

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Klinikdirektor: Prof. Dr. Nicolaus Kröger

Forschungsabteilung für Zell - und Gentherapie

Leiter: Prof. Dr. Boris Fehse

RGB-Markierung: Eine neue Methode für die Analyse zellulärer Klone *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Michael Thomaschewski
aus Danzig

Hamburg 2012

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 20.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Daniel Benten

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Judith Dierlamm

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Retrovirale Vektoren	1
1.1.1. Lentiviren.....	2
1.1.2. Lentivirale Vektoren der dritten Generation und die LeGO-Vektor- Plattform	6
1.2. Stabile Zellmarkierung	8
1.2.1. Resistenz-Marker	8
1.2.2. Oberflächen-Marker	9
1.2.3. Fluoreszenz-Marker	10
1.3. Die <i>Brainbow</i>-Maus	14
1.4. Leberzelltransplantation	15
1.4.1. Mechanismus des Engraftments und der Integration transplanteder Hepatozyten	16
1.4.2. Leberzelltransplantation als mögliches Verfahren zur Behandlung von Lebererkrankungen.....	16
1.4.3. Das uPA-Mausmodell	19
1.5. Klonalität von Tumoren	20
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Zellkultur	24
3.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.1.3. Zellmaterial.....	25
3.1.3.1. HEK 293T-Zellen	25
3.1.3.2. Immortalisierte humane fetale Hepatozyten (FH-hTERT)	25
3.1.3.3. BON-Zellen	26
3.2. Herstellung infektiöser lentiviraler Vektoren	26
3.2.1. Verwendete Vektorplasmide	26
3.2.2. Helferplasmide für die Virusproduktion	27
3.2.3. Ansetzen des Präzipitationspuffers und der Kalziumchloridlösung	27
3.2.4. Transfektion von HEK 293T-Zellen	27
3.2.5. Titerbestimmung des vektorhaltigen Überstandes	28
3.3. Versuchstiere	29

3.4. Hepatozytenisolierung und Transduktion	29
3.4.1. Erstellen der Stammlösungen	29
3.4.2. Zusammensetzung der Perfusionslösungen	30
3.4.3. <i>In situ</i> -Perfusion	30
3.4.4. Transduktion primärer Hepatozyten für die Kultivierung <i>in vitro</i>	32
3.4.5. Transduktion primärer Hepatozyten für die Transplantation.....	32
3.5. Transplantation von Zellen in die Leber	33
3.5.1. Transplantation von BON-Zellen in NOD/SCID-Mäuse.....	34
3.5.2. Transplantation von FH-hTERT in uPA/SCID-Mäuse	34
3.5.3. Transplantation primärer Hepatozyten in uPA/SCID-Mäuse	35
3.6. Histologie der Leber	36
3.6.1. Fixierung der Leber	36
3.6.2. Anfertigung von histologischen Schnitten am Kryotom	36
3.6.3. Fluoreszenz-Histologie.....	36
3.6.4. Immunhistochemische Peroxidasefärbung	36
3.7. Molekularbiologische Methoden	38
3.7.1. DNA-Isolierung.....	38
3.7.2. LM-PCR	38
3.7.2.1. Restriktionsverdau der genomischen DNA	40
3.7.2.2. Primer-Extension-Reaktion	40
3.7.2.3. Ligation	42
3.7.2.4. PCR	42
3.7.3. Nachweis spezifischer Integrationsstellen mit der verschachtelten (<i>nested</i>)-PCR	44
3.8. Durchflusszytometrie	45
3.9. Mikroskopie	45
3.9.1. Fluoreszenzmikroskopie	45
3.9.2. Konfokalmikroskopie	46
3.10. Magnetresonanztomografie (MRT)	46
4. Ergebnisse	47
4.1. RGB-Markierung: Eine neue Methode fluoreszenzbasierter Zellmarkierung	47
4.2. Produktion lentiviraler Partikel für die RGB-Markierung	48
4.3. Kalkulation der Transduktionseffizienz für die RGB-Markierung	49
4.4. RGB-Markierung in der Zellkultur	53
4.5. Klonale Zusammensetzung der Leberregeneration durch transplantierte primäre Hepatozyten	56
4.5.1. Isolation und Transduktion primärer Hepatozyten.....	56

4.5.2.	Transplantation und Regeneration: RGB-markierte primäre murine Hepatozyten in heterozygoten uPA/SCID-Mäusen.....	58
4.5.3.	Transplantation und Regeneration: RGB-markierte primäre humane Hepatozyten in homozygoten uPA/SCID-Mäusen.....	61
4.6.	Transplantation RGB-markierter FH-hTERT	63
4.6.1.	Transplantation und Repopulation: FH-hTERT in heterozygoten uPA/SCID-Mäusen	63
4.6.2.	Identifikation eines Tumors vier Monate nach der Transplantation	64
4.6.3.	Ermittlung der Klonalität des Tumors mit molekularbiologischen Methoden	66
4.7.	Klonales Tumorwachstum RGB-markierter BON-Tumorzellen	69
4.7.1.	Klonalität der BON-Tumoren in NOD/SCID-Mäusen.....	69
4.7.2.	Stabilität der RGB-Markierung	71
4.7.2.1.	Verfolgung eines Klons von der Einzelzelle <i>in vitro</i> bis zum Tumor in der Maus.....	71
4.7.2.2.	Serielle Transplantation von RGB-markierten BON-Zellen	75
5.	Diskussion.....	79
5.1.	RGB-Markierung: Eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung.....	79
5.2.	RGB-Markierung <i>in vitro</i>.....	81
5.3.	RGB-Markierung: Beurteilung der klonalen Zusammensetzung der Repopulation und Regeneration einer geschädigten Leber.....	82
5.3.1.	RGB-Markierung primärer Leberzellen	83
5.3.2.	Leberregeneration einer heterozygoten uPA/SCID-Maus	83
5.3.3.	Leberregeneration einer homozygoten uPA/SCID-Maus	84
5.3.4.	Vergleich der Leberregeneration.....	84
5.4.	Transplantation RGB-markierter FH-hTERT in die Leber	86
5.4.1.	Entstehung eines Tumors durch RGB-markierte FH-hTERT	87
5.4.2.	Beurteilung der Klonalität des Tumors durch molekularbiologische Methoden	89
5.5.	RGB-Markierung: Analysen zum klonalen Ursprung von Tumoren	89
5.5.1.	Farbstabilität der RGB-Markierung bei RGB-markierten BON-Tumorzellen.....	90
5.6.	Technische Voraussetzungen.....	93
5.7.	Fazit	93
6.	Zusammenfassung	95
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	96

8. Literaturverzeichnis	98
9. Publikationen	108
10. Danksagung	109
11. Eidesstattliche Erklärung	110

1. Einleitung

1.1. Retrovirale Vektoren

Nachdem Retroviren vor etwa 100 Jahren erstmals indirekt beschrieben worden sind (Rous 1911), wurden sie 70 Jahre später zum ersten Mal für den Transfer genetischen Materials in Zellen genutzt (Wei et al. 1981, Sorge et al. 1984, Ostertag et al. 1986). Retrovirale Vektoren ermöglichen eine dauerhafte Modifikation der Zelle und all ihrer Tochterzellen und machen sie auch heute zu einem wertvollen Werkzeug der biomedizinischen Forschung (Dunbar und Emmons 1994, Baum et al. 1995, Wiznerowicz und Trono 2005, Weber 2010).

Bei Retroviren handelt es sich um umhüllte Viren, deren Erbinformation als RNA vorliegt. Sie können ihr RNA-Genom durch die reverse Transkriptase in DNA umschreiben und anschließend mit Hilfe der Integrase stabil in das Genom einer Wirtszelle integrieren.

Die Familie der Retroviren wird in sieben Gattungen eingeteilt: die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren, die Lentiviren und die Spumaviren (Modrow et al. 2003).

Die ersten retroviralen Vektoren wurden aus γ -Retroviren der Maus entwickelt (Wei et al. 1981). Dabei konnte man sich den Umstand zunutze machen, dass unterschiedliche Mausretroviren durch die Nutzung spezifischer Envelop- bzw. Hüllproteine natürlicherweise verschiedene Zielzellen infizieren können. Nach ihrem Tropismus wurden die Retroviren (und abgeleitete Vektoren) in ökotrope (ecotrope) Viren, welche nur murine Zellen infizieren können, amphotrope Viren, welche sowohl murine als auch nicht-murine (inkl. humaner) Zellen infizieren können, und xenotrope Viren, die ausschließlich nicht-murine Wirtszellen infizieren können, unterschieden (Ganten und Ruckpaul 2001). Durch eine Pseudotypisierung der viralen Vektoren mit Glykoproteinen anderer Retroviren (z.B. Gibbon Ape Leukemia Virus, Bunnell et al. 1997) oder sogar anderer RNA-Viren wie dem *Vesikular-Stomatitis Virus* (VSV-G) konnte der Tropismus der viralen Vektoren zusätzlich erweitert werden, wodurch auch eine Infektion solcher Zellen möglich ist, die den entsprechenden spezifischen Rezeptor für die o.g. Maus-Retroviren nicht oder nicht ausreichend exprimieren (Burns et al. 1993, von Kalle et al. 1994). γ -Retroviren und deren abgeleitete Vektoren benötigen für die Integration in das Wirtsgenom einer Zelle eine Auflösung der Kernmembran, die physiologisch nur während der Mitose gegeben ist (Roe et al. 1993). Daher können nur proliferierende Zellen mit diesen Vektoren transduziert werden, was die Anwendung γ -retroviraler Vektoren einschränkt (Miller et al. 1990).

Nach der Entdeckung des humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) im Jahre 1983 (Barré-Sinoussi et al. 1983) wurde 8 Jahre später ein vom HIV-1 abgeleiteter Vektor für den Gentransfer entwickelt (Poznanski et al. 1991). HIV-1 gehört zu der Gruppe der Lentiviren.

Diese Viren und deren abgeleitete Vektoren erlauben im Vergleich zu γ -Retroviren auch die Transduktion nicht proliferierender Zellen und erweitern somit die Anwendungsgebiete retroviralen Gentransfers (Naldini et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit werden die HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren vereinfacht als lentivirale Vektoren bezeichnet.

1.1.1. Lentiviren

Lentivirale Partikel haben einen Durchmesser von etwa 100 bis 120 nm. Im Aufbau unterscheiden sich lentivirale Partikel nicht groß von anderen Retroviren (Abbildung 1). Die Partikel sind von einer Lipidmembran umhüllt, in der die viralen Hüllproteine (Glykoproteine) verankert sind. Diese sind bei der Infektion einer Zelle für die Rezeptorbindung verantwortlich. Innen an die Membran angelagert befindet sich das Matrixprotein. Die Kapsidproteine bilden ein konisches Kapsid im Innern des viralen Partikels. In dem Kapsid befindet sich das Genom, welches in Form von zwei identischen Kopien eines RNA-Einzelstranges in Plusorientierung vorliegt. Der RNA-Einzelstrang ist etwa 9 Kilobasen (kb) lang und besitzt eine 5'-Cap-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung. Das virale Genom weist damit die typischen Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Im Partikel befinden sich die viralen Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und Protease sowie weitere akzessorische virale Proteine. Zudem wird eine an die genomische RNA assoziierte tRNA als Primer für die reverse Transkriptase mitgeführt (Stevenson 2002, Modrow et al. 2003, Weber 2010).

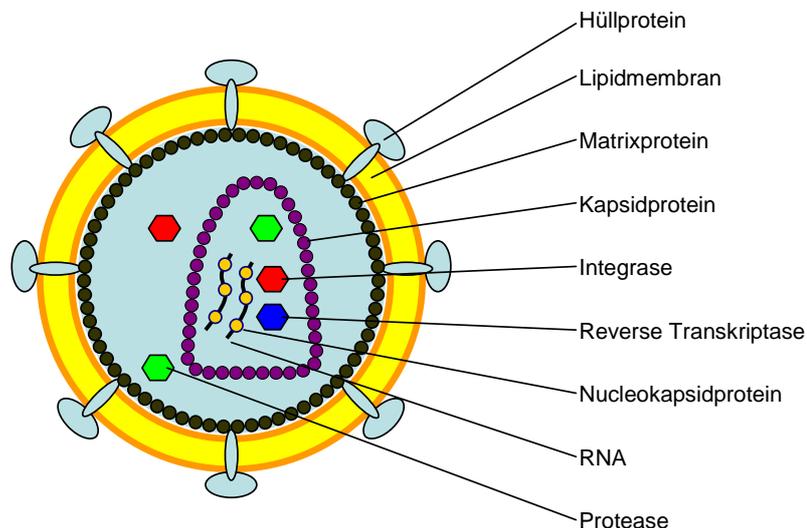
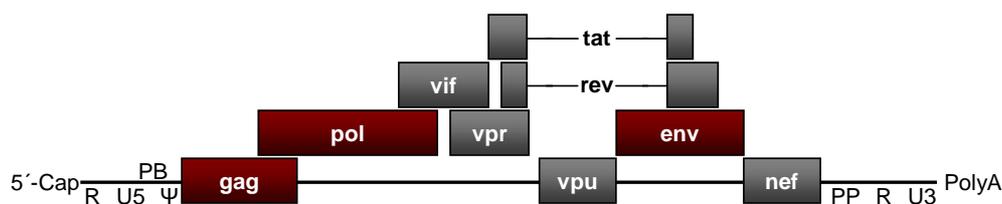


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Lentivirus-Partikels.

Bei Lentiviren handelt es sich um RNA Viren mit einem Einzel(+)Strang-Genom. Das Genom ist zusammen mit den viralen Enzymen im Kapsid verpackt, welches von einer Doppellipidmembran umhüllt ist (nach Modrow et al. 2003).

Das lentivirale Genom enthält - wie das Genom aller infektiösen Retroviren - Gene für die Polyproteine *gag* und *pol* sowie für das Hüllprotein *env* (Abbildung 2). Aus dem Polyprotein *gag* (gruppenspezifische Antigene) entstehen nach Spaltung durch die virale Protease die Matrix-, Kapsid- und Linkproteine, die für die Verpackung der viralen RNA wichtig sind. Das Polyprotein *pol* (*Polymerase*) bildet die viralen Enzyme Protease, reverse Transkriptase und Integrase. Die reverse Transkriptase und Integrase katalysieren den Einbau der viralen RNA ins Genom der Wirtszelle (siehe unten). Die Protease spaltet die translatierten Polyproteine *gag* und *pol* in ihre funktionellen Einheiten. *Env* (*Envelope*) sind die viralen Glykoproteine, die in der Lipidmembran des viralen Partikels verankert werden. Sie sind unter anderem entscheidend für die rezeptorvermittelte Bindung des viralen Partikels an eine Zielzelle. Lentiviren - wie auch Spuma- und δ -Retroviren - besitzen zusätzliche Gene, die für akzessorische und regulatorische Proteine kodieren (Stevensen 2002, Modrow et al. 2003). Sie werden durch alternatives Spleißen gebildet.



Gen	Protein
<i>gag</i>	<i>gag</i> ; Strukturproteine (Matrix-, Kapsid-, Nucleokapsid- und Linkprotein)
<i>pol</i>	<i>pol</i> ; Enzyme (Protease, reverse Transkriptase mit RNase H-Funktionalität, Integrase)
<i>env</i>	<i>env</i> ; Membranproteine (Polyprotein, externes Glykoprotein, transmembranes Glykoprotein)
<i>rev</i>	<i>rev</i> ; posttranskriptioneller Transaktivator
<i>tat</i>	<i>tat</i> ; Transaktivator der Transkription
<i>vif</i>	<i>vif</i> ; Virion Infektiösitätsfaktor
<i>vpr</i>	<i>vpr</i> ; Virion-assoziiertes Protein R
<i>vpu</i>	<i>vpu</i> ; Virales Protein U
<i>nef</i>	<i>nef</i> ; Nef-Protein (negative factor)

Akzessorische Proteine

Abbildung 2: Genomorganisation von HIV-1. Das Genom der Lentiviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit einer 5'-Cap-Struktur und einem 3'-Poly-A-Schwanz. Die R-Region schließt sich an die Cap-Struktur an und liegt auch in identischer Basenfolge und Orientierung am 3'-Ende des RNA-Genoms vor. Die U5-Region (U = *unique*) enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus ins Zellgenom wichtig sind. An die PB-Region (*primer binding*) ist regelmäßig eine tRNA als Primer für die reverse Transkriptase gebunden. Ψ ist das Verpackungssignal, worüber das RNA-Genom bei der Partikelbildung an die Nucleokapsidproteine bindet. Der Polypurintrakt (PP) ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription wichtig. Dem Polypurintrakt folgt die U3-Region, die analog zu der U5-Region für die Integration des Provirus wichtig ist. Zusätzlich enthält die Sequenz Enhancer-/Promotor-Elemente sowie regulatorische Elemente für die virale Transkription und Genexpression (nach Modrow et al. 2003).

Die Infektion einer Zielzelle mit einem lentiviralen Partikel und die anschließende Produktion neuer Partikel erfolgt in acht Schritten (Abbildung 3) (Modrow et al. 2003, Weber 2010): Zunächst bindet das Virus rezeptorvermittelt an die Zielzelle (1). Mit Hilfe des Hüllproteins *env* des Virus fusioniert die virale Membran mit der zellulären Membran und das Kapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt (2). Das Kapsid wird durch zelluläre Aktinfilamente und Mikrotubuli zur Kernpore transportiert (Arhel et al. 2007). Währenddessen wird bereits das RNA-Genom des Virus mit Hilfe der reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben (3). Am zentralen Polypurintrakt (cPPT) wird bei der reversen Transkription des RNA-Genoms ein Abschnitt mit dreisträngiger DNA gebildet (*flap*), der für den Kernimport der viralen DNA wichtig ist (Arhel et al. 2007). Die virale DNA wird aus dem Kapsid durch eine Kernpore in den Zellkern transportiert und durch die Integrase in das Genom der Zelle eingebaut (4). Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet. An den beiden Enden des Provirus befinden sich lange endständige Sequenzwiederholungen (LTR, engl. *long terminal repeat*), die am 5'-Ende des Provirus als 5'-LTR und am 3'-Ende als 3'-LTR bezeichnet werden. Diese Sequenzen enthalten Promotor/Enhancer-Elemente und ein Polyadenylierungssignal. Vom Provirus werden virale Gene als ungespleißte, einfach gespleißte und mehrfach gespleißte RNA transkribiert (5). Die viralen *rev*-Proteine, welche im Zellkern angereichert werden, steigern durch die Bindung an das *rev*-responsible Element (RRE) den Kernexport der transkribierten viralen RNA (Stevenson 2002, Modrow et al. 2003). Außer dem Hüllprotein *env*, das an der Membran des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert wird und in der Zellmembran verankert ist, werden alle anderen viralen Proteine an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert (6).

Gag und *pol* werden als Polyproteine bzw. Vorläuferproteine von ungespleißter RNA translatiert. Durch einen aminoterminal myristylierten Abschnitt werden die Proteine von innen in die Zellmembran eingelagert (7). An der Zellmembran findet dann die Partikelbildung statt: Die ungespleißte RNA, von der auch *gag* und *pol* translatiert werden, besitzt das vollständige virale Genom und damit auch das Verpackungssignal (Ψ , engl. *packaging signal*). Mit Hilfe dieses Signals kann das virale Genom an die Nucleokapsidproteine binden, wodurch sichergestellt wird, dass nur die ungespleißte vollständige virale RNA verpackt wird. Die Zellmembran schnürt sich - zusammen mit den angelagerten viralen Proteinen - nach Bindung der viralen RNA ab und bildet die Lipidmembran des noch unreifen Viruspartikels. Innerhalb des unreifen Partikels werden dann die Polyproteine durch die virale Protease in ihre funktionellen Komponenten gespalten (Matrixproteine, Kapsidproteine, reverse Transkriptase und Integrase) (Stevenson 2002, Klein et al. 2007, Ganser-Pornillos et al. 2008, Bieniasz 2009). Die Kapsidproteine lagern sich anschließend zu einem konischen Kapsid zusammen. Erst nach diesem Reifungsprozess ist der Partikel infektiös (8).

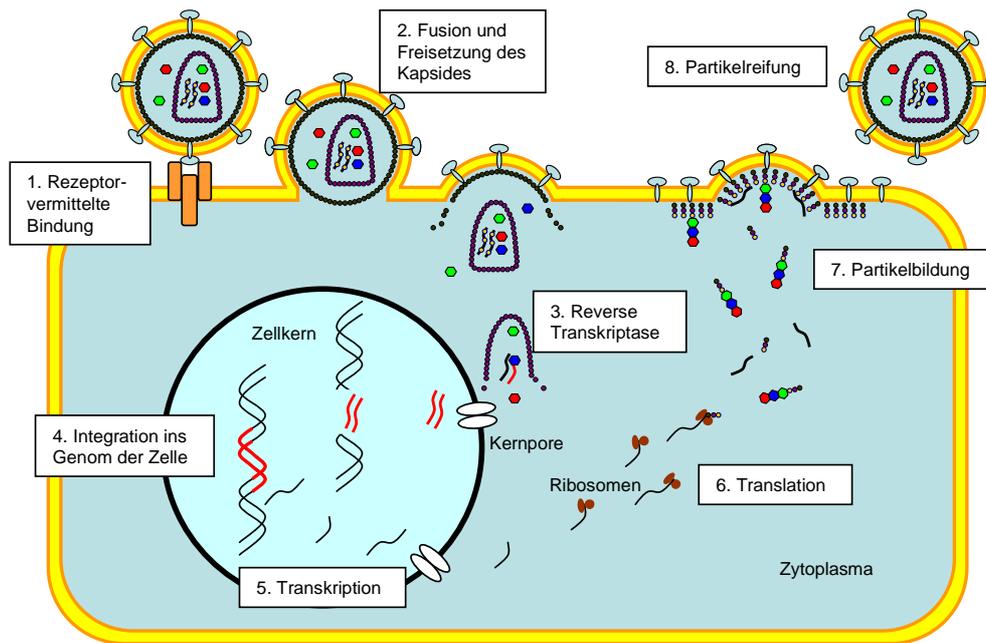


Abbildung 3: Lebenszyklus von Lentiviren (nicht maßstabsgetreu). Die genannten einzelnen Schritte sind ausführlich im Text beschrieben (nach Stevens 2002, Weber 2010).

Die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms läuft bei allen Retroviren gleich ab (Abbildung 4). Ausgehend von dem im Zellgenom integrierten Provirus wird das RNA-Genom des Virus über den Promotor im U3-Bereich des 5'-LTR ab dem R-Bereich transkribiert. In der 3'-LTR am Übergang vom R- zum U5-Bereich erfolgt die Polyadenylierung der transkribierten RNA. Bei der Transkription gehen der U3-Bereich im 5'-LTR und der U5-Bereich im 3'-LTR verloren. Nach der Infektion einer neuen Zielzelle werden die LTRs durch die reverse Transkription wieder vervollständigt, was für die Generierung neuer Viruspartikel notwendig ist (Abbildung 4). Da die reverse Transkriptase keine Korrekturlese-Fähigkeit besitzt, ist der Prozess relativ ungenau, wodurch häufig Mutationen innerhalb des Genoms auftreten. Dies ermöglicht eine schnelle Anpassung des Virus gegenüber antiviralen Medikamenten und fördert die Ausbildung von Resistenzen.

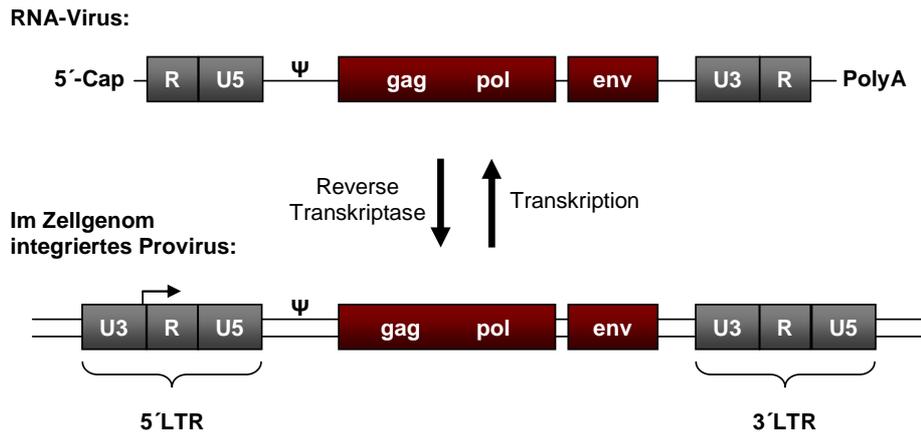


Abbildung 4: Umschreiben des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA durch die reverse Transkriptase und Transkription des RNA-Genoms vom integrierten Provirus (nicht maßstabsgetreu). Bei der reversen Transkription des RNA-Genoms gelangt der U3-Bereich in die 5'-LTR. Nach der Integration kann über Enhancer-/Promotor-Elemente in der U3-Region virale RNA transkribiert werden. Der gewinkelte Pfeil im U3-Bereich des integrierten Provirus gibt den Transkriptionsstart für die virale RNA an (nach Stevenson 2002, Modrow et al. 2003).

1.1.2. Lentivirale Vektoren der dritten Generation und die LeGO-Vektor-Plattform

Folgende grundsätzliche Anforderungen werden an moderne Vektorsysteme gestellt: (1) eine hohe Verpackungskapazität für die Einführung neuer Sequenzen, (2) eine hohe Effizienz in der Virusherstellung und Transduktion von Zielzellen sowie (3) eine hohe Sicherheit in der Handhabung.

Bei der Entwicklung lentiviraler Vektoren wird zunächst das Wildtyp-Provirus in ein Plasmid eingesetzt. Anschließend werden möglichst große Sequenzabschnitte des viralen Genoms entfernt, um Platz zur Einführung neuer Sequenzen zu schaffen (cDNA, Markergene, shRNA) und das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Partikel (durch Rekombination) zu minimieren. Moderne lentivirale Vektoren, wie der *pLentiLox 3.7*, kodieren für kein einziges virales Protein mehr und besitzen somit Platz für die Einführung neuer fremder Sequenzen (Rubinson et al. 2003). Sie enthalten lediglich *cis*-aktive Elemente für die Verpackung des viralen Genoms sowie für dessen reverse Transkription und Integration (Dull et al. 1998).

Für die Produktion lentiviraler Partikel sind jedoch die Proteine *gag*, *pol*, *rev* und *env* erforderlich. Sie werden bei der Vektorproduktion von zusätzlichen Helferplasmiden exprimiert (Dull et al. 1998, Pauwels et al. 2009). Das Hüllprotein *env* kann dabei je nach gewünschtem Tropismus von HIV-1 oder anderen Viren (Pseudotypisierung, s.o.) stammen (Hanawa et al. 2002, Frecha et al. 2009). Die Helferplasmide besitzen im Gegensatz zum Vektorplasmid kein Verpackungssignal (ψ) und können folglich keine verpackungsfähigen RNA-Genome bilden. Die Sequenzinformationen zur Produktion viraler Proteine gelangen

daher nicht in das Viruspartikel, wodurch dieses - nach einer Infektion - keine weiteren Partikel bilden kann. Folglich entstehen bei der Vektorproduktion keine replikationskompetenten viralen Partikel.

Durch Kotransfektion von Verpackungszellen mit dem Vektorplasmid und den Helferplasmiden erfolgt die Produktion lentiviraler Partikel (siehe Kapitel 3.2.). Der Vektor mit dem Transgen wird vom Vektorplasmid transkribiert. Die Proteine, die für die Verpackung des lentiviralen Vektors (*gag*), die Bindung des Partikels an eine Zielzelle (*env*) und die Integration des Vektors ins Genom (*pol*) notwendig sind, werden von den Helferplasmiden exprimiert (Bereitstellung in *trans*). Alternativ können die viralen Proteine auch permanent von Verpackungszelllinien exprimiert werden (Strang et al. 2004).

Auf diese Weise besitzen die resultierenden Vektoren eine Verpackungskapazität von etwa 9 kb fremder DNA (Zufferey et al. 1998). Es ist sogar möglich, mehr als 15 kb fremde DNA in lentivirale Vektoren zu verpacken und zu transportieren, wobei in diesen Fällen die Effizienz der Virusproduktion (Titer) deutlich reduziert ist (Kumar et al. 2001).

Um die Sicherheit der Vektoren weiter zu erhöhen, wurden die Enhancer-/Promotor-Sequenzen in der 3'-LTR entfernt. Dadurch fehlt den Vektoren nach reverser Transkription und Integration in das Genom der Zielzelle die Enhancer-/Promotor-Sequenz in der 5'-LTR. Diese Vektoren werden selbst-inaktivierende (SIN)-Vektoren genannt. Auf diese Weise können keine verpackungsfähigen Transkripte mehr von der 5'-LTR aus initiiert werden (Logan et al. 2004). Durch die Reduktion der Enhancer-/Promotor-Elemente in den SIN-Vektoren wird auch die Wahrscheinlichkeit der Transaktivierung benachbarter Gene reduziert. Bei den SIN-Vektoren erfolgt die Expression des Transgens durch einen internen Promotor, der je nach gewünschter Expressionsstärke und Zellspezifität frei gewählt werden kann. Der *pLentiLox 3.7* enthält zum Beispiel einen internen Zytomegalie-Virus (CMV)-Promotor (Rubinson et al. 2003).

Die Expressionsstärke und auch die Effizienz der Virusproduktion konnten zusätzlich durch das Hinzufügen des Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionell-regulatorischen Elements (wPRE) in den 3'-untranslatierten Bereich vor der 3'-LTR erhöht werden (Schambach et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden „*Lentiviral Gene Ontology*“ (LeGO)-Vektoren als Gentransfervektoren verwendet (Weber et al. 2008, Weber et al. 2010). Die LeGO-Vektoren sind auf der Basis des HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektors der dritten Generation *pLentiLox 3.7* entwickelt worden (Rubinson et al. 2003). Anstatt des internen CMV-Promotors im *pLentiLox 3.7* wird beim LeGO-Vektorsystem ein *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV)-Promotor verwendet, der in vielen Zellen eine stärkere Expression des Transgens ermöglicht (Weber et al. 2008). Auf Basis dieses Vektors wurden viele verschiedene

Vektoren entwickelt, die je nach Anwendung ausgewählt werden können und zudem durch das entwickelte „Baustein-Prinzip“ in ihren einzelnen Elementen variabel sind: Mit Hilfe der entwickelten Markierungsvektoren, die verschiedene Fluoreszenzproteine als Transgen exprimieren, können Zellen stabil markiert werden. Zudem wurden Vektoren entwickelt, die eine kombinierte Expression eines Markergens und einer zu untersuchenden cDNA ermöglichen. Durch eine hinzugefügte *Multiple Cloning Site*, die Erkennungssequenzen für viele verschiedene bakterielle Restriktionsenzyme besitzt, können mit wenig Aufwand verschiedene cDNAs in die Vektoren kloniert werden. Zusätzlich kann eine shRNA in die Vektoren eingeführt werden, um die Expression eines Gens herunterzuregulieren (*knock-down*). Das LeGO-Vektorsystem erlaubt eine effiziente Virusproduktion mit hohen Titern und eine effiziente Transduktion verschiedener Zellen. Neben Zelllinien können auch primäre Zellen, wie hämatopoetische Stammzellen, Nervenzellen und Leberzellen, effizient mit den LeGO-Vektoren infiziert werden (Weber et al. 2008, Weber et al. 2010).

Die stabile Markierung von Zellen stellt ein interessantes Anwendungsgebiet der LeGO-Vektoren dar. Durch eine stabile Zellmarkierung können zu untersuchende Zellen und deren Nachkommen über einen langen Zeitraum *in vitro* und *in vivo* verfolgt werden, wodurch neue Erkenntnisse über Regenerationsprozesse und die Entstehung maligner Tumore gewonnen werden können (Barese et al. 2011). Im folgenden Kapitel wird die stabile Zellmarkierung als eines der möglichen Anwendungsgebiete retroviralen Gentransfers näher vorgestellt.

1.2. Stabile Zellmarkierung

In vielen experimentellen Zell- und Tierversuchen werden verschiedene Methoden zur Zellmarkierung genutzt, um Zellen identifizieren und verfolgen zu können und damit Aufschluss über biologische Mechanismen zu bekommen. Eine oft genutzte Methode für die Zellmarkierung ist das Einbringen eines leicht identifizierbaren Markers durch Gentransfer. Für die Markierung werden vor allem drei verschiedene Marker-Typen verwendet: Resistenz-Marker, Oberflächen-Marker und Fluoreszenz-Marker (Fehse et al. 1998, Weber 2010). Diese Typen werden im Folgenden näher betrachtet.

1.2.1. Resistenz-Marker

Resistenz-Marker kodieren für ein bestimmtes Protein, das die Wirkung eines Zytostatikums inhibiert. Auf diese Weise können Zellen, die das Resistenzgen tragen, durch die Gabe des entsprechenden Zytostatikums selektiert werden, während Zellen, die kein Resistenzgen exprimieren bzw. nicht transduziert worden sind, absterben. Bei einem ineffizienten Gentransfer kann so mit geringem Aufwand durch Selektion eine reine Kultur transduzierter Zellen hergestellt werden, was einen großen Vorteil von Resistenz-Marker darstellt. Der

Gentransfer kann zudem bewusst niedrig dosiert werden, um die Zellen zu schonen oder um möglichst geringe Vektorkopien pro Zelle zu erhalten (Kustikova et al. 2003, Fehse et al. 2004). Ein weiterer Vorteil ist, dass die Selektion der markierten Zellen ohne apparativen Aufwand erfolgt und daher die Kontaminationsgefahr sehr gering ist. Ein Nachteil dieser Markergene ist ihre relativ hohe Immunogenität, was eine Anwendung des Markers in immunkompetenten Tieren einschränkt. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Selektion wenige Tage bis 2 Wochen dauert. Einige Primärzellen wie Hepatozyten (Giannini et al. 2003) oder hämatopoetische Stammzellen (Müller et al. 2008) können jedoch nur für kurze Zeit *in vitro* kultiviert werden. Zudem ist der Marker nicht direkt im Durchflusszytometer (FACS) und Mikroskopen sichtbar, so dass der Anteil genetisch-modifizierter Zellen nicht einfach zu quantifizieren ist. Auf Grund dessen kann nicht ohne weiteres überprüft werden, ob die Selektion vollständig abgelaufen ist und die Kultur ausschließlich aus genmodifizierten Zellen besteht. Zudem muss die Konzentration des Zytostatikums sorgfältig gewählt werden, um einerseits die Zellen effektiv zu selektionieren und andererseits nicht die resistenztragenen Zellen durch zu hohe Dosen zu töten (Kimura et al. 1994).

1.2.2. Oberflächen-Marker

Bei diesem Marker-Typ werden Proteine verwendet, die in der Zellmembran und auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Grundsätzlich können alle Oberflächenproteine verwendet werden, wobei das Oberflächenprotein nicht schon vorher auf den Zellen vorkommen sollte. Bei einer Markierung mit physiologisch im Organismus vorkommenden Oberflächenproteinen ist eine mögliche Immunreaktion auf das Markergen gering oder überhaupt nicht vorhanden (Fehse et al. 1998). Aus praktischen Gründen sollten hierbei Marker verwendet werden, die physiologisch nur in sehr wenigen Zellen exprimiert werden, da sonst eine Trennung genmodifizierter Zellen und physiologischer Zellen erschwert wird (Fehse et al. 1998).

Die genmodifizierten Zellen können mit spezifischen Antikörpern, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops oder eines Durchflusszytometers identifiziert werden. Der Anteil genmodifizierter Zellen kann so mit vergleichbar geringem Aufwand quantifiziert werden.

Die genmodifizierten Zellen können zudem mit Hilfe eines FACS (= *fluorescence activated cell sorting*) oder einer magnetischen Zellsortierung (MACS = *magnetic cell sorting*) angereichert werden (Fehse et al. 1998). Dabei dauert die Anreicherung - anders als bei der Verwendung von Resistenzmarkern - hier nur wenige Minuten bis Stunden.

Bei der Verwendung von Oberflächenproteinen als Marker muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Markerproteine nicht den Phänotyp der Zelle verändern, da viele Oberflächenproteine in Signaltransduktionswege der Zellen eingreifen oder das

Migrationsverhalten beeinflussen (Lange et al. 2007, Treschow et al. 2007). Um das Problem zu umgehen, kann eine trunkierte Form des Oberflächenproteins, die keine zytoplasmatische Domäne für die Signaltransduktion besitzt, verwendet werden. Beispiele hierfür sind trunkierte Formen der humanen Oberflächenantigene *low-affinity growth factor receptor* (Δ LNGBFR) oder CD34 (tCD34), die für die Markierung humaner T-Zellen entwickelt worden sind (Mavilio et al. 1994, Fehse et al. 2000). Auf Grund der genannten Vorteile wurden Oberflächenproteine bereits in klinischen Studien als Marker verwendet (Bonini et al. 1997).

