. Durch die Transduktion von Zellen mit niedriger Passagezahl wurde dieser Effekt jedoch weitgehend ausgeschlossen. Trotz der beobachteten Unterschiede der Transduktionseffizienz bei der Verwendung der gleichen viralen Überstände, sind daher auf andere Ursachen zurückzuführen. Da für den erfolgreichen retroviralen Gentransfer Zellteilung unbedingte Voraussetzung ist (MILLER et al., 1990), lassen sich nur gut proliferierende Zellpopulationen auch gut infizieren.

7.3 Diskussion des Gentransfers in endothelialen Vorläuferzellen und Rattenkardiomyoblasten

Die virale Transduktion von Rattenkardiomyoblasten ist von anderen Arbeitsgruppen bis dato in der Regel mit adenoviralen Vektoren durchgeführt worden. Diese haben den Vorteil, dass das Virus nach der erfolgreichen Transduktion von Zellen in vitro auch für eine Infektion der Zellen in vivo zur Verfügung steht. Mit adenoviralen Vektoren können sowohl proliferierende Zellen, als auch ruhende Zellen infiziert werden, allerdings ist die Expressionsdauer der viralen Genprodukte nur für einige Tage nachweisbar, da die Virus DNA nicht stabil in das Genom eingebaut wird (BENGEL et al., 2000).

Die Immunantwort auf adenovirale Vektoren mit Antikörperbildung verhindert ein mehrmaliges Anwenden des Gentransfers im gleichen Individuum.

Der Gentransfer in die verwendete Zelllinie H9c2 zeigte bei der FACS Analyse, dass sowohl die mit GALV-pseudotypisierten Viruspartikel, als auch die VSV.G-pseudotypisierten Viren eine in etwa gleich hohe Transduktionseffizienz zeigten. Auch in den molekularen Nachweismethoden wie Western Blot und Northern Blot war die Stärke der Genexpression in den verschiedenen pseudotypisierten Zelllinien gleich stark. Nach Behandlung der stabil transduzierten Zellen mit dem radioaktiven Substrat FIAU zeigte sich ebenfalls kein Unterschied in der Höhe der Substratverstoffwechslung.

In humanen endothelialen Vorläuferzellen haben KONG et al., 2004 durch retroviralen Gentransfer von gefäßprotektiven Substraten und dem Gen, das für das Antioxidans Hämoxigenase kodiert, durch deren gezielte Überexpression eine Verhinderung der Neointima in verletzten Gefäßendothelien beobachten können. Auch OTT et al., 2005 haben endotheliale Vorläuferzellen zur Behandlung einer experimentell erzeugten Linksherzinsuffizienz benutzt. Die Charakterisierung dieser Zellen ist in Abbildung 25 gezeigt.

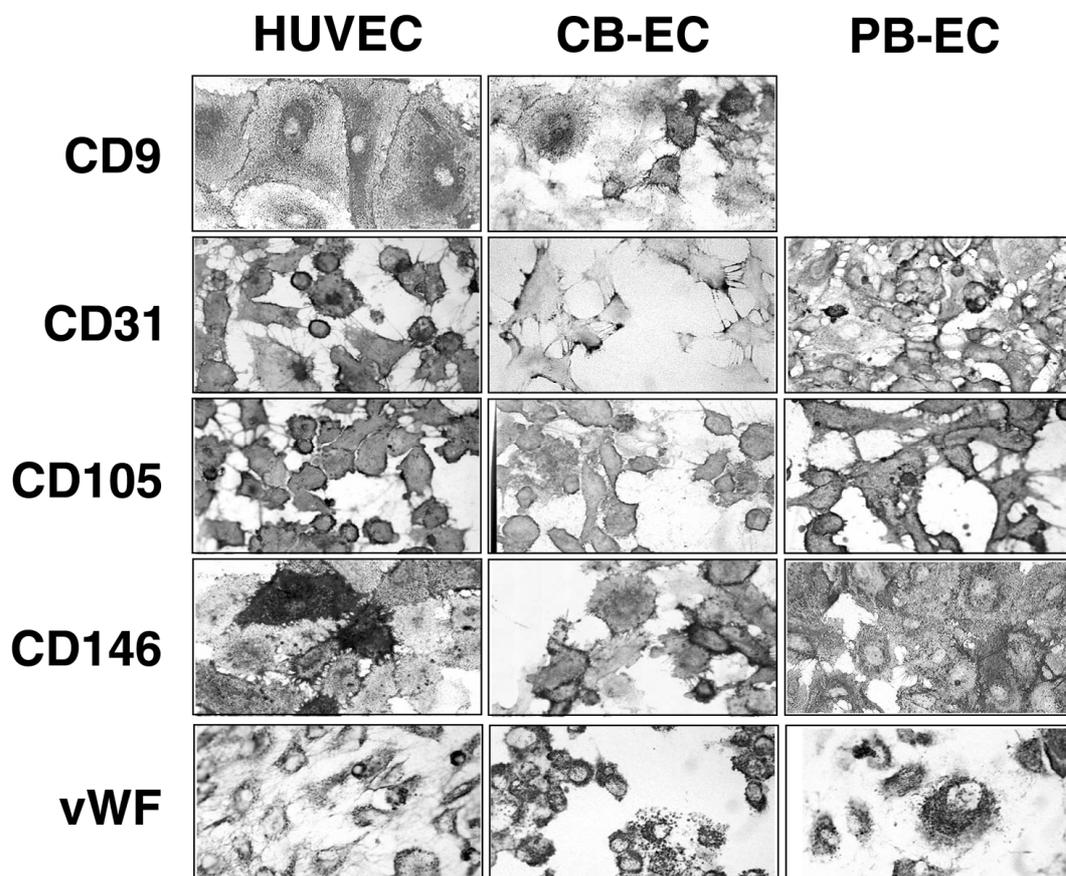


Abbildung 25: Analyse der endothelialen Vorläuferzellen (aus Ott et al. 2005)

Dargestellt sind endotheliale Zellen aus Nabelschnurisolat und peripherem Blut im Vergleich bekannten charakterisierten HUVEC Zellen. Es wurden Marker wie CD9 oder CD31 zum Vergleich bei der Charakterisierung verwendet.

Ein Nachweis des Gentransfers mittels PET durch stabile Transduktion der endothelialen Vorläuferzellen mit dem Reporter gen HSV1-tk hat bis jetzt nicht stattgefunden.

Bei der stabilen Transduktion der Zellen zeigte sich, dass die humanen endothelialen Vorläuferzellen nur unzureichend mit VSV.G- pseudotypisierten Viren zu infizieren sind. Die Transduktionseffizienz mit GALV-pseudotypisierten Viruspartikel war jedoch zufriedenstellend und zeigte eine höhere Effizienz als die Infektion von der verwendeten Rattenkardiomyoblasten Zelllinie H9c2. Nach Behandlung der stabil transfizierten NB1276 mit radioaktivem FIAU, und anschließender Messung der radioaktiven Aufnahme war eine höhere Verstoffwechslung der radioaktiven Substrate zu beobachten, als in der Zelllinie H9c2.

7.4 Diskussion der Verwendung von zwei Markergenen eGFP und HSV1-tk

Die Verwendung des Reporter gens eGFP ist eine weitverbreitete Methode in der Analyse der Transduktionseffizienz von viralem Gentransfer. Das liegt zum einen daran, dass durch Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie die ungefähre Zahl der infizierten Zellen sehr schnell abgeschätzt werden kann.

Zum anderen ist die FACS Analyse dieses Markergens inzwischen standardisiert, so dass sie ohne großen Aufwand und Unsicherheitsfaktoren durchgeführt werden kann. Im vorliegenden Fall wurden zwei Reporter gene mit einer dazwischen geschalteten IRES-Site verbunden und unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt.

IANNI et al., haben 1997 durch die Verwendung eines retroviralen Vektors, in dem eGFP mit lacZ durch IRES verknüpft wurde diese Art der Verbindung von zwei Reporter genen benutzt. Damit soll eine gleich starke Expression der beiden Genprodukte erreicht werden. Dies ist insofern wichtig, als dass das erste Reporter gen bei Etablierung der Infektionsmethode oft durch ein therapeutisches Gen ersetzt wird und meist zunächst als Marker gen eingesetzt wird um die Funktionalität von zwei klonierten Genen in einem viralen Vektor festzustellen.

Viele Autoren verwenden eGFP zusätzlich als Positivkontrolle, da bei erfolgreichem Transfer des Vektors auf den gelungenen Gentransfer des im gleichen Versuch verwendeten Vektors, bei dem eGFP durch ein therapeutisches Gen ersetzt wurde, zu schließen ist. So kann ein schneller Rückschluss auf die Effizienz des Gentransfers getroffen werden, bevor sehr aufwendige und teure Methoden zum Nachweis des Gentransfers vorgenommen werden (KONG et al., 2004).

Nach dem jetzigen Stand der Datenlage ist HSV1-tk das am meisten verwandte Reporter gen zur nicht-invasiven bildlichen Darstellung von Gentransfer. Dabei spielt es eine wichtige Rolle in der Erforschung der Genthherapie bei Herzkrankheiten.

Die Herpesvirale Thymidinkinase wird meist in Verwendung mit einem anderen therapeutischen Gen angewandt, wie zum Beispiel die retrovirale Transduktion von T-Zellen mit einem Vektor, der neben HSV1-tk auch den mutierten Nervenwachstumsfaktor- Rezeptor NTP exprimiert (GALLARDO et al., 2004).

In der onkologischen Tumortherapie des Magenkarzinom wurde HSV1-tk und das therapeutische Gen mit der IRES- Site erfolgreich kombiniert (ZHANG et al., 2004).

Versuche die zwei unterschiedlichen Marker gene in einem Fusionsgen unterzubringen waren ebenfalls erfolgreich (JACOBS et al., 1999). Da jedoch HSV1-tk und eGFP intrazellulär verbleiben ist das Austauschen eines Reporter gens gegen ein therapeutisches Gen auf nicht- sezernierte Genprodukte beschränkt (KOEHNE et al., 2003)

Die Datenlage der Gentherapie am Herzen in Kombination mit dem Markergen HSV1-tk beinhaltet einige Studien mit adenoviralen Vektoren. CHEN et al haben 1999 einen durch IRES verknüpften adenoviralen Vektor der HSV1-tk und den Dopaminrezeptor D2R80a exprimiert ins Rattenmyokard injiziert. Im selben Jahr publizierte die Arbeitsgruppe um ANTON (ANTON et al. 2004) einen adenoviralen Vektor, der neben HSV1- tk auch den endothelialen Wachstumsfaktor VEGF bildet.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine abgeschwächte Grünlichtemission. Diese Abschwächung zeigte sich auch in der FACS- Analyse der infizierten Zellen. Die visuelle Abschwächung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass eGFP als zweites Transgen im IHRES-Konstrukt vorliegt, wobei bekannt ist, dass die zweite Bindung der Ribosomen an die mRNA weniger effizient ist als die initiale Bindung.

7.5 Diskussion der Transduktionseffizienz: retrovirale Vektoren im Vergleich zu adenoviralen Vektoren in Herz und Tumor

Retrovirale Vektoren sind sehr verbreitet in der Transduktion von Tumorzelllinien, da diese Zellen sich durch ein unbegrenztes Wachstum auszeichnen (KONG et al., 2004).

In der Gentherapie von Stammzellen myokardialen und endothelialen Ursprungs werden bevorzugt adenovirale Vektoren verwendet, da diese eine sehr viel höhere Transduktionseffizienz aufweist

Auch in den vorliegenden Ergebnissen war die Höhe der MOI im Vergleich mit adenoviralen Virustitern eher niedrig. Die Gegenüberstellung der erzielten Titer mit denen anderer retroviraler Vektoren war jedoch zufrieden stellend.

7.6 Diskussion der Hüllspektren

In der Arbeit sollten die Hüllen des vesikulären Stomatitis Virus mit denen des Gibbon- Ape- Leukämie- Virus verglichen werden, da sich für die VSV.G-pseudotypisierten Viren ein leichteres Erreichen hoher Virustiter gezeigt hatte.

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich jedoch kein Unterschied in den Virustitern und der Infektiosität der verschiedenen pseudotypisierten Viren in der Zelllinie H9c2. Wie erwartet wurde mit der retroviralen Transduktion VSV.G-pseudotypisierter Viren in humanen endothelialen Vorläuferzellen nur eine niedrige Effizienz erreicht. Das VSV.G einen toxischen Effekt auf die Zellen haben kann, sollte in Zukunft auf die GALV-pseudotypisierten Viren zurückgegriffen werden.

7.7 Diskussion der Verwendung von mutanter und wildtyp HSV1- tk

GAMBHIR et al., haben 1999 zum erstenmal die durch Punktmutation veränderte HSV1- sr39TK zur radioaktiven Aufnahme von Tracer- Substraten verwendet. Diese mutierte Form der Thymidinkinase weist eine höhere Aufnahme des radioaktiven Markers FHBG als die des bis dahin favorisierten Markers FIAU auf.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung adenoviraler Vektoren die höchste Effizienz in der Kombination von HSV1- tk mit FIAU und HSV1- sr39tk mit FHBG erzielt werden konnte (ANTON et al., 2004, MIYAGAWA et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich sowohl in der RNA- Analyse im Northern Blot als auch in der Protein- Analyse im Western Blot ein deutlich höheres Signal bei den HSV1-tk transduzierten Zellen bei gleich hohem Prozentsatz infizierter Zellen. Dieser Unterschied war in der Zelllinie H9c2 stärker ausgeprägt als in den NB1276.

Bei der Analyse der radioaktiven Aufnahme war dieser signifikante Unterschied nicht mehr nachweisbar.

Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass HSV1- sr39tk bei gleich starker Expression und gleicher Effizienz im Northern Blot und Western Blot Nachweis zu einer stärkeren Verstoffwechslung des radioaktiven Trancers FIAU führen würde. Die spezifische Aktivität des Proteins HSV1-sr-TK wäre somit höher als die der wildtyp HSV1-TK.

Ein anderer Erklärungsansatz wäre eine stärkere Stabilität der HSV1-tk RNA, was zu einer erhöhten Translation führen würde und damit zu einer stärkeren Protein Synthese. Ein unterschiedliches Spleißmuster von HSV1-TK und HSV1-sr39 TK ist allerdings nicht zu erkennen.

Die oben erwähnten Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von KANG und Mitarbeitern (2005), in der verschiedene radioaktive Substrate wie (14C)FIAU, (3H) FEAU, (14C)FMAU und (3H)PCV in Bezug auf die Verwendung

1. von HSV1-tk versus HSV1- sr39tk
2. von adenovirale versus stabil retroviral transduzierter C5 Zellen

verglichen wurden.

Dabei zeigte sich, dass die Höhe der radioaktiven Aufnahme bei allen Tracern bei der Verwendung von HSV1- sr39tk höher war als bei der Verwendung des Reportergens HSV1-tk.

Obwohl die Autoren als Zielzellen die Zelllinie C5, eine Gliomblastomzelllinie der Ratten verwendet haben, zeigten sich ähnliche Resultate in den gezeigten Versuchen.