1.2.3. Fluoreszenz-Marker

In vielen Zellkulturanwendungen und Tierversuchen haben sich Fluoreszenzproteine als Markertyp durchgesetzt. Zellen, die Fluoreszenzproteine als Marker exprimieren, können durch ein Mikroskop oder ein Durchflusszytometer schnell und eindeutig identifiziert werden. Im Vergleich zu Resistenz- und Oberflächenmarkern, die Zytostatika und Antikörper für eine Markierung bzw. Identifikation benötigen, sind bei der Markierung mit Fluoreszenzproteinen keine weiteren Substanzen notwendig.

Da die gebräuchlichsten Fluoreszenzproteine aus Quallen und Korallen stammen, werden die Proteine vom Immunsystem jedoch als fremd erkannt. Alle Zellen, die ein Fluoreszenzprotein exprimieren, werden durch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort abgetötet. Daher können Fluoreszenzproteine in immunkompetenten Tiermodellen nur eingeschränkt genutzt werden.

Fluoreszenzproteine können jedoch auch, vor allem wenn sie permanent exprimiert werden, in Stoffwechselwege der Zelle eingreifen und damit den Phänotyp und das Verhalten der Zelle beeinflussen (Baens et al. 2006, Strack et al. 2008). Zudem ist die Analyse von Antigenen mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, die ein ähnliches Emissionsspektrum wie das Markerprotein besitzen, erschwert, da die Fluoreszenz in der Zelle nicht ohne weiteres abschaltbar ist. In diesem Fall müssen andere Fluoreszenzfarben verwendet werden.

Trotz dieser Nachteile wurden Fluoreszenzproteine in vielen Zellkulturanwendungen und Tierversuchen erfolgreich eingesetzt und ermöglichten den Aufschluss vieler zuvor unbekannter biologischer Mechanismen. Die Verleihung des Nobelpreises 2008 an Martin Chalfie, Osamu Shimomura und Roger Y. Tsien für die Entdeckung und Erforschung des ersten Fluoreszenzproteins zeigt, wie bedeutend Fluoreszenzproteine für die Forschung sind. Das Funktionsprinzip von Fluoreszenzproteinen wurde in den Jahren nach ihrer Entdeckung detailliert aufgeklärt (Chalfie et al. 1994, Tsien 1998, Shaner et al. 2004, Shaner et al. 2007). Heutzutage sind verschiedene Fluoreszenzproteine kommerziell erhältlich. Dabei unterscheiden sich die Proteine nicht nur in ihrem Emissionsspektrum bzw.

Emissionsmaximum, sondern auch in ihrer optimalen Anregungswellenlänge (Excitationsmaximum), ihrer Helligkeit und Photostabilität. Die gebräuchlichsten und bezüglich der Expression und Toxizität am besten charakterisierten Fluoreszenzproteine sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Spektrale Eigenschaften der besten Fluoreszenzproteine (nach Shaner et al. 2005, Shaner et al. 2007)

Klasse	Protein	Excitation (nm) ¹	Emission (nm) ²	Helligkeit ³	Photo-stabilität ⁴
Far-red	mPlum	590	649	4,1	53
	mKate	588	635	15	166
Red	mCherry	587	610	16	96
	J-Red	584	610	8,8	13
	mRFP1	584	607	12,5	8,7
	mStrawberry	574	596	26	15
	DsRed-monomer	556	586	3,5	16
	TagRFP	555	584	48	37
Orange	tdTomato	554	581	95	98
	mOrange	548	562	49	9
	mKO	548	559	31	122
Yellow-green	YPet	517	530	80	49
	mCitrine	516	529	59	49
	Venus	515	528	53	15
	EYFP	514	527	51	60
Green	sfGFP	485	510	54	157
	Emerald	487	509	39	0,69
	EGFP	488	507	34	174
	mTFP1	462	492	54	110
Cyan	CyPet	435	477	18	59
	mCFPm	433	475	13	64
	Cerulean	433	475	27	36
	EBFP2	383	448	18	55
UV-excitable green	T-Sapphire	399	511	26	25

1,2 Hier sind jeweils die Excitations- und Emissionsmaxima gelistet. 3 Die Helligkeit entspricht dem Produkt aus Quantenausbeute und molarem Extinktionskoeffizient mit der Einheit (mM*cm)⁻¹. 4 Zeit in Sekunden bis zur halbmaximalen Helligkeit nach Ausbleichen unter definierten Messbedingungen.

Fluoreszenzproteine werden abhängig von ihrem Emissionsmaximums in folgende Farbklassen gruppiert: *Far-red*, *Red*, *Orange*, *Yellow-green*, *Green*, *Cyan* und *UV-excitable green*. Das Excitationsmaximum gibt die Wellenlänge an, mit der ein Fluoreszenzprotein am effizientesten angeregt werden kann. Dies spielt vor allem bei der Durchflusszytometrie eine wichtige Rolle, bei der die Fluoreszenzproteine mit speziellen Lasern angeregt werden. Die Laser regen die Fluoreszenzproteine mit einer definierten Wellenlänge an, woraufhin die Fluoreszenzproteine Photonen mit einem spezifischen Wellenlängenspektrum (Emissionsspektrum) aussenden. Mit der Anregungswellenlänge eines Lasers lassen sich nicht alle Fluoreszenzproteine effizient anregen, was den Nutzen einiger Fluoreszenzproteine einschränkt. Die Zahl verschiedener Laser in Durchflusszytometern ist limitiert und oft sind nur ein oder zwei Laser mit jeweils einer definierten Anregungswellenlänge vorhanden.

Das Emissionsspektrum spielt vor allem in der Mikroskopie eine wichtige Rolle. Hier müssen passende Fluoreszenzfilter vorhanden sein, um die jeweiligen Fluoreszenzfarben erkennen zu können. Auch bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzproteine zur Markierung von Zellen muss das Emissionsspektrum der verschiedenen Proteine beachtet werden. Die Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzproteine sollten dabei möglichst weit auseinander liegen, um eine Unterscheidung der Markierung zu ermöglichen (Shaner et al. 2005). Bei Fluoreszenzproteinen mit überlappenden Emissionsspektren (z.B. *eGFP* und *Venus*) sind die Farben auch bei angepassten Filtern in Mikroskopen oft nicht voneinander zu trennen. Demgegenüber erlaubt die Durchflusszytometrie durch die elektronische Kompensation auch die Trennung eng beieinander liegender Farben (z.B. *eGFP* und *Venus*). Die Helligkeit eines Fluoreszenzproteins wird als das Produkt aus der Quantenausbeute und dem molaren Extinktionskoeffizienten angegeben (Shaner et al. 2004, Shaner et al. 2005). Die Helligkeit eines Fluoreszenzproteins wird durch viele variable Faktoren beeinflusst, wie der Faltungseffizienz des Proteins, der pH-Stabilität, der Photostabilität, dem *Imaging-Setup* oder auch dem menschlichen Auge. Auf Grund dessen ist es unmöglich, ein Fluoreszenzprotein als das „hellste“ zu bezeichnen (Shaner et al. 2005). Die Helligkeitsangabe erlaubt daher nur einen Vergleich, und das vor allem innerhalb der Farbklassen. Zudem muss beachtet werden, dass die Helligkeit mit Hilfe von aufgereinigten Proteinen gemessen wurde. Sie liefert somit keine direkte Information darüber, wie stark die Fluoreszenz des Proteins in den Zellen tatsächlich ist.

Irgendwann bleichen alle Fluoreszenzproteine nach Anregung aus und das Fluoreszenzsignal ist nicht mehr sichtbar bzw. messbar. Die Zeitspanne bis zum Ausbleichen unterscheidet sich unter den Fluoreszenzproteinen und wird mit Hilfe des Merkmals der Photostabilität beschrieben. Die Photostabilität spielt vor allem bei

mikroskopischen Anwendungen eine Rolle. Manche Fluoreszenzproteine bleichen innerhalb weniger Sekunden aus und begrenzen damit die Betrachtungszeit oder die Zahl der Fotos (z.B. beim wiederholten Fotografieren in verschiedenen Vergrößerungen), was die Auswertung ziemlich erschwert.

Verschiedene Fluoreszenzproteine können auch gleichzeitig als Marker eingesetzt werden, um zum Beispiel verschiedene Zellen oder Zellpopulationen voneinander zu trennen. Durch die Verwendung retroviraler Vektoren ist die Markierung stabil im Genom der Zelle integriert und wird daher auch an alle Tochterzellen weitergegeben, was eine Verfolgung von Zellklonen ermöglicht. Vafaizadeh et al. (2010) markierten Brustdrüsenstammzellen getrennt voneinander mit jeweils einer von drei verschiedenen Fluoreszenzfarben. Hierfür wurden drei lentivirale Vektoren genutzt, die jeweils ein rotes, ein grünes und ein blaues Fluoreszenzprotein als Transgen enthielten. Die Zellpopulationen wurden anschließend miteinander vermischt, so dass eine Mischpopulation aus rot, grün und blau markierten Brustdrüsenstammzellen entstand. Die markierten Brustdrüsenstammzellen wurden in immundefiziente Tiere transplantiert und bildeten gesundes Brustdrüsengewebe. Innerhalb verschiedener Areale des Brustdrüsengewebes exprimierten alle Zellen jeweils nur eine der drei Fluoreszenzfarben, was darauf hindeutet, dass alle Zellen des Areals aus einer angewachsenen Brustdrüsenstammzelle gebildet wurden, die ihre Fluoreszenzmarkierung an alle Tochterzellen weitergegeben hatte. Ob die Areale tatsächlich aus einer einzelnen Zelle gebildet wurden, lässt sich jedoch nicht sicher sagen. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Areale aus zwei, drei oder sogar mehreren Zellen gebildet wurden, die zufällig alle die gleiche Fluoreszenzfarbmarkierung besaßen. Um präzisere Aussagen zur klonalen Expansion der Brustdrüsenstammzellen machen zu können, müssten deutlich mehr Fluoreszenzfarben zur Markierung eingesetzt werden. Hierdurch könnte die Wahrscheinlichkeit, dass ein Areal aus zwei Zellen gebildet wurde, die zufällig die gleiche Fluoreszenzfarbe exprimierten, deutlich minimiert werden.

Trotz der Vielzahl beschreibender Fluoreszenzproteine ist die Zahl tatsächlich unterscheidbarer Fluoreszenzproteine bzw. Fluoreszenzfarben jedoch limitiert (Shaner et al. 2005, 2007). Gleichzeitig müssten bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzproteine für die Markierung von Zellen für jede einzelne Fluoreszenzfarbe entsprechende Vektoren für den Gentransfer produziert werden, was einen zusätzlichen Aufwand darstellt.

Anhand der Arbeit von Vafaizadeh et al. (2010) konnte gezeigt werden, dass die stabile Zellmarkierung mit Fluoreszenzproteinen eine Beurteilung über die Organregeneration als Ganzes erlaubt. Der Beitrag einzelner Zellklone an der Regeneration kann jedoch auf Grund der limitierten Anzahl vorhandener Fluoreszenzfarben nicht ausreichend nachvollzogen

werden. Doch genau dieses ist ein wichtiger Baustein zu einem besseren Verständnis der Organregeneration. Eine neue Möglichkeit bzw. eine Erweiterung in der Nutzung von Fluoreszenzproteinen für die Zellmarkierung wurde von Livet et al. (2007) in Form des *Brainbow*-Mausmodells entwickelt, welches im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

1.3. Die *Brainbow*-Maus

Livet et al. beschrieben 2007 ein neues Modell der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung. Dabei griffen sie auf das Prinzip der Dreifarben Theorie zurück, das 1859 von Hermann von Helmholtz auf der Basis einer älteren Theorie von Thomas Young beschrieben wurde. Hiernach können durch die Addition der drei Primärfarben rot, grün und blau in unterschiedlichen Intensitäten und Kombinationen alle spektralen Farben generiert werden. Dieses Prinzip wird beispielsweise in Fernseh- und Computerbildschirmen angewandt, wo durch die Kombination der drei Primärfarben bis zu 16,7 Millionen verschiedene Farben angezeigt werden. Dieses Prinzip haben Livet et al. (2007) auf Fluoreszenzfarben übertragen. Sie entwickelten ein Konstrukt (*Brainbow-1.0*), das drei Fluoreszenzproteine (RFP, YFP und M-CFP) enthielt. Durch ein *Cre/lox*-Rekombinationssystem wurde zufällig jeweils nur eines der drei Fluoreszenzproteine exprimiert (XFP). Die Gruppe entwickelte eine für das *Brainbow-1.0*-Konstrukt und *Cre* transgene Maus. Die Expression des *Brainbow-1.0*-Konstruktes erfolgte hierbei unter der Kontrolle eines neuronenspezifischen Regulatorelements, so dass das Konstrukt ausschließlich in den Neuronen der Mäuse exprimiert wurde (*Thy-Brainbow-1.0*). Die Expression von *Cre*, welches an einen Östrogenrezeptor gekoppelt war, konnte durch eine Injektion von Tamoxifen induziert werden. Die Gruppe konnte beobachten, dass die Neuronen der Mäuse Mischfarben exprimierten. Die Zellen enthielten mehrere Kopien des *Brainbow-1.0*-Konstruktes, die jeweils unabhängig voneinander rekombinierten. Von Zelle zu Zelle wurden verschiedene Kombinationen der drei Fluoreszenzproteine exprimiert und in der Addition entstand für jede Zelle eine unterschiedliche Fluoreszenzfarbe. Auf diese Weise konnten bis zu 100 verschiedene Fluoreszenzfarben generiert werden. Hierdurch war es möglich, viele Neurone an Hand der verschiedenen Fluoreszenzfarben zu unterscheiden. Die Markierung der Zellen und derer Axone ermöglichte so eine Analyse neuronaler Schaltkreise in verschiedenen Regionen im Gehirn der Mäuse.

Die Methode ist bisher jedoch nur für Zellen im Gehirn beschrieben worden. Eine Übertragung der Methode auf andere Systeme - wie z.B. die Leber - ist kostspielig und zeitintensiv und daher nicht ohne weiteres umsetzbar.

Das Prinzip der Dreifarbentheorie, das von Livet et al. (2007) in Form des *Brainbow*-Mausmodells an Fluoreszenzproteinen angewandt wurde, könnte in ähnlicher Weise auch durch retrovirale LeGO-Vektoren umgesetzt werden. Hieraus ergab sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, eine neue Methode zur vielfarbigen Zellmarkierung basierend auf lentiviralem Gentransfer zu etablieren, welche sich sowohl für die Analyse der Organregeneration als auch des Tumorwachstums eignet. Beide Themengebiete - die Leberregeneration durch transplantierte Hepatozyten und die Klonalität von Tumoren - werden in den folgenden Kapiteln der Einleitung als mögliche Anwendungsgebiete der neuen Methode vorgestellt.

1.4. Leberzelltransplantation

Bei einer akuten Leberschädigung kommt es zum Verlust von Hepatozyten, der in der Regel durch ausgeprägte Proliferation der verbleibenden Hepatozyten zu einer Leberregeneration führt. Eine chronische Leberschädigung führt dagegen zu einer Aktivierung hepatischer Sternzellen, die durch Produktion von Extrazellulärmatrix in einer Leberfibrose/-zirrhose mündet; dabei kann die Proliferation von Hepatozyten ebenfalls zur Leberregeneration beitragen. Ist diese Fähigkeit zur Regeneration nicht ausreichend, kommt es zum irreversiblen akuten Leberversagen. In diesem Fall ist eine Lebertransplantation notwendig, um den Patienten vor den Folgen einer hepatischen Insuffizienz und dem daraus folgenden Tod zu bewahren. Im Zuge des Mangels an vorhandenen Leberpräparaten für eine Lebertransplantation wurde das Verfahren der Leberzelltransplantation entwickelt.

Bei diesem Verfahren wird anders als bei der Transplantation ganzer Leberlappen eine Suspension aus Hepatozyten in die Milz oder in die Portalvene injiziert. Die sinusoidalen Gefäße in der Leber ermöglichen den Übertritt transplantierte Hepatozyten aus dem Blut in die Leber (Engraftment). Die transplantierten Hepatozyten bauen sich in die Struktur der Leber ein, bilden biliäre Strukturen und erfüllen ihre hepatozytenspezifische Funktion (Integration). Zudem können transplantierte Hepatozyten geschädigtes Lebergewebe durch Proliferation repopulieren und regenerieren. Die Transplantation von Hepatozyten stellt eine mögliche Alternative zur orthotopen Lebertransplantation dar. Sie könnte - ähnlich wie die Lebertransplantation - als therapeutisches Verfahren zur Behandlung von schweren Leberschäden und Lebererkrankungen eingesetzt werden. Zurzeit ist das Verfahren noch nicht ausgereift und wird bisher nur in klinischen Studien angewandt.

1.4.1. Mechanismus des Engraftments und der Integration transplanteder Hepatozyten

Der Mechanismus des Engraftments und der Integration transplanteder Hepatozyten ist in seinen Einzelheiten noch nicht genau geklärt. Gupta et al. (1999) haben das Engraftment und die Integration transplanteder Hepatozyten im Tiermodell studiert und in drei Schritten beschrieben:

Nach einer Injektion in die Milz oder Portalvene wandern die Zellen entlang des portalen Gefäßsystems in die Leber und gelangen dort in die hepatischen Sinusoide. Bei diesem Schritt wird ein Großteil der transplanteden Zellen in der Leber durch Makrophagen (Kupferzellen) und andere phagozytierende Zellen eliminiert (>70%).

Den zweiten Schritt stellt das Eindringen der transplanteden Zellen ins Leberparenchym (Engraftment) dar. Auf welche Weise die Hepatozyten aus den Sinusoiden in die Leber gelangen und welche Mechanismen dafür notwendig sind, ist bisher nicht geklärt. Die Struktur der Leberläppchen mit dem diskontinuierlichen Epithel (Fenestrationen zwischen den Endothelzellen, diskontinuierliche Basalmembran) und der langsame Blutfluss in den Sinusoiden scheinen die Anheftung und das Engraftment transplanteder Zellen zu erleichtern. Auf Grund dessen wird angenommen, dass die transplanteden Zellen durch das diskontinuierliche Epithel in das Leberparenchym eintreten. Diese These konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützt werden, bei denen man Spalten bzw. Brüche im sinusoidalen Endothel nach Hepatozytentransplantationen beobachten konnte. Zudem wird angenommen, dass Faktoren wie das Anheftungspotential der transplanteden Zellen an die Endothelmembran und Komponenten der extrazellulären Matrix für das Engraftment entscheidend sind.

Die ersten beiden Schritte dauern maximal 24 Stunden. Danach befinden sich keine transplanteden Zellen in den Sinusoiden. Die transplanteden Zellen sind entweder ins Leberparenchym eingetreten (etwa 20%) oder durch Phagozytose eliminiert worden.

Der dritte Schritt ist die Integration der Zellen in das Lebergewebe. Die Zellen müssen Zell-Zell-Verbindungen mit den wirtseigenen Hepatozyten bilden und biliäre Membranstrukturen aufbauen. Zudem müssen die Zellen ihre hepatozytenspezifische Funktion wahrnehmen. Dieser Prozess ist meist nach 7 Tagen abgeschlossen. Nach der Integration sind die transplanteden Zellen phänotypisch nicht von den wirtseigenen Zellen zu unterscheiden.

1.4.2. Leberzelltransplantation als mögliches Verfahren zur Behandlung von Lebererkrankungen

Die Leberzelltransplantation stellt bei der Behandlung schwerer Leberschäden und Lebererkrankungen eine mögliche Alternative zur Organtransplantation dar. Ein klarer Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Organtransplantation ist seine Einfachheit. Bei der

Leberzelltransplantation werden die Zellen in die Milz oder in die Portalvene injiziert. Im Vergleich dazu ist die Lebertransplantation eine aufwendige Operation, die für den Patienten mit vielen Risiken und Belastungen verbunden ist.

Im Jahr 1992 wurde das Verfahren der Leberzelltransplantation an einem Menschen mit *Crigler-Najjar Syndrom Typ I* angewandt (Fox et al. 1998). Das *Crigler-Najjar Syndrom* ist eine seltene Erbkrankheit (Prävalenz < 1: 1.000.000), die durch einen Defekt der Bilirubin-Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase gekennzeichnet ist. Dieses Enzym ist für die Bilirubinausscheidung verantwortlich. Beim Typ I fehlt das Enzym völlig und es kommt schon unmittelbar nach der Geburt zu einem schweren Ikterus, der unbehandelt zum Tode führt. In der Studie wurden einem Patienten Hepatozyten eines Spenders transplantiert, welche eine physiologische Aktivität der Bilirubin-Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase besaßen. Die Enzymaktivität nach Transplantation war jedoch nicht hoch genug, um den Patienten vollständig zu heilen (Fox et al. 1998). Auch für andere kongenitale Lebererkrankungen wird untersucht und diskutiert, ob eine Zelltherapie mit Hepatozyten eines Spenders eine mögliche Therapieoption darstellt.

Eine Alternative zur allogenen Zelltransplantation stellt der Ansatz der *ex vivo*-Gentherapie dar (Grossman et al. 1994, Grossman et al. 1995). Patienten mit einem Gendefekt im Leberstoffwechsel könnten durch ein gentherapeutisches Verfahren behandelt werden. Bei der *ex vivo*-Gentherapie werden die Hepatozyten mit dem Gendefekt aus einem Leberteilstück des Patienten - zum Beispiel nach einer Hemihepatektomie – isoliert. In der Zellkultur erfolgt ein Gentransfer mit retroviralen Vektoren, die nach Integration ins Zellgenom das fehlende oder defekte Gen als Transgen in den Hepatozyten exprimieren. Nach dem Gentransfer werden die Hepatozyten dem Patienten wieder zurück infundiert. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die transplantierten Zellen vom Patienten selbst stammen und eine Abstoßungsreaktion somit deutlich minimiert wird. Zudem ist bei dem gentherapeutischen Verfahren keine Spenderleber notwendig, was bei dem derzeitigen Mangel an Spenderlebern einen wichtigen Aspekt darstellt. In einer Studie von Grossman et al. (1995) wurden fünf Kinder mit einer familiären Hypercholesterinämie autologe Hepatozyten transplantiert, die zuvor *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor transduziert worden sind, der den humanen *low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor als Transgen enthielt. In der Studie konnte bei drei von fünf Kindern ein Engraftment transplantiertter Zellen und eine 20-prozentige Reduktion des LDL-Cholesterins beobachtet werden. Die Expression des Transgens war in dieser Studie jedoch nicht sehr lange detektierbar. Auch für andere kongenitale Lebererkrankungen (z.B. Hämophilie A und B, Alpha-1-Antitrypsinmangel, Morbus Wilson) wird untersucht, ob der Ansatz der *ex vivo*-Gentherapie eine mögliche Therapieoption darstellt (Nguyen et al. 2004).

Das Fehlen von Spenderlebern und die wachsende Zahl an Patienten, die eine Lebertransplantation benötigen, führen dazu, dass viele Patienten während der Wartezeit an den Folgen der Leberinsuffizienz versterben. In einigen klinischen Studien wurde daher bei Patienten mit einem akuten Leberversagen die Hepatozytentransplantation als eine Art Übergangsbehandlung zur eigentlichen orthotopischen Lebertransplantation genutzt (Habibullah et al. 1994, Strom et al. 1999, Schneider et al. 2006). Dabei erhielten die Patienten 10^7 - 10^{10} allogene Hepatozyten, die aus einer Spenderleber eines verstorbenen Menschen isoliert wurden. Aus einer ganzen Leber eines verstorbenen erwachsenen Menschen können theoretisch etwa 24×10^{10} Hepatozyten isoliert werden. Mit einer Spenderleber könnten daher theoretisch bis zu 25 Patienten behandelt werden. Durch die Hepatozytentransplantation soll eine für das Überleben ausreichende Leberfunktion wiederhergestellt werden, so dass die Patienten während der Wartezeit auf eine Spenderleber nicht an den Folgen der insuffizienten Leberfunktion versterben. In diesen Studien konnten die transplantierten Hepatozyten in der Leber identifiziert werden und bei den Patienten konnte eine Besserung der Symptomatik beobachtet werden: der Ammoniak-Spiegel im Serum wurde gesenkt, das Herz-Kreislaufsystem konnte stabilisiert werden, die plasmatische Gerinnung und die Enzephalopathie-Symptomatik konnten verbessert werden. Das Problem dieser Studien, wie bei den Zell- und Gentherapiestudien, war die geringe Effizienz dieses Verfahrens. Die Zahl angewachsener Zellen war oft zu gering, um die metabolische Lebererkrankung zu korrigieren bzw. um eine ausreichende Leberfunktion zu gewährleisten.

In neuesten Studien wird das Verfahren der Leberzelltransplantation in der Pädiatrie zur Behandlung neonataler Harnstoffzyklusdefekte eingesetzt. Harnstoffzyklusdefekte - vor allem wenn sie sich beim Neugeborenen manifestieren - haben eine sehr schlechte Prognose. Die Leberzelltransplantation stellt - gegenüber der deutlich invasiveren Lebertransplantation - ein alternatives Therapieverfahren dar. In einer Studie von Meyburg et al. (2009) wurden vier Kinder in einem Alter zwischen einem Tag und drei Jahren mit repetitiven intraportalen Leberzelltransfusionen behandelt. Die Leberzellen wurden dabei aus einer einzelnen Leberspende gewonnen und auf alle vier Kinder verteilt. Während des Beobachtungszeitraumes von 4-13 Monaten kam es bei allen Kindern zu einer metabolischen Stabilisierung (u.a. Normalisierung des Ammoniakspiegels). Eines der vier Kinder verstarb jedoch nach vier Monaten infolge einer schweren metabolischen Dekompensation.

1.4.3. Das uPA-Mausmodell

Um die Repopulation und Regeneration der Leber durch transplantierte Hepatozyten zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt (Weber et al. 2009, Gilgenkrantz 2010). Als Beispiel wird hier das *urokinasetype plasminogen activator* (uPA)-Mausmodell näher beschrieben, mit dem Repopulationsraten von bis zu 90% erreicht werden können (Petersen et al. 1998, Dandri et al. 2001). Dieses Modell wurde auch in dieser Dissertation genutzt.

Dr. Brinsters Forschungsgruppe entwickelte 1990 eine transgene Maus, die unter der Kontrolle eines Albumin-Enhancer/Promotors die Protease *urokinasetype plasminogen activator* (uPA) exprimiert (Heckel et al. 1990). Die hepatozytenspezifische Expression von uPA führt nicht nur zu einer hohen uPA-Plasmakonzentration und daraus resultierenden neonatalen Hämorrhagien und Hypofibrinogenämie, sondern vor allem zu einem massiven Untergang von Hepatozyten mit daraus resultierender chronischer hepatischer Insuffizienz. Dieser funktionelle Leberschaden ermöglicht das Engraftment und die Proliferation von transplantierten Hepatozyten, welche die geschädigte Leber der Empfängermaus regenerieren (Rhim et al. 1995). Um auch xenogene Zellen transplantieren zu können, wurde die uPA-Maus in den immundefizienten *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Hintergrund rückgekreuzt (Meuleman et al. 2008, Lütgehetmann et al. 2010). Für die Transplantationsexperimente können Tiere verwendet werden, die sowohl homozygot als auch heterozygot für das Merkmal der hepatozytenspezifischen uPA-Expression sind. Dabei ermöglichen homozygote Tiere eine fast vollständige Rekonstitution der Leber mit transplantierten primären Hepatozyten (Meuleman et al. 2008). Bei heterozygoten Tieren beträgt der Anteil transplantierte Zellen an der gesamten Leber nur bis zu 15% (Dandri et al. 2001). Vor allem bei heterozygoten Tieren wird die Expression von uPA in einer kleinen Fraktion der Wirtsleberzellen oft auf Grund einer somatischen Rekombination aufgehoben (Sandgren et al. 1991). Diese Zellen erhalten damit einen Wachstumsvorteil gegenüber den uPA-exprimierenden Zellen und regenerieren die Leber. Bei Transplantationsversuchen konkurrieren die Zellen daher direkt mit transplantierten Zellen und erschweren damit die Repopulation. Daher erfolgt bei diesen Tieren die Transplantation von Leberzellen in einem Alter von 13-21 Tagen, da zu diesem Zeitpunkt die Lebern der Mäuse nur in sehr kleinen Anteilen endogen regeneriert sind (Dandri et al. 2001). Die homozygoten Tiere erhalten eine Hepatozytentransplantation in einem Alter von 6-14 Tagen (Meuleman et al. 2005). Ohne die Transplantation gesunder Zellen versterben homozygote Tiere meist innerhalb kurzer Zeit an einem Leberversagen. Daher müssen diese Tiere möglichst früh gesunde Hepatozyten erhalten.

Die angewachsenen Zellen teilen sich in der Leber und formen so genannte Regenerationsknoten. Eine aktive Proliferation der Zellen ist dabei nur am Rand der Knoten zu beobachten, wo die Zellen im Kontakt zum endogen geschädigten Lebergewebe der Wirtsmaus stehen. Die transplantierten primären Hepatozyten formen Gallenkanälchen, die sich mit dem Gallengangssystem der Wirtsmaus verbinden. Nach der Transplantation von humanen Hepatozyten konnten humanes Albumin, alpha-1-Antitrypsin, Apolipoprotein A, Apolipoprotein E und andere humane Proteine im Blut der Mäuse detektiert werden. Dieses zeigt, dass die transplantierten Zellen im uPA-Modell auch funktionell in die Leber integrieren und am Leberstoffwechsel beteiligt sind (Meuleman et al. 2005).

Obwohl die Zelltransplantation seit über 10 Jahren in verschiedenen Tiermodellen und bei einigen Patienten angewandt wurde, war bislang kaum etwas über die Klonalität der Zellregeneration bekannt. Neue Erkenntnisse über die Klonalität der Leberregeneration nach Leberzelltransplantation könnten dazu beitragen, das Verfahren der Leberzelltransplantation zu optimieren. Die Leberzelltransplantation stellt daher ein interessantes Anwendungsgebiet einer neuen Methode zur Identifikation von Zellklonen dar.

1.5. Klonalität von Tumoren

Nowell entwickelte im Jahr 1976 ein Konzept der klonalen Evolution eines Tumors. Nach diesem Konzept erhält zufällig eine gesunde Gewebszelle durch ein initiales Ereignis - zum Beispiel in Form einer genetischen Mutation - einen Wachstumsvorteil gegenüber den benachbarten Zellen (Wagener und Müller 2009). Sofern intrazelluläre und extrazelluläre Kontrollmechanismen dies zulassen, entsteht daraus ein Klon aus identischen Zellen. Wird eine Zelle dieses Klons im Folgenden von einem weiteren Ereignis getroffen, erwirbt diese Zelle einen weiteren Wachstumsvorteil. Diese Sequenz wiederholt sich, bis eine Zelle maligne transformiert und einen malignen Tumor bildet. Nach diesem Modell hängt es vom Zufall ab, welche Zelle des Klons von einem Ereignis getroffen wird. Das Ereignis kann nicht vorhergesagt werden und kann für die Zelle bzw. den Zellklon sowohl ein Vor- als auch ein Nachteil sein. Besonders unter limitierenden Bedingungen (Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel, Chemotherapie) können sich einzelne Zellklone, die einen Wachstumsvorteil besitzen, gegenüber anderen durchsetzen (Merlo et al. 2006). Die entstandene maligne Tumorzelle akkumuliert nach und nach weitere Mutationen, wodurch Kontrollmechanismen ausgeschaltet und zusätzliche Wachstumsvorteile erworben werden (genetische Instabilität als „*driving force*“).

Die Mehrzahl der aggressiven soliden Tumoren sind hochgradig aneuploid (Mitelman und Heim 1987). Der Grad der Aneuploidie scheint in vielen Fällen mit dem Stadium des Tumors

zusammenzuhängen, wobei fortgeschrittene Tumoren meist ein erhöhtes Ausmaß an chromosomalen Veränderungen aufweisen (Risques et al. 2001).

Obwohl die meisten Tumoren aus einer einzigen maligne transformierten Zelle entstehen und daher bezüglich ihres Ursprungs klonal sind, zeigen sie nach biologischen Kriterien ein heterogenes Bild. Innerhalb eines Tumors finden sich multiple Subklone, die ebenfalls klonal expandieren und sich unabhängig voneinander entwickeln (Leedham und Wright 2008).

Zur Erklärung der Heterogenität innerhalb von Tumoren gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen (Abbildung 6):

Die stochastische Hypothese geht davon aus, dass jede Zelle innerhalb eines Tumors eine geringe, aber gleich hohe Wahrscheinlichkeit besitzt, Klone zu generieren und sich wie eine Stammzelle zu verhalten (Wagener und Müller 2009). Auf Grund eines Ereignisses können sich zufällig einzelne Klone entwickeln, die ein unterschiedliches Wachstums- und Differenzierungspotential besitzen und über Gewebsgrenzen hinweg proliferieren oder sogar metastasieren.

Die Stammzellhypothese geht davon aus, dass es eine Hierarchie der Zellen innerhalb eines Tumors gibt, die sich in ihrem Potential zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung unterscheiden (Wagener und Müller 2009). Dabei können die Stammzellen durch weitere Mutationen divergente Eigenschaften besitzen. So könnten einige Stammzellen auf Grund eines Nachteils von anderen überwachsen werden. Eine andere Stammzelle wiederum könnte eine Mutation erhalten, die es der Zelle ermöglicht, in das Gefäßsystem einzutreten und zu metastasieren. Die Stammzellhypothese wird von verschiedenen Beobachtungen gestützt. Nur wenige Zellen eines Tumors besitzen die Fähigkeit, *in vitro* anzuwachsen und Kolonien zu bilden (Reya et al. 2001, Wang und Dick 2005). Auch bei der Transplantation von humanen Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML-Zellen) in SCID-Mäuse konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Anteil der Zellen die Fähigkeit besitzt, im Mausmodell eine Leukämie auszulösen. Diese leukämie-initiiierenden Zellen konnten mit Hilfe von spezifischen Markern auf der Zelloberfläche identifiziert werden (Lapidot et al. 1994). Das Anwachsen und Verhalten der leukämie-initiiierenden Zellen unterscheidet sich jedoch je nach verwendetem *in vivo*-Modell (Rombouts et al. 2000). Zudem spiegeln die Leukämien im Mausmodell nicht die Prozesse im Patienten wider (Rombouts et al. 2000).

Tumorstammzellen konnten auch aus soliden menschlichen Tumoren wie dem Mammakarzinom und dem Glioblastom isoliert werden (Al-Hajj und Clarke 2004, Singh et al. 2004). Viele Zellen innerhalb eines Tumors besitzen nur eine limitierte Fähigkeit zu proliferieren, während eine gewisse Population an Tumorstammzellen eine enorme Fähigkeit besitzt zu proliferieren und neue Tumoren zu bilden. Dabei unterscheiden sich die

Populationen im Wachstumsmuster und erzeugen dadurch eine heterogene Tumorfornation (Al-Hajj und Clarke 2004, Singh et al. 2004). In einigen Modellen war es jedoch nicht möglich, Stammzellen zu identifizieren, was wiederum für die stochastische Hypothese spricht (Lindeman und Visvader 2010).

Die Beurteilung der Klonalität spielt in der Therapie von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Das Vorhandensein verschiedener Klone innerhalb eines Tumors kann zum Beispiel erklären, warum einige Zellen gegenüber einem Chemotherapeutikum resistent sind, weiter expandieren und eine Heilung verhindern. Viele Patienten bekommen einige Jahre nach einer kurativen Therapie eines malignen Tumors ein Rezidiv. Trotz augenscheinlicher Tumorfreiheit sind einige Tumorzellen nicht eliminiert worden. Diese Zellen ruhten mehrere Jahre und fingen irgendwann wieder an zu proliferieren. Die Beurteilung der klonalen Zusammensetzung von Tumoren spielt daher eine wichtige Rolle und könnte dazu beitragen, neue Erkenntnisse in der Wachstumsdynamik von Tumoren zu erlangen. Daraus könnten schließlich neue Therapiestrategien entwickelt werden.

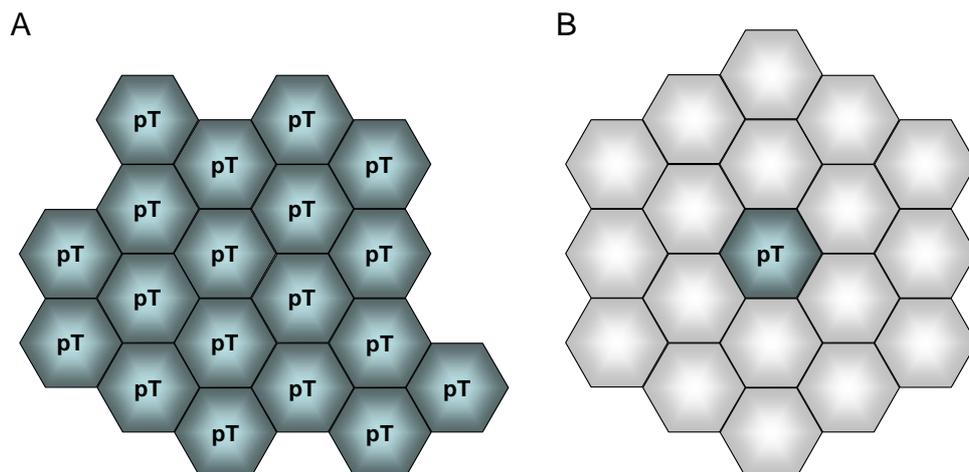


Abbildung 6: Hypothesen des klonalen Aufbaus von Tumoren. (A) Nach der stochastischen Theorie besitzt jede Tumorzelle das Potential, sich wie eine Stammzelle zu verhalten. Mit einer geringen, aber gleich hohen Wahrscheinlichkeit (p) können alle Zellen des Tumors nach einer Transplantation in einem geeigneten Wirt einen Tumor (T) bilden. (B) Nach der Stammzellhypothese besitzen nur wenige Zellen das Potential, einen Tumor (pT) zu bilden. Die anderen Zellen können nach einer Transplantation keinen Tumor bilden (nach Wagener und Müller 2009).

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Fluoreszenzproteine haben sich in vielen Anwendungen als ein effektives Mittel für die Markierung von Zellen bewährt. Inzwischen ist eine ganze Reihe von Fluoreszenzproteinen in verschiedenen Farben verfügbar, was z.B. die spezifische Markierung unterschiedlicher Zelltypen mit einzelnen Fluoreszenzfarben ermöglicht. Die Zahl verschiedenfarbiger Fluoreszenzproteine ist jedoch limitiert. Eine individuelle Markierung einzelner Zellen mit charakteristischen Farben und eine damit verbundene Unterscheidung und Verfolgung einzelner Zellklone ist hiermit nur beschränkt möglich.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung entwickelt werden, die eine individuelle Farbkodierung von Zellen ermöglicht. Hierzu sollte das Prinzip der Dreifarbentheorie auf Fluoreszenzfarben übertragen werden. Gemäß der Dreifarbentheorie können durch die Addition der drei Primärfarben rot, grün und blau (RGB) in unterschiedlichen Intensitäten und Kombinationen alle spektralen Farben generiert werden. Die Arbeit ging von der Prämisse aus, dass das Prinzip der Dreifarbentheorie auch durch die gleichzeitige Expression dreier Fluoreszenzproteine, eines roten, eines grünen und eines blauen, umgesetzt werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Zellen gleichzeitig mit drei lentiviralen Vektoren transduziert werden, die jeweils eines der genannten Fluoreszenzproteine exprimieren. Durch die Mischung der exprimierten Fluoreszenzproteine, die aufgrund der Zufälligkeit der Transduktion in verschiedenen Mengen und Kombinationen in den Zellen vorliegen sollten, würde dann eine neue Fluoreszenzfarbe generiert werden. Diese neue, RGB-Markierung genannte Methode würde eine individuelle fluoreszenzbasierte Zellmarkierung ermöglichen. Da lentivirale Vektoren stabil in das Genom der Zelle integrieren, sollte die spezifische Fluoreszenzfarbe an alle Tochterzellen weitergegeben werden, was eine Untersuchung der klonalen Zusammensetzung von Zellverbänden ermöglichen würde. Die RGB-Markierung wäre daher nicht nur eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung, sondern darüber hinaus auch eine neuartige Methode zur Verfolgung und Identifikation von Zellklonen.

Die RGB-Markierung sollte in dieser Arbeit zur Identifikation und Verfolgung von Zellklonen in der Leber angewendet werden. Mit der Methode sollte erstmals die klonale Zusammensetzung der Regeneration einer geschädigten Leber durch transplantierte Leberzellen visualisiert und anhand dessen beurteilt werden.

Eine individuelle Farbmarkierung von Tumorzellen könnte eine Beurteilung der Klonalität von Tumoren ermöglichen. Die klonale Evolution von Tumoren, Metastasen und Rezidiven könnte hierdurch analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ebenfalls untersucht werden, ob mit der neuen Methode das klonale Wachstum von Tumoren in der Leber untersucht und verfolgt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellbrutschränken in einer Atmosphäre mit 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Anteil von 5% bei 37°C kultiviert. Die Dichte der Zellen in den Zellkulturschalen wurde so gehalten, dass ein permanentes Wachstum durch Teilung gewährleistet war. Wenn die Dichte der Zellen in der Zellkulturschale entsprechend hoch war, wurden die adhärennten Zellen vom Boden abgelöst und je nach Bedarf aufgeteilt. Um die adhärennten Zellen abzulösen, wurde zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) gewaschen. Dann wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) vom Boden abgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und in das jeweilige Kulturmedium überführt, um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren. Die Zellen wurden dann in einer geeigneten Verdünnung wieder ausgesät.

3.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die adhärennten Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Reagenzgefäß (Greiner Bio-One, Frickenhausen/Deutschland) überführt und 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, so dass sich ein Zellpellet am Boden des Reagenzgefäßes bildete. Das Medium im Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in hitze-inaktiviertes fötales Rinderserum (FBS) (Invitrogen) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen (Nunc A/S, Roskilde/Dänemark) überführt und in einem mit Isopropanol (Sigma-Aldrich) gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene, Rochester/USA) über Nacht bei -80°C langsam heruntergekühlt. Am darauf folgenden Tag wurden die Einfrierröhrchen mit den Zellen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt und dort gelagert.

Um die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen aufzutauen, wurden die Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern im Röhrchen sichtbar war. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Reagenzgefäß (Greiner Bio-One) überführt, welches 10 ml 4°C kaltes Kulturmedium enthält. Um das DMSO aus dem Medium zu entfernen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 x g, 5 min) und der Überstand mit dem darin enthaltenen DMSO verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend im Kulturmedium resuspendiert.

3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer *Neugebauer-Zählkammer* (Gesamtfläche 0,025 mm², Tiefe 0,1 mm, 4 Großquadranten mit je 16 Kleinquadranten, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Deutschland). Die Zellzahl pro ml ergab sich aus dem Durchschnitt der Zellzahl pro Großquadrant aus allen vier Großquadranten, der dann mit 10⁴ multipliziert wurde. Mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung (Invitrogen) wurden tote Zellen angefärbt, die bei der Zellzahlbestimmung nicht mitgezählt wurden. Tote Zellen besitzen keine intakte Membranbarriere, wodurch der Farbstoff in die Zellen gelangt und diese blau-schwarz anfärbt.

3.1.3. Zellmaterial

3.1.3.1. HEK 293T-Zellen

HEK 293T-Zellen wurden Ende der 70er Jahre durch eine Transformation menschlicher embryonaler Nierenzellen (HEK: *Human Embryonic Kidney*) mit einem Adenovirus entwickelt (Zur Hausen et al. 1967). Die Zelllinie exprimiert das *SV40 large T-Antigen*, das die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem *SV40 origin of replication* ermöglicht. HEK 293T-Zellen sind adhärent wachsende Zellen und wurden in folgendem Medium kultiviert:

HEK 293T Kulturmedium:

- 500 ml DMEM+GlutaMAX (Invitrogen)
- 50 ml FBS (Invitrogen)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- 12,5 ml HEPES (Invitrogen)

3.1.3.2. Immortalisierte humane fetale Hepatozyten (FH-hTERT)

FH-hTERT wurden durch eine Transduktion primärer fetaler humaner Hepatozyten mit einem retroviralen Vektor entwickelt, welcher die *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) unter der Kontrolle eines *Moloney Murine Leukemia virus* (MMLV)-Promotors enthielt (Wege et al. 2003). Durch die ektopische Expression der humanen Telomerase konnten die Zellen immortalisiert werden, wobei die Expression hepatozytenspezifischer Marker (Albumin, Glykogen, Glukose-6-Phosphatase, u.a.) weiterhin erhalten blieb. Die Zellen besitzen kein onkogenes Potential. Nach subkutaner Injektion der Zellen in Nacktmäuse sowie nach Transplantation der Zellen in die Leber wurde kein Tumorwachstum beobachtet (Wege et al. 2003). Die *in vitro* adhärent wachsenden Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

FH-hTERT-Kulturmedium:

- 500 ml DMEM+GlutaMAX
- 50 ml FBS

- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 12,5 ml HEPES
- 5 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich)
- 2,4 µg/ml Hydrocortison (Sigma-Aldrich)

3.1.3.3. BON-Zellen

BON-Zellen wurden 1986 aus einer Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids isoliert (Evers et al. 1994). *In vitro* wachsen die Zellen adhärent und weisen keine Kontaktinhibition auf. Nach subkutaner Injektion der Zellen in Nacktmäuse kommt es zur Entstehung von subkutanen Tumoren mit einer Tumorverdopplungszeit von etwa 13 Tagen (Evers et al. 1994). Die *in vitro* adhärent wachsenden Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

BON-Kulturmedium:

- 500 ml DMEM/F12 (Invitrogen)
- 50 ml FBS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin

3.2. Herstellung infektiöser lentiviraler Vektoren

Die Herstellung infektiöser lentiviraler Vektoren erfolgte durch Kotransfektion von geeigneten Produzentenzellen mit allen benötigten Plasmiden. Die Transfektion erfolgte dabei durch eine Kalziumphosphat-Präzipitation (Pear et al. 1993, Pear 2001, Weber 2005).

3.2.1. Verwendete Vektorplasmide

Von den Vektorplasmiden wurde nach der Transfektion in HEK 293T-Zellen ein RNA-Genom transkribiert. Folgende drei Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 2: Verwendete Vektorplasmide

LeGO-C2	Der lentivirale SIN-Vektor besitzt einen SFFV-Promotor als internen Promotor und <i>mCherry</i> als Transgen (Weber et al. 2008).
LeGO-V2	Der lentivirale SIN-Vektor besitzt einen SFFV-Promotor als internen Promotor und <i>Venus</i> als Transgen (Weber et al. 2008).
LeGO-Cer2	Der lentivirale SIN-Vektor besitzt einen SFFV-Promotor als internen Promotor und <i>Cerulean</i> als Transgen (Weber et al. 2008).

3.2.2. Helferplasmide für die Virusproduktion

Die Helferplasmide trugen Gene, die für die Produktion lentiviraler Partikel notwendig waren. Die Expression der für die Verpackung benötigten Proteine erfolgte in den Produzentenzellen. Hierbei wurden folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Helferplasmide

pMDLg/pRRE	Das Plasmid trägt die HIV1-Gene <i>gag</i> und <i>pol</i> unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Dull et al. 1998).
pRSV-rev	Das Plasmid trägt das HIV1-Gen <i>rev</i> unter der Kontrolle eines <i>Rous Sarcoma Virus</i> (RSV)-promotors (Hope et al. 1990).
phCMV-VSV-G	Das Plasmid trägt das Hüllprotein VSV-G unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Beyer et al. 2002).

3.2.3. Ansetzen des Präzipitationspuffers und der Kalziumchloridlösung

Vor der Virusproduktion wurden die dafür notwendigen Lösungen angesetzt:

2x Präzipitationspuffer (2x HBS):

- 8 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland)
- 0,38 g KCl (Carl Roth)
- 0,125 g NaH₂PO₄-H₂O (Merck, Darmstadt/Deutschland)
- 5 g HEPES (ICN Biomedicals Inc., Aurora/USA)
- 1,1 g D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck)

Die Chemikalien wurden in destilliertem Wasser gelöst, so dass ein Endvolumen von 500 ml erreicht wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natriumhydroxid (NaOH, Merck) auf 7,15 eingestellt. Der 2x Präzipitationspuffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kalziumchloridlösung (2,5 M):

- 73,5 g CaCl₂ (Merck)
- 250 ml H₂O

Die Kalziumchloridlösung wurde ebenfalls aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.2.4. Transfektion von HEK 293T-Zellen

Als Produzentenzellen wurden HEK 293T-Zellen verwendet. Einen Tag vor der eigentlichen Transfektion wurden 5 x 10⁶ HEK 293T-Zellen in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 9 cm ausgesät (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) und kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Im ersten Schritt wurden die Kalziumchloridlösung und die benötigten Plasmide in folgenden Mengen in ein 1,5 ml-Reagenzgefäß (Eppendorf, Hamburg/Deutschland) pipettiert:

Transfektionsansatz:

10 µg Vektorplasmid

10 µg pMDLg/pRRE

5 µg pRSV-rev

2 µg phCMV-VSV-G

50 µl Kalziumchloridlösung

Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Ein 15 ml-Reagenzgefäß mit konischem Boden (Greiner Bio-One) wurde mit 500 µl 2x Präzipitationspuffer (2x HBS) befüllt. Der Transfektionsansatz wurde dann tröpfchenweise in das 15-ml Reagenzgefäß gegeben, während mittels einer 2 ml-Pasteurpipette (Becton Dickinson Labware, Heidelberg/Deutschland) Luft in den Präzipitationspuffer geblasen wurde. Dadurch sollte eine möglichst optimale Durchmischung der Plasmide erreicht werden. Die Lösung wurde für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium, in dem die HEK 293T-Zellen kultiviert wurden, gewechselt, wobei für die Transfektion das Kulturmedium zusätzlich 25 µM Chloroquin (Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland) enthielt. Nach der Inkubationszeit wurde das Präzipitat tröpfchenweise in das Kulturmedium gegeben und durch mehrmaliges Schwenken der Kulturschale durchmischt. 6-8 Stunden nach Zugabe des Präzipitats wurde das Medium abgenommen und neues Kulturmedium hinzugegeben. Die viralen Vektoren wurden nun von den Produzentenzellen in das Kulturmedium abgegeben. Am darauf folgenden Tag wurde der Kulturüberstand, in dem sich die viralen Vektoren befanden, abgenommen und mit einem 0.22 µm-Sterilfilter filtriert (Millipore, Bedford/USA). Der vektorhaltige Überstand wurde bei -80°C gelagert.

3.2.5. Titerbestimmung des vektorhaltigen Überstandes

Vor der Verwendung der produzierten viralen Vektoren, mussten die Titer der vektorhaltigen Überstände bestimmt werden. Hierfür wurde eine definierte Anzahl ausgesäeter HEK 293T-Zellen (i. d. R. 50.000 Zellen pro Loch) mit verschiedenen Volumina (0,1 µl, 0,3 µl, 1 µl) des vektorhaltigen Überstandes transduziert. Für die Transduktion wurden die Zellen im Kulturmedium mit 8 µg/ml Polybren kultiviert. Die Transduktion der Zellen erfolgte durch Zugabe des vektorhaltigen Überstandes in das Medium der Zellen und eine anschließende Zentrifugation für eine Stunde bei 1000 x g (Temperatur 22°C). Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und frisches HEK 293T-Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Am vierten Tag nach der Transduktion erfolgte die Analyse der Transduktionsrate am Durchflusszytometer. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Kulturplatten abgelöst und in FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) überführt.

Am Durchflusszytometer wurden die vitalen HEK 293T- Zellen gezählt, und unter diesen wurde der Prozentsatz transduzierter Zellen ermittelt (Transduktionsrate). Am Durchflusszytometer konnten die transduzierten Zellen an Hand der Expression der von den Vektorkonstrukten kodierenden fluoreszierenden Proteine identifiziert werden. Da bei höheren Transduktionsraten die Wahrscheinlichkeit steigt, dass mehrere Vektoren pro Zelle im Genom integriert sind und der Titer somit unterschätzt wird, wurden für die Berechnung des Titers Ansätze mit geringen Transduktionsraten (<30%) verwendet (Fehse et al. 2004). Der Titer der vektorhaltigen Überstände konnte nun folgendermaßen in infektiösen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) berechnet werden: $\text{Titer} = (\text{Zahl der kultivierten Zellen} \cdot \text{Transduktionsrate}) / \text{Volumen an zugegebenem Überstand (in ml)}$.

3.3. Versuchstiere

Folgende Versuchstiere wurden in dieser Arbeit verwendet:

C57Bl/6J-Maus

uPA/SCID-Maus

NOD/SCID-Maus

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf - gemäß internationalen Richtlinien der Tierhaltung - mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18.Mai 2006 (BGBl.IS.1207)) mit den Tierversuchsgenehmigungsnummern ORG_320_Leberzelle und G06/025 durchgeführt.

3.4. Hepatozytenisolierung und Transduktion

Die Isolierung primärer Hepatozyten erfolgte nach der beschriebenen Methode der 2-Schritt- (*in situ*)-Kollagenase-Perfusion (Seglen 1976, Aiken et al. 1990, Lütgehetmann 2005, Li et al. 2010). Bei dieser Methode wurden die Hepatozyten in der Leber durch eine sequentielle Perfusion mit einer Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA)-Lösung und einer Kollagenase-Lösung aus dem Gewebeverband gelöst, so dass sie anschließend vereinzelt werden konnten. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Kollagenase-Perfusion sowie das Ansetzen der einzelnen Perfusionslösungen beschrieben

3.4.1. Erstellen der Stammlösungen

10x Leffert´s Stammpuffer:

23,83 g HEPES (Sigma-Aldrich)

2,24 g KCl (Merck)

75,87 g NaCl (J.T. Backer, Denventer/Holland)

1,38 g NaH₂PO₄-H₂O (Merck)

18,02 g alpha-D-Glukose (Sigma-Aldrich)

Die Zusätze wurden in destilliertem Wasser gelöst, so dass ein Endvolumen von 1000 ml erreicht wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH (Merck) auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde steril durch ein *Bottle Top*-Filtersystem mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (Corning, New York/USA) und bei 4°C gelagert.

EGTA-Stammlösung:

100 ml 10x Leffert's Stammpuffer

900 ml destilliertes Wasser

1,9 g EGTA (Sigma-Aldrich)

Die EGTA-Lösung wurde ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Kalziumchlorid (CaCl₂)-Stammlösung:

14 g CaCl₂ (Merck)

500 ml H₂O

3.4.2. Zusammensetzung der Perfusionslösungen

Perfusionsmedium I:

54 ml des 10x Leffert's Stammpuffer und 60 ml der EGTA-Stammlösung wurden mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 600 ml aufgefüllt.

Perfusionsmedium II:

50 ml des 10x Leffert's Stammpuffer wurden mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt.

Perfusionsmedium III:

50 ml des 10x Leffert's Stammpuffer und 5 ml der Kalziumchlorid-Stammlösung wurden mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Darin wurden anschließend 125 mg Kollagenase Typ 2 (215 U/mg, Worthington, Lakewood/USA) gelöst.

Die drei Lösungen wurden ebenfalls mit dem *Bottle Top*-Filtersystem (Porengröße von 0,2 µm) filtriert.

3.4.3. *In situ*-Perfusion

Die Perfusionsapparatur bestand aus einer Pumpe (Gerät XX8200230, Millipore, Bedford/USA), einem Schlauchsystem (Masterflex, Gelsenkirchen/Deutschland), einer Heizplatte PZ72 (Harry Gestigkeit, Düsseldorf/Deutschland) und einem Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel/Deutschland). Die Perfusionsmedien I-III wurden

für die Perfusion im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Schlauchsystem bestand aus einem Ansaugschlauch sowie einem weiteren Schlauch und einer Luftfalle. Der Ansaugschlauch wurde durch die Pumpe geführt und endete in der Luftfalle. Von der Luftfalle führte der zweite Schlauch zu einer 22G-Venenverweilkanüle (B.Braun, Melsungen/Deutschland). Die Perfusionsmedien sollten während der Leberperfusion durch die Venenverweilkanüle über die obere Hohlvene (*Vena cava superior*) in die Leber fließen. Vor der Perfusion wurde das Schlauchsystem mit einer 0,9%-Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gespült. Während der Spülung wurde die Flussrate auf 7 ml/min kalibriert.

Für die Isolation muriner Hepatozyten wurden C57Bl/6J-Mäuse verwendet. Aus einer Maus konnten etwa 20 Millionen Hepatozyten isoliert werden. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Applikation einer Ketamin/Xylazin-Narkoselösung narkotisiert:

Ketamin/Xylazin-Narkoselösung:

- 1 ml Ketamin (entspricht 100mg Ketamin) (Albrecht, Aulendorf/Deutschland)
- 0,15 ml Xylazin (entspricht 3mg Xylazin) (Rompun, Bayer, Leverkusen/Deutschland)
- 3,85 ml 0,9%ige NaCl-Lösung

Je nach Körpergewicht wurden den Mäusen zwischen 100-200 µl der Lösung intraperitoneal injiziert.

Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe begann die Operation mit dem Desinfizieren des Bauches mit einer 80%-Ethanolösung (Th. Geyer, Hamburg/Deutschland). Zur Perfusion wurden die Mäuse auf eine erwärmte Heizplatte (37°C) gelegt. Der Bauchraum wurde mit einem V-förmigen Schnitt eröffnet. Entlang der medialen Axillarlinie wurde der Thorax eröffnet, so dass der Bauchraum und das noch schlagende Herz sichtbar waren. Die Darmschlingen wurden zur besseren Darstellung der unteren Hohlvene (*Vena cava inferior*) aus dem Bauchraum luxiert. Ein 3-0 USP Seide-Faden (Resorba, Nürnberg/Deutschland) wurde zur späteren Fixierung der Venenverweilkanüle unter die obere Hohlvene (*Vena cava superior*) gelegt. Die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) wurde kaudal eröffnet. Die Venenverweilkanüle wurde über den rechten Vorhof in die obere Hohlvene eingeführt und mit dem 3-0 Faden fixiert. Die untere Hohlvene (*Vena Cava inferior*) wurde anschließend mit einer Gefäßklemme (F.S.T., Heidelberg/Deutschland) abgeklemmt. Die Leber wurde nun 4 Minuten mit dem Perfusionsmedium I perfundiert, um das Blut in der Leber zu entfernen. Zugleich wurde die Portalvene (*Vena portae*) eröffnet, um einen Abfluss für das Blut und die Perfusionslösungen zu schaffen. Anschließend wurde die Leber für 2 Minuten mit dem Perfusionsmedium II perfundiert. Im letzten Schritt erfolgte der Verdau durch die Perfusion mit dem Perfusionsmedium III für etwa 20 Minuten. Dabei war ein Anschwellen der Leber zu beobachten.

Primäre humane Hepatozyten wurden analog zu dem beschriebenen Verfahren aus einem Leberpräparat nach einer Lebertransplantation isoliert. Die Perfusion erfolgte in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Maura Dandri (*1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf*). Die Perfusionsmedien flossen hierbei in einen Ast der Portalvene. Das Einverständnis der Patienten zur Verwendung des Leberpräparates für die Forschung lag vor (PD Dr. Jörg-Matthias Pollok, *Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf*).

Die Hepatozyten wurden in den folgenden Schritten auf Eis kühl gehalten, um ihre Vitalität zu erhalten. Alle verwendeten Medien wurden ebenfalls auf Eis gekühlt. Zwei Petrischalen wurden mit Perfusionsmedium I befüllt und auf Eis gekühlt. Die perfundierte Leber wurde aus dem Situs frei präpariert und in die erste Petrischale überführt. Dort wurde die Leber kurz gespült und in die zweite Petrischale überführt. Mit einem Zellschaber (Sarstedt) wurden die Hepatozyten aus dem Digestat gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Filtration (100 µm Nylon Filter, Becton Dickinson Biosciences) von den unverdauten Leberstücken sowie Kapselresten getrennt und in ein 50 ml-Reagenzgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 1 Minute bei 50 x g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5810R, Hamburg/Deutschland) und in 10 ml Waschmedium (Hepatozyte Washmedium, Invitrogen) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (50 x g, 1 Minute, 4°C) und im Kulturmedium bzw. im Transduktionsmedium resuspendiert. Mittels einer Trypanblau-Färbung wurden die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen in einer *Neugebauer-Zählkammer* bestimmt.

3.4.4. Transduktion primärer Hepatozyten für die Kultivierung *in vitro*

Nach der Isolation wurden die Zellen in h-SFM (Invitrogen), das als Zusatz 8 µg/ml Polybren enthielt, resuspendiert und in 6-Loch-Platten für adhärent wachsende Zellen (Greiner Bio-One) überführt (250.000 Zellen pro Loch). Der vektorhaltige Überstand wurde dann in einer gewählten Menge in das Kulturmedium pipettiert. Die Zellen wurden im Zellinkubator kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium mit dem vektorhaltigen Überstand abgesaugt und 2 ml h-SFM ohne Polybren pro Loch zur weiteren Kultivierung *in vitro* dazugegeben. Anschließend wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Die Bestimmung der Transduktionsrate erfolgte durch eine durchflusszytometrische Messung 4-5 Tage nach der Transduktion.

3.4.5. Transduktion primärer Hepatozyten für die Transplantation

Für die Transduktion und anschließende Transplantation wurden die primären Hepatozyten nach der Isolation in h-SFM, das als Zusatz 8 µg/ml Polybren enthielt, resuspendiert und in

6-Loch-Suspensionsplatten (Greiner Bio-One) überführt (200.000 Zellen pro Loch). Zu der Zellsuspension wurde nun der vektorhaltige Überstand gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde lang in Suspension im Zellinkubator mit den lentiviralen Vektoren transduziert. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert. Das Medium mit dem vektorhaltigen Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden für die Transplantation in h-SFM resuspendiert, so dass sich 1 Millionen Zellen in 40 µl h-SFM befanden. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

3.5. Transplantation von Zellen in die Leber

Die Zellen wurden durch das Verfahren der intrasplenischen Injektion transplantiert (siehe Kapitel 2.5.). Für die Transplantation wurden die Mäuse narkotisiert. Die Operationsfläche wurde mit sterilen Tüchern abgedeckt und das sterile Operationsbesteck wurde auf die Tücher platziert. Folgendes Operationsmaterial wurde für die Transplantation verwendet:

MikRon 9mm AUTOCLIP Physicians Kit (Becton Dickinson Biosciences)

Schere (F.S.T., Heidelberg/Deutschland)

Nadelhalter (F.S.T.)

Gebogene Pinzette (F.S.T.)

Pinzette (F.S.T.)

Resorba Seide, Schwarz 3-0 USP, nicht resorbierbar (Resorba)

Ethicon Vicryl 3-0 USP, resorbierbar (Johnson & Johnson Medical, Norderstedt/Deutschland)

Ethicon Vicryl Plus 3-0 USP, resorbierbar (Johnson & Johnson Medical)

Ethicon Ethilon 3-0 USP, nicht resorbierbar (Johnson & Johnson Medical)

Einmalkanüle (26 Gx1/2") (B.Braun)

Polysteribox (Ritter, Schwabmünchen/Deutschland)

Silikon Noppenmatte (Th. Geyer)

Sterilisationssiegel (Th. Geyer)

Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe wurde die linke Flanke der Mäuse rasiert, so dass der Bereich, unter dem sich die Milz befand, weiträumig vom Fell befreit war. Durch einen etwa 1 cm langen Hautschnitt an der linken Flanke, Durchtrennung der darunter liegenden Bauchmuskulatur und Eröffnung des Peritoneums wurde die Milz dargestellt. Im nächsten Schritt wurde die Milz aus dem Situs luxiert, ohne dabei die Milzgefäße (*Arteria und Vena splenica*) zu durchtrennen. Die zu transplantierten Zellen wurden in eine 1 ml-Spritze aufgenommen und mit Hilfe einer Kanüle in den distalen Pol der Milz injiziert. Um eine Milzblutung an der Einstichstelle zu verhindern, wurde der distale Pol mit einem 3-0 Faden legiert. Nach der Injektion wandern die Zellen durch die Portalvene in die Leber und wachsen

dort an. Regelmäßig bleibt auch ein gewisser Anteil der Zellen in der Milz hängen und wächst dort an.

Nach der Transplantation wurde die Milz wieder in den Situs luxiert. Die Bauchmuskulatur wurde mit einem 3-0 Faden zusammengenäht und die Hautwunde wurde mit einem Clipper verschlossen. In dieser Arbeit erfolgte die Zelltransplantation mit verschiedenen Versuchstieren und Zellen. Die Transplantation wurde daher abhängig vom Zelltyp und dem Versuchstier in einigen Schritten modifiziert.

3.5.1. Transplantation von BON-Zellen in NOD/SCID-Mäuse

Für die Transplantationsversuche mit der BON-Tumorzelllinie wurde das *None-Obese Diabetic/Severe Combined Immundeficiency* (NOD/SCID)-Mausmodell verwendet. Die Tiere ermöglichen auf Grund einer schweren kombinierten Immundefizienz eine Transplantation xenogener wie auch fluoreszenzexprimierender Zellen.

Für die Transplantation wurden 4-16 Wochen alte Tiere verwendet. Die gewünschte Anzahl der zu transplantierenden Zellen pro Maus wurde in 200 µl Transplantationsmedium (DMEM+GlutaMAX mit 2% FBS) aufgenommen und bis zur Transplantation bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für die Transplantation wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Applikation der Ketamin/Xylazin-Narkoselösung narkotisiert. Nach Eintreten der nötigen Narkosetiefe wurde die Zellsuspension (200 µl pro Maus) wie oben beschrieben intrasplenal injiziert. Um ein Tumorwachstum in der Milz zu verhindern, wurde den Tieren die Milz entnommen. Dazu wurden die Milzgefäße am Gefäßpol mit einem 3-0 Faden legiert und distal der Ligation durchtrennt. Dies geschah etwa 15 Minuten nach der intrasplenalen Injektion der Zellen. Während dieses Zeitraumes hatten die meisten Zellen die Milz verlassen und befanden sich in der Portalvene oder im Gefäßsystem der Leber. Die Operationswunde wurde wie oben beschrieben verschlossen. Zur Infektionsprofilaxe erhielten die Tiere ein Antibiotikum (Enrofloxacin), das ihnen subkutan in den Nacken injiziert wurde:

Enrofloxacin-Lösung:

0,4 ml Enrofloxacin (entspricht 10 mg Enrofloxacin) (Baytril®, Bayer, Leverkusen/Deutschland)

9,6 ml 0,9%ige NaCl-Lösung (Baxter, Unterschleißheim/Deutschland)

Pro Tier wurden 200 µl der Antibiotikalösung subkutan injiziert.

3.5.2. Transplantation von FH-hTERT in uPA/SCID-Mäuse

Für die Transplantationsversuche mit den FH-hTERT wurde das uPA/SCID-Mausmodell verwendet. Die FH-hTERT weisen *in vivo* - anders als die BON-Zellen - kein unkontrolliertes Wachstum auf. Daher brauchen die Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den

mauseigenen Hepatozyten, um effektiv in der Leber anzuwachsen und zu proliferieren. Dieser Wachstumsvorteil ist im uPA/SCID-Mausmodell gegeben (siehe Kapitel 2.5.3.). Für die Transplantationsversuche mit den FH-hTERT wurden uPA^{+/-}/SCID-Mäuse verwendet, die bei der Transplantation ein Alter von 3 Wochen besaßen. Um das Anwachsen zusätzlich zu verstärken, wurden die Tiere 24 Stunden vor der Transplantation mit Monocrotalin (MCT) vorbehandelt. Monocrotalin ist ein Alkaloid, was toxisch auf sinusoidale Epithelzellen und Kupferzellen wirkt. Durch die Schädigung dieser Zellen wird das Engraftment transplanteder Zellen verbessert (Joseph et al. 2006).

Monocrotalin (MCT)-Lösung:

40 mg Monocrotalin-Pulver (Sigma-Aldrich) wurde in 1 ml PBS mit 150 µl HCl (1 Molar) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde anschließend mit einer NaOH-Lösung (1 Molar) auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde mit PBS auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt.

Die angesetzte MCT-Lösung wurde intraperitoneal injiziert, so dass jede Maus 0,2 mg MCT pro Gramm Körpergewicht erhielt.

Für die Transplantation wurden pro Maus 1.000.000 Zellen in 40 µl Transplantationsmedium (DMEM+GlutaMAX mit 2% FBS) aufgenommen und bis zur Transplantation bei Raumtemperatur aufbewahrt. Da die uPA-Mäuse an einem schweren Leberschaden leiden und die Ketamin/Xylazin-Narkose vor allem in der Leber verstoffwechselt wird, wäre diese Narkoseform für die Tiere tödlich. Daher wurde bei diesem Mausmodell Isofloran als Narkosemittel verwendet. Nach Eintreten der Narkose wurden die Zellen wie oben beschrieben durch eine intrasplenale Injektion transplantiert.

3.5.3. Transplantation primärer Hepatozyten in uPA/SCID-Mäuse

Die Transplantationsversuche mit primären Hepatozyten wurden mit uPA/SCID-Mäusen durchgeführt. Wie bereits erwähnt, besitzen die transplantierten Hepatozyten einen Wachstumsvorteil gegenüber den mauseigenen Hepatozyten, die das uPA-Transgen exprimieren. Dieses ermöglicht ein effektives Anwachsen und Proliferation der transplantierten primären Hepatozyten. In dieser Arbeit wurden primäre murine Hepatozyten in 3 Wochen alte uPA^{+/-}/SCID-Mäuse transplantiert, während für die Transplantationsversuche mit primären humanen Hepatozyten 3 Wochen alte uPA^{+/-}/SCID-Mäuse verwendet wurden. Für die Transplantation wurden pro Maus 1.000.000 Zellen in 40 µl h-SFM aufgenommen und bis zur Operation bei 4°C aufbewahrt. Die Tiere wurden wie bereits beschrieben mittels Isofloran narkotisiert. Die Transplantation erfolgte wie oben beschrieben durch eine intrasplenale Injektion.

3.6. Histologie der Leber

3.6.1. Fixierung der Leber

Für die Fixierung der Präparate wurden folgende Lösungen verwendet:

Paraformaldehyd (PFA)-Lösung:

4 g PFA-Pulver (Sigma-Aldrich) wurde in 100 ml PBS gelöst. Die Lösung des Pulvers erfolgte bei einer Temperatur von ca. 60°C (Dauer etwa 1,5 Stunden).

Succrose-Lösung:

20 g Succrose (Merck) wurde in 100 ml destilliertes Wasser gelöst.

Die entnommenen Leberlappen wurden für 4 Stunden bei 4°C in der PFA-Lösung fixiert. Danach wurde die PFA-Lösung abgesaugt und die Leberpräparate wurden für 48 Stunden bei 4°C mit der Succrose-Lösung entwässert. Nach der Fixierung wurden die Leberlappen in *Tissue-Tek Cryomold Intermediate*-Einbettformen (Sakura, Torrance/USA) überführt, die mit *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (Sakura, Alphen aan den Rijn/Niederlande) gefüllt waren, und unmittelbar danach in -80°C gekühltem Methylbutan (Sigma-Aldrich) schockgefroren. Die Leberpräparate wurden im Block aus den *Tissue-Tek Cryomold Intermediate*-Einbettformen geholt und bei -80°C gelagert.

3.6.2. Anfertigung von histologischen Schnitten am Kryotom

Die Kryoschnitte wurden an dem *Cryo-Star HM560* (Microm, Walldorf/Deutschland) bei einer Temperatur von -19°C und einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt. Hierbei wurden karbonbeschichtete C-35 Mikrotome-Klingen (Feather, Osaka/Japan) verwendet. Die Leberschnitte wurden nach dem Schneiden durch elektrostatische Anziehungskraft auf einen Objektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht) gezogen und bei -80°C gelagert.

3.6.3. Fluoreszenz-Histologie

Für die Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Kryoschnitte mit dem *Fluoromount-G-Medium* (SouthernBiotech, Birmingham, USA) eingedeckelt. Hierfür wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und nach Zugabe eines Tropfens *Fluoromount-G-Mediums* mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig/Deutschland) eingedeckelt. Die Schnitte wurden für etwa 5 Minuten getrocknet und konnten anschließend am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

3.6.4. Immunhistochemische Peroxidasefärbung

Durch immunhistologische Methoden können Antigene in einer Probe identifiziert bzw. lokalisiert werden. In dieser Arbeit wurde die immunhistochemische Peroxidasefärbung als

eine der verfügbaren immunhistologischen Methoden verwendet, um ein Antigen zu identifizieren.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht darauf, dass ein (primärer) Antikörper an ein spezifisches, zu untersuchendes Antigen bindet. Im zweiten Schritt bindet ein sekundärer Antikörper an den primären Antikörper (indirekte Methode). Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert. Durch die Umsetzung eines Substrates mit Hilfe dieses Enzyms wird die Bindung des primären Antikörpers sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit sollten Fluoreszenzproteine durch eine immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht werden. Als Primärantikörper wurde ein *green fluorescent protein* (GFP)-IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (Nr. A11122, Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) verwendet. Der Antikörper bindet neben GFP auch *Cerulean* und *Venus*. Die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte durch die Bindung eines sekundären Antikörpers, an dem ein Enzym gekoppelt war, das eine Farbentstehung durch eine Enzym-Substrat-Reaktion auslöst. Hierfür wurde das DAKO REAL *EnVision Kit* (DAKO, Hamburg/Deutschland) verwendet, das aus folgenden Substanzen bestand:

Sekundäre Antikörper (DAKO REAL *EnVision HRP Rabbit/Mouse*):

Der sekundäre Antikörper ist mit einem Polymer bestückt, das mehrere Peroxidasen besitzt. Auf diese Weise soll das Signal, das nach einer Bindung des sekundären Antikörpers entsteht, verstärkt werden und die Sensitivität der Peroxidasefärbung erhöhen. Der sekundäre Antikörper bindet Antikörper, die aus einem Kaninchen oder einer Maus stammen.