Um weitere genauere Ergebnisse der Kinetik der radioaktiven Substrate zu bekommen und dasjenige mit der höchsten Effizienz auszusuchen, sollten in Bezug auf die Reportergenexpression in der Therapie kardialer Erkrankungen Versuche, die den Vergleich der verschiedenen Tracersubstanzen in myokardialen oder endothelialen Stammzellen zum Ziel haben, durchgeführt werden

7.8 Diskussion der radioaktiven Aufnahme von retroviral versus adenoviral transduzierten Zellen mit den Tracern FIAU und FHBG

Der Vergleich der zellulären Aufnahme der zwei radioaktiven Tracer- Substanzen FIAU und FHBG hat im allgemeinen eine Favorisierung von (¹⁴C) FIAU in stabil transduzierten Zellen ergeben (TJUVAJEV et al., 2002). In Zellen, die mit einem adenoviralen Vektor infiziert wurde, zeigte sich im Allgemeinen die höchste Aufnahme bei der Verwendung von (¹⁸F)FHBG (MIN et al., 2003).

So hat zum Beispiel die Arbeitsgruppe von WU (2002, 2004) adenovirale Vektoren zur nicht- invasiven Darstellung des Gentransfers im PET zunächst in vitro mit H9c2 Zellen und dann in vivo mit frisch isolierten Kardiomyoblasten hergestellt. Diese Gruppe verwendete das Reporteragen HSV1- sr39tk und als radioaktives Substrat (¹⁸F)FHBG.

Verschiedene andere Arbeitsgruppen haben zur nicht-invasiven Darstellung der Reporteragenexpression in myokardialen Zellen in vitro und in vivo ebenfalls diese Kombination verwendet (INUBUSHI et al., 2003, MIYAGAWA et al., 2005).

Allerdings wurde zum Nachweis des myokardialen Gentransfer im Schweinemodel der radioaktive Tracer (¹⁴I)FIAU verwendet (BENGEL et al., 2003), der ebenso wie in einem anderen tierexperimentellen Ansatz (SIMOES et al., 2005) ausreichend hoch war um eine Aussage über die Kinetik der radioaktiven Aufnahme zu treffen.

Das kann auch daran liegen, dass der radioaktive Tracer FHBG sehr aufwendig und teuer in der Herstellung ist und deswegen seine Herstellung nur an wenigen Zentren realisiert werden kann.

Literatur über die Verwendung von retroviralen Vektoren im Zusammenhang mit der HSV1-tk vermittelten Verstoffwechslung von radioaktiven Substraten gibt es nur in tumorassoziierten Zelllinien.

Somit war dies der erste Versuch mit myokardialen und endothelialen Stammzellen nach stabiler Transduktion mit HSV1- tk und HSV1-sr39tk eine radioaktive Aufnahme zu messen.

7.9 Diskussion der Verwendung von HSV1-tk in vivo

Ursprünglich wurde die HSV1- tk Gentherapie als Suizidgen zusammen mit der Behandlung von Ganciclovir in der Therapie nicht Chemotherapie- sensiblen Tumoren entwickelt.

Das nicht toxische Prodrug Ganciclovir wird von der Thymidinkinase phosphoryliert und dann von endogenen Kinasen zu GCV-Triphosphat phosphoryliert. Dies führt zum DNA-Kettenabbruch und Einzelstrangbrüchen (BELTINGER et al., 1999).

Die Apoptose der Zelle kommt durch die Aktivierung der Kaspase- Kaskade zustande.

Die Behandlung der HSV1- tk transduzierten Zellen mit Ganciclovir führt zu einer Anhäufung der p53 Expression und eine gesteigerte Ausbildung von CD95 und Tumor- Nekrose- Faktor- Rezeptor auf der Zelloberfläche.

Durch die CD95 Aggregation kommt es zur Bildung des sogenannten Fas- assoziierten Todes- Domänen- Protein (FAAD) und einem Kaspase 8 enthaltenden, Selbstmord induzierendem Signalkomplex.

Zusätzlich zu diesem Mechanismus sensibilisiert die Behandlung mit TK/GCV das Stattfinden eines Zelltodes, der CD95L, TNF, und TNF-verwandten, Apoptose auslösenden Ligand (TRAIL) benutzt.

Ein weiterer Mechanismus, der in der Gentherapie mit HSV1- tk und Ganciclovir ausgenutzt wird ist der sogenannte Bystander Effect. Damit wird das Phänomen beschrieben, dass bei der Behandlung HSV1- tk positiver Tumoren, in denen circa 10% der Tumorzellen HSV1- tk positiv sind, ein weitaus größerer Teil des Tumors sensibel für die Behandlung ist.

Ein möglicher Erklärungsversuch ist der, dass das toxische Produkt GCV-Triphosphat über Gap junctions von der transduzierten in die nicht transduzierten Zelle übergeht. Diese Zellwand Brücken werden von Connexin43, einem gap junction Protein, gebildet, das nach stabiler HSV1- tk Transduktion vermehrt exprimiert wird. Da auch Bystander-negative Tumorzelllinien existieren, bei denen in der Western Blot Analyse trotzdem Connexin 43 exprimieren, liegt dieser Effekt der Fähigkeit der Zellen zugrunde, diese Zellwandverbindungen auszubilden (McMASTERS et al., 1998, ZHANG et al., 2003).

Diese Faktoren führen bei der Verwendung des HSV1- tk Reportersystems in der Verwendung der Analyse myokardialer Gentherapie zu einer möglichen Toxizität der transduzierten Thymidinkinase.

Andererseits könnte trotz einer geringeren Transduktionseffizienz bei der Verwendung von retroviralen Vektoren bei der Infektion von kardialen bzw. endothelialen Zellen der Bystander- Effekt ausgenutzt werden, wenn HSV1- tk zusammen mit einem therapeutischen Gen verwendet wird. Dabei sollte es sich jedoch um ein intrazellulär verbleibendes Genprodukt handeln, damit es durch die Connexin43 Verbindungen in die anderen Zellen gelangen kann

Die Analyse der eigenen Wachstumskurve zeigte in Abwesenheit einer Prodrug keine Toxizität. Das Sistieren der Wachstums der Zellen ist auf die beschränkte Passagezahl der nicht immortalisierten Stammzellen zurückzuführen, da auch die nicht infizierten Zellen ihr Wachstum zum gleichen Zeitpunkt einstellen.

Eine Langzeittoxizität in vivo ist aber dadurch nicht auszuschließen. Um dies zu erreichen, sollte eine Analyse des Zellüberlebens und der Zytotoxizität mit radioaktivem Tracer durchgeführt werden, um HSV1-tk positive und untransduzierten Zellen zu vergleichen.

8 Ausblick

Transgene Tiere, die Reporter- Konstrukte im ganzen Körper tragen oder selektiv in bestimmten Organen oder Zelltypen im ausgewachsenen Organismus oder während einer bestimmten Phase der embryonalen Entwicklung sind der Gegenstand des Schwerpunktes der augenblicklichen Forschung. Verfahren zur nicht- invasiven Darstellung können dazu beitragen, die Aktivierung oder Ausschaltung spezifischer Gene, Signaltransduktions Wege oder Protein- Protein Interaktionen zu detektieren. Diese Information kann nützlich sein um zu bestimmen oder zu beobachten, wann eine Zelle ein Stadium höherer Malignität erreicht oder ob eine bestimmte Therapie effektiv eine spezifische Signaltransduktion auslöst.

In klinischen Studien ist die Anwendung von Reporter-Genen mehr beschränkt als in der Anwendung im Tiermodell, da die Notwendigkeit besteht nur Zielgewebe mit den spezifischen Reporter- Konstrukten zu transduzieren. Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keinen idealen Vektor zum spezifischen Gentransfer nur in definierten Organen, obgleich dies ein Gegenstand intensiver Forschung ist. Dies und mehrere andere Gründe (siehe Diskussion) führen dazu, dass aktuell keine Markergenstudien zugelassen werden.