Substrat-Chromogen-Lösung für die Peroxidasereaktion (DAKO REAL *DAB+ Chromogen*):

Der Peroxidase wird Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Bei der Peroxidasereaktion werden Protonen freigesetzt, die das farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das ebenfalls in der Lösung vorhanden ist, unter Bildung von Wasser zu einem braunfarbenen Endprodukt oxidieren.

Substratpuffer (DAKO REAL *Substrate Buffer*):

Die Substrat-Chromogen-Lösung wird für die Peroxidasereaktion mit dem Substratpuffer vermischt: 20 µl Substrat-Chromogen-Lösung + 1000 µl Substratpuffer. Im ersten Schritt wurden die Leberschnitte für 10 Minuten mit einer Lösung, bestehend aus Methanol (Walter CMP, Kiel) mit 3% Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland), bedeckt, um die endogenen Peroxidasen weitgehend zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte mehrmals für einige Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit einem *bovine serum albumine* (BSA)-Block (Dade Behring Marburg, Marburg/Deutschland) bedeckt und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Der BSA-Block diente zur Absättigung von freien

Bindungsstellen auf den Schnitten und führte zu einer Reduzierung unspezifischer Bindungen des primären Antikörpers. Im nächsten Schritt wurde der primäre GFP-Antikörper - 1:300 in PBS verdünnt - auf die Leberschnitte pipettiert. Für die Bindung des primären Antikörpers wurden die Präparate 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden danach mehrmals in PBS gewaschen. Nun wurde der sekundäre Antikörper auf die Präparate gegeben. Für die Bindung des sekundären Antikörpers wurden die Schnitte 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präparate wurden danach mehrmals für einige Minuten in der PBS gewaschen. Die Substrat-Chromogen-Lösung für die Peroxidasereaktion wurde nun auf die Leberschnitte pipettiert, so dass die Schnitte komplett mit der Lösung bedeckt waren. Nach einer Minute wurde die Peroxidasereaktion gestoppt, indem die Schnitte in destilliertes Wasser eingetaucht wurden. Die Peroxidasereaktion konnte zur Kontrolle auch direkt am Mikroskop beobachtet werden. Nach der Peroxidasefärbung wurden die Zellkerne mit Hämatoxillin (Sigma-Aldrich) angefärbt. Hierzu wurde das Hämatoxillin großflächig auf die Schnitte aufgetragen. Die Einwirkzeit für die Hämatoxillinfärbung betrug 1 Minute. Die Schnitte wurden anschließend für 20 Minuten unter Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurden die Schnitte mit *Aquatex* (Merck) und einem Deckglas auf dem Objektträger fixiert.

3.7. Molekularbiologische Methoden

3.7.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem *QIAamp DNA Micro Kit* (50) (Qiagen, Hilden/Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.7.2. LM-PCR

Die Methode der *Ligation-Mediated-Polymerase-Kettenreaktion* (LM-PCR) wurde 1989 von Lüdecke et al. beschrieben. Die LM-PCR ermöglicht eine Identifikation retroviraler Integrationsstellen im Zellgenom (Kustikova et al. 2008). Das integrierte Provirus wird von LTRs flankiert, deren Sequenzen bekannt sind. Das Prinzip der LM-PCR beruht darauf, dass ein Primer an eine Sequenz in der LTR des integrierten Provirus bindet und ausgehend von dem gebundenen Primer ein DNA-Strang bis in die genomische DNA synthetisiert wird. Durch die Ligation eines *Linkers* an das Ende der amplifizierten DNA-Sequenz kann der Abschnitt mit Primern, die an die LTR des Vektors und an den *Linker* binden, durch eine PCR amplifiziert werden. Nach der Amplifikation können die DNA-Sequenzen analysiert (Sequenzierung, etc.) und der Integrationsort des Vektors im Genom der Zelle identifiziert werden (Abbildung 7).

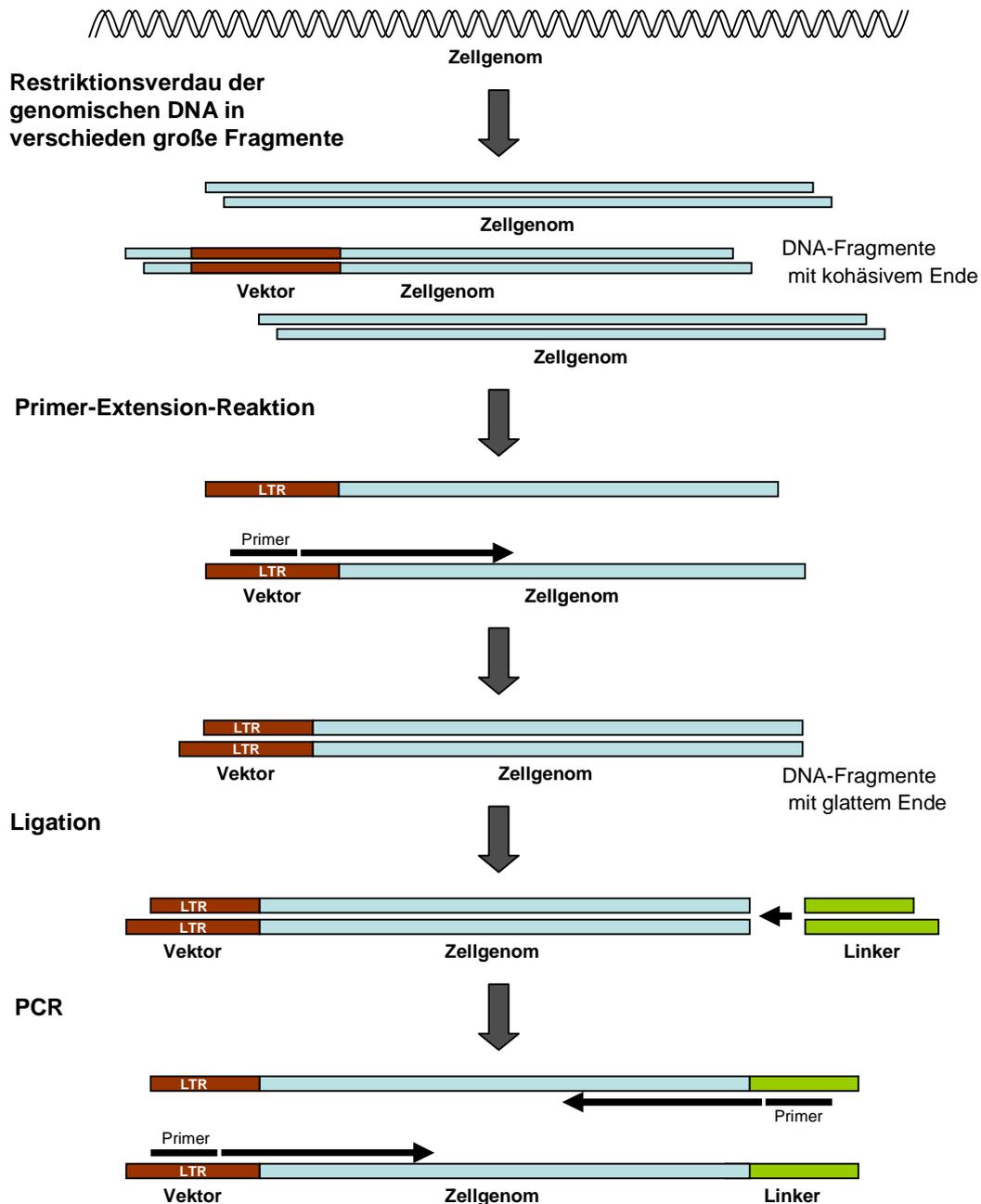


Abbildung 7: Prinzip der LM-PCR (vereinfacht dargestellt). Die genomische DNA der Zelle wird mit einem Restriktionsenzym geschnitten, so dass verschieden große DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden entstehen. Da die Sequenz des Vektors bekannt ist, kann ein Primer synthetisiert werden, der an die 3'-LTR des integrierten Vektors bindet. Mit Hilfe einer Polymerase wird eine DNA-Sequenz vom 3'-LTR des Vektors in 3'-Richtung bis in die (unbekannte) genomische DNA synthetisiert (Primer-Extension-Reaktion). In der Folge entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente mit einem glatten 3'-Ende. An dieses Ende wird in der Ligrationsreaktion ein *Linker* ligiert. Der *Linker* besitzt ein glattes Ende, das an die gesuchte DNA-Sequenz bindet, und ein kohäsives Ende, das eine Bindung in falscher Orientierung verhindert. Die Sequenz des *Linkers* ist dabei bekannt. Nun kann das DNA-Fragment durch eine PCR amplifiziert werden. Bei der PCR bindet ein Vorwärtsprimer an die bekannte 3'-LTR des integrierten Vektors und ein Rückwärtsprimer an die bekannte Sequenz des *Linkers*. Die unbekannte genomische DNA-Sequenz, die den Integrationsort des Vektors definiert, wird auf diese Weise amplifiziert und kann durch eine darauf folgende Sequenzierung analysiert werden (nach Steigerwald et al. 1990).

Die durchgeführte LM-PCR erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll von Kustikova et al. (2008) und wurde in der vorliegenden Arbeit in vier Schritte unterteilt:

3.7.2.1. Restriktionsverdau der genomischen DNA

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen verwendet: *Tsp509I* (New England BioLabs, Frankfurt a. Main/Deutschland) und *HpyCHIV4* (New England BioLabs). *Tsp509I* zerlegte die genomische DNA in durchschnittlich 133,32 Basenpaar (bp) große Fragmente, während *HpyCHIV4* die genomische DNA-Sequenz in durchschnittlich 1330,49 bp große DNA-Fragmente verdaute (Gabriel et al. 2009). Beide Restriktionsendonukleasen erzeugten kohäsive Enden. Folgender Ansatz wurde für die Zerlegung der genomischen DNA verwendet:

Restriktion der genomischen DNA:

0,2-1,0 µg genomische DNA

0,5 µl Restriktionsenzymlösung (*Tsp509I* oder *HpyCHIV4*)

3 µl 10x Restriktionsenzym-puffer (New England BioLabs)

0,5 µl RNase, DNase frei (Roche Applied Science, Penzberg/Deutschland)

30 µl H₂O

Beim Verdau der genomischen DNA mit *HpyCHIV4* wurde der Ansatz 2-5 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Der Ansatz mit *Tsp509I* als Restriktionsendonuklease wurde 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C und anschließend 2 Stunden im Wasserbad bei einer Temperatur von 65°C inkubiert. Nach dem Verdau wurden folgende Zusätze den Ansätzen beigemischt:

3 µl 3 M Natriumazetat (Merck)

75 µl Ethanol (100%) (Merck)

1 µl Glykogen (20 µg/µl Roche Applied Science)

Der Ansatz wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 20 Minuten zentrifugiert (4°C und 13000 rpm) (Eppendorf 5417R, Hamburg/Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 70 µl 70%igen Ethanol resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 Minuten bei 13000 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 10 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

3.7.2.2. Primer-Extension-Reaktion

Nach dem ersten Schritt erfolgte die Primer-Extension-Reaktion, die den zweiten Schritt der LM-PCR darstellt. Durch die Bindung eines spezifischen, biotinylierten Primers an die 3'-LTR wurde mit Hilfe einer Polymerase doppelsträngige DNA in 3'-Richtung vom integrierten

Provirus ins Zellgenom synthetisiert. Durch die Verwendung eines biotinylierten Primers konnten die synthetisierten DNA-Sequenzen an Streptavidin gekoppelte Partikel gebunden und auf diese Weise von den anderen DNA-Fragmenten, die keine Vektorsequenz enthalten, getrennt werden. Die Primer-Extension-Reaktion wurde mit folgenden Materialien durchgeführt:

Sequenz des biotinylierten Primers (Schmidt et al. 2007):

Vektor-Primer 1: Biotin-GAGCTCTCTGGCTAACTAGG

Die Synthese dieses Primers und aller weiteren verwendeten Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen.

Ansatz der Primer-Extension-Reaktion:

10 µl DNA aus dem ersten Schritt

1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene, La Jolla/USA)

2 µl 10x *Pfu*-Puffer (Stratagene)

0,4 µl dNTPs (10mM) (Stratagene)

1 µl biotinylierte Primer (0,25 pmol/µl)

20 µl H₂O

Die Primer-Extension-Reaktion erfolgte mit Hilfe eines PCR-Gerätes (Biometra, Göttingen/Deutschland). Die DNA wurde 15 Minuten bei 95°C denaturiert und 30 Minuten bei 64°C mit den Primern hybridisiert. Im Anschluss erfolgte die Elongation für 15 Minuten bei 72°C.

Die DNA wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR Purifikation Kit (250)* (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in 40 µl destilliertem Wasser gelöst.

Danach wurden magnetisierte, Streptavidin-beschichtete Partikel der DNA beigemischt (Dynabeads® M-280 Streptavidin 10 mg/ml, Dynal, Hamburg/Deutschland). Zunächst wurden 20 µl der Magnetpartikel mit 100 µl 2x BW-Puffer (10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7,5) gewaschen, indem sie in den Puffer gelöst, dann mit Hilfe eines magnetischen Reaktionsgefäßhalters (Dynal) am Rand des Reagenzgefäßes gesammelt und durch Abpipettieren vom Puffer wieder befreit wurden. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Magnetpartikel wurden in 40 µl 2x BW-Puffer resuspendiert. 40 µl dieser Lösung wurden nun mit 40 µl der aufgereinigten DNA vermengt. Die Bindung der Magnetpartikel an die biotinylierte DNA erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte 5 Stunden. Um eine stetige Durchmischung zu gewährleisten, rotierten die Lösungen während dieser Zeitspanne in einem Rotator (Rottberg, Göttingen/Deutschland). Durch zweimaliges Waschen mit 100 µl destilliertem Wasser unter der Verwendung des magnetischen Reaktionsgefäßhalters wurde nicht gebundene bzw. nicht-biotinylierte DNA aus dem

Gemisch entfernt. Die übrig gebliebenen Magnetpartikel mit der gebundenen DNA wurden anschließend in 5 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

3.7.2.3. Ligation

Einen Tag vor der Ligation wurde der doppelsträngige *Linker* durch *Annealing* zweier Oligonukleotide hergestellt:

Linker (Schmidt et al. 2007):

40 µl H₂O

20 µl Primer-*Linker* 1 (200 pmol/µl)

Sequenz: GACCCGGGGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGG

20 µl Primer-*Linker* 2 (200 pmol/µl)

Sequenz: CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATCTCCCG

Bei der Aneinanderlagerung der beiden Sequenzen entstanden ein glattes Ende und ein Ende mit Überhang, bestehend aus den Basen GACC (unterstrichen). Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 20 µl 5x *Annealing*-Puffer (0,5 M Tris-HCl, 0,35 M MgCl₂ (Merck), pH 7,4). Der Ansatz wurde erneut für 5 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Das Wasserbad wurde nun ausgeschaltet, und der Ansatz wurde über Nacht in dem Wasserbad belassen. Der *Linker*-Ansatz wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Die Ligation des *Linkers* mit der DNA erfolgte im folgenden Ansatz:

Ligationsansatz:

5 µl Streptavidin-beschichtete Partikel mit der gebundenen DNA

0,2 µl Ligase (400 U/µl, New England BioLabs)

1 µl 10x Ligations-Puffer (New England BioLabs)

1 µl Polylinker

2,8 µl H₂O

Die Ligation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 16°C. Der Ligationsansatz wurde dann zweimal mit 100 µl destilliertem Wasser unter Verwendung des magnetischen Reaktionsgefäßhalters gewaschen.

3.7.2.4. PCR

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte durch eine zweistufige (*nested*)-PCR. Durch eine erste PCR wird die gewünschte Sequenz amplifiziert. Die amplifizierte Sequenz dient nun als Matrize für eine zweite PCR. Hierbei werden Primer verwendet, die innerhalb der Matrize die gewünschte Sequenz amplifizieren. Die Technik der *nested*-PCR weist zwei Vorteile auf. Sie ermöglicht die Amplifikation einer gewünschten Sequenz, die nur in geringer

Menge - relativ zur Gesamtprobenmenge an DNA - in einer Probe vorhanden ist (hohe Sensivität). Die *nested*-PCR generiert dabei ausreichend DNA-Material für weitere Prozeduren (z.B. Sequenzierung). Zudem weist sie eine hohe Spezifität auf. Bei der klassischen (einstufigen) PCR kann es - auf Grund von unspezifischen Bindungen der Primer - zur Amplifikation unerwünschter DNA-Sequenzen kommen. Dieser Effekt wird durch eine zweite PCR, bei der im Gegensatz zur ersten PCR ein anderes Primerpaar verwendet wird, reduziert.

Folgende Materialien wurden für die erste PCR verwendet:

Primer-Sequenzen (Schmidt et al. 2007):

Vektor-Primer 2: AGCTTGCCTTGAGTGCTTCA

Linker-Primer 1: GACCCGGGAGATCTGAATTC

Ansatz der ersten PCR:

1 µl DNA

12,5 µl *Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix* (ABgene, Hamburg/Deutschland)

1 µl Vektor-Primer 2 (25 pmol/µl)

1 µl *Linker*-Primer 1 (25 pmol/µl)

PCR Programm (Biometra):

2 min 94°C → 30x (15 sec 94°C → 30 sec 60°C → 2 min 68°C) → 10 min 68°C → 4°C

Das Produkt dieser PCR wurde als Matrize für eine zweite PCR genutzt, bei der Primer verwendet wurden, die weiter innen liegen. Das Amplifikat der zweiten PCR besitzt daher eine kürzere Basenpaarlänge als das Amplifikat der ersten PCR. Folgende Materialien wurden für die zweite PCR verwendet:

Primer-Sequenzen (Schmidt et al. 2007):

Vektor-Primer 3: AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT

Linker-Primer 2: AGTGGCACAGCAGTTAGG

Ansatz der zweiten PCR:

1 µl DNA der ersten PCR (1:200 verdünnt)

12,5 µl *Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix* (ABgene, Hamburg/Deutschland)

1 µl Vektor-Primer 3 (25 pmol/µl)

1 µl *Linker*-Primer 2 (25 pmol/µl)

PCR Programm (Biometra):

2 min 94°C → 30x (15 sec 94°C → 30 sec 60°C → 2 min 68°C) → 10 min 68°C → 4°C

Im Anschluss wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde 1%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose-Pulver (Invitrogen) in 100 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Invitrogen) aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid (Invitrogen) versetzt. Die Lösung wurde dann in eine Gelkammer (PeqLab,

Erlangen/Deutschland) gegossen. Nachdem die Lösung sich zu einem Gel verfestigt hatte, wurde dieses in ein Gelsystem (PeqLab) überführt, das mit TAE-Puffer gefüllt war. Die DNA-Amplifikate wurden zusammen mit einem DNA-Ladepuffer (ein Sechstel des Gesamtvolumens, Fermentas, St. Leon-Rot/Deutschland) in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Bandengröße 10 µl 100 bp-DNA-Ladder (Fermentas) in eine freie Tasche pipettiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines Elektrophorese-Gerätes (Spannung 150 V, Stromstärke 150 mA, Biometra), das mit dem Gelsystem verbunden war. Das Elektrophorese-Gerät lieferte eine Gleichspannung an das Gelsystem, wobei der Minuspol an dem Gelende mit den Geltaschen angeschlossen war und der Pluspol an dem anderen Ende des Gels. Die negativ geladenen DNA-Banden wanderten je nach Ladung und Größe unterschiedlich schnell (vom Minuspol zum Pluspol) durch das Gel und wurden auf diese Weise aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden anschließend mit einem Einmalskalpell (B.Braun) ausgeschnitten, mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktions Kit* (250) (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben extrahiert und durch die Firma Invitrogen sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der Vektor-Primer 2 verwendet. Um Kontaminationen zu verhindern, musste das Skalpell nach dem Ausschneiden einer Bande mit Wasser gespült werden. Nach der Sequenzierung wurden die Integrationsstellen mit Hilfe des *QuickMap-Tool* (Appelt et al. 2009) im Genom lokalisiert.

3.7.3. Nachweis spezifischer Integrationsstellen mit der verschachtelten (*nested*)-PCR

Durch eine verschachtelte (*nested*)-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine durch die LM-PCR identifizierte (spezifische) Integrationsstelle eines lentiviralen Vektors auch in anderen DNA-Proben vorhanden war (zum Prinzip der *nested*-PCR siehe vorheriges Kapitel). Für die erste PCR wurde der Vektor-Primer 2 benutzt, der an eine Region in der 3'-LTR des Provirus band. Da die Sequenz des Integrationsortes des Vektors bekannt war, konnte ein für die Integrationsstelle spezifischer Primer synthetisiert werden, der an die genomische DNA-Sequenz in der Nähe des Provirus bindet (Zellgenom-Primer 1). Bei der zweiten PCR wurden zwei Primer genutzt, die weiter innen liegen. Der Vorwärtsprimer band eine Sequenz in der LTR des Vektors (Vektor-Primer 3) und der Rückwärtsprimer an eine genomische Sequenz in der Nähe des integrierten Vektors (Zellgenom-Primer 2).

Sofern in einer DNA-Probe die identifizierte (spezifische) Integrationsstelle des Vektors vorhanden war, sollten nach der *nested*-PCR Amplifikate entstehen, die durch eine gelelektrophoretische Auftrennung identifiziert werden können. Wenn der spezifische Integrationsort in der Probe nicht vorhanden war, entstand kein Amplifikat. Für die *nested*-PCR wurden folgende Primer verwendet:

Erste PCR:

Primer Sequenzen:

Vektor-Primer 2: AGCTTGCCTTGAGTGCTTCA

Zellgenom-Primer 1: TGCAGTTTTCTGGCTCTCCT

Zweite PCR:

Primer Sequenzen:

Vektor-Primer 3: AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT

Zellgenom-Primer 2: CAGTCTCTATGCAGTGGCTTTC

3.8. Durchflusszytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *BD FACS Canto II* (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg/Deutschland) für die durchflusszytometrischen Messungen verwendet. Für die Anregung und Messung der Fluoreszenzproteine *mCherry*, *Venus* und *Cerulean* wurden folgende Laser und Filter verwendet:

Tabelle 4: Verwendete Laser und Filter für die durchflusszytometrische Messung von Fluoreszenzproteinen.

	Wellenlänge des Lasers für die Anregung	LP-Filter	BP-Filter (bzw. weiterer LP-Filter)
mCherry	488 nm	655	670 LP-Filter
Venus	488 nm	502	530/30
Cerulean	407 nm	502	510/50

Die Messung und Analyse der Daten erfolgte durch die *BD FACS Diva Software* (Version 6.1.3).

3.9. Mikroskopie

3.9.1. Fluoreszenzmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop *Olympus IX81* (Olympus, Hamburg/Deutschland) verwendet, welches mit einer *Color-View II* Digitalkamera (Olympus) ausgestattet war. Das Mikroskop war mit entsprechenden Filtern für die Anregung und Identifikation von *mCherry* (U-MWIG2, Olympus), *Venus* (U-MNIBA2, Olympus) und *Cerulean* (F36-710, Semrock, Rochester/USA) ausgestattet. Die Kameraaufnahmen erfolgten mit Hilfe der *Cell^P Software* von Olympus (Version 2.8). Bei der Analyse von Präparaten, die *mCherry*, *Venus* und *Cerulean* enthielten, wurde für jedes

Fluoreszenzprotein eine Aufnahme mit dem entsprechenden Filter angefertigt. Die drei Aufnahmen wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Gimp* (Version 2.6.8) übereinander gelagert (*Overlay*). Eine Betrachtung aller Fluoreszenzemissionen zur gleichen Zeit war mit den verwendeten Filtern nicht möglich. Bei der Anfertigung mehrerer *Overlay*-Aufnahmen innerhalb eines Versuches oder einer Versuchsreihe musste darauf geachtet werden, dass stets die gleichen Belichtungszeiten im jeweiligen Emissionskanal verwendet werden. Andernfalls wäre ein Vergleich der Fluoreszenzen nicht möglich. Für die Dissertation wurden zusätzlich Tonwertkorrekturen der *Overlay*-Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Gimp* (Version 2.6.8) durchgeführt, um ein verbessertes Druckbild zu erhalten.

3.9.2. Konfokalmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *Nikon A1*-Konfokalmikroskop (Nikon, Düsseldorf/Deutschland) verwendet. Die Aufnahmen und deren Übereinanderlagerung (*Overlay*) erfolgten durch die *Nikon NIS-elements Software*. Bei den *Overlay*-Aufnahmen wurden Tonwertkorrekturen mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Gimp* (Version 2.6.8) durchgeführt, um ein verbessertes Druckbild zu erhalten.

3.10. Magnetresonanztomografie (MRT)

Die MRT-Aufnahmen wurden an einem klinischen 3 Tesla Ganzkörper Magnetresonanztomografen (Philips Medical Systems, Hamburg/Deutschland) in der Gruppe von PD Dr. Harald Ittrich in der Abteilung für *Klinische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf* durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden die Versuchstiere narkotisiert. Die Darstellung und Analyse der Aufnahmen erfolgte mit der *K-PACS Software* (Version 1.6.0).

4. Ergebnisse

4.1. RGB-Markierung: Eine neue Methode fluoreszenzbasierter Zellmarkierung

Für die RGB-Markierung wurden drei LeGO-Vektoren verwendet, die jeweils *mCherry* (rotes Fluoreszenzprotein), *Venus* (grün-gelbes Fluoreszenzprotein) und *Cerulean* (blaues Fluoreszenzprotein) unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors als Transgen in den Zellen exprimieren (RGB-Vektoren, Abbildung 8). Mit Hilfe der drei Vektoren sollten die drei Primärfarben rot, grün und blau (RGB) als Fluoreszenzproteine in den Zellen exprimiert werden (Weber et al. 2008, Weber et al. 2010).

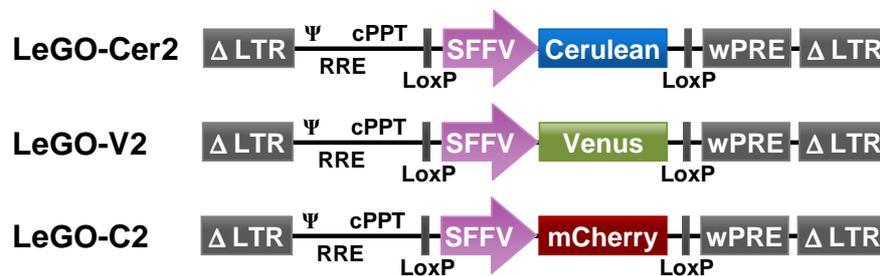


Abbildung 8: RGB-Vektoren. Das LeGO-Vektorsystem wurde für den Gentransfer der Fluoreszenzproteine in die Zellen genutzt. In der Abbildung ist schematisch der Aufbau der Vektoren dargestellt, wenn sie im Zellgenom integriert sind. Links befindet sich jeweils die 5'-LTR und rechts die 3'-LTR. Drei Vektoren wurden für die RGB-Markierung genutzt, von denen jeder eine der drei Primärfarben als Fluoreszenzprotein exprimiert (RGB-Vektoren). LeGO-Cer2 kodiert für das blaue Fluoreszenzprotein *Cerulean*, LeGO-V2 kodiert für das grün-gelbe Fluoreszenzprotein *Venus* und LeGO-C2 enthält die Sequenz für das rote Fluoreszenzprotein *mCherry*. Die Fluoreszenzproteine werden unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors in den Zellen exprimiert. Zusätzlich enthalten die Vektoren *LoxP*-Erkennungssequenzen, um bei Bedarf das Transgen mit dem Promotor aus den Zellen zu entfernen (nach Weber et al. 2008, Weber et al. 2011).

Wenn die drei RGB-Vektoren als virale Partikel gleichzeitig auf Zielzellen gegeben werden, sollten die Vektoren zufällig und in unterschiedlicher Anzahl in das Zellgenom der Zellen integrieren (Abbildung 9). In einer Zelle könnten zum Beispiel die Vektoren LeGO-C2 und LeGO-V2 im Genom integriert sein, wodurch auf Grund der Expression beider Fluoreszenzen in deren Addition ein gelbes Fluoreszenzsignal entstehen würde. In das Genom einer anderen Zelle könnten zufällig zwei Vektoren, die beide jeweils *mCherry* exprimieren, und ein weiterer Vektor, der *Venus* exprimiert, integriert sein, was in der Addition eine orange Fluoreszenzfarbe ergäbe. Folglich wäre die Zelle mit einer orangen Fluoreszenzfarbe markiert. Auf diese Weise könnten durch unterschiedliche Kombinationen der Expression der drei Fluoreszenzproteine - analog zur Dreifarbentheorie - viele

verschiedene Fluoreszenzfarben generiert werden (Abbildung 9). Nach diesem Prinzip sollte eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung entwickelt werden, die es erlaubt, Zellen durch lentivirale Vektoren individuell mit verschiedenen Fluoreszenzfarben zu markieren. Die Methode trägt den Namen RGB-Markierung. Da die Vektoren stabil in das Genom der Zielzelle integrieren, sollte das spezifische Expressionsmuster der Fluoreszenzproteine bzw. die individuelle Fluoreszenzfarbe auch an alle Tochterzellen weitergegeben werden. Auf diese Weise könnten Zellklone identifiziert und in ihrer Expansion verfolgt werden.

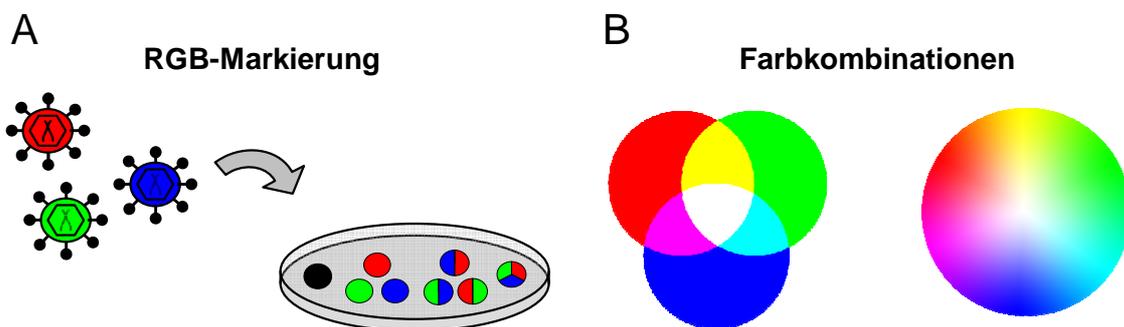


Abbildung 9: Prinzip der RGB-Markierung. Nach dem Prinzip der Dreifarbentheorie sollten durch unterschiedliche Kombinationen der Expression der drei Fluoreszenzproteine *mCherry*, *Venus* und *Cerulean* (RGB), viele verschiedene Fluoreszenzfarben generiert werden. (A) Die drei RGB-Vektoren (LeGO-Cer2, LeGO-V2 und LeGO-C2) werden als lentivirale Partikel gleichzeitig auf die Zellen gegeben. Es hängt vom Zufall ab, wie viele Vektoren und welche Kombinationen in das Genom einer Zelle integrieren. Beispielsweise sind in einer Zelle zwei Vektoren integriert, von denen einer für ein rotes Fluoreszenzprotein und der andere Vektor für ein grünes Fluoreszenzprotein kodiert. Durch die Addition beider Fluoreszenzfarben entsteht eine gelbe Fluoreszenzfarbe. (B) Analog zu der Dreifarbentheorie entstehen durch die Addition zweier Primärfarben in jeweils gleicher Intensität die Farben gelb, lila und türkis. Bei der Addition aller drei Primärfarben entsteht weiß. Zusätzlich können durch die Addition der drei Primärfarben mit unterschiedlichen Intensitäten viele weitere Farben generiert werden. Theoretisch kann somit durch die Addition eines roten, grünen und blauen (RGB) Fluoreszenzproteins jede spektrale Farbe als Fluoreszenz erzeugt werden (Weber et al. 2011).

4.2. Produktion lentiviraler Partikel für die RGB-Markierung

Im ersten Schritt wurden die lentiviralen Vektoren für die RGB-Markierung unter Zuhilfenahme von HEK 293T-Zellen produziert (siehe Kapitel 3.2.1.-3.2.4). Als Hüllprotein wurde VSV-G verwendet, das einen breiten Tropismus besitzt und eine Infektion vieler verschiedener Zelltypen ermöglicht (Burns et al. 1993). Anschließend wurde eine Titration der produzierten vektorhaltigen Überstände durchgeführt, um die Effizienz der Virusproduktion und die Zahl der viralen Partikel je Volumeneinheit (Titer) zu ermitteln (siehe Kapitel 3.2.5.). Die Titerbestimmungen der vektorhaltigen Überstände auf HEK 293T-Zellen ergaben Titer zwischen 141 und 248 Millionen viralen Partikeln pro ml (Abbildung 10).

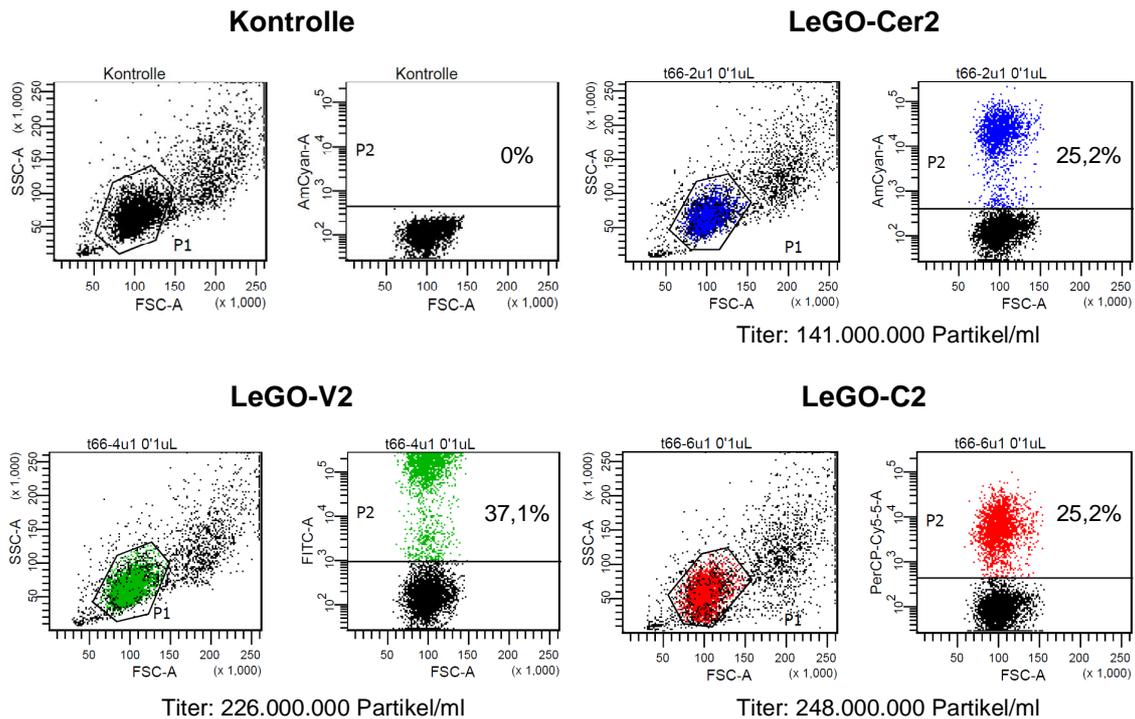


Abbildung 10: Titration der produzierten lentiviralen Vektoren. Der vektorhaltige Überstand wurde nach der Produktion titriert, um die Anzahl der lentiviralen Partikel je Volumeneinheit zu ermitteln. Die Transduktionsraten wurden durch eine durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Fluoreszenz 4 Tage nach der Transduktion bestimmt. So sind zum Beispiel 25,2% der ausgesäten 50.000 HEK 293T-Zellen durch die Zugabe von 0,1 μ l virushaltigen LeGO-Cer2-Überstandes transduziert worden. Dieses entspricht einem Titer von $1,41 \times 10^8$ viralen Partikeln pro ml. Analog dazu wurde auch der Titer der anderen Vektoren errechnet.

4.3. Kalkulation der Transduktionseffizienz für die RGB-Markierung

Für die RGB-Markierung von Zellen sollten die drei RGB-Vektoren als virale Partikel gleichzeitig auf die Zielzellen gegeben werden, wodurch die Zellen - je nachdem, wie viele und welche der drei RGB-Vektoren im Genom der Zelle integriert sind - unterschiedliche Mengen und Kombinationen der drei Fluoreszenzproteine synthetisieren (Abbildung 9). Durch die Addition der Fluoreszenzen in einer Zelle wird eine neue Fluoreszenzfarbe generiert. Um dies zu erreichen, musste eine geeignete Menge viralen Überstandes verwendet werden. Eine zu geringe Anzahl viraler Partikel für die RGB-Markierung führt dazu, dass die meisten Zellen nur mit einem Vektor transduziert werden. Demnach gibt es kaum Mehrfachintegrationen in einer Zelle und die Zellen sind lediglich mit den Primärfarben rot, grün oder blau markiert (vgl. Abbildung 14). Andererseits kann die Anzahl viraler Partikel auch zu groß sein. In diesem Fall besitzen die Zellen mehrere Kopien der drei RGB-Vektoren in ihrem Genom und in jeder Zelle werden gleichzeitig große Mengen aller drei Fluoreszenzproteine synthetisiert. Daraus folgt, dass die meisten Zellen in der Addition mit

weiß-grauen Fluoreszenzfarben markiert werden. Eine Unterscheidung der Zellen würde bei diesen Farben deutlich schwieriger sein (vgl. Abbildung 14).

Um Zellen mit möglichst vielen verschiedenen Farben zu markieren, die dabei auch gut voneinander zu unterscheiden sind, musste eine geeignete Multiplizität der Infektionen (MOI) gewählt werden. Die MOI ist ein gebräuchlicher Term in der Nutzung von Vektoren. Er besagt, wie viele virale Partikel pro Zelle für eine Transduktion genutzt werden. Eine MOI von 1 bedeutet, dass jeweils ein infektiöses Partikel pro Zielzelle zugegeben wird (z.B. 10.000 virale Partikel auf 10.000 Zellen). Gleichzeitig bedeutet dies unter der Voraussetzung, dass bei der Transduktion der gleiche Zelltyp verwendet wird wie bei der Titration, dass im Durchschnitt eine Vektorkopie pro Zelle zu erwarten ist. In diesem Fall beträgt die Transduktionsrate der Gesamtpopulation etwa 60% (Tabelle 5). Bei einer MOI von 1 werden nämlich einige Zellen mehrfach transduziert, wodurch andere Zellen wiederum nicht mit den viralen Partikeln transduziert werden. Im Durchschnitt ist aber dennoch pro Zelle eine Vektorkopie anzufinden. Fehse et al. (2004) errechneten mit Hilfe der *Poisson*-Verteilung aus der mathematischen Statistik die zu erwartende Transduktionsrate bei einer bestimmten Vektorkopiezahl pro Zelle sowie den jeweiligen Anteil mehrfach transduzierter Zellen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Erwartete Transduktionsrate und prozentuale Verteilung der Vektorkopien über der Zellpopulation bei verschiedenen durchschnittlichen Vektorkopiezahlen pro Zelle (nach Fehse et al. 2004).

Durchschnittliche Vektorkopiezahl pro Zelle	Transduktions-rate (%)	Erwartete prozentuale Verteilung der Zellen mit x Vektorkopien						
		1	2	3	4	5	6	>6
0,25	22,1	88,0	11,0	0,9	0,1	*	*	*
0,5	39,3	77,1	19,3	3,2	0,4	*	*	*
1	63,2	58,2	29,1	9,7	2,4	0,5	*	*
2	86,5	31,3	31,3	20,9	10,4	4,2	1,4	*
3	95,0	15,7	23,6	23,6	17,7	10,6	5,3	3,6
4	98,2	7,5	14,9	19,9	19,9	15,9	10,6	24,0

(* weniger als 0,5 %)

Die Transduktionseffizienz für die RGB-Markierung wurde so gewählt, dass sich im Durchschnitt pro Farbe eine Vektorkopie in der Zelle befindet. Demnach sollte bei der RGB-Markierung die Transduktionsrate für jeden einzelnen Vektor etwa 60% betragen. Bezogen auf alle drei Vektoren wird eine Gesamt-MOI von 3 erreicht, bei der 15,7% der Zellen nur

eine Vektorintegration haben (siehe Tabelle 5) und demnach mit einer der drei Primärfarben markiert werden. Gleichzeitig haben bei dieser MOI 23,6% der Zellen zwei Vektorkopien, 23,6% der Zellen besitzen drei und 36,5% der Zellen besitzen mehr als drei Vektorkopien. In diesen Zellen werden durch unterschiedliche Kombinationen der Expression der drei Fluoreszenzproteine Mischfarben generiert. Hierbei ist noch zu erwähnen, dass sich statistisch gesehen in diesen Gruppen eine geringe Anzahl an Zellen befindet, die jeweils den gleichen Farbvektor in ihrem Genom tragen und damit keine Mischfarbe, sondern eine der drei Primärfarben exprimieren (rot, grün oder blau). 5% der Zellen sind bei der kalkulierten Transduktionseffizienz nicht transduziert und besitzen somit keine Fluoreszenzfarbmarkierung.

Unter Verwendung dieser kalkulierten Transduktionseffizienz sollten die Zellen mit vielen gut unterscheidbaren Fluoreszenzfarben markiert werden. So sollte verhindert werden, dass die Zellen wegen einer zu geringen Vektorkopiezahl nur mit den Primärfarben markiert werden oder im anderen Extremfall auf Grund vieler Vektorkopien ausschließlich weiß-graue Fluoreszenzfarben besitzen. Zudem können zu viele Vektorintegrationen einen toxischen Effekt auf die Zellen haben (Kustikova et al. 2003, Modlich et al. 2005).

Um abschätzen zu können, wie viele verschiedene Farben bei dieser kalkulierten Transduktionseffizienz entstehen, wurde ein vereinfachtes Modell erstellt (Abbildung 11). Es wurde angenommen, dass die Intensität der Fluoreszenz unabhängig vom Integrationsort des Vektors im Genom der Zelle und für alle Vektorintegrationen gleich ist. Zudem wurde angenommen, dass bei einer Transduktionsrate von 60% pro Farbe die Vektorkopiezahl pro Zelle für jeden der drei RGB-Vektoren zwischen null und drei variiert. In diesem Modell könnten bei der gewählten Transduktionseffizienz insgesamt 63 verschiedene Farben generiert werden (Abbildung 11).

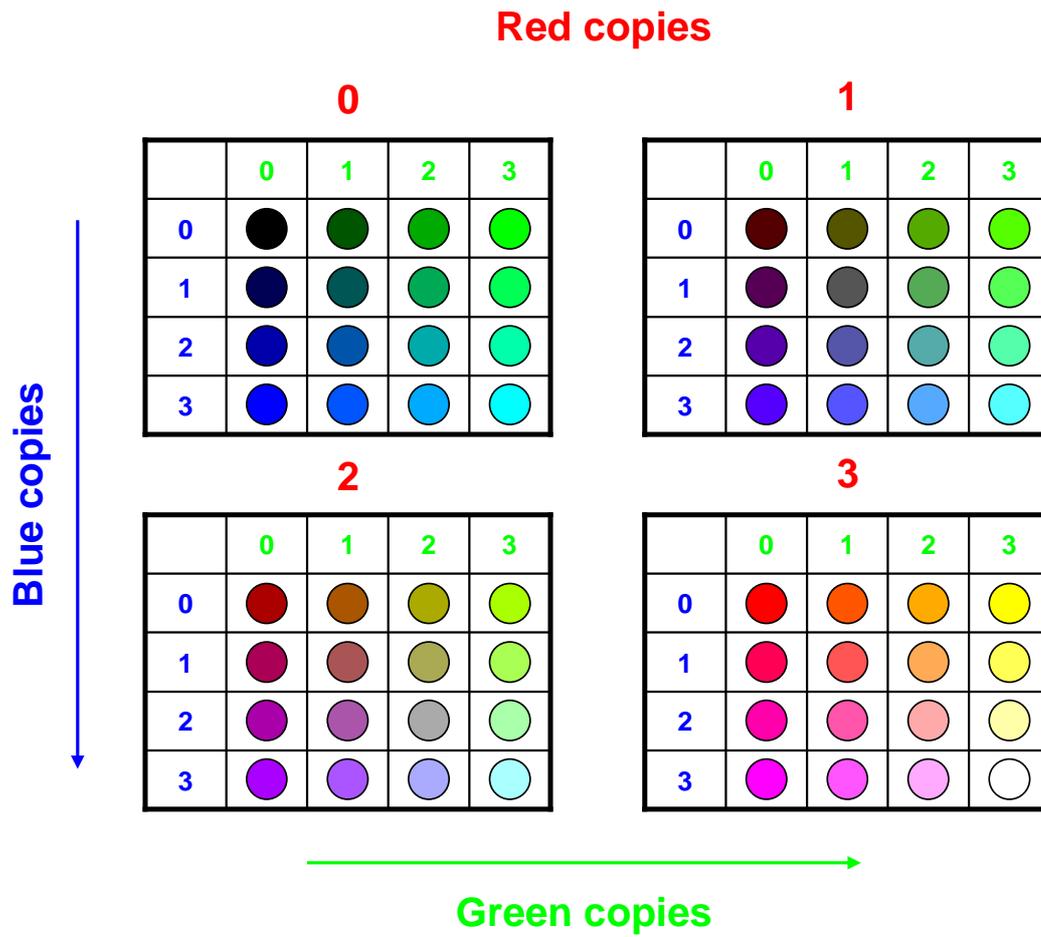


Abbildung 11: Vereinfachtes Modell zur Darstellung der Farbmöglichkeiten und der Anzahl der möglichen Farben. In diesem Modell wird angenommen, dass die Zahl der möglichen Vektorkopien pro Zelle für jeden einzelnen RGB-Vektor zwischen 0 und 3 liegt. Die Zeilen in jedem Quadranten geben an, wie viele Vektorkopien des Vektors LeGO-Cer2 (blau) sich in einer Zelle befinden. Die Spalten geben jeweils an, wie viele Kopien des Vektors LeGO-V2 (grün-gelb) sich in der Zelle befinden. Die vier Quadranten entsprechen der Vektorkopiezahl des Vektors LeGO-C2 in der Zelle. Aus der Addition der Farben und deren jeweiligen Intensität, die sich aus der Vektorkopiezahl ergibt, können die Farben simuliert werden, die bei den Konstellationen entstehen würden. In diesem Modell wird zusätzlich vereinfacht angenommen, dass die Expression des Fluoreszenzproteins und damit die Intensität jeder Primärfarbe bei jeder Integration gleich sind. Beispielsweise sendet eine Zelle ein pinkes Fluoreszenzsignal aus, wenn sich in ihr drei Vektorkopien des Vektors LeGO-C2, drei Vektorkopien des Vektors LeGO-Cer2 und keine Vektorintegration des Vektors LeGO-V2 befinden (erste Spalte und vierte Zeile im vierten Quadranten). Insgesamt gäbe es nach diesem Modell 63 verschiedene Farbmöglichkeiten (Weber et al. 2011).

Tatsächlich beeinflussen die Integrationsstellen die Expression eines Transgens. Teilweise können sich die Expressionslevel eines Transgens je nach Integrationsort um den Faktor vier unterscheiden (Kustikova et al. 2003) Daher kann sich die Intensität der Primärfarben abhängig vom Integrationsort des Vektors unterscheiden, wodurch weitere Mischfarben entstehen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache können bei der gewählten Transduktionsrate weitaus mehr als 63 verschiedene Farben generiert werden.

Ein weiterer Faktor musste bei der RGB-Markierung beachtet werden: Die Transduktionseffizienz ist bei gleicher MOI von Zelltyp zu Zelltyp verschieden (Zhang et al. 2004). Da jedoch der Titer durch Transduktion von HEK 293T-Zellen bestimmt worden ist, war es schwierig, mit Hilfe der MOI die zu erwartende Transduktionsrate einer anderen Zellpopulation (z.B. Hepatozyten) zu kalkulieren. Daher musste für jede neue Zielzelle eine Titration durchgeführt werden. Dazu wurden die neuen Zielzellen in einer bestimmten Anzahl in mehreren Ansätzen ausplattiert und jeweils mit verschiedenen MOIs transduziert. Vier Tage danach wurde die Transduktionsrate mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Für die RGB-Markierung eines neuen Zelltyps wurde schließlich pro RGB-Vektor jene MOI verwendet, bei der eine Transduktionsrate von etwa 60% erreicht wurde.

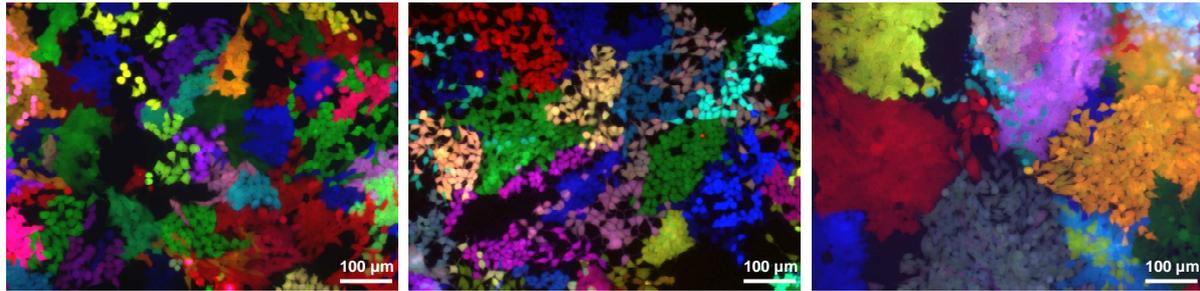
4.4. RGB-Markierung in der Zellkultur

Die Technik der RGB-Markierung von Zellen wurde zuerst in der Zellkultur angewandt. Hierbei sollte untersucht werden, ob es mit dieser Technik möglich ist, Zellen an Hand ihrer Fluoreszenzfarbe voneinander zu unterscheiden, und vor allem, ob es möglich ist, ihre klonale Expansion in der Zellkultur zu verfolgen.

Die RGB-Markierung wurde zunächst an HEK 293T-Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen in einer geringen Dichte ausplattiert und in ihrem Kulturmedium mit darin enthaltenem Polybren (8 µg/ml) kultiviert. Die RGB-Markierung erfolgte durch Zugabe der lentiviralen RGB-Vektoren in das Kulturmedium, wobei eine MOI von 1 je RGB-Vektor verwendet wurde (siehe Kapitel 4.3). Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei 1000 x g zentrifugiert.

Jeweils 3, 4 und 5 Tage nach der Transduktion wurden Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur angefertigt. In den *Overlays* der Fluoreszenzaufnahmen ist sichtbar, dass durch die RGB-Markierung viele verschiedene Mischfarben generiert worden sind, die mit dem bloßen Auge gut voneinander zu unterscheiden sind (Abbildung 12). Zudem sind mehrere zusammenhängende Areale sichtbar, in denen alle Zellen die gleiche Fluoreszenzfarbe besitzen. Die Zellen in diesen Arealen sind jeweils aus einer transduzierten Zelle entstanden, die ihre individuelle Fluoreszenzfarbe an alle Tochterzellen weitergegeben hat. An Hand der identischen Fluoreszenzfarbe konnten Zellklone identifiziert werden.

So konnte mit Hilfe der RGB-Markierung die klonale Zusammensetzung der Zellkultur und das spezifische Wachstumsverhalten von HEK 293T-Zellen visualisiert werden: HEK 293T-Zellen haben *in vitro* eine hohe Zellteilungsrate und sind, sobald sie auf den Zellboden angehaftet sind, relativ ortständig (Abbildung 12).



3d nach Transduktion

4d nach Transduktion

5d nach Transduktion

Abbildung 12: RGB-Markierung von HEK 293T-Zellen. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur als *Overlay*. HEK-293T-Zellen wurden in geringer Dichte ausplattiert und mit den RGB-Vektoren transduziert. Nach jeweils 3, 4 und 5 Tagen wurden Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur angefertigt. Durch die RGB-Markierung wurden viele Zellen individuell mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert. Bei der Betrachtung des ersten Bildes wird deutlich, dass durch die RGB-Markierung sogar verschiedene Grüntöne generiert wurden und voneinander zu unterscheiden sind. Auf den Fluoreszenzaufnahmen sind zudem zusammenhängende Zellcluster erkennbar, die alle den gleichen Fluoreszenzfarbton exprimieren. Diese Cluster sind Zellklone, die durch Zellteilung aus einer einzelnen transduzierten Zelle entstanden sind. Die RGB-Markierung wurde hier an alle Tochterzellen weitergegeben. Auf diese Weise konnte mit Hilfe der RGB-Markierung das spezifische Wachstumsverhalten von HEK-293T-Zellen visualisiert werden, welche *in vitro* eine hohe Zellteilungsrate besitzen und in der Regel zusammenhängend wachsen.

Die RGB-Markierung wurde im nächsten Schritt an anderen Zelllinien und auch an primären Zellen in der Zellkultur getestet. BON-Zellen, FH-hTERT und primäre Hepatozyten wurden mit den drei RGB-Vektoren transduziert. Zuvor musste für jeden Zelltyp - wie oben erwähnt - eine Titration der RGB-Vektoren durchgeführt werden, um die geeignete MOI für die RGB-Markierung zu ermitteln (siehe Kapitel 4.3.). Bei der Transduktion dieser Zellen wurde - wie auch bei den HEK 293T-Zellen - Polybren (8 µg/ml) in das jeweilige Kulturmedium gegeben. Bei diesen Zellen wurde jedoch auf eine anschließende Zentrifugation verzichtet. Der virale Überstand wurde lediglich in das Kulturmedium gegeben, und am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

Die Transduktion primärer differenzierter Zellen mit lentiviralen Vektoren ist vergleichsweise ineffizienter als die Transduktion von Zelllinien (Naldini et al. 1996, De Vos et al. 2003, Satoh et al. 2005). Daher besteht besonders bei primären Zellen die Gefahr, dass eine Transduktionsrate von 60% je RGB-Vektor nicht erreicht werden kann und damit die Anzahl der verschiedenen Fluoreszenzfarben zu gering ist. Doch mit den in dieser Dissertation verwendeten LeGO-Vektoren war es möglich, auch primäre Zellen wie Hepatozyten effizient zu transduzieren.

Sowohl BON-Zellen und FH-hTERT als auch primäre Hepatozyten konnten durch die Technik der RGB-Markierung mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert werden. Auch hier konnte das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Zellen *in vitro* visualisiert

werden (Abbildung 13). Während sich BON-Zellen in der Zellkultur ähnlich wie HEK 293T-Zellen verhalten, bewegen sich FH-hTERT bei ihrer klonalen Expansion entlang des Zellkulturbodens in alle Richtungen, so dass sich die Zellen der einzelnen Klone untereinander vermischen. In diesem Fall ist es deutlich schwieriger, Zellklone an Hand der Fluoreszenzfarbe zu identifizieren. Demgegenüber teilen sich primäre Hepatozyten *in vitro* äußerst selten.

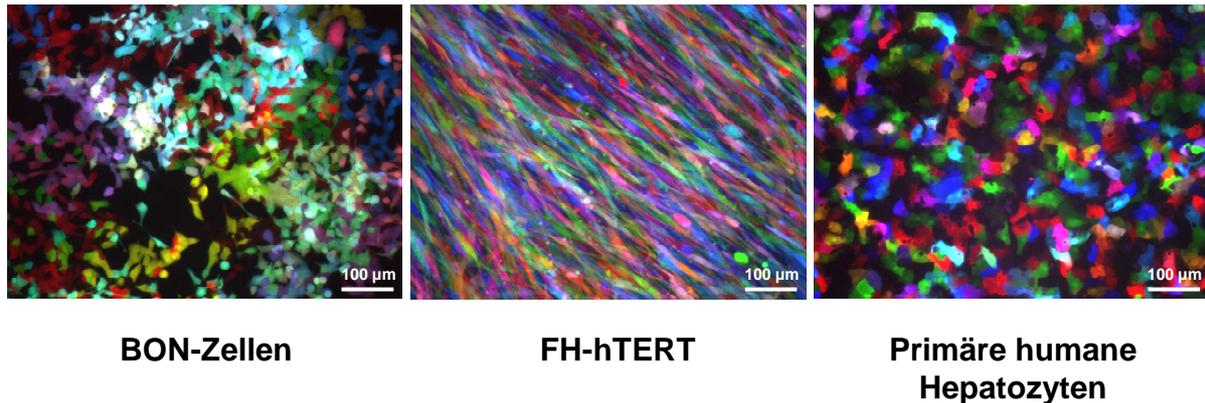
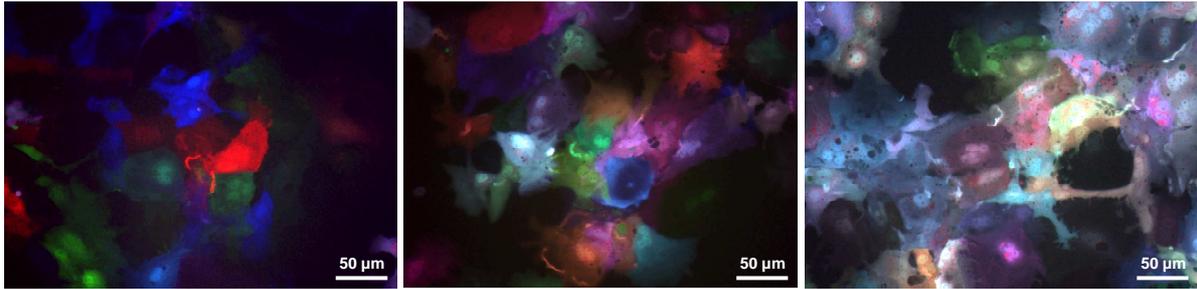


Abbildung 13: RGB-Markierung von BON-Zellen, FH-hTERT und primären humanen Hepatozyten. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur als *Overlay*. BON-Zellen (MOI 1 je Vektor), FH-hTERT (MOI 3 je Vektor) und primäre humane Hepatozyten (MOI 40 je Vektor) wurden gleichzeitig mit den drei RGB-Vektoren transduziert. Durch die RGB-Markierung wurde das spezifische Wachstumsverhalten der Zellen *in vitro* sichtbar: BON-Klone bleiben während der Zellexpansion weitgehend zusammen, während die FH-hTERT in verschiedene Richtungen wandern, wodurch es zu einer Durchmischung der Zellklone kommt. Primäre Hepatozyten teilen sich in der Zellkultur äußerst selten (Weber et al. 2011).

Wie im Kapitel 4.3. dargestellt, musste für die RGB-Markierung eine geeignete Transduktionsrate pro RGB-Vektor gewählt werden, um viele verschiedene Fluoreszenzfarben zu erzeugen, die gleichzeitig auch gut voneinander zu unterscheiden sind. Eine zu geringe Transduktionsrate führt dazu, dass sich oft nur eine Vektorkopie in den Zellen befindet, wodurch die Zellen lediglich mit den Primärfarben rot, grün und blau markiert werden. Bei einer zu hohen Transduktionsrate befinden sich von jeder Primärfarbe mehrere Kopien in einer Zelle, wodurch die Zellen mit weiß-grauen Fluoreszenzfarben markiert werden. Um beide Extreme zu verdeutlichen, wurden primäre murine Hepatozyten mit verschiedenen MOIs transduziert (Abbildung 14). Bei einer geringen Transduktionsrate (MOI 10 je RGB-Vektor) wurden die Hepatozyten hauptsächlich mit den Farben rot, grün und blau markiert, während bei einer hohen Transduktionsrate (MOI 80 je RGB-Vektor) Pastelltöne entstanden sind.



MOI 10

MOI 40

MOI 80

Abbildung 14: RGB-Markierung primärer muriner Hepatozyten mit unterschiedlichen Transduktionsraten. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur als *Overlay*. Primäre murine Hepatozyten wurden gleichzeitig mit den RGB-Vektoren mit unterschiedlichen MOIs transduziert. Bei einer MOI von 10 je RGB-Vektor wurden die Zellen zum großen Teil nur mit den Farben rot, grün und blau markiert, während bei einer MOI von 80 je RGB-Vektor eher weiß-graue Farben entstanden sind. Eine große Anzahl verschiedener Farben findet sich bei einer MOI von 40 je RGB-Vektor.

4.5. Klonale Zusammensetzung der Leberregeneration durch transplantierte primäre Hepatozyten

Obwohl das uPA-Modell seit 1963 erfolgreich angewandt wird, blieb die Klonalität der Repopulation transplantiert primärer Hepatozyten in diesem Modell bisher weitgehend ungeklärt. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob mit Hilfe der RGB-Markierung die klonale Zusammensetzung der Leberrepopulation und Regeneration durch intrasplenal transplantierte primäre Hepatozyten beurteilt werden kann.

4.5.1. Isolation und Transduktion primärer Hepatozyten

Primäre murine Hepatozyten für die Transplantation und Regeneration wurden aus einer C57Bl/6J-Maus durch die Methode der 2-Schritt-*(in situ)*-Kollagenase-Perfusion isoliert (siehe Kapitel 3.4.). Nach derselben Methode wurden auch primäre humane Hepatozyten aus einer resektierten Leber nach einer Lebertransplantation isoliert. Um ein effektives Engraftment und Integration der isolierten Zellen sicherzustellen, sollten die Zellen möglichst schnell nach der Isolation transplantiert werden. Je länger sich die Zellen *ex vivo* befinden, desto geringer ist ihr Potential, in der Empfängerleber anzuwachsen und zu integrieren. Zudem nimmt die Vitalität der Zellen ab (Giannini et al. 2003, Wang et al. 2004, Li et al. 2010, Lecluyse und Alexandre 2010).

Bei der zuvor erfolgten RGB-Markierung primärer Hepatozyten wurden die Zellen für etwa 12 Stunden mit den RGB-Vektoren inkubiert (siehe Kapitel 4.4.). Nach 12 Stunden *in vitro* wäre das Potential der Zellen ins Lebergewebe zu engraften und zu integrieren jedoch deutlich herabgesetzt. Die Dauer der Transduktion musste für die Transplantationsversuche also

deutlich reduziert werden. Daher wurden die primären Hepatozyten unter der Verwendung eines im Labor entwickelten Protokolls transduziert, das eine effiziente Transduktion primärer Hepatozyten innerhalb von nur einer Stunde ermöglicht (siehe Kapitel 3.4.5.). Bei der Verwendung dieses Protokolls musste auf Grund der kurzen Transduktionsdauer die Menge des vektorhaltigen Überstandes von einer MOI von 40 auf eine MOI von 80 je RGB-Vektor verdoppelt werden, um eine Transduktionsrate von etwa 60% je RGB-Vektor zu erreichen. Eine weitere Problematik kam hinzu. Die Transduktionsraten konnten vor der Transplantation nicht ermittelt werden, da für deren Bestimmung die Expression der Fluoreszenzproteine nötig war. Die Fluoreszenzen waren aber erst nach drei Tagen messbar und erreichten ihre volle Intensität nach fünf Tagen. Die Zellen mussten jedoch unmittelbar nach der Isolation und Transduktion transplantiert werden. Die Transplantation der RGB-markierten Zellen erfolgte also ohne genau zu wissen, ob eine effiziente Transduktionsrate für die RGB-Markierung erreicht worden war. Für die spätere Analyse wurde daher ein Teil der transduzierten Zellen für vier Tage *in vitro* kultiviert. Auf diese Weise konnte kontrolliert werden, ob die Transduktion effizient genug war, um die Hepatozyten mit vielen verschiedenen Mischfarben zu markieren (Abbildung 15).

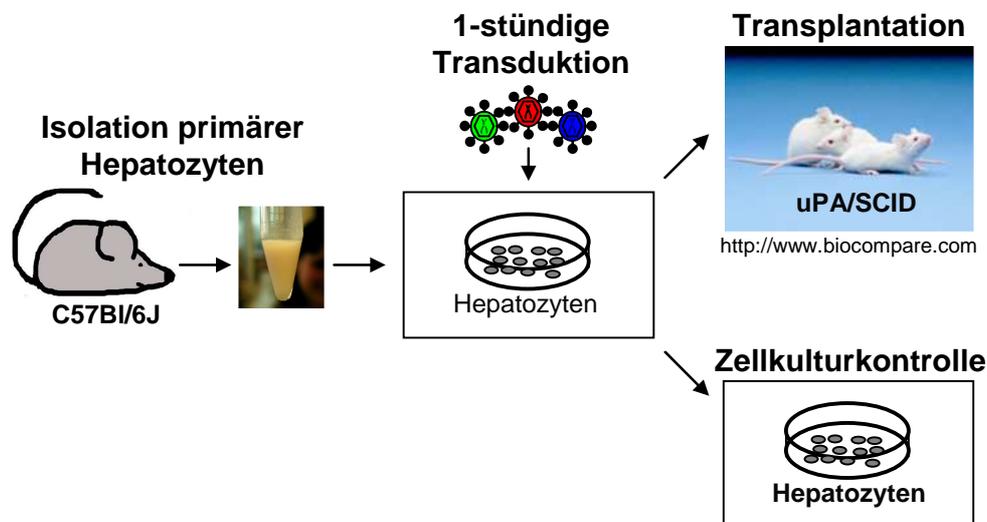


Abbildung 15: Isolation, Transduktion und Transplantation primärer Hepatozyten. Zunächst wurden primäre Hepatozyten aus einer C57Bl/6J-Maus durch eine 2-Schritt-Kollagenase-Perfusion isoliert. Die isolierten primären Hepatozyten wurden in Suspensionsplatten überführt und dort für die Dauer von einer Stunde mit den RGB-Vektoren transduziert. Unmittelbar danach wurden die Zellen durch intrasplenale Injektion in uPA/SCID-Mäuse transplantiert. Da die Transduktionsrate nach der einstündigen Transduktion nicht ermittelt werden konnte, wurde ein Teil der transduzierten Zelle als *in vitro*-Kontrolle kultiviert. Die Transduktionsrate konnte auf diese Weise vier Tage nach der Transduktion und Transplantation durch eine durchflusszytometrische Messung bestimmt werden.

4.5.2. Transplantation und Regeneration: RGB-markierte primäre murine Hepatozyten in heterozygoten uPA/SCID-Mäusen

Fünf heterozygoten uPA/SCID-Mäusen wurden jeweils 1 Millionen RGB-markierte primäre murine Hepatozyten transplantiert. Die Transplantation der Zellen erfolgte, wie im Kapitel 3.5.3. beschrieben, durch eine intrasplenale Injektion der Zellen. Ein Teil der Zellen wurde - wie oben beschrieben - als Kontrolle für die Transduktionseffizienz *in vitro* kultiviert. Die Analyse der Zellkulturkontrolle vier Tage nach der Transduktion ergab, dass die primären murinen Hepatozyten bei der einstündigen Transduktion mit einer MOI von 80 je RGB-Vektor mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert worden sind (Abbildung 16A). Ein geringer Anteil der Hepatozyten war jedoch nicht transduziert worden und besaß daher keine Fluoreszenzfarbmarkierung. Auch diese nicht-markierten Hepatozyten dürften entsprechend ihrem Anteil zur Repopulation der Mäuselebern beigetragen haben.

Vier Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse sakrifiziert, die Lebern aus dem Situs der Mäuse herauspräpariert und fixiert (siehe Kapitel 3.6.). Am Kryotom wurden 7 µm dicke Schnitte der gefrorenen Leberlappen angefertigt und am Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Durch die Fluoreszenz konnten die transplantierten Zellen in der Leber identifiziert werden. Zudem konnte durch die Technik der RGB-Markierung die klonale Zusammensetzung der Leberregeneration beurteilt werden. In der Leber konnten viele Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben identifiziert werden, woraus geschlossen werden kann, dass die Leber durch mehrere transplantierte Zellen repopuliert bzw. regeneriert worden ist. Mit Hilfe der RGB-Markierung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich die Zellen nach dem Engraftment und der Integration mehrmals in der Leber geteilt haben (Abbildung 16B). Dabei war innerhalb der meisten Repopulationsareale nur eine spezifische Fluoreszenzfarbe sichtbar. Diese Areale sind folglich durch Expansion einer einzelnen angewachsenen Zelle entstanden. Gleichzeitig gab es auch Repopulationsareale, innerhalb derer zwei bis vier unterschiedliche Fluoreszenzfarben sichtbar waren. Diese Areale wurden von mehreren angewachsenen Zellen gebildet (Abbildung 16C).

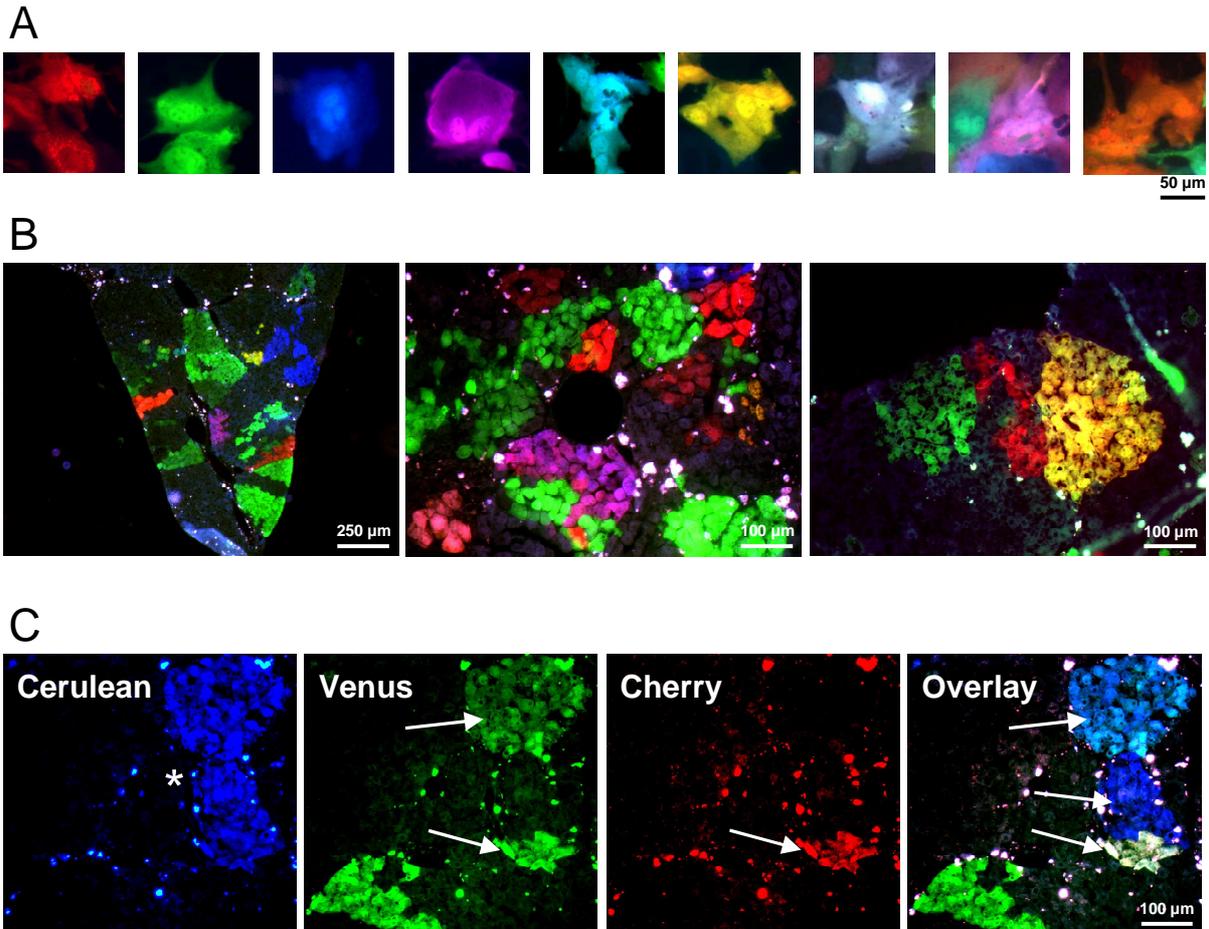


Abbildung 16: Regeneration der geschädigten Leber einer heterozygoten uPA/SCID-Maus durch RGB-markierte primäre Hepatozyten. (A) Ein Teil der transduzierten Zellen wurde für die Bestimmung der Transduktionsrate als *in vitro*-Kontrolle kultiviert. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur als *Overlay*. An den Einzelzellenaufnahmen wird deutlich, dass bei der einstündigen Transduktion mit einer MOI von 80 je RGB-Vektor die Hepatozyten mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert werden konnten. Somit wurden ausreichend hohe Transduktionsraten für eine effiziente RGB-Markierung erreicht. (B) Dargestellt sind Fluoreszenz-*Overlays* der Leberschnitte von uPA-Mäusen vier Wochen nach der Transplantation RGB-markierter primärer Hepatozyten. Durch die RGB-Markierung wird sichtbar, dass viele Zellen bzw. Zellklone in der Leber angewachsen sind und durch Proliferation unterschiedlich große Repopulationsareale gebildet haben. (C) Beispiel eines Repopulationsareals mit den Fluoreszenzaufnahmen der einzelnen Fluoreszenzfilter und deren Übereinanderlagerung als *Overlay*. An diesem Beispiel wird deutlich, dass bei der Verwendung einer einzigen Fluoreszenzfarbe als Marker die Zahl der Klone eines Regenerationsareals unterschätzt werden kann. Bei der Betrachtung einer Fluoreszenzfarbe - zum Beispiel *Cerulean* - könnte man annehmen, dass das Repopulationsareal von einer, vielleicht auch von zwei engrafteten Zellen gebildet worden ist (*). Bei der Betrachtung der roten und der grünen Fluoreszenz wird deutlich, dass das Areal aus 3 Klonen besteht. Ein oberer Klon exprimiert *Cerulean* und *Venus*, was im *Overlay* eine türkise Fluoreszenzfarbe ergibt. Der mittlere Klon exprimiert nur *Cerulean*, während der untere Klon alle drei Fluoreszenzproteine exprimiert und damit im *Overlay* eine weiße Fluoreszenz besitzt (Weber et al. 2011).