Bei der Entwicklung jeden neuen Vektors und jeden neuen Reporter- Gens sind viele aufwendige Testreihen zur Überprüfung der Sicherheit und der Entwicklung standardmäßig anwendbarer Verfahren notwendig.

Die vorrangigen Anwendungsgebiete von Marker- bzw. Reporter- Gen Anwendung zur nicht- invasiven bildlichen Darstellung sind

1. Die quantitative Messung der Transduktionseffizienz, indem Lokalisation, Ausdehnung und Dauer der Transgenexpression gemessen werden.
2. Monitoring des weiteren Verlaufs der Zellen nach Transduktion *in vitro* insbesondere die *ex vivo* Transduktion von Stammzellen und immunkompetenten Zellen.

Die Vorteile dieser Art der Überwachung des Gentransfers liegen auf der Hand. Es ist möglich die transkriptionale und posttranskriptionale Regulation endogener Zielgen Expression darzustellen, außerdem spezifische Protein- Protein Interaktionen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit neue experimentelle Wege

Das Potential den pharmazeutischen Effekt eines Medikamentes auf einen spezifischen Signaltransduktionsweg in einem individuellen Tumor zeigt eine Chance die Wirksamkeit der Therapie schon auf molekularer Ebene zu beurteilen. Dafür wäre die diagnostische Verwendung von Reporter genen notwendig, die sehr spezifisch nur die Zielzellen bzw. das Zielorgan transduzieren. Diese Anwendungslücke werden Verfahren der molekularen Darstellung in der nächsten Dekade füllen.

Die Anwendung von Reporter genen speziell in der gentherapeutischen Behandlung von kardialen Erkrankungen gewinnt immer mehr an Bedeutung. (s. Abbildung 26).

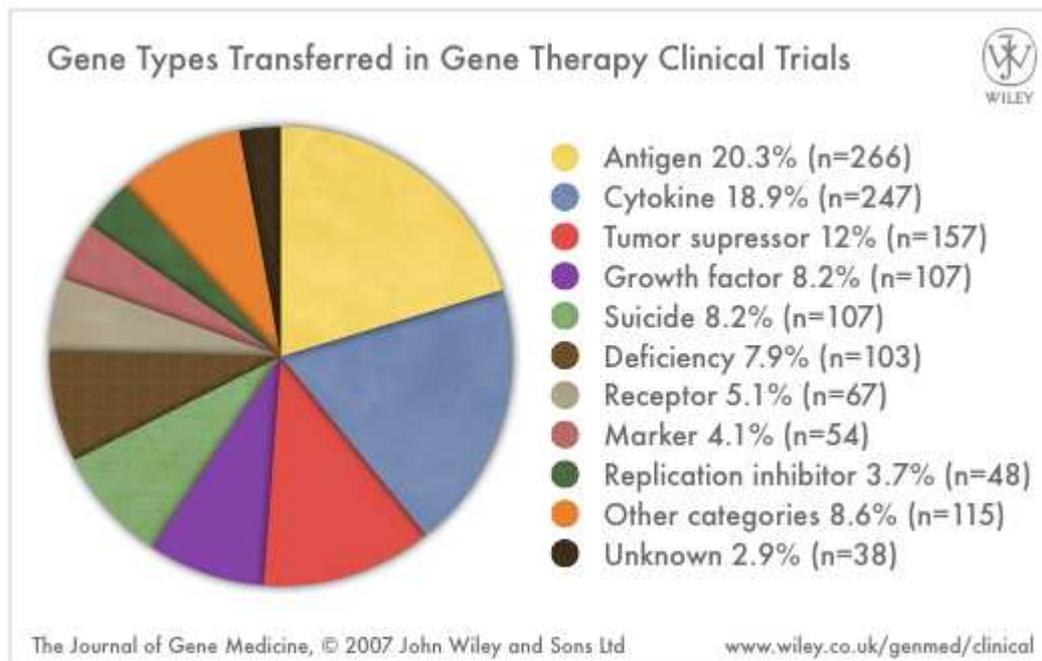


Abbildung 26: Gentyphen, die in der genterapeutischen Studien verwendet werden (aus: The Journal of gene medicine, 2007).

Dargestellt sind die verschiedenen Arten von Genen, die zur Zeit in klinischen Studien Anwendung finden. Mit einem Anteil von in etwa 20% sind Antigene und Cytokine die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Gruppe. Markergene finden sich mit 5% Anteil an allen genterapeutischen klinischen Studien in der Verteilung.

Einige Ansätze werden zur Zeit in klinischen Phase I Studien erprobt. Dabei liegt ein besonderes Augenmerk auf der Behandlung der koronaren ischämischen Herzkrankheit und der Therapie der kongenitalen Herzinsuffizienz. Die Lösungsansätze zielen dabei entweder auf eine Injektion stabil transduzierter Zellen oder das direkte Einbringen viraler Vektoren zum Gentransfer ab. Um die Effizienz dieser Therapie vor allem auch im Langzeitversuch zu beurteilen, ist es notwendig die vorhandenen Reporter-gen Systeme so zu verändern, dass dies möglich ist (ISNER et al., 2002). Mit der vorliegenden Arbeit wurden „proof of principle“ Experimente mit retroviralen Vektoren vorgestellt, welche die Basis für die nicht-invasive Darstellung von Zellen nach kardialer Applikation in das Herz über einen längeren Zeitraum im Tiermodell ermöglichen sollten.

9 Zusammenfassung:

Stammzelltherapie mittels viralem Gentransfer ist ein zukunftsweisender Ansatz in der Therapie kardialer Erkrankungen. Da jedoch die Effizienz des Gentransfers in der Regel nur durch klinische Test oder subjektive Einschätzung der behandelten Patienten indirekt messbar ist, besteht die Notwendigkeit, geeignete molekularbiologische Strategien zu entwickeln um den Erfolg der genterapeutischen Behandlung nachzuweisen.

Eine effektive Möglichkeit zur Darstellung von biologischen Prozessen zeigt die Positron-Emissions-Tomographie (PET), da sie neben einer hohen Sensitivität der Marker-Detektion auch die Möglichkeit einer guten quantitativen Darstellung der zu untersuchenden Regionen bietet.

Das Prinzip der Verwendung von Reportergenen zur nicht-invasiven Darstellung wie der Herpes Virus Typ 1 Thymidin Kinase (HSV1- TK) beruht auf Vektor-assoziiierter Überexpression eines Transgens im Zielgewebe, welches für ein Protein kodiert, das im normalen Gewebe nicht oder nicht in dieser Häufigkeit vorhanden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die bei der Virusherstellung verwendeten Plasmide wildtyp-tk -IRES- eGFP und mutant- tk- IRES- eGFP kloniert. Dann wurden die Viren in der Verpackungszelllinie 293T hergestellt, filtriert und kryokonserviert.

Um eine optimale Infektiosität für die unterschiedlichen Zielzellen zu erreichen, wurden zwei verschiedene Virushüllen- die des Gibbon- Ape- Leukemia- Virus (GALV) und des vesikulären Stomatitis Virus (VSV.G)- benützt. Nach der Infektion von H9c2 und EPC fand eine Analyse der Infektionsrate im FACS statt, die eine Transduktionseffizienz von bis zu 75% zeigte.

Da es in der Literatur einige Hinweise auf eine eventuell vorhandene Zelltoxizität bei der Verwendung von HSV1-tk gab, wurde mit den endothelialen Vorläuferzellen eine Wachstumskurve angelegt, die jedoch durch die Mortalität der Zellen begrenzt war.