Die RGB-markierten Zellen in der Leber wurden zusätzlich durch eine immunhistochemische Färbung identifiziert (Abbildung 17). Hierbei wurden serielle 7 µm Leberschnitte angefertigt, von denen ein Leberschnitt am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und der jeweils darauf folgende Leberschnitt immunhistochemisch gefärbt wurde. Für die Färbung wurde ein GFP-Antikörper verwendet, der sowohl *Cerulean* als auch *Venus* als Antigen erkennt und bindet. *mCherry* konnte vom Antikörper jedoch nicht gebunden werden (siehe Kapitel 3.6.4.). Daher konnten Zellen, die ausschließlich *mCherry* exprimierten, nicht angefärbt werden. Die Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidasereaktion. Des Weiteren wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin angefärbt. Durch die immunhistochemische Färbung konnten die RGB-markierten Hepatozyten histologisch analysiert werden (Abbildung 17): Die transplantierten RGB-markierten Zellen haben sich in das Lebergewebe des Wirtes integriert und durch Proliferation morphologisch gesundes Lebergewebe gebildet. Mit Hilfe des Protokolls für eine kurzzeitige, einstündige Transduktion konnte sowohl die Vitalität der Zellen als auch das Potential, in die Leber zu integrieren und dabei gesundes Lebergewebe zu bilden, erhalten werden. In dem histologischen Bild ist zudem sichtbar, dass auch die wirtseigenen Hepatozyten die Leber regeneriert haben. In heterozygoten Mäusen kommt es häufig zu dem Effekt, dass einige Hepatozyten das uPA-Transgen durch somatische Rekombination verlieren und auf diese Weise gesundes Lebergewebe bilden können (Sandgren et al. 1991). Daher war auch außerhalb der Repopulationsareale gesundes Lebergewebe vorhanden. Einige der gesunden Areale könnten potentiell auch von nicht-transduzierten Hepatozyten gebildet worden sein (s.o.). Durch die Anfertigung serieller Schnitte konnten beide Methoden - die RGB-Markierung und die Immunhistochemie - parallel betrachtet werden. Mit beiden Methoden konnten die transplantierten Zellen eindeutig in der Leber identifiziert werden. Bei Anwendung der RGB-Markierung konnte zusätzlich die klonale Zusammensetzung der Zellen analysiert werden, was mit der immunhistochemischen Färbung nicht möglich war.

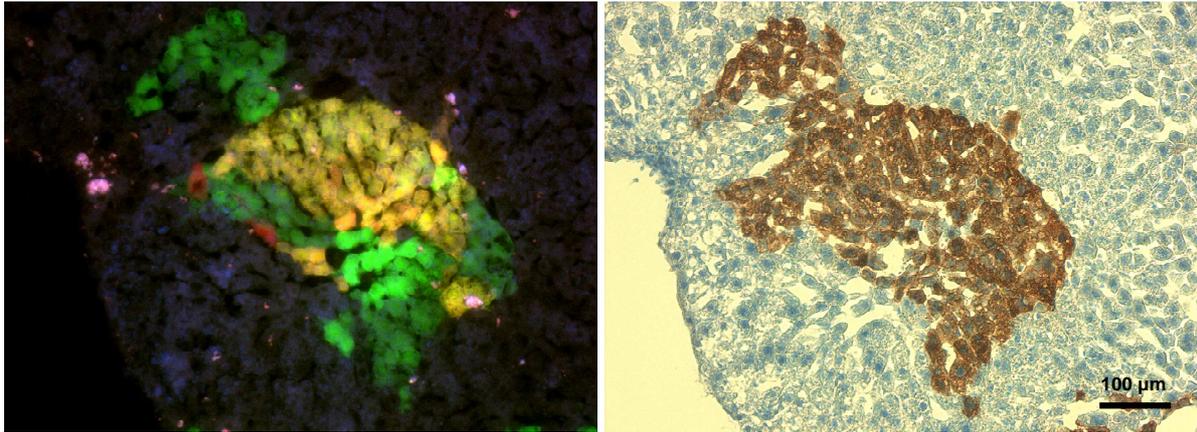


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung der Repopulationsareale. Zwei serielle 7 µm Leberschnitte eines Leberlappens wurden angefertigt. Einer der beiden Leberschnitte wurde am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ist als *Overlay* dargestellt (linkes Bild). Der zweite Schnitt wurde immunhistochemisch mit einem Primärantikörper gegen GFP gefärbt (rechtes Bild). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hämatoxyllin angefärbt. Die transplantierten Hepatozyten konnten hier zusätzlich zur Fluoreszenz durch eine zweite Methode identifiziert werden. Im histologischen Bild wird sichtbar, dass die transplantierten Zellen im Lebergewebe integriert sind und morphologisch gesundes Lebergewebe gebildet haben. Die Leber heterozygoter uPA/SCID-Mäuse wird auch durch wirtseigene Hepatozyten regeneriert, die das uPA-Transgen durch somatische Rekombination verloren haben. Daher ist auch um die Repopulationsareale herum gesundes Lebergewebe sichtbar. Ein geringer Anteil der Leber wurde wahrscheinlich auch durch nicht-transduzierte Zellen repopuliert, die mit diesen Methoden jedoch nicht identifiziert werden konnten.

4.5.3. Transplantation und Regeneration: RGB-markierte primäre humane Hepatozyten in homozygoten uPA/SCID-Mäusen

In einem zweiten Versuch wurden homozygote uPA/SCID-Mäuse als Empfängertiere gewählt, wobei hier die Repopulation und Regeneration durch humane Hepatozyten erfolgen sollte. In diesem Fall wurden jedoch keine frisch isolierten Hepatozyten verwendet, sondern nach einer Isolation eingefrorene Hepatozyten. Da die Transduktion frisch aufgetauter Hepatozyten im Labor noch nicht etabliert war, wurden für die Transduktion und Transplantation zwei Gruppen gebildet, in denen die Zellen entweder mit einer MOI von 80 oder einer MOI von 160 transduziert worden sind. In den *in-vitro*-Kontrollen wurde deutlich, dass die Transduktionsrate bei einer MOI von 80 zu gering war und die meisten Zellen lediglich mit den Primärfarben markiert worden sind. Bei einer MOI von 160 je RGB-Vektor wurden die Zellen mit vielen verschiedenen Farben markiert. Insgesamt musste für das Erreichen gleicher Transduktionsraten bei aufgetauten Zellen deutlich mehr viraler Überstand verwendet werden als bei frisch isolierten Hepatozyten.

Vier Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse sakrifiziert, die Lebern aus dem Situs herauspräpariert und fixiert (siehe Kapitel 3.6.). Die angefertigten Leberschnitte (7µm) wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auch hier konnten mit Hilfe der RGB-

Markierung die Repopulation und Regeneration visualisiert werden (Abbildung 18). In homozygoten Tieren konnten kreisrunde Repopulationsareale identifiziert werden, die jeweils eine spezifische Fluoreszenzfarbe zeigten. Stellt man sich die Regenerationsareale dreidimensional vor, so ergeben sich kugelförmige Regenerationsknoten. Diese dreidimensionale Struktur der Repopulationsareale in der Leber homozygoter uPA/SCID-Mäuse ist bereits beschrieben worden (Dandri et al. 2001, Meuleman et al. 2008). Durch die RGB-Markierung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die meisten Regenerationsknoten monoklonal sind und durch die Proliferation einer einzelnen angewachsenen Zelle entstehen. In den *Overlays* ist sichtbar, dass die Leber der homozygoten uPA/SCID-Mäuse nicht vollständig regeneriert wurde. Um die repopulierten Areale befinden sich viele autofluoreszierende Makrophagen, die im *Overlay* als weiß leuchtende Zellen sichtbar sind. Dieses deutet darauf hin, dass die Leber in diesen Arealen immer noch massiv geschädigt ist. Die Makrophagen phagozytierten die durch die uPA-Expression zu Grunde gegangenen Hepatozyten. Nur in den Regenerationsknoten ist morphologisch gesundes Lebergewebe gebildet worden. Hier befinden sich daher keine Makrophagen (Abbildung 18).

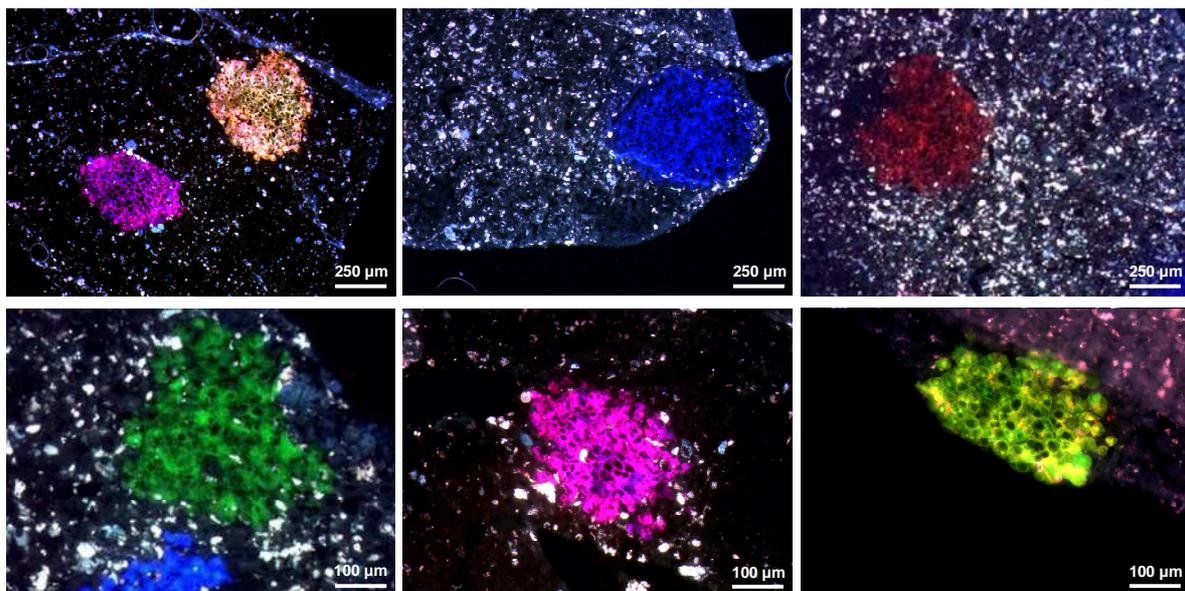


Abbildung 18: Regeneration der geschädigten Leber einer homozygoten uPA/SCID-Maus durch RGB-markierte humane Hepatozyten. Dargestellt sind Fluoreszenz-*Overlays* der Leberschnitte von homozygoten uPA/SCID-Mäusen vier Wochen nach der Transplantation RGB-markierter primärer humaner Hepatozyten. In homozygoten uPA/SCID-Mäusen sind vor allem monoklonale Repopulationsareale gebildet worden. Während die transplantierten Hepatozyten morphologisch gesundes Lebergewebe gebildet haben, finden sich in der wirtseigenen Leber viele autofluoreszierende Makrophagen (weiß leuchtende Zellen), welche die toxisch geschädigten Leberzellen phagozytieren.

4.6. Transplantation RGB-markierter FH-hTERT

Wege et al. (2003) konnten bereits zeigen, dass hTERT-immortalisierte fetale Hepatozyten (FH-hTERT) die Fähigkeit besitzen, in der Leber anzuwachsen und sich dort zu integrieren. Dabei konnte, trotz der Expression von hTERT, kein malignes Wachstum der Zellen beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass die Zellen in der Leber hepatozytenspezifische Proteine synthetisieren.

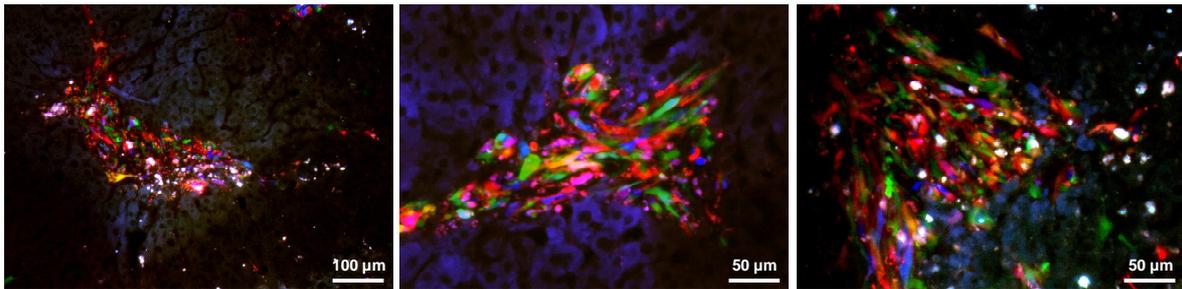
In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob und wie FH-hTERT eine geschädigte Leber repopulieren und regenerieren. Im uPA-Modell sollten FH-hTERT ähnlich wie primäre Hepatozyten einen Wachstumsvorteil besitzen und die Leber durch Proliferation repopulieren können. Die klonale Zusammensetzung der Repopulation sollte auch hier mit Hilfe der RGB-Markierung analysiert werden.

4.6.1. Transplantation und Repopulation: FH-hTERT in heterozygoten uPA/SCID-Mäusen

Wie im Kapitel 4.4. dargestellt, gelang es FH-hTERT effizient mit den RGB-Vektoren zu transduzieren, so dass die Zellen mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert waren. Diese Zellen wurden in 10 heterozygote uPA/SCID-Mäuse durch das Verfahren der intrasplenalen Injektion transplantiert (siehe Kapitel 3.5.2.). Da es mit der Transplantation dieser Zellen bisher wenig Erfahrungen gab, sollte eine Repopulationskinetik erhoben werden. Daher wurde eine erste Maus neun Tage nach der Transplantation sakrifiziert, um sicherzustellen, dass die Zellen in das Lebergewebe engraftet sind. Durch die RGB-Markierung konnte gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt viele Zellen in der Leber angewachsen sind. In meist abgegrenzten Arealen befanden sich mehrere Zellen mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarben (Abbildung 19A).

Zwei weitere Mäuse wurden acht Wochen nach der Transplantation sakrifiziert. Mit Hilfe der RGB-Markierung konnte gezeigt werden, dass aus den polyklonalen Clustern neun Tage nach der Transplantation (Abbildung 19A) einige wenige Zellen proliferiert sind und oligoklonale Areale gebildet haben (Abbildung 19B). Nach 8 Wochen haben die Zellen jedoch nicht die hepatozytenspezifische Morphologie angenommen, sondern waren eher spindelförmig.

A



B

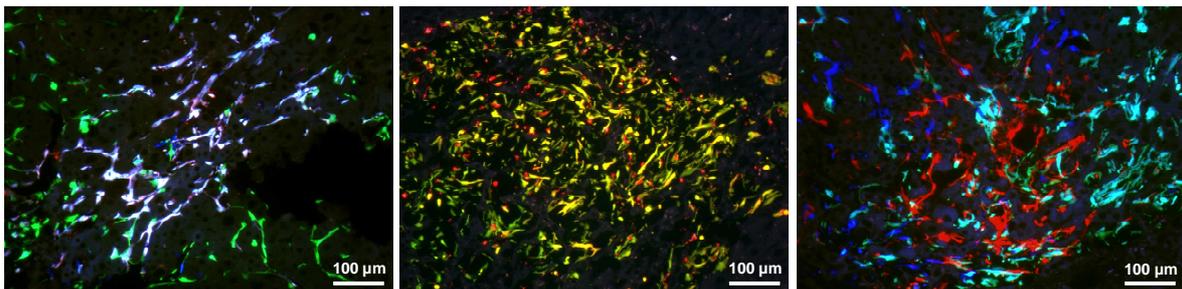


Abbildung 19: Repopulation RGB-markierter FH-hTERT in heterozygoten uPA/SCID-Mäusen. RGB-markierte FH-hTERT wurden durch intrasplenale Injektion in 10 heterozygote uPA/SCID-Mäuse transplantiert. (A) Dargestellt sind *Overlays* von 7 µm Leberschnitten einer heterozygoten uPA/SCID-Maus neun Tage nach der Transplantation. Mit Hilfe der RGB-Markierung konnte ein polyklonales Anwachsen der FH-hTERT in meist abgegrenzten Arealen verstreut über die ganze Leber visualisiert werden. (B) Hier sind *Overlays* von Leberschnitten zweier heterozygoter uPA/SCID-Mäuse 8 Wochen nach der Transplantation dargestellt. In den Lebern befanden sich oligoklonale Repopulationsareale der FH-hTERT. Die RGB-Markierung macht deutlich, dass die Repopulationsareale durch die Proliferation einzelner Zellen (meist 2-3 Zellen pro Repopulationsareal) entstanden sind.

4.6.2. Identifikation eines Tumors vier Monate nach der Transplantation

Vier Monate nach der Transplantation wurde untersucht, ob die RGB-markierten FH-hTERT nicht doch Tumoren in den Lebern der Mäuse gebildet haben. Eventuelle Tumoren sollten mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) detektiert werden. Mit einem 3-Tesla-MRT wurden transversale Schichtbilder der Lebern erstellt. In einer der sieben verbliebenen Mäuse konnte ein etwa 5 mm großer Tumor im linken Leberlappen identifiziert werden (Abbildung 20A). Bei der Anfertigung von Kryoschnitten des linken Leberlappens am Kryotom konnte der Tumor, der im MRT sichtbar war, mit bloßem Auge identifiziert werden (Abbildung 20B). Bei der Betrachtung der Leberschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde sichtbar, dass alle Zellen des Tumors im *Overlay* eine homogene blaue Fluoreszenzfarbe besaßen (Abbildung 20D). Daher konnte die Hypothese gestellt werden, dass der Tumor aus einer einzelnen angewachsenen Zelle entstanden ist. Eine immunhistochemische Färbung gegen GFP und eine Anfärbung der Zellkerne mittels

Hämatoxillin konnte zeigen, dass der gesamte Tumor aus RGB-markierten FH-hTERT bestand (Abbildung 20C). Zusätzlich konnte der Tumor an Hand der Färbung pathologisch beurteilt werden: Der Tumor besaß einen Durchmesser von etwa 5 mm und infiltrierte das umliegende gesunde Lebergewebe.

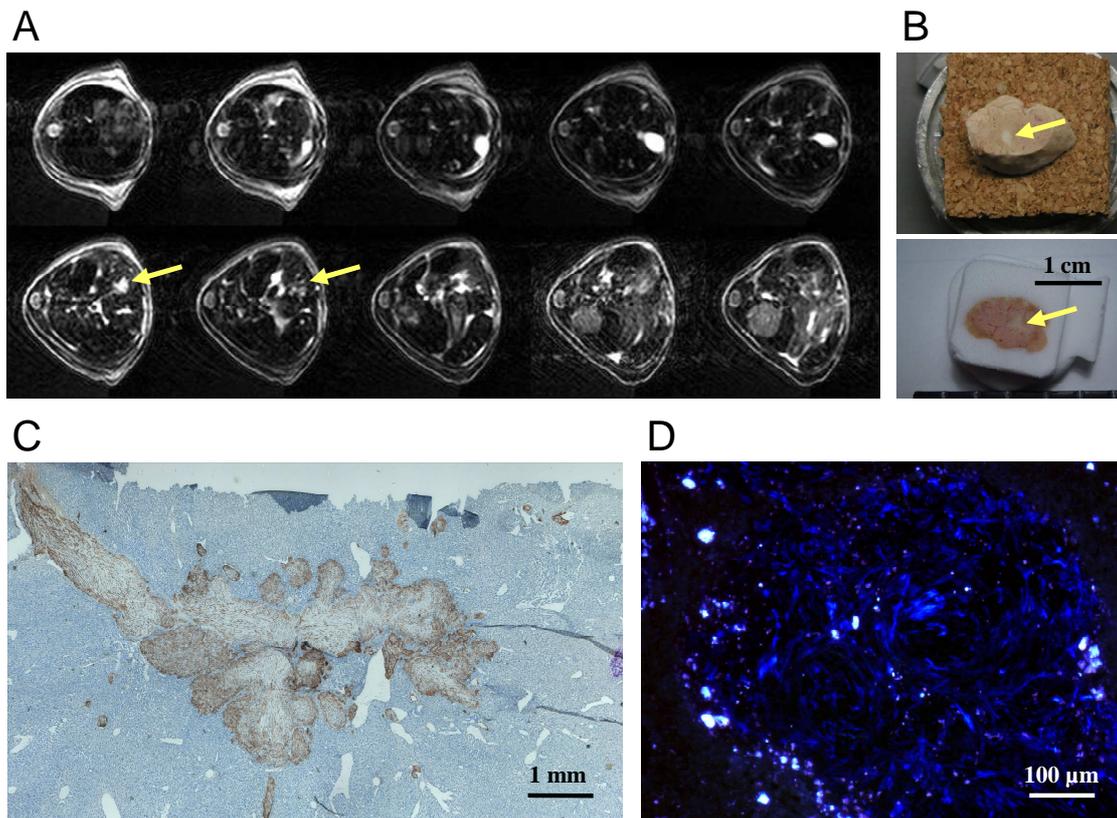


Abbildung 20: Identifikation eines Tumors. (A) Bei einer von sieben Mäusen konnte vier Monate nach der Transplantation RGB-markierter FH-hTERT ein Tumor im MRT identifiziert werden (gelbe Pfeile). In den transversalen Schichtbildern ist im linken Leberlappen ein etwa 5 mm großer Tumor erkennbar. (B) Beim Anfertigen von Kryoschnitten konnte der Tumor makroskopisch identifiziert werden. (C) Dargestellt ist eine immunhistochemische Färbung gegen GFP. Der Tumor zeigt im histologischen Bild ein infiltratives Wachstum und besitzt einen Durchmesser von etwa 5 mm. (D) Dargestellt ist ein Fluoreszenz-*Overlay* eines Ausschnittes des Tumors. Alle Zellen des Tumors besitzen die gleiche blaue Fluoreszenzfarbe.

Die anderen sechs Mäuse, bei denen im MRT kein Tumor identifiziert worden ist, wurden ebenfalls analysiert. Sowohl bei der Anfertigung von Leberschnitten am Kryotom als auch bei deren Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte kein Tumor identifiziert werden. Stets waren Areale sichtbar, die aus mono- oder oligoklonalen FH-hTERT bestanden. Die Klonalität und Größe der Areale waren vergleichbar mit den Arealen 8 Wochen nach der

Transplantation (vgl. Abbildung 19). Diese FH-hTERT zeigten hier kein malignes Wachstumsverhalten.

4.6.3. Ermittlung der Klonalität des Tumors mit molekularbiologischen Methoden

Die RGB-Markierung ermöglichte eine Beurteilung der Klonalität des FH-hTERT-Tumors. Alle Zellen des Tumors zeigten die gleiche blaue Fluoreszenzfarbe, woraus zu schließen ist, dass der Tumor monoklonal, also aus einer einzelnen malignen Zelle entstanden war. Die Klonalität des Tumors sollte zusätzlich durch molekularbiologische Methoden analysiert werden.

Die RGB-Vektoren integrieren wie alle lentiviralen Vektoren weitgehend zufällig in das Genom der Zellen, wobei transkriptionell aktive Bereiche bevorzugt werden (Schröder et al. 2002). Das heißt, die Integrationsstellen sind von transduzierter Zelle zu transduzierter Zelle verschieden und für jede einzelne transduzierte Zelle spezifisch. Da die Vektoren stabil in das Genom einer Zelle integrieren, besitzen alle Zellen, die aus einer transduzierten Zelle entstanden sind, die gleiche spezifische Integrationsstelle des Vektors und können auf diese Weise als Klon identifiziert werden (Kustikova et al. 2008).

An Hand der spezifischen Integrationsstellen der RGB-Vektoren sollte nun die Klonalität des Tumors bestimmt werden. Die Identifikation der Integrationsstellen erfolgte durch eine *Ligation-mediated* Polymerase-Kettenreaktion (LM-PCR). Die LM-PCR wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt, bei denen jeweils ein unterschiedliches Restriktionsenzym (*Tsp509I* und *HpyCHIV4*) für den Verdau der genomischen DNA verwendet wurde (zum Prinzip und Protokoll der LM-PCR siehe Kapitel 3.7.2.). Parallel zu jedem Ansatz wurde eine Kontrolle durchgeführt, bei der statt einer genomischen DNA-Probe Wasser verwendet wurde. In der Kontrolle sollten am Ende der LM-PCR daher keine amplifizierten DNA-Produkte vorhanden sein. Nach der LM-PCR und der gelelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA-Produkte im Agarosegel waren in beiden Ansätzen mehrere DNA-Banden sichtbar (Abbildung 21A). Abgesehen von den internen Kontrollen entspricht jede DNA-Bande im Agarosegel nach der LM-PCR im Idealfall einer identifizierten Integrationsstelle eines lentiviralen Vektors im Genom. Bei der Betrachtung der Banden fällt auf, dass auch in der Wasserkontrolle des *HpyCHIV4*-Ansatzes DNA amplifiziert wurde. Dies spricht dafür, dass sich in einigen Reagenzien der LM-PCR kontaminierte DNA-Sequenzen befanden und bei der LM-PCR amplifiziert wurden.

Alle amplifizierten DNA-Produkte wurden aus dem Agarosegel isoliert und anschließend sequenziert. Nur zwei Banden - eine Bande im *Tsp509I*-Ansatz und eine weitere im *HpyCHIV4*-Ansatz - enthielten humane Sequenzen der FH-hTERT (Abbildung 21A und 21B),

wobei in beiden Banden jeweils die gleiche Integrationsstelle eines RGB-Vektors vorhanden war. Alle anderen Banden enthielten keine humanen Sequenzen. Es handelte sich dabei um PCR-Artefakte, die auf Grund von Kontaminationen aufgetreten sind. Zu berücksichtigen ist, dass die zur Verfügung stehende DNA-Probenmenge sehr gering war, was ein Auftreten von PCR-Artefakten bei der LM-PCR zusätzlich begünstigt.

Somit konnte in der DNA-Probe des Tumors eine spezifische Integrationsstelle eines lentiviralen Vektors identifiziert werden. Diese befand sich auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (Abbildung 21C). Im Folgenden wurden aus drei Arealen des Tumors DNA-Proben isoliert. Hierbei sollte untersucht werden, ob die gleiche spezifische Integrationsstelle in verschiedenen Arealen des Tumors vorhanden war. Der Nachweis der identischen Integrationsstelle erfolgte durch eine *nested*-PCR. Basierend auf der Sequenz der LM-PCR wurden für die *nested*-PCR Primer synthetisiert, mit denen die spezifische Sequenz des Vektors zusammen mit der benachbarten genomischen Sequenz amplifiziert werden konnte. Zur Kontrolle der Spezifität der *nested*-PCR wurde DNA aus dem rechten Leberlappen der Maus verwendet, in dem sich FH-hTERT mit einer anderen Fluoreszenzfarbe befanden. In allen drei Tumorproben konnte die spezifische Integrationsstelle aus der LM-PCR nachgewiesen werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass die verschiedenen Areale des Tumors aus derselben Zelle entstanden sind. Die DNA Probe aus dem rechten Lappen war hingegen negativ. Hier konnte keine Zelle identifiziert werden, die die gleiche spezifische Integrationsstelle besaß.

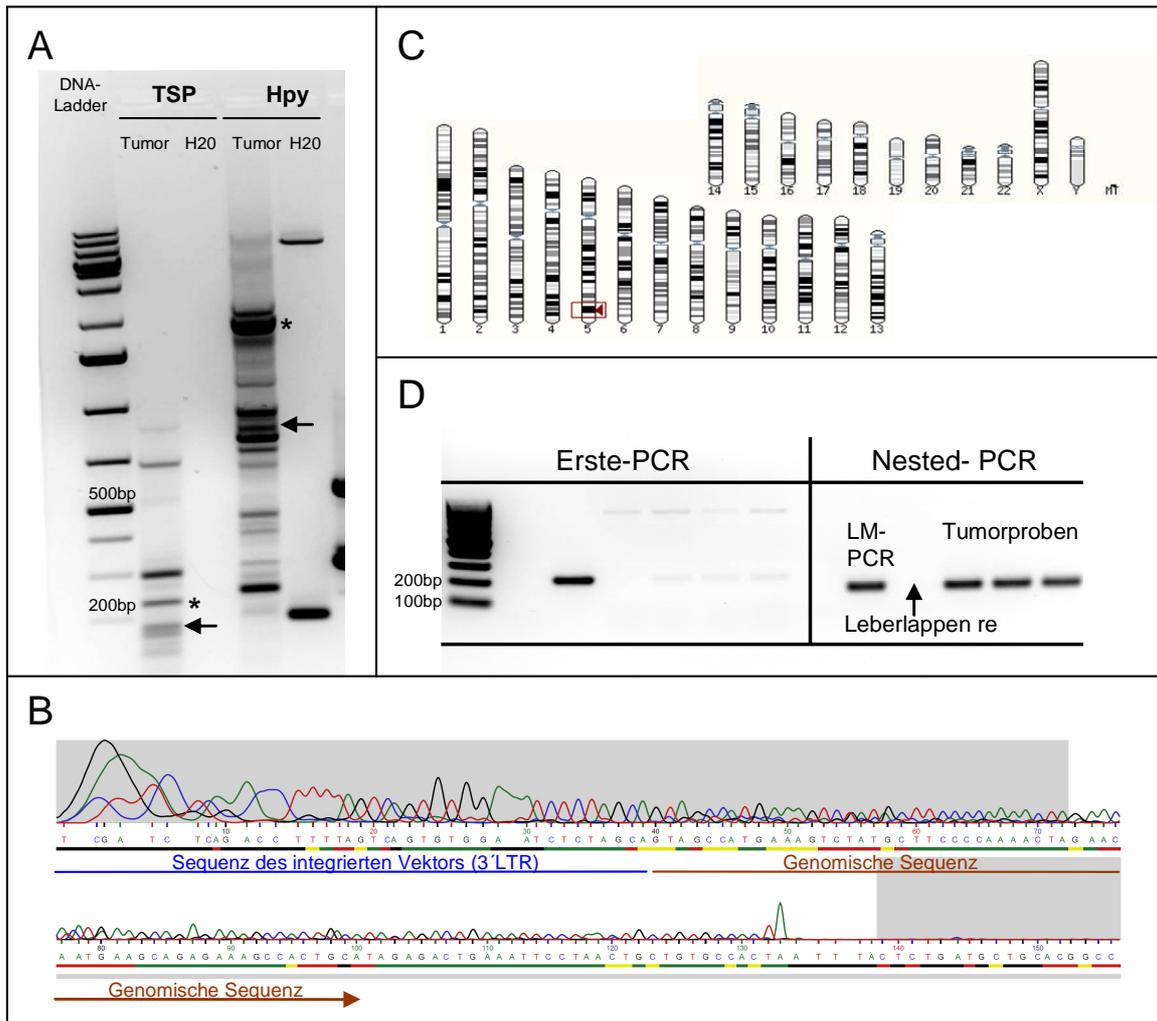


Abbildung 21: Die Klonalität des FH-hTERT-Tumors. Mit Hilfe der LM-PCR wurden die spezifischen Integrationsstellen der lentiviralen RGB-Vektoren im Tumor identifiziert. Hierfür wurden zwei LM-PCR-Ansätze durchgeführt, bei denen jeweils ein verschiedenes Restriktionsenzym (*Tsp509I* und *HpyCHIV4*) zum Verdau der genomischen DNA verwendet wurde. Parallel zu jedem Ansatz wurde eine Kontrolle durchgeführt, in der statt einer DNA-Probe Wasser verwendet wurde. (A) Die vier LM-PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und entsprechend der Ladung und der Fragmentgröße aufgetrennt. Die mit einem (*) markierten Banden entsprechen den internen Kontrollen. Abgesehen von den internen Kontrollen stellt jede DNA-Bande im Agarosegel (im Idealfall) eine identifizierte Integrationsstelle dar. Auf dem Agarosegel sind sowohl beim *Tsp509I*-Ansatz als auch beim *HpyCHIV4*-Ansatz mehrere Banden sichtbar. Zudem wurden auch in der Wasserkontrolle beim *HpyCHIV4*-Ansatz PCR-Banden produziert, die auf eine DNA-Kontamination während der LM-PCR schließen lassen. (B) Nach der Sequenzierung konnte die bekannte 3'-LTR-Vektorsequenz identifiziert werden (blaue Linie). Die Sequenz darüber hinaus in 3'-Richtung entspricht der genomischen Sequenz (braune Linie). Von allen DNA-Banden in der LM-PCR enthielten nur zwei Banden Integrationen in humaner DNA (Pfeile), wobei in beiden Banden die gleiche Integrationsstelle identifiziert worden ist. Die Sequenz der Integrationsstelle ist in (B) dargestellt. Alle anderen Banden enthielten keine humane Erbinformation. (C) Daher konnte innerhalb des Tumors eine spezifische Vektorintegration auf dem langen Arm des Chromosoms 5 aufgezeigt werden. (D) Drei weitere DNA-Proben wurden aus jeweils unterschiedlichen Stellen des Tumors isoliert. Durch eine *nested*-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die in der LM-PCR identifizierte spezifische Integrationsstelle in allen drei Tumorproben vorhanden war. Als Kontrolle diente DNA aus dem rechten Leberlappen der Maus, in der die Integrationsstelle nicht nachgewiesen werden konnte (Leberlappen re).

4.7. Klonales Tumorwachstum RGB-markierter BON-Tumorzellen

In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass die RGB-Markierung eine Beurteilung der Klonalität von Tumoren erlaubt. Dabei sollte das klonale Tumorwachstum von BON-Zellen in der Leber mit Hilfe der RGB-Markierung analysiert werden. Bei den BON-Zellen handelt es sich um eine humane Karzinoid-Zelllinie, die nach Transplantation in immundefiziente Mäuse zu der Entstehung multipler Tumoren führt (Evers et al. 1994).

In diesem Modell sollte zusätzlich untersucht werden, ob RGB-markierte Zellen ihre spezifische Fluoreszenzfarbe konservieren und diese sich nicht während einer Zellexpansion *in vitro* oder bei der Bildung solider Tumoren *in vivo* verändern.

4.7.1. Klonalität der BON-Tumoren in NOD/SCID-Mäusen

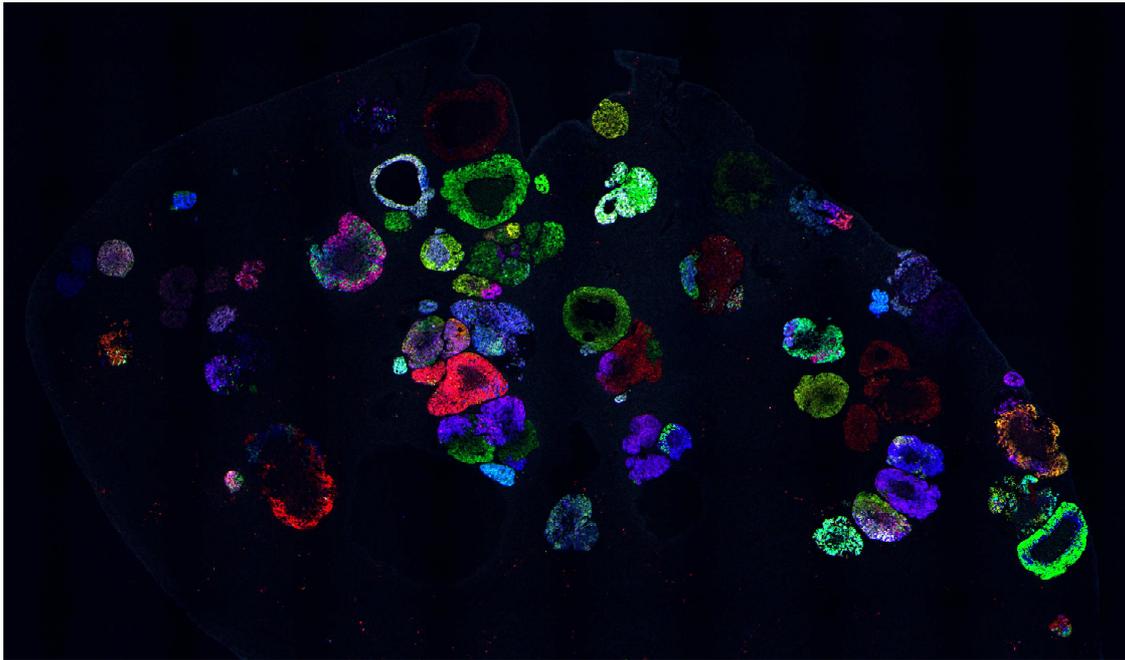
Die BON-Zellen konnten bereits effizient mit den RGB-Vektoren transduziert werden, so dass die Zellen mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert waren (siehe Kapitel 4.4.). Diese markierten Zellen wurden nun für die *in vivo*-Versuche verwendet und sollten in der Leber Tumoren bilden.

Die RGB-markierten BON-Zellen wurden intrasplenal in NOD/SCID-Mäuse injiziert. Ähnlich wie primäre Hepatozyten sind auch BON-Zellen in der Lage, nach intrasplener Injektion über die Portalvene in die Leber zu gelangen und dort anzuwachsen. Da es sich bei den BON-Zellen um Tumorzellen handelte, die in ihrer Expansion *in vivo* keine Kontaktinhibition aufweisen, musste in den Versuchen auch kein Mausmodell mit einem endogenen Leberschaden verwendet werden. Anders als bei den bisher durchgeführten Transplantationsversuchen, bei denen keine Tumorzellen verwendet wurden, wurde den Mäusen 15 Minuten nach Injektion der BON-Zellen die Milz entfernt, um die Entstehung von Tumoren in der Milz zu verhindern (siehe Kapitel 3.5.1.).

Nach der Transplantation von BON-Zellen kommt es bereits innerhalb kurzer Zeit zur Entstehung großer Tumoren (Evers et al. 1994). Bereits nach vier Wochen bilden sich derart große Tumoren in den Lebern der Mäuse, dass kaum noch gesundes Lebergewebe vorhanden ist. Daher wurden die Tiere etwa 3 Wochen nach der Transplantation sakrifiziert. Bei der Präparation der Lebern waren bereits multiple Tumoren sichtbar. Nach der Fixierung wurden 7 µm-dicke Schnitte der einzelnen Leberlappen am Kryotom angefertigt. Bei der Betrachtung der Leberschnitte am Fluoreszenzmikroskop waren multiple Tumoren sichtbar, die jeweils verschiedene Fluoreszenzfarben besaßen (Abbildung 22). Die BON-Tumorzellen zeigten in der Leber ein verdrängendes Wachstum und infiltrierte nicht das Lebergewebe (im Gegensatz zu dem Tumor in Kapitel 4.6.2.). In den Leberschnitten waren daher vor allem kreisrunde Tumorareale sichtbar. Teilweise zeigten die Tumoren ein derartig schnelles Wachstum, dass die Zellen im Zentrum des Tumors auf Grund der fehlenden

Nährstoffversorgung zu Grunde gegangen sind und daher auch keine Fluoreszenz zeigten. Lediglich die äußeren Zellschichten dieser Tumoren waren noch vital und exprimierten Fluoreszenzproteine. Da die Tumoren in ihrer dreidimensionalen Struktur eher kugelförmig waren, könnte die Hypothese gestellt werden, dass die Tumoren - ähnlich wie die Regenerationsknoten in homozygoten uPA/SCID-Mäusen (Abbildung 18) - jeweils aus einer angewachsenen Zelle gebildet worden sind. Tatsächlich konnte mit Hilfe der RGB-Markierung gezeigt werden, dass der Großteil der Tumoren einfarbig war. Das heißt, alle Zellen innerhalb eines Tumorareals besaßen die gleiche Farbmarkierung und sind folglich aus einer angewachsenen Zelle entstanden. Vereinzelt fanden sich aber auch Tumoren, die mehr als eine Fluoreszenzfarbe besaßen. Diese Tumoren sind demnach aus zwei bis drei angewachsenen Tumorzellen entstanden (Abbildung 22).

A



B

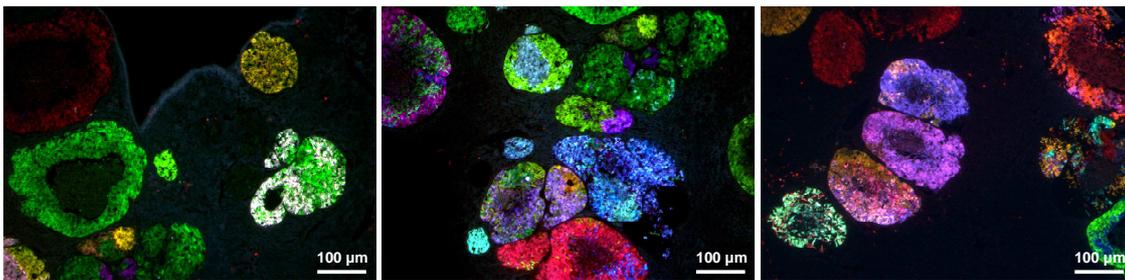


Abbildung 22: Klonalität von BON-Tumoren in der Leber. (A) Ein gesamter Leberschnitt eines Leberlappens mit BON-Tumoren ist hier als *Overlay* konfokalmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. Durch die Übersichtsaufnahme wird deutlich, dass BON-Zellen drei Wochen nach der Transplantation multiple Tumoren in der Leber gebildet haben. (B) Hier sind *Overlays* fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen einzelner Ausschnitte des Leberlappens (A) dargestellt. Sowohl einfarbige als auch mehrfarbige Tumoren sind sichtbar (Weber et al. 2011).

4.7.2. Stabilität der RGB-Markierung

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie stabil die RGB-Markierung über einen langen Zeitraum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist. Hierzu wurden zwei Versuchsansätze entwickelt.

4.7.2.1. Verfolgung eines Klons von der Einzelzelle *in vitro* bis zum Tumor in der Maus

Durch *Limiting Dilution* wurden aus einer Population RGB-markierter BON-Zellen, die sich in Zellkultur befanden, einzelne Zellen isoliert, so dass sich pro Loch einer 96-Loch Kulturplatte

eine einzige RGB-markierte BON-Zelle befand. Insgesamt wurden über 100 Einzelzellen abgelegt, von denen jede eine individuelle Fluoreszenzfarbe besaß.

Diese Zellen sollten nun *in vitro* proliferieren, bis aus jeder einzelnen Zelle mehrere Millionen entstanden sind. Die Fragestellung hierbei war, ob sich während der Expansion *in vitro* die Fluoreszenzfarbe verändert. Von den über 100 ausgesäten Klonen proliferierten jedoch nur 10. Für die BON-Zellen kann daher von einer Klonierungseffizienz von ca. 10% ausgegangen werden.

Während der gesamten Expansion wurden die Zellen der Klone am Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Speziell wurde dabei untersucht, ob sich innerhalb der Klone Zellen befanden, die eine andere Fluoreszenzfarbe besaßen als die ursprüngliche Einzelzelle. Exemplarisch konnte an Hand von drei Zellklonen (Klon D3, Klon E3 und Klon D5), die jeweils aus einer einzelnen RGB-markierten BON-Zelle entstanden sind, gezeigt werden, dass alle Zellen eines Klons die gleiche Fluoreszenzfarbe besaßen wie die ursprüngliche Einzelzelle. In den *Overlays* der drei Klone konnte während der gesamten Zellexpansion *in vitro* keine Zelle identifiziert werden, die eine andere Fluoreszenzfarbe besaß als die Ursprungszelle (Abbildung 23).

Die drei expandierten Klone (Klon D3, Klon E3 und Klon D5) wurden intrasplenal in NOD/SCID-Mäuse transplantiert, um zu untersuchen, ob die Zellklone auch *in vivo* bei der Ausbildung von Tumoren ihre individuelle Fluoreszenzfarbe beibehalten. 2-3 Mäuse wurden je Klon verwendet. Drei Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse sakrifiziert. Die Leberlappen wurden aus dem Situs der Mäuse herauspräpariert und fixiert. Erneut wurden 7 µm Leberschnitte am Kryotom angefertigt und sowohl am Fluoreszenzmikroskop als auch am konfokalen Mikroskop analysiert. In den Mäusen, die den lilafarbenen (Klon D3) und den gelbfarbenen Klon (Klon E3) transplantiert bekommen haben, sind erneut multiple Tumoren in der Leber gewachsen. In den Lebern der Mäuse, denen der gelbe Klon (Klon E3) transplantiert wurde, waren ausschließlich Tumoren sichtbar, die die gleiche gelbe Fluoreszenzfarbe besaßen wie die ursprüngliche Einzelzelle (Abbildung 23). Auch die Mäuse, denen der lilafarbene Klon (Klon D3) transplantiert wurde, enthielten ausschließlich Tumoren, die aus lilafarbenen Zellen bestanden (Abbildung 23 und Abbildung 24). In den Mäusen, denen der weiß-exprimierende Klon transplantiert wurde, konnte beim Öffnen des Mausitus makroskopisch kein Tumor in der Leber identifiziert werden. Auch nach der Anfertigung der Leberschnitte am Kryotom und bei Betrachtung der Schnitte am Fluoreszenzmikroskop konnten nur vereinzelt BON-Tumoren identifiziert werden. Doch auch hier war die RGB-Markierung stabil und die Tumoren zeigten alle die gleiche weiße Fluoreszenzfarbe wie die Ursprungszelle (Abbildung 23).

Bei der Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen eines Klons zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. *in vitro* und nachher als Tumor *in vivo*) musste darauf geachtet werden, dass stets die gleichen Belichtungszeiten verwendet wurden, da sonst eine andere Farbe im *Overlay* generiert worden wäre (siehe Kapitel 3.9.1.).

Aus jedem Leberlappen der Tiere wurden mehrere Leberschnitte analysiert, und in keinem Schnitt konnte beobachtet werden, dass sich die Fluoreszenzfarbe der Klone während des Tumorwachstums *in vivo* verändert hatte. Die RGB-Markierung war sowohl während einer Zellexpansion über einen Monat *in vitro* als auch bei der Bildung von Tumoren *in vivo* stabil (Abbildungen 23 und 24).

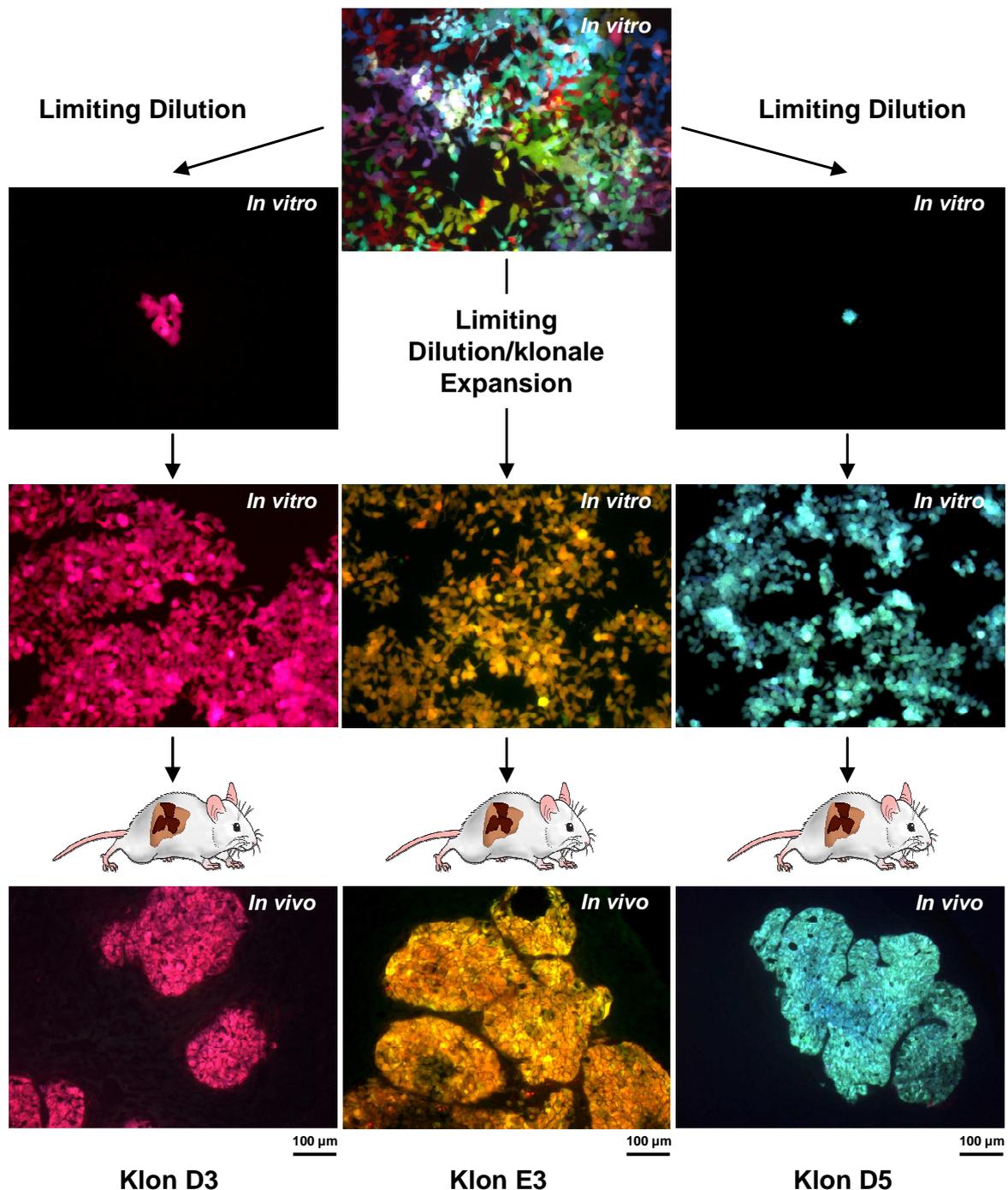


Abbildung 23: Verfolgung eines Klons von der Einzelzelle *in vitro* bis zum Tumor in der Leber. Durch *Limiting Dilution* wurden aus einer Population RGB-markierter BON-Zellen einzelne Zellen isoliert, von denen jede einzelne in einem Loch einer Zellkulturplatte kultiviert wurde. Die Zellen expandierten *in vitro*, bis aus den einzelnen Zellen durch Zellteilung mehrere Millionen Zellen entstanden sind. Die klonale Zellexpansion dreier Zellklone (Klon D3, Klon E3 und Klon D5) ist hier durch *Overlays* fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. In den *in vitro* Zellkulturaufnahmen nach der einmonatigen Expansion zeigen alle Zellen eines Klons die gleiche homogene Fluoreszenzfarbe wie die Einzelzelle. Innerhalb der Klone konnte keine Zelle mit einer anderen Fluoreszenzfarbe identifiziert werden. Nach der Expansion *in vitro* wurden die Klone D3, E3 und D5 durch eine intrasplenale Injektion in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. In den *Overlays* fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Leberschnitte zeigen alle Tumoren die gleiche homogene Fluoreszenzfarbe wie die ursprüngliche Einzelzelle.

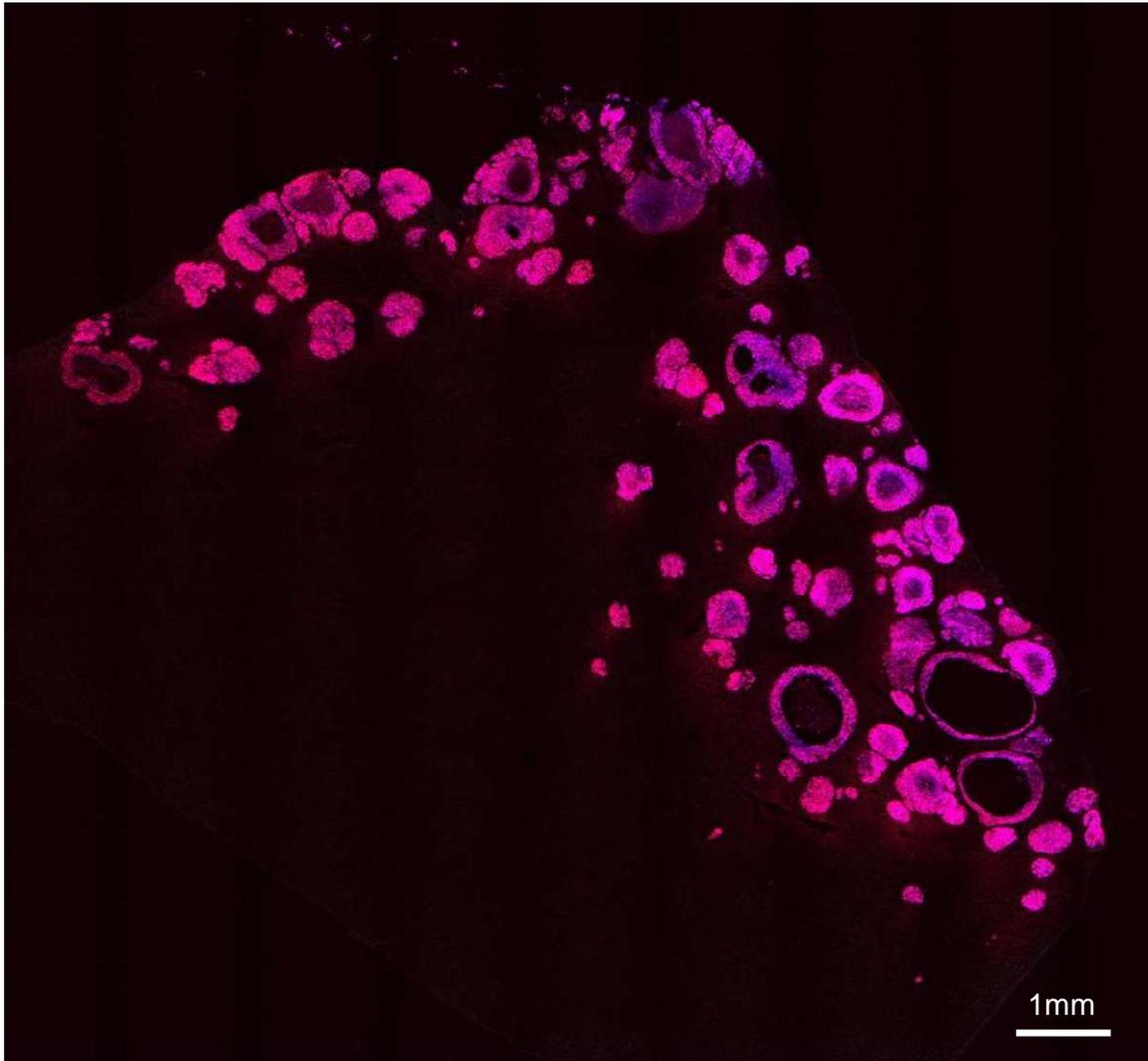


Abbildung 24: Gesamter Leberschnitt mit Zellen des Klons D3. Ein gesamter Leberschnitt einer Maus, der der Klon D3 transplantiert wurde, ist hier als *Overlay* dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop erstellt. In der Übersichtsaufnahme des gesamten Leberlappens zeigen alle Tumoren in der Leber die gleiche Fluoreszenzfarbe. In einigen lilafarbenen Tumoren sind blaufarbene Areale zu sehen. Dabei handelt es sich um zu Grunde gegangene Tumorzellen. (siehe Kapitel 4.7.1., Weber et al. 2011).

4.7.2.2. Serielle Transplantation von RGB-markierten BON-Zellen

Parallel zum oben dargestellten Experiment (Kapitel 4.7.2.1.) wurde untersucht, ob RGB-markierte BON-Zellen ihre individuelle Fluoreszenzfarbe auch nach der Durchführung serieller Transplantationen beibehalten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst RGB-markierte BON-Zellen durch intrasplenale Injektion in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. 2 Wochen nach der Transplantation sollten BON-Zellen aus Tumoren in der Leber isoliert und *in vitro* kultiviert werden. Hierfür wurde eine NOD/SCID-Maus 2 Wochen nach der Transplantation RGB-

markierter BON-Zellen sakrifiziert. Anschließend wurden etwa 500 µl PBS in die Portalvene injiziert, um das Blut aus der Leber zu entfernen. Die Leber wurde aus dem Situs der Maus herauspräpariert und die einzelnen Leberlappen wurden in je ein Loch einer 6-Loch-Kulturplatte überführt. Damit die Leberpräparate nicht austrockneten, wurde zuvor BON-Kulturmedium in die Löcher gefüllt. Bei der Präparation waren bereits makroskopisch Tumoren auf der Oberfläche der Leber erkennbar. Am Fluoreszenzmikroskop konnten die BON-Tumoren in den Leberlappen zusätzlich durch ihre Fluoreszenz identifiziert werden. Für die Isolation der BON-Zellen aus den Tumoren in der Leber wurde speziell nach monochromatischen Tumoren gesucht. Da die BON-Zellen das Lebergewebe nicht infiltrierten, sondern eher verdrängend wuchsen, ließen sich die Zellen eines Tumors mit mechanischen Mitteln aus dem Gewebe der Leber isolieren. Nach der Isolation wurde am Fluoreszenzmikroskop kontrolliert, ob die isolierten Zellen eines Tumors tatsächlich eine einzige spezifische Fluoreszenzfarbe besaßen (Abbildung 25B). Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und konnten kultiviert werden. Die isolierten Zellen wurden über einen Monat *in vitro* expandiert und bildeten Klone, bestehend aus mehreren Millionen Zellen. Während dieses Zeitraumes änderten die Zellen nicht ihre Fluoreszenzfarbe, sondern besaßen stets die Farbe des initialen Tumors, aus dem sie isoliert worden waren (Abbildung 25C). Nach der Expansion *in vitro* wurden die Zellen wieder in NOD/SCID-Mäuse retransplantiert. Hierfür wurden zwei Tumorklone verwendet: ein kultivierter Tumorklon, der aus einem initial lilafarbenen Tumor isoliert worden war (Klon T1), sowie ein kultivierter Tumorklon aus einem grün-gelben Tumor (Klon T2). Für die Transplantation wurden zwei NOD/SCID-Mäuse je Tumorklon verwendet. Drei Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse sakrifiziert, die Leberlappen präpariert und fixiert. Auch hier sind multiple Tumoren in den Lebern der Mäuse entstanden. Erneut wurden mehrere 7 µm-Schnitte aus jedem Leberlappen der Mäuse angefertigt und sowohl am Fluoreszenzmikroskop als auch am konfokalen Mikroskop analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass in beiden Gruppen alle Tumoren in der Leber die gleiche Fluoreszenzfarbe exprimierten wie der initiale Tumor (Abbildung 25D und E). Innerhalb der Tumoren konnte keine Zelle identifiziert werden, die eine andere Fluoreszenzfarbe besaß als die spezifische Fluoreszenzfarbe des Tumors, aus dem die Zellen isoliert worden sind.

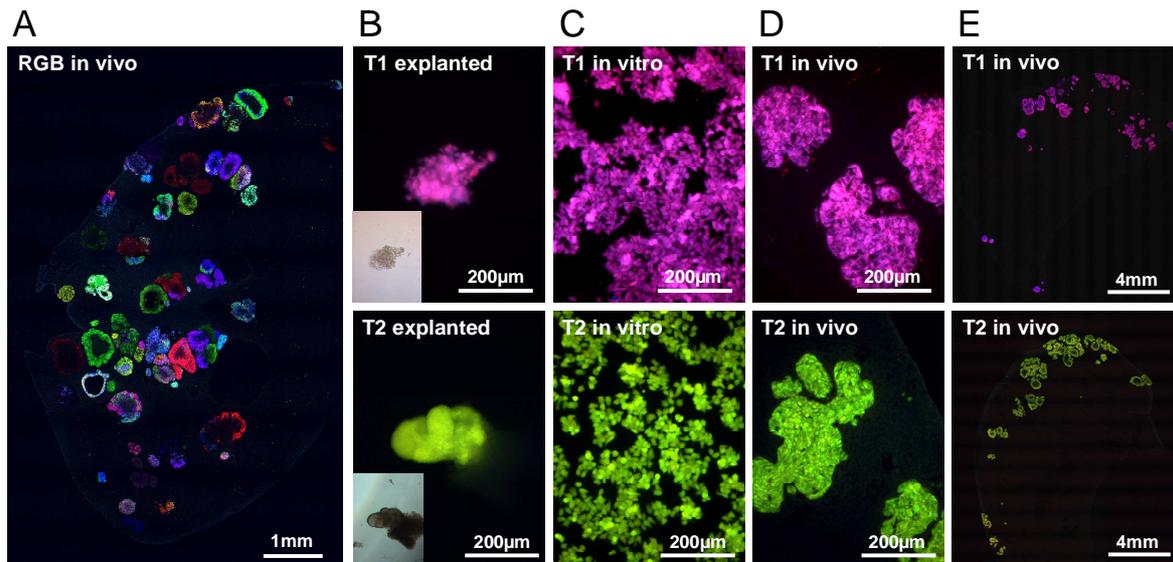


Abbildung 25: Serielle Transplantation RGB-markierter BON-Zellen. (A) RGB-markierte BON-Zellen wurden durch intrasplenale Injektion in eine NOD/SCID-Maus transplantiert. Nach zwei Wochen sind multiple Tumoren in der Leber gewachsen, von denen die meisten monochromatisch waren. Es sind aber auch Tumoren zu sehen, die mehr als eine Fluoreszenzfarbe exprimieren (vgl. Abbildung 22). (B) Die Leberlappen mit den BON-Tumoren wurden direkt nach der Saktifizierung der Maus am Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei wurden monochromatische Tumoren aus der Leber herausgeschnitten. Exemplarisch sind Fluoreszenzaufnahmen zweier herausgeschnittener Tumoren (T1 und T2) als *Overlay* dargestellt. (C) Die herausgeschnittenen Tumoren wurden mechanisch zerkleinert, so dass die Zellen des Tumors kultiviert werden konnten. Die aus der Leber isolierten Tumorzellen wurden über einen Monat *in vitro* kultiviert. In den *Overlays* der Zellkultur zeigen alle Zellen der beiden isolierten Tumorklone (T1 und T2) die gleiche Fluoreszenzfarbe wie der Tumor (B), aus dem die Zellen isoliert worden sind. (D) Die isolierten Tumorklone (T1 und T2) wurden nach einmonatiger Zellkultur intrasplenal in NOD/SCID-Mäuse retransplantiert. Drei Wochen nach der Transplantation sind multiple Tumoren in den Lebern der Mäuse gewachsen. In den *Overlays* wird sichtbar, dass die Tumoren in den Lebern der Mäuse die gleiche Fluoreszenzfarbe besitzen wie der Tumor, aus dem die Zellen ursprünglich isoliert worden sind (vgl. B). (E) Mit einem konfokalen Mikroskop konnten Aufnahmen eines gesamten Leberlappens erstellt werden. Auf den *Overlays* der gesamten Leberschnitte der Tumorklone T1 und T2 ist sichtbar, dass alle Tumoren in der Leber einfarbig sind. Die spezifische RGB-Markierung der Zellen hat sich nicht verändert (Weber et al. 2011).

Zusammenfassend konnte auch hier gezeigt werden, dass das Expressionsmuster der RGB-Vektoren über einen langen Zeitraum *in vitro* sowie nach Retransplantation konstant war und die Fluoreszenzfarbe, welche aus dem Expressionsmuster resultiert, sich nicht verändert hatte.

Zusätzlich wurde eine 1:1 Mischung beider kultivierten Tumorklone (T1 und T2) durch eine intrasplenale Injektion in zwei NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Drei Wochen nach der Transplantation sind in den Lebern der Mäuse monochromatische Tumoren identifiziert worden, die entweder eine lilafarbene (Klon T1) oder eine grün-gelbe (Klon T2) Fluoreszenzfarbe besaßen. Gleichzeitig bestanden einige Tumoren aus Zellen beider Farben, was bedeutet, dass hier einzelne Tumoren aus mehreren engrafteten Zellen gebildet

worden sind (Abbildung 26). Daraus folgt, dass BON-Zellen *in vivo* sowohl monoklonale als auch oligoklonale Tumoren bilden können. Diese klonale Zusammensetzung der BON-Tumoren konnte bereits im Kapitel 4.7.1. durch die RGB-Markierung visualisiert werden und wurde mit diesem Versuch verifiziert.

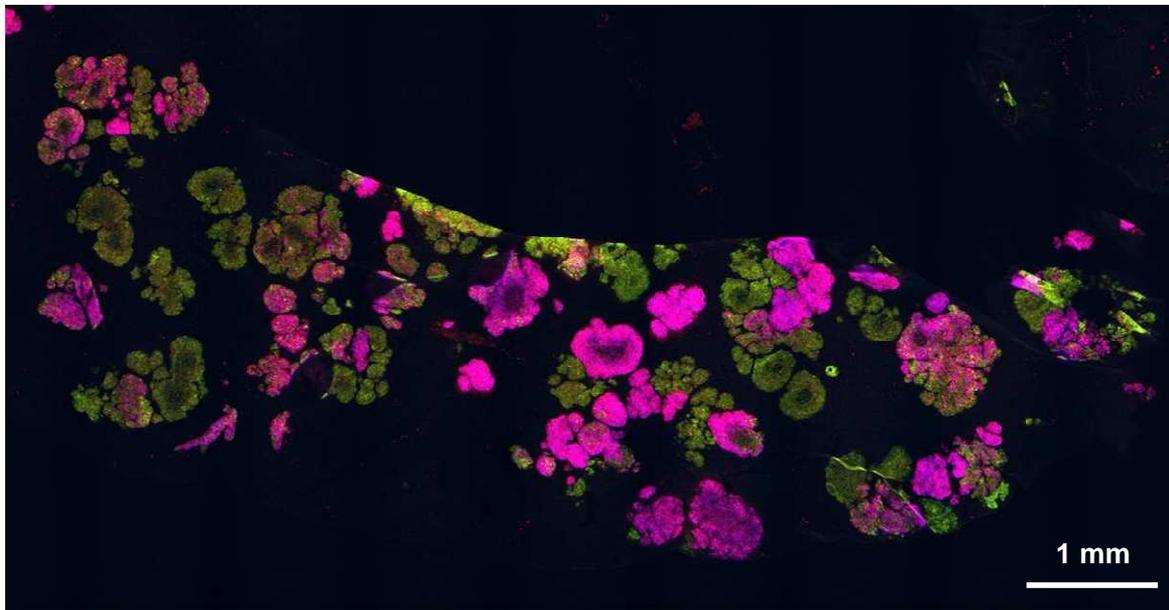


Abbildung 26: Gemeinsame Transplantation der isolierten Tumorklone T1 und T2. Eine 1:1 Mischung der Tumorklone T1 und T2 (siehe Abbildung 25C) wurde intrasplenal in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Mit einem konfokalen Mikroskop wurden Aufnahmen eines gesamten Leberschnittes erstellt. Im *Overlay* sind monochromatische Tumoren sichtbar. Diese Tumoren zeigen entweder eine lilafarbene oder grün-gelbe Fluoreszenz. In dem Leberschnitt befinden sich auch Tumoren, die sowohl aus lilafarbenen Zellen als auch aus grün-gelben Zellen bestehen (Weber et al. 2011).

5. Diskussion

5.1. RGB-Markierung: Eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung etabliert, mit der das Spektrum unterschiedlicher Fluoreszenzfarben für die Zellmarkierung deutlich erweitert werden konnte. Die Methode heißt RGB-Markierung und wurde auf Basis der Dreifarbentheorie entwickelt. Nach der Dreifarbentheorie, die 1859 von Hermann von Helmholtz auf der Basis einer älteren Theorie von Thomas Young beschrieben wurde, können durch die Addition der drei Primärfarben rot, grün und blau (RGB) in unterschiedlichen Intensitäten und Kombinationen alle spektralen Farben generiert werden. Dieses Prinzip wird beispielsweise in Fernseh- und Computerbildschirmen angewandt, bei denen durch die Kombination der drei Primärfarben bis zu 16,7 Millionen verschiedene Farben angezeigt werden können.

Bei der RGB-Markierung werden drei lentivirale Vektoren verwendet, die jeweils ein rotes (*mCherry*), ein grün-gelbes (*Venus*) und ein blaues (*Cerulean*) Fluoreszenzprotein als Transgen exprimieren (RGB-Vektoren). Die drei RGB-Vektoren werden gleichzeitig auf Zielzellen gegeben, wodurch die Vektoren zufällig in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen in das Genom der Zellen integrieren. Die drei Primärfarben rot, grün und blau werden nun als Fluoreszenzproteine in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen in den Zellen exprimiert, woraufhin in der Addition - analog zur Dreifarbentheorie - eine neue Fluoreszenzfarbe generiert wird. Theoretisch kann dabei - genauso wie beim Farbfernseher - jede spektrale Farbe als Fluoreszenz erzeugt werden. Dabei hängt es vom Zufall ab, wie viele Vektoren und welche Kombinationen in das Genom einer Zelle integrieren. Hierdurch können Zellen mit vielen unterschiedlichen Mischfarben markiert werden.

Fluoreszenzproteine haben sich in vielen Anwendungen als ein effektives Mittel für die spezifische Markierung von Zellen bewährt. Obwohl inzwischen eine ganze Reihe von Fluoreszenzproteinen in verschiedenen Farben verfügbar sind (Shaner et al. 2005, Shaner et al. 2007), konnte eine derartige Farbvielfalt wie bei der RGB-Markierung bislang nicht erreicht werden. In der Arbeit von Vafaizadeh et al. (2010) wurde deutlich, dass sich bestimmte Fragen auf Grund der limitierten Anzahl verschiedener Fluoreszenzfarben nicht beantworten lassen (siehe Kapitel 2.2.3.): Die Arbeitsgruppe markierte u.a. Brustdrüsenstammzellen mit drei verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen und beobachtete auf diese Weise die Expansion der Zellen *in vivo*. Im Brustdrüsengewebe waren alle drei Markierungsfarben sichtbar, was darauf hindeutete, dass mehrere Stammzellklone an der Bildung des Brustdrüsengewebes beteiligt waren. Auf Grund der limitierten Anzahl

verschiedener Markierungsfarben konnten jedoch Fragen zur genauen Anzahl der beteiligten Zellklone und zum Teilungsverhalten (symmetrisch vs. asymmetrisch) der Stammzellen nicht hinreichend beantwortet werden. Durch die RGB-Markierung ist es nun möglich, Zellen mit weitaus mehr verschiedenen Farben als bisher zu markieren. Dieses erlaubt deutlich präzisere Aussagen hinsichtlich des klonalen Wachstumsverhaltens von Zellen.

In einem vereinfachten Modell wurde die Anzahl der möglichen Fluoreszenzfarben ermittelt, die bei der RGB-Markierung entstehen können (Abbildung 11). Bei null bis drei Vektorkopien pro RGB-Vektor können in einer Zelle durch die unterschiedlichen Kombinationen der Vektorintegrationen 63 verschiedene Fluoreszenzfarben entstehen. Das Modell berücksichtigte jedoch nicht, dass die Expressionsstärke der Fluoreszenzproteine abhängig vom Integrationsort des Vektors im Zellgenom ist. Die Expressionslevel können sich dabei je nach Integrationsort bis um den Faktor vier unterscheiden (Kustikova et al. 2003). Somit sind weitaus mehr Farbabstufungen möglich.

Um die Zellen mit möglichst vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben zu markieren, muss eine Transduktionsrate von etwa 60% pro RGB-Vektor erreicht werden. Bei einer zu niedrigen Transduktionsrate enthalten die meisten Zellen lediglich eine Vektorkopie in ihrem Genom, und die Zellpopulation wäre dementsprechend nur mit den Primärfarben rot, grün und blau markiert. Gleichzeitig muss darauf geachtet werden, dass die Transduktionsrate nicht zu hoch ist, da die Zellen dann mehrere Kopien der drei RGB-Vektoren besitzen und dann vor allem mit weiß-grauen Farbtönen markiert werden. Eine Unterscheidung der Zellen ist bei diesen Farben deutlich schwieriger. Zudem können zu viele Vektorintegrationen einen toxischen Effekt auf die Zellen haben (Kustikova et al. 2003, Modlich et al. 2005).

Ein ähnliches Modell wurde von Livet et al. (2007) beschrieben. In transgenen Tieren wurden drei oder mehr Fluoreszenzproteine (XFP) durch ein *Cre/lox*-Rekombinationssystem (*Brainbow*) zufällig in unterschiedlichen Mengen und Kombinationen in Neuronen exprimiert, wodurch die Zellen individuell mit verschiedenen Farben markiert worden sind und voneinander unterschieden werden konnten. Das Modell von Livet et al. wurde bisher nur für Neurone beschrieben und ist nicht ohne weiteres auf andere Systeme übertragbar, da die Generierung transgener Tiere kostenintensiv und aufwendig ist. Im Gegensatz dazu ist die RGB-Markierung mit vergleichbar geringem Aufwand auf viele verschiedene Systeme übertragbar. Lentivirale Vektoren - speziell die in dieser Arbeit genutzte LeGO-Vektor-Plattform - ermöglichen einen effizienten Gentransfer in viele verschiedene Zellen (Weber et al. 2008, Weber et al. 2010). So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die RGB-Markierung für unterschiedlichste Zielzellen und sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Anwendungen eignet.