Der Nachweis der Genexpression auf RNA- Ebene wurde erfolgreich mittels Northern- Blot durchgeführt. Um die Umsetzung der genetischen Information auf Proteinebene zu kontrollieren wurden Western- Blot Experimente durchgeführt. Die Möglichkeit der Verwendung zur nicht-invasiven bildlichen Darstellung in der Positron- Emissions- Tomographie (PET) wurde mit einem *in- vitro* Experiment vervollständigt.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen zu zeigen, dass endotheliale Vorläuferzellen und Kardiomyoblasten mit retroviralen Vektoren stabil transduzierbar sind. Neben dem Transfer des Markergens eGFP ist es gelungen das Reportergen HSV1-TK stabil ins Zellgenom zu verbringen und dessen Funktionalität in der radioaktiven Aufnahme und Verstoffwechslung zu beweisen.

Damit ist die Möglichkeit vorhanden, einen Transfer von therapeutischen Genen *in vivo* und *in vitro* zu verwirklichen. Da jedoch der Reportergentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren zu jetzigen Zeitpunkt wegen möglicher Risiken wie der Insertationsmutagenese nur auf präklinische Experimente beschränkt bleiben kann, ist zu prüfen, ob dieses

Prinzip der stabilen Transfektion mittels anderer viraler Vektoren wie Lentiviren, SIN Viren oder Adeno-assoziiierter Viren realisiert werden kann.

9 Summary:

Stem cell therapy via viral gene transfer is a forward-looking approach in the therapy of cardiovascular disease. As Efficiency of gene transfer is generally just indirectly measurable through clinical tests or subjective evaluation of the patient treated, it is essential to detect appropriate strategies in molecular biology in order to demonstrate successful gen-therapeutical treatment.

One actual feasibility in biological process imaging is the positron emission tomography as it shows not only a high sensitivity in marker detection but also the possibility of sufficient quantitative description of the regions to be analysed.

The principle of application of reporter genes for non invasive imaging like as herpes viral type 1 thymidine kinase is based upon vector associated over expression of a transgene in the target tissue coding for a protein that is not or not such frequently existent in normal tissue.

In the presented study we first cloned the plasmides to be used: wildtype-TK-IRES-eGFP and mutant-TK-IRES-eGFP. Retroviruses were then generated in 293T cells, filtrated and cryp-preserved. In order to reach an ideal infectivity two different pseudotyped viruses – the Gibbon Ape Leucemia Virus (GALV) and the Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G). Infectious rates of transfected H9c2 and EPC were analysed through FACS that showed an efficiency of transduction up to 75%.

As there is a presumed cell toxicity associated to HSV1-TK existing in former literature a growth curve with endothelial progenitor cells has been built up which was limited by natural cell mortality.

The proof of gene expression on RNA-level has been conducted with Northern blot analysis. Control of transfer into protein-level has been conducted with Western blot analysis. The feasibility for application for non-invasive imaging in PET has been completed with an in-vitro uptake trial.

With this study we could demonstrate that it is possible to receive stable transduced endothelial progenitor cells and Cardiomyoblasts using retroviral vectors. Besides the transfer of the marker-gene eGFP we succeeded in stably transferring the reporter-gene HSV1-TK into the cell genome and we could proof its functionality via radioactive uptake and metabolism. Herefore there is a potential existing to realize therapeutic gene transfer in vivo and in vitro.

As retroviral gene transfer up to current development remains limited for potential risks such as insertation mutagenesis, it is to be considered to realize this principle of stable transfection via differing viral vectors for example Lentivirus, SIN-vectors or adeno-associated viruses.

10 Literaturverzeichnis:

Adam Ma., Osborne WR., Miller AD.

R-region cDNA inserts in retroviral vectors are compatible with virus replication and high-level protein synthesis from the insert

Hum Gene Ther 1995, 6:1169-1176

Adam Ma., Miller Ad.

Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions

J Virol 1988, 62:3802-6

Anton M., Wittermann C., Haubner R., Simoes M., Reder S., Essien B., Wagner B., Henke J., Erhardt W., Noll S., Hackett NR., Crystal RG., Schwaiger M., Gansbacher B., Bengel FM.

Coexpression of herpesviral thymidine kinase reporter gene and VEGF gene for noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer: an in vitro evaluation

J Nucl Med 2004, 45: 1743-1746

Arai T., Takada M., Ui M. Iba H.

Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus g protein-pseudotyped retrovirus vector into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts

Virology 1999, 260:109-115

Asahara T., Murohara T., Sullivan M., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schattemann G., Isner JM.

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis

Science 1997, 275:965-967

Baltimore D.

Viruses, polymerases and cancer
Science 1976, 192:632-6

Bauer TR., Miller AD., Hickstein DD.

Improved transfer of the leukocyte integrin CD18 subunit into hematopoietic cell lines by using retroviral vectors having a gibbon ape leukemia virus envelope
Blood 1995, Vol 86 No 6:2379-2387

Baum C., Dullmann J., Li Z., Fehse B., Meyer J., Williams DA., von Kalle C.

Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells.
Blood 2003, 101:2099-114

Bean BP.

Classes of calcium channels in vertebrate cells
Annu Rev Physiol 1989, 51:367-384

Bell P., Vandenberghe LH., Wu D., Johnston J., Limberis M., Wilson JM.

A comparative analysis of novel fluorescent proteins as reporters for gene transfer studies
DOI: 10.1369/jhc7A7180.2007

Bellik L., Ledda F., Parenti A.

Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation
FEBS Letters 2005, 579:2731-2736

Beltinger C., Fulda S., Kammertoens T., Meyer E., Uckert W., Debatin KM.

Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases
Proc. Natl. Acad. Sci, 1999, 96:8699-8704

Bender MA., Palmer TD., Gelinas RE., Miller AD.

Evidence that the packaging signal of moloney murine leukemia virus extends into the gag region

Journal of Virology, 1987, 1639-1646

Bengel FM., Anton M., Avril N., Brill T., Nguyen N., Haubner R., Gleiter E., Gansbacher B., Schwaiger M.

Uptake of radiolabeled 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosyluracil in cardiac cells after adenoviral transfer of the herpesvirus thymidine kinase gene

Circulation 2000, 102:948-950

Bengel FM., Anton M., Richter T., Simoes MV., Haubner R., Henke J., Erhardt W., Reder S., Lehner T., Brandau W., Boeckstegers P., Nekolla SG., Gansbacher B., Schwaiger M.

Noninvasive imaging of transgene expression by use of positron emission tomography in a pig model of myocardial gene transfer

Circulation 2003, 108:2127-2133

Blasberg RG., Tjuvajev JG.

Molecular-genetic imaging: current and future perspectives

J. Clin. Invest. 2003, 111:1620-1629

Bolognesi DP., Montelaro RC., Frank H., Schafer W.

Assembly of type C oncoviruses: a model

Science 1987, 199:183-6

Bowermann B., Brown PO., Bishop JM., Varmus HE.

A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA

Genes Dev 1989, 3:469-78

Brand K, Strauss M.

Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie
In: GANTEN G, RUCKPAUL K. (Hrsg.), Handbuch der molekularen Medizin,
Bd. 2
Springer Verlag, Berlin 1998, 116

Bunnell BA., Metzger M., Byrne E., Morgan RA., Donahue RE.

Efficient in vivo marking of primary CD4+ T lymphocytes in nonhuman primates
using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector
Blood 1997, Vol 89 6:1987-1995

Burns JC., Friedmann T., Driever W., Burrascano M.

Vesicular stomatitis virus G glykoprotein pseudotyped retroviral vectors:
concentration to very high titer an efficient gene transfer into mammalian cells
Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:8033-8037

**Cavazanno-Calvo M., Hacein-Bey S., De Saint Basile G., Gross F., Yvon E.,
Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova JL., Bousso P., Deist
FL., Fischer A.**

Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.
Science 1994, 263: 802-5

Check E.

Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer.
Nature 2002, 419:545-6

Chen ST., Iida A., Guo L., Friedmann T., Yee JK.

Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the g
protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible
system
Proc Natl Acad USA, 1996, 93:100057-100062

Chen IY., Wu JC., Min JJ., Sundaresan G., Lewis X., Liang Q., Herschman HR., Gambhir SS.

Micro-positron emission tomography imaging of cardiac gene expression in rats using bicistronic adenoviral vector-mediated gene delivery
Circulation 2004, 109, 1415-1420

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward WW., Prasher DC.

Green fluorescent protein as a marker for gene expression
Science 1994, 263: 802-5

Chong H., Vile RG.

Replication-competent retrovirus produced by a `split-function` third generation amphotropic packaging cell line
Gene Ther 1996;3:624-629

Chong H., Starkey W., Vile RG.

A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging construct, and endogenous retroviral sequences
Journal of Virology 1998, 2663-2670

Cone RD., Mulligan RC.

High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range
Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:6349-53

Coffin J.

Genome Structure

In: Weiss R., Teich N., Varmus H., Coffin J. (Hrsg.), RNA Tumor Viruses (2.Auflage) Band 2, Supplemente, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1984, 17-75

Coffin JM., Hughes SH., Varmus HE.

Retrovirus

CSHL Press, 1997

Cormack BP., Valdivia RH., Falkow S.

FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)

Gene 1996, 173:33-8

Danos O. and Mulligan RC.

Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges

Proc Natl Acad Sci, USA 1988, 95: 6460-6464

Delouis C., Milan D., L'haridon R., Gianquinto L., Bonnerot C., Nicolas JF.

Xenotropic and amphotropic pseudotyped recombinant retrovirus to transfer genes into cells from various species.

Biochem Biophys Res Commun 1990, 169:8-14

Dougherty JP., Temin HM.

A promotorless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing

Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84:1197-1201

Emerman M und Temin HM.

Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors
Molecular and Cellular Biology, 1986, 792-800

Emi N., Friedmann T., Yee JK.

Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus
J of Virology 1991, 1202-1207

Fadini GP., Agostini C., Avogaro A.

Characterization of endothelial progenitor cells
Biochem and Biophys Res Commun 2005, 336:1-2

Felgner PL., Gadek TR., Holm M., Roman R., Chan HW., Wenz M., Northrop JP., Ringold GM., Danielsen M.

Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proc Nat. Acad Sci USA 1987, 84:7413-7

Flasshove M., Bardenheuer W., Schneider A., Hirsch G., Bach P., Bury C., Moritz T., Seeber S., Opalka P.

Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene
J Cancer Res Clin Oncol 2000, 126: 391-399

Forg P., Von Hoegen P., Dalemans W., Schirmacher V.

Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination
Gene Ther 1998, 5:789-97

Forrester JS., Price MJ., Makkar RR.
Stem cell repair or infarcted myocardium
An overview for clinicians
Circulation 2003, 108:1139-1145

Gambhir SS., Barrio JR., Phelps ME., Iyer M., Namavari M., Satyamurthy N., Wu L., Green LA., Bauer E., MacLaren DC., Nguyen K., Berg AJ., Cherry SR., Herschman HR.
Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography
Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96:2333-2338

Gambhir SS., Bauer E., Black ME., Liang Q., Kokoris MS., Barrio JR., Iyer M., Namavari M., Phelps ME., Herschmann HR.
A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography
PNAS 2000, vol 97 6: 2785-2790

Gehling UM. et al.
In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells
Blood 2000, 95:3106-3112

Glossmann H., Striessnig J.
Structure and pharmacology of voltage-dependent calcium channels
ISI Atlas Sci Pharmacol 1988, 2:202-210

Grisham J.

Inquiry into gene therapy widens.
Nat Biotechnol 2000, 18:254-5

Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay JP., Thrasher AJ., Wulfraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., Fischer A., Davies EG., Kuis W., Leiva L., Cavazzana-Calvo M.

Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy.
N Engl J Med 2002, 346:1185-93

Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., Le Deist F., Wulfraat N., McIntyre E., Redford I., Villeval JL., Fraser CC., Cavazzana-Calvo M., Fischer A.

A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.
N Engl J Med 2003, 348:255-6

Hadjantonakis AK., Gerstenstein M., Ikawa M., Okabe M., Nagy A.

Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells.
Mech Dev 1998,76:79-90

Hadjantonakis AK., Macmaster S., Nagy A.

Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal
BMC Biotechnology 2002 2:11

Hammer RE., Palmiter RD., Brinster RL.

Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene.
Nature 1984, 311:65-7

Hanlon L., Argyle D., Bain D., Nicolson L., Dunham S., Golder MC., Mc Donald M., Mc Gillivray C., Jarrett O., Neil JC., Onions DE.

Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors.

J Virol 2001, 75:8424-33

Hantzopoulos PA., Sullenger BA., Ungers G., Gilboa E.

Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector

Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:3519-3523

Heim R., Cubitt AB., Tsien RY.

Improved green fluorescence

Nature 1995, 373:663-4

Heim R., Tsien RY.

Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer

Current Biology 1996, 6:178-182

Hescheler J., Meyer R., Plant S., Krautwurst D., Rosental W., Schultz G.

Morphological, biochemical and electrophysical characterization of a clonal cell (H9c2) line from Rat Heart

Circulation Research 1991, 69:1476-1486

Hoerr I., Obst R., Rammensee HG., Jung G.

In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies

Eur J Immunol 2000, 30:1-7

Hsieh CL., Chen BF., Wang CC., Liu HH., Chen DS., Hwang LH.

Improved gene expression by a modified bicistronic retroviral vector
Biochem and Biophys Res Commun 1995, Vo. 213 3: 910-917

Hu WS. and Pathak VK.

Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy
Pharmacol Rev 2000, 52:493-511

Hunter E., Swanstrom R.

Retrovirus envelope glycoproteins.
Curr Top Microbiol Immunol 1990, 157:187-253

**Ianni di M., Casciari C., Ciurnelli R., Fulvi A., Bagnis C., Sadelain M.,
Lucheroni F., Mannoni P., Stella CC., Martelli MF., Tabilio A.**

Retroviral transfer of herpes simplex virus-thymidine kinase and beta-galactosidase
genes into U937 cells with biscitronic vector
Leukemia Research, 1997 Vol. 21 10:951-959

Inouye S., Tsuji FI.

Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence
characteristics of the recombinant protein
FEBS Lett 1994, 341:277-80

**Inubushi M., Wu JC., Gambhir SS., Sundaresan G., Satyamurthy N.,
Namavari M., Yee S., Barrio JR., Stout D., Chatziioannou AF., Wu L.,
Schelbert HR.**

Positron-emission tomography reporter gene expression imaging in rat
myocardium
Circulation 2003; 107:326-332

Isner JM.

Myocardial gene therapy
Nature 2002, Vol 415

Jacobs A., Dubrovin M., Hewett J., Sena-Esteves M., Tan CW., Slack M., Sadelain M., Breakefield XO., Tjuvajev JG.

Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: implications for noninvasive imaging of transgene expression
Neoplasia 1999, Vol.1 2: 154-161

Jacobs A., Tjuvajev JG., Dubrovin M., Akhurst T., Balatoni J., Beattie B., Joshi R., Finn R., Larson SM., Herrlinger U., Pechan PA., Chiocca A., Breakefield XO., Blasberg RG.

Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo
Cancer Research, 2001 61: 2983-2995

Jaenisch R., Jahner D., Nobis P., Simon I., Lohler J., Harbers K., Grotkopp D.

Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice
Cell 1981, 24:519-529

Kain SR., Adams M., Kondepudi A., Yang TT., Ward WW., Kitts P.

Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization
Biotechniques 1995, 19:650-5

Kain SR., Ganguly S.

Overview of genetic reporter systems

In: Ausebel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA., Struhl J. (Hrsg.), Current protocols in molecular biology, Volume 2; John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, USA, 2001, 9.6.3-9.6.12

Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Gordon R., Tepper O., Gravereaux E., Pieczek A., Iwaguro H., Hayashi SI., Isner JM., Asahara T.

Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects

Circulation Research 2000, 86:1198-1202

Kandel ES., Chang BD., Schott B., Shtil AA., Gudkov AV., Roninson IB.

Applications of green fluorescent protein as a marker of retroviral vektors

Somat Cell Mol Genet 1997, 23:325-40

Kang KW., Min JJ., Chen X., Gambhir SS.

Comparison of (14C)FMAU, (3H)FEAU, (14C)FIAU, and (3H)PCV for monitoring reporter gene expression of wild type and mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in cell culture

Mol Imaging Biol 2005, 7: 296-303

Kavanaugh MP., Miller DG., Zhang W., Law W., Kozak SL., Kabat D., Miller AD.

Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus und amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters

Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:7071-7075

Kay MA., Manno CS., Ragni MV., Larson PF., Couto LB., Mc Ceilland A., Glader B., Chew AJ., Tai SJ., Herzog RW., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake AW., High KA

Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector.

Nat Genet 2000, 24:257-61

Kim JW., Closs EL., Albritton LM., Cunningham JM.

Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor

Nature 1991, 352:725-728

Kimes BW., Brandt BL.

Properties of a clonal muscle cell line from rat heart

Exp Cell Res 1976, 98:367-381

Koehne G., Doubrovin M., Doubrovina K., Zanzonico P., Gallardo HF., Ivanova A., Balatoni J., Teruya-Feldstein J., Heller G., May C., Ponomarev V., Ruan S., Finn R., Blasberg RG., Bornmann W., Riviere I., Sadelain M., O'Reilly RJ., Larson SM., Tjuvajev JG.

Serial in vivo imaging of the targeted migration of human hsv-tk-transduced antigen-specific lymphocytes

Nature Biotechnology 2003, DOI: 10.1038/nbt805

Kong D., Melo LG., Mangi AA., Zhang L., Lopez-Illasaca M., Perella MA., Liew CC., Pratt RE., Dzau VJ.

Enhanced inhibition of neointimal Hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells

Circulation 2004, 109:1769-1775

Krall W., Kohn DB.

Expression levels by retroviral vectors based upon the N2 and the Mit freundlichen Grüßen backbones
Gene Ther 1996, 3:365

Ledley FD.

Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products
Hum Gen Ther 1995, 6:1129-44

Lewis PF., Emerman M.

Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.
J Virol 1994, 68:510-6

Li Z., Düllmann J., Schiedlmeier B., Schmidt M., Kalle von C., Meyer J., Forster M., Stocking C., Wahlers A., Frank O., Ostertag W., Kühlcke K., Eckert HG., Fehse B., Baum C.

Murine leukemia induced by retroviral gene marking
Science 2002, Vol 296:497

Liu F., Jan MS., Chou CK., Chen PH., Ke NJ.

Is green fluorescent protein toxic to the living cells?
Biochem Biophys Res Commun 1999, 260:712-7

Mann R., Mulligan RC., Baltimore D.

Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus
Cell 1983; 33:153-159

Markowitz DG., Goff SP., Bank A.

Safe and efficient ecotropic and amphotropic packaging lines for use in gene transfer experiments

Trans Assoc Am Physicians 1988;101:212-21

Mastromarino P., Conti C., Goldoni P., Hauttecoeur B. Orsi N.

Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH

J Gene Virol 1987, 68:2359-69

Matukonis M., Li M., Molina RP., Paszkiet B., Kaleko M., Luo T.

Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems

Hum Gene Ther 2002, 13:1293-1303

McMasters RA., Saylor RL., Jones KE., Hendrix ME., Moyer MP., Drake RR.

Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin 43 gap junction formation

Human Gene Therapy 1998, 9:2253-2261

Miller AD., Jolly DJ., Friedmann T., Verma IM.

A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT

Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80:4709-4713

Miller AD., Law FM., Verma IM.

Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene
Molecular and Cellular Biology 1985, 431-437

Miller AD. and Buttimore C.

Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production
Molecular and Cellular Biology 1986, 2895-2902
Improved retroviral vectors for gene transfer and expression
Biotechniques 1989, 7(9):980-990

Miller DG., Adam MA., Miller AD.

Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection
Molecular and Cellular Biology 1990, 4239-4242

Miller AD.

Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer
Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93: 11407-11413

Min JJ., Iyer M., Gambhir SS.

Comparison of (18F)FHBG und (14C)FIAU for imaging of HSV-tk reporter gene expression : adenoviral infection vs. stable transfektion
Eur J Nuc Med Mol Imaging 2003, 30:1547-1560

Miyagawa M., Anton M., Haubner R., Simoes MV., Städele C., Erhardt W., Reder S., Lehner T., Wagner B., Noll S., Noll B., Grote M., Gambhir SS., Gansbacher B., Schwaiger M., Bengel FM.

PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene
J Nuc Med, 2004, 45:1917.1923

Miyagawa M., Anton M., Wagner B., Haubner R., Souvazoglou, Gansbacher B., Schwaiger M., Bengel FM.

Non-invasive imaging of cardiac transgene expression with PET: comparison of the human sodium/iodide symporter gene and HSV1-tk as the reporter gene
Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005, 32: 1108-1114

Naldini L., Blömer U., Gage FH., Trono D., Verma IM.

Efficient transfer, integration and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector
Proc Natl Acad USA, 1996, 93:11382-11388

Ory DS., Neugeboren BA., Mulligan RC.

A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes
Proc Natl Acad Sci USA 93:11400-11406

Ott I., Keller U., Knoedler M., Goetze KS., Doss K., Fischer P., Urlbauer K., Debus G., Bubnoff von N., Rudelius M., Schoemig A., Peschel C., Oostendorp RAJ.

Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction
The FASEB Journal express article 2005; 10.1096/fj.04-3219fje

Pagés JC., Bru T.

Toolbox for retrovectorologists
Journal of gene medicine 2004, 6:67-82

Palú G., Parolin C., Takeuchi Y., Pizzato M.

Progress with retroviral gene vectors
Rev Med Virol 2000, 10:185-202

Pasanen T., Hakkareinen T., Timonen P., Parkkinen J., Tenhunen A., Loimas S., Wahlfors J.

TK-GFP fusion gene virus vectors as tools for studying the features of HSV-TK/ganciclovir cancer gene therapy in vivo
Int J Mol Med 2003, 12(4): 525-31

Paulus W., Baur I., Boyce FM, Breakfield XO, Reeves SA.

Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells
J Virol 1996, 70:62-67

Peichev M., Naiyer AJ., Pereira D., Zhu Z., Lane WJ., Williams M., Oz MC., Hicklin DC., Witte L., Moore MA., Rafii S.

Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors
Blood 2000, 95:952-958

Poeschla EM., Wong-Staal F., Looney DJ.

Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors
Nat Med 1998, 4(3)354-357

Prasher DC., Eckenrode VK., Ward WW., Prendergast FG., Cormier MJ.

Primary structure of the Aequorea Victoria green fluorescent protein.
Gene 1992, 111:229-33

Prats AC., Roy C., Wang PA., Erard M., Housset V, Gabus C., Paoletti C., Darlix JL.

Cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA.
J Virol 1990, 64: 774-83

Raffi S., Lyden D.

Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration

Nature Medicine 2003 Volume 9, Number 6

Riddell SR., Elliott M., Lewinsohn DA., Gilbert MJ., Wilson L., Manley SA., Lupton SD., Overell RW., Reynolds TC., Corey L., Greenberg PD.

T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic t lymphocytes in HIV-infected patients

Nat Med. 1996, 2(2): 216-23

Romano G., Michell P., Pacilio C., Giordano A.

Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications.

Stem Cells 2000, 18:19-39

Rosengart TK., Lee LY., Patel SR., Sanborn TA., Parikh M., Bergman GW., Hachamovitch R., Szulcz M., Kligfield PD., Okin PM., Hahn RT., Derereux RB., Post MR., Hackett NR., Foster T., Grasso TM., Lesser ML., Isom OW., Crystal RG.

Angiogenesis gene therapy:

Phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease

Circulation 1999, 100: 468-474

Roe T., Reynolds TC., Yu G., Brown PO.

Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis

Embo J 1993, 12:2099-108

Rols MP., Del Teil C., Golzio M., Dumond P., Cross S., Teissie J.

In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma.

Nat Biotechnol 1998, 16:168-71

Rubin GM., Spradling AC.

Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.
Science 1982, 218:348-353

Russell DW. And Miller AD.

Foamy virus vectors
J of Virology 1996, 217-222

Scherdin U., Rhodes K., Breindl M.

Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration.
J Virol 1990, 64:907-12

Schmidt M., Zickler P., Hoffmann G., Haas S., Wissler M., Muessig A., Tisdale JF., Kuramoto K., Andrews RG., Wu T., Kiem HP., Dunbar CE., Von Kalle C.

Polyclonal long-term repopulation stem cell clones in a primate model.
Blood 2002, 100:2737-43

Schwantes A., Ortlepp I., Löchelt M.

Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors
Virology 2002, 301:53-63

Shimotohno K., Temin HM.

Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus
Cell 1981, 26(1Pt1):67-77

Shinnick TM., Lerner RA., Sutcliffe JG.

Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus.
Nature 1981, 293:543-8

Sipido KR., Marban E.

L-type calcium channels, potassium channels and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle
Circulation Research, 1991, 69:1487-1499

Soneoka Y., Cannon PM., Ramsdale EE., Griffiths JC., Romano G., Kingsman SM., Kingsmann AJ.

A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors
Nucleic Acids Research, 1995, Vol. 23, No. 4

Southern PJ., Berg P.

Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter
J Mol Appl Genet 1982, 1(4):327-341

Stegemann M., Meyer R., Haas HG., Robert-Nigoud M.

The cell surface of isolated cardiac myocytes: A light microscope study with use of fluorochrome coupled lectins
J Mol Cell Cardiol 1990, 22:787-803

Stocking C., Bergholz U., Friel J., Klingler K., Wagener T., Starke C. Kitamura T., Miyajima A., Ostertag W.

Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line
Growth Factors 1993, 8(3):197-209

Tatum EL.

Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine.
Perspect Biol Med 1966, 10:19-32

Temin H.

The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis
Science 1976, 192:1075-1080

Temin HM.

Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors
Hum Gene Ther 1990, 1(2):111-123

Tjuvajev JG., Stockhammer G., Desai R., Uehara H., Watanabe K., Gansbacher B., Blasberg RG.

Imaging the expression of transfected genes in vivo
Cancer Res. 1995, 55(24):6126-32

Tjuvajev JG., Chen SH., Joshi A., Joshi R., Guo ZS., Balatoni J., Ballon D., Koutcher J., Finn R., Woo SL., Blasberg RG.

Imaging adenoviral-mediated herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression in vivo
Cancer Res 1999, 59:5186-5193

Tjuvajev JG., Doubrovin M., Akhurst T., Cai S., Balatoni J., Alauddin MM., Finn R., Bornmann W., Thaler H., Conti PS., Blasberg RG.

Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression

J Nucl Med 2002, 43: 1072-1083

Trautwein W., Hescheler J.

Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G-proteins

Annu Rev Physiol 1990, 52:257-274

Trobridge GD., Russell DW.

Helper-free foamy virus vectors

Hum Gene Ther 1998, 20; 9(17):2517-25

Tsien RW., Lipscombe D., Madison DV., Bley KR., Fox AP.

Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation

Trends Neurosci 1988, 11:431-437

Urbich C., Dimmeler S.

Endothelial progenitor cells

Characterization and role in vascular biology

Circulation Research 2004, 95:343-353

Verma IM., Somia N.

Gene therapy- promises, problems and prospects

Nature 1997, 389:239-242

Vile RG., Nelson JA., Castleden S., Chong H., Hart IR.

Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component.

Cancer Res 1994, 54:6228-34

Weijtens MEM. Willemsen RA., Hart EH., Bolhuis RLH.

A retroviral vector system `STITCH` in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human t lymphocytes

Gene Therapy 1998, 5:1195-1203

Weiss RA., Boettiger D., Murphy HM.

Pseudotypes of avian sarcoma viruses with the envelope properties of vesicular stomatitis virus

Virology 1977, 76:808-825

Willemsen RA., Debets R., Chames P., Bolhuis RLH.

Genetic engineering of t cell specificity for immunotherapy of cancer

Human Immunology 2003, 64:56-68

Withers-Ward ES., Kitamura Y., Barnes JP., Coffin JM.

Distribution of targets for an avian retrovirus DNA integration in vivo

Genes Dev 1994, 8:1473-87

Wolff JA., Malone RW., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner PL.

Direct gene transfer into mouse muscle in vivo

Science 1990, 247:1465-8

Wu X., Holschen J., Kennedy SC., Ponder KP.

Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression

Hum Gene Ther 1996, 7(2):159-171

Wu JC., Inubushi M., Sundaresan G., Schelbert HR., Gambhir SS.

Optical imaging of cardiac reporter gene expression in living rats

Circulation 2002, 105:1631-1634

Wu JC., Chen IY., Sundaresan G., Min JJ., De A., Qiao JH., Fishbein MC., Gambhir SS.

Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography

Circulation 2003, 108:1302-1305

Wu JC., Chen IY., Wang Y., Tseng JR., Chhabra A., Saled M., Min JJ., Fishbein MC., Crystal R., Gambhir SS.

Molecular imaging of the Kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium

Circulation 2004, 110: 685-691

Xu L., Yee JK., Wolff JA., Friedmann T.

Factors affecting long-term stability of Moloney murine leukemia virus-based vectors

Virology 1989, 171(2):331-341

Yang S., Delgado R., King S., Woffendin C., Barker CS., Yang ZY., Xu L., Nolan GP., Nabel GJ.

Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection

Hum Gene Ther 1999; 10:123-132

Yang NS., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., Mc Cabe D.

In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.

Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87:9568-72

Yee JK., Miyanohara A., LaPorte P., Bouic K., Burns JC., Friedmann T.

A general method for the generation of high titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes

Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91:9564-9568

Zavada J.

Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukemia and of avian myeloblastosis viruses

J Gene Virol 1972, 15:183-192

Zhang G., Gurtu V., Kain SR.

An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells.

Biochem Biophys Res Commun 1996, 227: 707-11

Zhang JH., Wan MX., Yuan JY., Pan BR.

Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplex virus thymidine kinase and cytokine genes expressed in gastric carcinoma cell line SGC7901

World J Gastroenterol 2004, 10(1): 26-30

Zimmer M.

Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior.

Chem Rev 2002, 102: 759-81

Zuffrey R., Nagy D., Mandel RJ., Naldini L., Trono D.

Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.

Nat Biotechnol 1997, 15:871-5

Meiner Familie gewidmet