5.2. RGB-Markierung *in vitro*

Retrovirale Vektoren, zu denen auch die Lentiviren gehören, können durch die reverse Transkriptase und Integrase stabil in das Genom einer Zelle integrieren. Mit der Verwendung von lentiviralen Vektoren für den Gentransfer ist die RGB-Markierung stabil im Genom der Zellen integriert. Die individuelle Markierung geht daher nach diversen Runden von Zellteilungen nicht verloren, sondern wird in gleicher Weise an alle Tochterzellen weitergegeben. Die neu entwickelte Methode eignet sich daher nicht nur für eine individuelle Fluoreszenzfarbmarkierung einzelner Zellen, sondern darüber hinaus auch für die Verfolgung und Identifikation einzelner Zellklone. Dieses konnte in Zellkulturversuchen veranschaulicht werden. Nach der Transduktion und Kultivierung von HEK 293T-Zellen waren am Fluoreszenzmikroskop mehrere zusammenhängende Areale sichtbar, in denen alle Zellen die gleiche spezifische Fluoreszenzfarbe besaßen. Die Zellen in diesen Arealen sind jeweils aus einer transduzierten Zelle entstanden, die ihre individuelle Fluoreszenzfarbe an alle Tochterzellen weitergegeben hat. Zwar kann auch hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein Areal von zwei Zellen gebildet wurde, die zufällig die gleiche Fluoreszenzfarbe besaßen. Da die Zellen jedoch mit vielen unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert wurden, war die Wahrscheinlichkeit für einen derartigen Fall ziemlich gering.

Mit Hilfe der RGB-Markierung konnte dabei das unterschiedliche *in vitro*-Wachstumsverhalten der Zellen visualisiert werden: BON-Zellen verhalten sich in Zellkultur ähnlich wie die HEK 293T-Zellen. Sie weisen eine hohe Zellteilungsrate auf und wachsen stets zusammenhängend. Primäre Hepatozyten teilen sich hingegen *in vitro* äußerst selten. FH-hTERT scheinen sich bei ihrer klonalen Expansion entlang des Zellkulturbodens in alle Richtungen zu bewegen, so dass sich die Zellen der einzelnen Klone untereinander vermischen.

Daraus folgt, dass die Methode geeignet ist, das klonale Wachstumsverhalten von Zellen *in vitro* zu analysieren. Die Methode könnte in verschiedenen *in vitro*-Versuchen z.B. zur Analyse unterschiedlicher Zellkulturbedingungen oder Zell-Zell-Interaktionen angewendet werden. Eine denkbare Anwendung wären Echtzeitanalysen zur Teilung von Stammzellen (Rieger et al. 2009): Mit Hilfe der RGB-Markierung könnten das Teilungsverhalten der Stammzellen (symmetrisch vs. asymmetrisch), die Rolle von Wachstumsfaktoren (intrinsische vs. extrinsische Faktoren) und der Einfluss von Stromazellen untersucht werden.

5.3. RGB-Markierung: Beurteilung der klonalen Zusammensetzung der Repopulation und Regeneration einer geschädigten Leber

Bei einer akuten Leberschädigung kommt es zum Verlust von Hepatozyten, der in der Regel durch ausgeprägte Proliferation der verbleibenden Hepatozyten zu einer Leberregeneration führt. Dagegen führt die chronische Leberschädigung zu einer Aktivierung hepatischer Sternzellen, die durch Produktion von Extrazellulärmatrix in einer Leberfibrose/-zirrhose mündet; dabei kann die Proliferation von Hepatozyten ebenfalls zur Leberregeneration beitragen. Ist diese Fähigkeit zur Regeneration nicht ausreichend, kommt es zum irreversiblen akuten Leberversagen, das ohne Lebertransplantation häufig zum Tode führt.

Im Zuge des Mangels an vorhandenen Leberpräparaten für eine Lebertransplantation wurde das Verfahren der Leberzelltransplantation entwickelt. Hiernach wird eine Suspension aus Leberzellen, die aus einem Leberpräparat isoliert wurden, in die Portalvene oder die Milz eines Empfängers injiziert. Die transplantierten Leberzellen gelangen dann über die Portalvenen in die Sinusoide, treten von dort in das geschädigte Gewebe der Leber über und regenerieren die Leber (Gupta et al. 1999). Dieses Verfahren wird zur Zeit nur in klinischen Studien angewandt (Meyburg et al. 2009). Obwohl die Zelltransplantation seit über 10 Jahren in verschiedenen Tiermodellen und bei einigen Patienten angewandt wurde, war bislang kaum etwas über die Klonalität der Zellregeneration bekannt. Daher wurde die RGB-Methode eingesetzt, um die Proliferation transplanteder Hepatozyten *in vivo* zu verfolgen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die neuentwickelte Methode der RGB-Markierung die klonale Zusammensetzung der Repopulation und Regeneration einer kranken Leber durch transplantierte Leberzellen visualisiert und beurteilt werden. Hierfür wurde ein Mausmodell verwendet (uPA/SCID-Maus), bei dem die Mäuse an einen massiven Leberschaden mit chronischer hepatischer Insuffizienz erkranken (Heckel et al. 1990). Die Mäuse können durch die Transplantation gesunder primärer Leberzellen, die die kranke Leber repopulieren und regenerieren, geheilt werden (Rhim et al. 1995, Dandri et al. 2001, Meuleman et al. 2008). Die uPA-Maus besitzt zudem einen immundefizienten *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Hintergrund und ermöglicht damit eine Transplantation xenogener Zellen (Meuleman et al. 2008, Lütgehetmann et al. 2010). Zugleich wird hierdurch eine Immunantwort gegen die immunogenen Fluoreszenzproteine, die bei der RGB-Markierung eingesetzt werden, verhindert. Auf Grund ihrer Immunogenität können Fluoreszenzmarker - anders als zum Beispiel Oberflächenmarker - nicht in immunkompetenten Organismen angewendet werden. Die RGB-Markierung kann daher *in vivo* nur in immundefizienten Tiermodellen angewendet werden.

5.3.1. RGB-Markierung primärer Leberzellen

Primäre Leberzellen stellten hinsichtlich der Transduktion mit den RGB-Vektoren zunächst ein Problem dar. Sie können nicht über mehrere Stunden *in vitro* kultiviert werden, da die Vitalität der Zellen stark abnimmt und die Zellen über die Zeit dedifferenzieren (Giannini et al. 2003, Wang et al. 2004, Li et al. 2010, Lecluyse und Alexandre 2010). Die Zellen müssen möglichst schnell nach der Isolation wieder transplantiert werden, um ein effizientes Anwachsen der Zellen in der Empfängerleber sicherzustellen. Daher wurde ein Protokoll entwickelt, das eine effiziente Transduktion primärer Leberzellen innerhalb von nur einer Stunde ermöglicht (siehe Kapitel 3.4.5.). Dabei wurden Transduktionsraten von etwa 60% pro RGB-Vektor erreicht (bei einer MOI von 80 je RGB-Vektor). Die Zellen konnten bei diesen Transduktionsraten mit vielen unterschiedlichen Mischfarben markiert werden. Mit dem entwickelten Transduktionsprotokoll konnten vergleichbare Transduktionsraten erzielt werden, wie sie unter anderem von Giannini et al. (2003) beschrieben worden sind. Aus den genannten Transduktionsraten (60% je RGB-Vektor) ergibt sich, dass ca. 5% der transplantierten Zellen mit keinem der drei Vektoren transduziert worden sind und daher keine Farbmarkierung besaßen. Dieses ließ sich nicht vermeiden, da die transduzierten Zellen innerhalb kurzer Zeit transplantiert werden mussten und daher weder sortiert noch selektioniert werden konnten.

5.3.2. Leberregeneration einer heterozygoten uPA/SCID-Maus

In einem ersten Versuch wurden RGB-markierte primäre murine Leberzellen in Mäuse transplantiert, die heterozygot für das leberschädigende uPA-Transgen waren. Die transplantierten Leberzellen konnten vier Wochen nach der Transplantation an Hand der Fluoreszenzmarkierung in den Leberpräparaten identifiziert werden. Hierbei war sichtbar, dass sich die transplantierten Leberzellen in das Lebergewebe des Empfängers integriert und morphologisch gesundes Lebergewebe gebildet haben. In mehreren veröffentlichten Arbeiten mit dem uPA-Modell konnten transplantierte Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden in den Empfängerlebern identifiziert werden. Nach der Transplantation xenogener Zellen (z.B. primäre humane Leberzellen) konnten diese beispielsweise mit Hilfe spenderspezifischen Markern identifiziert werden (Dandri et al. 2001, Meuleman et al. 2005, Lütgehetmann et al. 2010). In einer anderen Arbeit wurden die Zellen vor der Transplantation durch lentiviralen Gentransfer mit einem Fluoreszenzprotein markiert, so dass diese später durch die Fluoreszenz in den Lebern der uPA-Mäuse identifiziert werden konnten (Giannini et al. 2003).

Durch die Anwendung der RGB-Markierung konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die klonale Zusammensetzung der Repopulation und Regeneration beurteilt werden. Die RGB-

Markierung ermöglicht in diesem Fall nicht nur eine effiziente Identifikation der Zellen, sondern einen zusätzlichen Informationsgewinn hinsichtlich der klonalen Zusammensetzung der Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Repopulation und Regeneration der Leber polyklonal erfolgt war. In den Leberpräparaten waren mehrere verschiedenfarbige Areale sichtbar, innerhalb derer alle Zellen jeweils die gleiche spezifische Fluoreszenzfarbe als Markierung besaßen. Folglich sind mehrere einzelne Leberzellen in der Leber angewachsen. Diese haben sich anschließend mehrmals geteilt und auf diese Weise die kranke Leber repopuliert und regeneriert.

5.3.3. Leberregeneration einer homozygoten uPA/SCID-Maus

In einem zweiten Versuch mit dem uPA-Modell wurden Mäuse verwendet, die homozygot für das uPA-Transgen waren. In diesem Fall wurden die erkrankten Lebern durch primäre humane Leberzellen regeneriert, die aus einem menschlichen Leberpräparat nach einer Lebertransplantation isoliert wurden. Auch diese Zellen konnten effizient mit den RGB-Vektoren transduziert werden, so dass diese mit vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert waren. Vier Wochen nach der Transplantation konnten in den Leberpräparaten kreisrunde Repopulationsareale identifiziert werden, die von den transplantierten humanen Zellen gebildet wurden. Dreidimensional handelt es sich dabei um kugelförmige Regenerationsknoten, die in mehreren veröffentlichten Arbeiten bereits beschrieben worden sind (Dandri et al. 2001, Meuleman et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die RGB-Markierung gezeigt werden, dass die Regenerationsknoten monoklonal und aus einer einzelnen angewachsenen Zelle entstanden sind.

5.3.4. Vergleich der Leberregeneration

Durch die RGB-Markierung wurde erkennbar, dass sich die Repopulation und Regeneration durch transplantierte Leberzellen in heterozygoten und homozygoten Mäusen unterscheidet: In heterozygoten Mäusen waren die Regenerationsareale deutlich kleiner und in ihrer dreidimensionalen Struktur heterogener. Für heterozygote Tiere konnte bereits gezeigt werden, dass einige wirtseigene Leberzellen das uPA-Transgen durch somatische Rekombination verlieren (Meuleman et al. 2008). Die Zellen besitzen wie die transplantierten Hepatozyten einen Wachstumsvorteil gegenüber den uPA-exprimierenden Hepatozyten und regenerieren ebenfalls die geschädigte Leber. Die Proliferation der transplantierten RGB-markierten Zellen wurde daher gestoppt, sobald sie in den Kontakt mit endogenen Hepatozyten kamen (Kontaktinhibition). Unter den transplantierten Zellen befanden sich jedoch auch nicht-transduzierte Hepatozyten (etwa 5%). Sie haben womöglich auch - in

ähnlicher Weise wie die endogenen Leberzellen - in einigen wenigen Arealen das Wachstum RGB-markierter Zellen durch Kontaktinhibition gestoppt.

Bei homozygoten Tieren kommt es hingegen äußerst selten zu einer endogenen Repopulation der Leber durch wirtseigene Leberzellen (Meuleman et al. 2008). Da die wirtseigenen Zellen auf Grund der uPA-Expression ständig zugrunde gehen, wird die Expansion der transplantierten Zellen - anders als bei den heterozygoten Tieren - nicht durch Kontaktinhibition gestoppt. Die transplantierten Leberzellen können, nachdem sie ins Lebergewebe angewachsen sind, in alle Richtungen proliferieren und bilden auf diese Weise kugelförmige Regenerationsknoten (Dandri et al. 2001, Meuleman et al. 2008).

Dieses Wachstumsverhalten in homozygoten Tieren konnte bisher nur nach Sakrifizierung der uPA/SCID-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation beschrieben werden. Lütgehetmann et al. (2010) analysierten die Größe der Repopulationsareale in den Lebern der Mäuse jeweils 5, 10, 20, 40 und 80 Tage nach der Transplantation. Die transplantierten Zellen wurden durch eine immunhistochemische Färbung identifiziert. 5 Tage nach der Transplantation waren Areale zu sehen, die aus ein bis zwei Zellen bestanden. In den Mäusen, die zu späteren Zeitpunkten nach der Transplantation sakrifiziert wurden, konnten immer größer werdende Areale identifiziert werden. Auf diese Weise zeigten Lütgehetmann et al. (2010), dass die Regenerationsknoten durch eine klonale Expansion ein bis zweier angewachsener Zellen entstanden sind. Dieses beschriebene Wachstumsverhalten der transplantierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der RGB-Markierung bestätigt werden. Hierfür mussten jedoch nicht viele Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation sakrifiziert werden. Durch die Anwendung der RGB-Markierung konnte allein durch die Betrachtung der Fluoreszenzfarben in den Arealen die klonale Expansion der Zellen zurückverfolgt werden. Damit kann auch die Zahl zu analysierender Tiere signifikant verringert werden.

Insgesamt konnte im Regenerationsmodell gezeigt werden, dass die RGB-Markierung auch *in vivo* zur Identifikation von Zellen und vor allem zur Beurteilung der klonalen Expansion ein exzellentes Mittel darstellt. Durch die RGB-Markierung konnte in Mäusen die klonale Zusammensetzung der Regeneration einer geschädigten Leber durch transplantierte gesunde Zellen visualisiert und an Hand dessen beurteilt werden.

Eine direkte RGB-Markierung *in vivo*-lebender Zellen - beispielsweise durch eine intravenöse Injektion der RGB-Vektoren - ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Eine kalkulierte und gezielte Transduktion von Zellen ist bei einem derartigen Versuchsansatz technisch anspruchsvoll und erfordert die weitere Entwicklung geeigneter Protokolle.

5.4. Transplantation RGB-markierter FH-hTERT in die Leber

Die Zahl der vorhandenen Leberspenden für eine Lebertransplantation oder Leberzelltransplantation ist begrenzt. Eine Lösung des Problems könnten immortalisierte Leberzellen darstellen. Die Zellen könnten *in vitro* expandiert und anschließend verteilt auf mehrere Empfänger transplantiert werden. Dazu konnten bereits erste erfolgreiche Versuche durchgeführt werden, bei denen es gelang, primäre Leberzellen aus Ratten zu immortalisieren und *in vitro* zu kultivieren und zu expandieren (Fox et al. 1995). Wege et al. (2003) konnten primäre humane fetale Hepatozyten durch eine ektopische Expression der humanen Telomerase immortalisieren und entwickelten daraus eine Zelllinie: humane Telomerase (hTERT)-immortalisierte fetale Hepatozyten (FH-hTERT).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der RGB-Markierung untersucht, ob FH-hTERT - ähnlich wie die primären Leberzellen - eine geschädigte Leber repopulieren und regenerieren können. Als Empfängertiere für die Transplantation wurden heterozygote uPA/SCID-Mäuse verwendet. In der Literatur gibt es - anders als für die Transplantation primärer Leberzellen - nur wenige Daten zu Transplantationen von FH-hTERT (Wege et al. 2003). Daher wurde bereits neun Tage nach der Transplantation RGB-markierter FH-hTERT eine Maus analysiert, um zu überprüfen, ob die Zellen die Fähigkeit besitzen, in der Leber einer Empfängermaus anzuwachsen. Durch die RGB-Markierung konnten die transplantierten Zellen in vielen Arealen der Empfängerleber identifiziert werden. In den meist abgegrenzten Arealen befanden sich mehrere FH-hTERT mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben, wodurch gezeigt werden konnte, dass viele der transplantierten FH-hTERT in das Lebergewebe der Empfängertiere eingewandert waren. Mit Hilfe der RGB-Markierung konnte zudem gezeigt werden, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Zellteilung der FH-hTERT in den Empfängerlebern stattgefunden hat. Eine derartige Beurteilung der klonalen Zusammensetzung dieser Areale wäre mit anderen Markierungs- und Identifikationsmethoden nicht möglich. Durch eine Markierung mit nur einem Marker kann nicht unterschieden werden, ob diese Areale in Folge einer klonalen Expansion einer einzelnen angewachsenen Zelle entstanden sind, oder ob es sich - wie durch die RGB-Markierung gezeigt - um mehrere transplantierte Zellen handelt, die an dieser Stelle gemeinsam ins Lebergewebe eingewandert sind.

Acht Wochen nach der Transplantation wurden zwei weitere Mäuse analysiert. In mehreren Arealen in den Lebern der Mäuse waren FH-hTERT sichtbar, die je Areal nur noch mit zwei bis drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert waren. Demnach expandierten nur einige wenige der angewachsenen Zellen.

Durch die RGB-Markierung konnte so die Repopulationskinetik der FH-hTERT visualisiert werden: Aus den polyklonalen Clustern neun Tage nach der Transplantation proliferierten

einige wenige Zellen und bildeten oligoklonale Areale in der Leber. Nach acht Wochen hatten die Zellen jedoch nicht die hepatozytenspezifische Morphologie angenommen, sondern waren eher spindelförmig. Die Zellen scheinen also nicht in der Lage zu sein, in den Mäusen gesundes Lebergewebe zu bilden. Ob die angewachsenen Zellen hepatozytenspezifische Marker exprimierten, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

5.4.1. Entstehung eines Tumors durch RGB-markierte FH-hTERT

Vier Monate nach der Transplantation wurden MRT-Aufnahmen der Lebern der Mäuse angefertigt. Überraschenderweise konnte in einer der sieben Mäuse ein Tumor in der Leber identifiziert werden. Mit Hilfe der RGB-Markierung und durch immunhistochemische Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass der Tumor, der im MRT sichtbar war, von FH-hTERT gebildet wurde. Er besaß einen Durchmesser von etwa 5 mm und infiltrierte das angrenzende gesunde Lebergewebe.

In allen anderen sechs Mäusen, die RGB-markierte FH-hTERT erhielten, konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden. In diesen Mäusen waren Repopulationsareale sichtbar, die aus mono- oder oligoklonalen FH-hTERT bestanden. In diesen Arealen war jedoch kein malignes Wachstumsverhalten der Zellen zu beobachten. Der aufgetretene Tumor stellte somit in diesem Experiment ein singuläres Ereignis dar.

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzfarbmarkierung der FH-hTERT, die den Tumor bildeten, war erkennbar, dass alle Zellen eine homogene blaue Fluoreszenzfarbe besaßen. Keine andere Fluoreszenzfarbe konnte innerhalb des Tumors identifiziert werden.

Durch die Verwendung der RGB-Markierung konnten Rückschlüsse bezüglich des klonalen Ursprungs des Tumors gemacht werden: Der Tumor schien aus einer einzelnen transformierten Zelle entstanden zu sein.

In den bisher veröffentlichten Arbeiten besaßen die FH-hTERT kein onkogenes Potential (Wege et al. 2003). In der Arbeit von Wege et al. (2003) konnte weder nach subkutaner Injektion der Zellen noch nach Transplantation der Zellen in die Leber ein Tumorwachstum beobachtet werden.

Bei retroviralen Vektoren - wie auch bei den lentiviralen RGB-Vektoren - erfolgt der Gentransfer durch einen stabilen Einbau der Vektorsequenz in das Genom der Wirtszelle. Hierbei besteht die Gefahr, dass durch die Integration des Vektors Zellregulationsmechanismen auf DNA-Ebene beeinflusst werden (Kustikova et al. 2005, Baum et al. 2006, Fehse 2006). Der Vektor kann beispielsweise in die Nähe eines Protoonkogens oder eines Gens, das eine wichtige Rolle im Zellzyklus der Zelle besitzt, integrieren und die Expression dieses Gens aktivieren bzw. heraufregulieren. Sobald die Vektorintegration zu einem nachweisbaren Effekt auf eine betroffene Zelle geführt hat, wird

von der so genannten Insertionsmutagenese gesprochen (Baum et al. 2003, Fehse 2006). Im schlimmsten Fall kann dieses zu einem unkontrollierten Wachstum der Zelle und zur Entstehung eines malignen Tumors führen. Derartige Fälle konnten in klinischen Gentherapiestudien beobachtet werden: In einer in Paris durchgeführten Gentherapiestudie wurden 9 Patienten mit einem schweren kombinierten Immundefekt (*X-chromosomal severe combined immunodeficiency*; SCID-X1) erfolgreich mit einem retroviralen Vektor behandelt, der das bei diesen Patienten fehlende Gen für den IL-2 Rezeptor (*IL2-receptor gamma*; IL2RG) als Transgen enthielt. Bei vier von neun Patienten kam es jedoch nach 31-68 Monaten zu Leukämien. Bei drei Patienten konnte nachgewiesen werden, dass durch die Integration des therapeutischen Vektors das Protoonkogen LMO2 aktiviert wurde und verantwortlich für die klonale Proliferation war (Hacein-Bey-Abina et al. 2008). In einer analogen Gentherapiestudie in London konnte ebenfalls ein Leukämiefall beobachtet werden, dem offensichtlich der gleiche Mechanismus zugrunde lag (Howe et al. 2008).

Der in der Maus entstandene Lebertumor könnte daher auf ähnliche Weise durch eine Insertionsmutagenese infolge der RGB-Markierung entstanden sein. Obwohl die Insertionsmutagenese ein äußerst seltenes Ereignis darstellt (Baum et al. 2003), kann ihr Auftreten bei der Nutzung der RGB-Markierung nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Bei den FH-hTERT-Zellen handelte es sich zudem um bereits immortalisierte Zellen, sodass für eine maligne Transformation dieser Zellen evtl. nur noch ein zusätzlicher *Hit* notwendig ist. Im Rahmen der Beurteilung der Klonalität des Tumors durch molekularbiologische Methoden (siehe nächstes Kapitel) wurde der Integrationsort des lentiviralen Vektors im Genom der Zellen identifiziert. In der Nähe des Vektors befand sich jedoch kein bekanntes Gen. Folglich blieb unklar, ob der Tumor durch eine Insertionsmutagenese entstanden ist. Eine andere mögliche Ursache wäre, dass einige Zellen in Folge der Langzeitkultivierung *in vitro* maligne transformiert sind. Die Zelllinie wurde 2002 entwickelt und ist seitdem mehrfach *in vitro* passagiert worden. In der Literatur ist beschrieben, dass Zellen, wenn sie über längere Zeit *in vitro* kultiviert werden, ihren Phänotyp verändern und sogar zu malignen Tumorzellen mutieren können (Milyavsky et al. 2003, Røslund et al. 2009). Die Ursache der Entstehung des Tumors wurde jedoch an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

Anhand des hier beschriebenen Experiments konnte insgesamt gezeigt werden, dass die RGB-Markierung eine mögliche Methode zur Untersuchung des klonalen Ursprungs von Tumoren darstellt. Tatsächlich konnte auf der Grundlage der RGB-Markierung und der nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen (s.u.) eindeutig gezeigt werden, dass der Tumor durch die klonale Expansion einer einzelnen Zelle entstanden ist.

5.4.2. Beurteilung der Klonalität des Tumors durch molekularbiologische Methoden

Die *Ligation mediated*-Polymerase-Kettenreaktion (LM-PCR) stellt eine etablierte Methode zur Identifikation von Klonen innerhalb einer Population transduzierter Zellen dar (Kustikova et al. 2008).

Retrovirale Vektoren integrieren zufällig an verschiedenen Orten im Genom der Zellen. Die Integrationsstellen sind von Zelle zu Zelle verschieden und für jede einzelne transduzierte Zelle spezifisch. Da die Vektoren stabil in das Genom einer Zelle integrieren, besitzen alle Zellen, die durch Zellteilungen aus einer transduzierten Zelle entstehen, die gleiche spezifische Integrationsstelle des retroviralen Vektors und können auf diese Weise als Klon identifiziert werden (Kustikova et al. 2008). Mit Hilfe der LM-PCR können die spezifischen Integrationsstellen der Vektoren identifiziert werden.

Die Klonalität des FH-hTERT-Tumors wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mit Hilfe der LM-PCR bestimmt. Hierdurch sollte die RGB-Markierung als Methode zur Identifikation von Zellklonen bestätigt werden. In einer DNA-Probe des Tumors konnte nach der LM-PCR eine spezifische Integrationsstelle eines lentiviralen Vektors identifiziert werden. Die Vektorintegration ließ sich auf dem langen Arm des Chromosoms 5 lokalisieren. Zusätzlich konnte in zwei weiteren Arealen des Tumors mit Hilfe einer verschachtelten (*nested*)-PCR nachgewiesen werden, dass auch hier die Zellen die gleiche spezifische Integrationsstelle besaßen. Somit konnte gezeigt werden, dass der Tumor tatsächlich - wie auf Basis der RGB-Markierung bereits vermutet - aus einer einzelnen transduzierten Zelle entstanden ist. Die RGB-Markierung als Methode zur Identifikation von Zellklonen konnte hier durch eine zweite unabhängige Methode zur Beurteilung der Klonalität bestätigt werden.

An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass mit Hilfe der LM-PCR und der *nested*-PCR nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden konnte, ob sich innerhalb des Tumors noch weitere kleine Zellklone befanden. Die Sensivität der LM-PCR ist relativ limitiert. Zellklone, die aus wenigen Zellen bestehen, können mit dieser Methode kaum nachgewiesen werden (Kustikova et al. 2008).

Hier wird ein Vorteil der RGB-Markierung gegenüber der LM-PCR deutlich: Die RGB-Markierung erlaubt auch eine Identifikation von Klonen, die aus wenigen Zellen bestehen. Sogar Einzelzellklone können an Hand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzfarbe unterschieden werden.

5.5. RGB-Markierung: Analysen zum klonalen Ursprung von Tumoren

Obwohl die meisten Malignome aus einer einzelnen maligne transformierten Zelle entstehen, finden sich innerhalb der Tumoren multiple Subklone, die in Folge des Tumorwachstums

entstehen und unabhängig voneinander expandieren (Leedham und Wright 2008). Innerhalb des Tumorverbandes entstehen Subklone, die eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika entwickeln oder die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen. Bisher durchgeführte Studien zur Analyse der Klonalität von Tumoren erfolgten durch serielle Transplantationen der Tumorzellen oder durch Identifikation der Klone anhand spezifischer molekularbiologischer Marker wie X-Chromosom-Inaktivierung, Mikrosatellitenmarker und Punktmutationen (Leedham und Wright 2008). Diese Methoden sind jedoch aufwendig und reichen zur Beantwortung vieler ungeklärter Fragen nicht aus (Jovanovic et al. 2003, Leedham und Wright 2008, Wagener und Müller 2009). Effektive neue Methoden zur Beurteilung der klonalen Zusammensetzung der Tumoren und zur Verfolgung einzelner Tumorsubklone könnten dazu beitragen, neue Erkenntnisse in der Wachstumsdynamik und Metastasierung von Tumoren zu erlangen.

In dem Transplantationsversuch mit RGB-markierten FH-hTERT konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe der RGB-Markierung Rückschlüsse bezüglich des klonalen Ursprungs eines Tumors gemacht werden können. In einem weiteren Versuch wurde durch die RGB-Markierung das klonale Tumorwachstum von humanen BON-Tumorzellen in der Leber immundefizienter Mäuse verfolgt. Die Zelllinie stammt ursprünglich aus einer Lymphknotenmetastase eines Patienten mit einem Pankreaskarzinoid (Evers et al. 1994). Drei Wochen nach der Transplantation der RGB-markierten BON-Tumorzellen konnten multiple Tumoren in den Lebern der Mäuse identifiziert werden, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert waren. Innerhalb der meisten Tumoren war jeweils eine individuelle Fluoreszenzfarbe erkennbar. Dieses deutet darauf hin, dass die Tumoren unabhängig voneinander jeweils aus einer einzelnen angewachsenen Tumorzelle entstanden sind. Die angewachsenen Tumorzellen expandierten verdrängend in alle dreidimensionalen Richtungen und bildeten auf diese Weise mehrere kugelförmige Tumoren in der Leber. Die klonale Expansion der Tumorzellen in der Leber konnte hier mit Hilfe der RGB-Markierung visualisiert werden.

5.5.1. Farbstabilität der RGB-Markierung bei RGB-markierten BON-Tumorzellen

In den Lebern waren jedoch auch vereinzelt Tumoren sichtbar, innerhalb derer zwei bis drei verschiedene Fluoreszenzfarben sichtbar waren. Diese Tumoren scheinen aus zwei bis drei angewachsenen Tumorzellen entstanden zu sein. Erstaunlich jedoch war, dass die Tumoren die gleiche kugelförmige Struktur besaßen wie die monoklonalen Tumoren. Bei einem Tumor, der aus zwei bis drei verschiedenen Zellen entstand, ist durchaus zu erwarten, dass die Struktur des daraus entstehenden Tumors heterogener ist (z.B. in Form von zwei bis drei

ineinander verschachtelten Kugeln). An dieser Stelle können zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden, warum es zum Auftreten von mehrfarbigen Tumoren kam: (1) Die Tumoren sind gemäß der RGB-Markierung oligoklonal und durch die klonale Expansion mehrerer angewachsener Zellen entstanden. (2) Die Tumoren könnten aber auch genauso wie die einfarbigen, monoklonalen Tumoren aus einer einzelnen angewachsenen Zelle entstanden sein. Während der Tumorexpansion könnten jedoch einige Zellen ihre Fluoreszenzfarbe verändert und so den Eindruck erweckt haben, dass der Tumor aus mehreren angewachsenen Zellen gebildet wurde. Es ist durchaus bekannt, dass Tumorzellen während der Tumorexpansion weitere Mutationen erhalten und auf diese Weise einen Subklon innerhalb des Tumors bilden (Leedham und Wright 2008). Durch Mutationen während der Tumorexpansion könnten theoretisch auch Vektorsequenzen für die Expression der Fluoreszenzproteine vermehrt oder eliminiert werden. Folgendes Szenario wäre beispielsweise denkbar: Eine Tumorzelle wurde mit zwei Vektoren transduziert, von denen einer für ein grünes und der andere für ein rotes Fluoreszenzprotein kodiert. Durch Addition beider Fluoreszenzen entsteht daraus eine gelbe Fluoreszenzfarbe. Während der Tumorexpansion ging in einer Tumorzelle die Sequenz für die Expression des roten Fluoreszenzproteins auf Grund einer chromosomalen Deletion verloren. Folglich wären innerhalb des Tumors, der aus einer Zelle entstanden ist, zwei Fluoreszenzfarben sichtbar: eine gelbe und eine grüne.

Die Frage nach der Farbstabilität der RGB-Markierung hat für die Methode wichtige Implikationen. Wie an dem obigen Szenario dargestellt, kann die klonale Zusammensetzung von Zellen bei Änderungen der Fluoreszenzfarbmarkierung fehlgedeutet werden. Eine Identifikation und Verfolgung von Zellklonen mit Hilfe der RGB-Markierung ist in der Tat nur möglich, wenn die spezifische Fluoreszenzfarbmarkierung innerhalb eines Zellklons konstant bleibt. Für die RGB-Markierung musste daher gezeigt werden, dass sie über einen langen Zeitraum *in vitro* und *in vivo* stabil ist. Dabei sollten sich weder die Farbe noch der Farbton innerhalb eines Zellklons verändern. Dazu wurden zwei Versuchsansätze entwickelt:

In dem ersten Versuch wurden Einzelzellklone RGB-markierter BON-Tumorzellen generiert. Die Zellen wurden *in vitro* klonal expandiert, so dass aus einer einzelnen RGB-markierten Zelle mehrere Millionen Zellen entstanden. Dabei konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum von mehr als einem Monat keine Farbänderung beobachtet werden. Alle Zellen besaßen die gleiche Fluoreszenzfarbe wie die ursprüngliche Einzelzelle. Auch nach Transplantation der Zellen in die Leber konnten ausschließlich Tumoren identifiziert werden, die die gleiche Fluoreszenzfarbe zeigten wie die Ursprungszelle. Dabei konnte weder *in vitro* noch *in vivo* eine Zelle detektiert werden, die ihre Fluoreszenzfarbe geändert oder verloren hatte.

In dem zweiten experimentellen Ansatz wurde untersucht, ob RGB-markierte BON-Tumorzellen ihre individuelle Fluoreszenzfarbe auch nach serieller Transplantation beibehalten. Hierfür wurden RGB-markierte BON-Tumorzellen in immundefiziente Mäuse transplantiert, so dass in den Lebern der Mäuse multiple Tumoren mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarben entstanden. Aus einfarbigen Tumoren wurden Zellen isoliert und über einen Monat *in vitro* kultiviert. Anschließend wurden die generierten Tumorklone wieder in Mäuse transplantiert. Alle Tumoren, die daraufhin in den Lebern der Mäuse entstanden sind, besaßen die gleiche Fluoreszenzfarbe wie der initiale Tumor, aus dem die Zellen ursprünglich isoliert worden waren. Innerhalb der Tumoren konnte keine einzige Zelle identifiziert werden, die ihre Fluoreszenzfarbe geändert hat.

Mit den beiden Versuchen zur Farbstabilität konnte somit nachgewiesen werden, dass die RGB-Markierung über einen langen Zeitraum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabil ist. Das spezifische Expressionsmuster der drei Fluoreszenzproteine, das in der Addition eine spezifische Fluoreszenzmischfarbe ergibt, bleibt sogar nach serieller Transplantation konstant.

Zusätzlich wurde der beschriebene serielle Transplantationsansatz benutzt, um den klonalen Ursprung der mehrfarbigen Tumoren zu klären. Dazu wurden zwei verschiedenfarbige Tumorklone im Verhältnis 1:1 intrasplenal in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. In den Lebern der Mäuse konnten neben einfarbigen Tumoren, die eine der beiden klonspezifischen Fluoreszenzfarben besaßen, auch Tumoren identifiziert werden, innerhalb derer beide Fluoreszenzfarben präsent waren.

Hierdurch konnte bestätigt werden, was durch die RGB-Markierung bereits visualisiert werden konnte: Tumoren, die nach einer Transplantation von BON-Tumorzellen in der Leber entstehen, können durch die klonale Expansion einer einzelnen oder mehrerer gleichzeitig angewachsener Zellen gebildet werden.

Ob die Farbstabilität der RGB-Markierung, die in dieser Arbeit bei BON-Tumorzellen gezeigt werden konnte, insbesondere auch für andere Tumorzellen gilt, muss weiter untersucht werden. Ein Markenzeichen von Tumorzellen ist ihre genetische Instabilität. Die Mehrzahl der aggressiven soliden Tumoren sind hochgradig aneuploid (Mitelman und Heim 1987). Der Grad der Aneuploidie scheint in vielen Fällen mit dem Stadium des Tumors zusammenzuhängen, wobei fortgeschrittene Tumoren meist ein erhöhtes Ausmaß an chromosomalen Veränderungen aufweisen (Risques et al. 2001). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Folge von chromosomalen Veränderungen während der Tumorprogression integrierte Vektorsequenzen vermehrt oder eliminiert werden und sich damit die Fluoreszenzfarbmarkierung verändert.

5.6. Technische Voraussetzungen

Geräte der Wahl zur Identifizierung von Zellklonen mit Hilfe der RGB-Markierung sind Fluoreszenzmikroskope oder konfokale Mikroskope. Die Mikroskope müssen dabei mit den entsprechenden Filtern für die Betrachtung der drei Fluoreszenzproteine *mCherry*, *Venus* und *Cerulean* (bzw. möglicher alternativer Fluoreszenzproteine) ausgestattet sein (siehe Kapitel 3.9.1.). In der vorliegenden Arbeit wurde für jedes der drei Fluoreszenzproteine jeweils ein eigener Filter verwendet. Für die Betrachtung der RGB-Markierung mussten drei Fluoreszenzaufnahmen - jeweils mit einem der drei Filter - angefertigt und anschließend als *Overlay* zusammengefügt werden. Eine direkte Betrachtung der RGB-Markierung ist mit *Triple Bandpass*-Filtern möglich, bei denen die drei Fluoreszenzen gleichzeitig betrachtet werden können. Bei Experimenten, bei denen die Verteilung der Fluoreszenzfarben bzw. der Zellklone über längeren Zeitraum beobachtet werden soll, muss darauf geachtet werden, dass stets die gleichen technischen Voraussetzungen gegeben sind: (1) Die Fluoreszenzen sollten immer mit demselben Mikroskop und mit derselben Kamera betrachtet werden. (2) Hierbei sollten die jeweiligen Geräteeinstellungen möglichst gleich bleiben. (3) Bei der Erstellung von Fluoreszenzaufnahmen sollten die Belichtungszeiten dokumentiert und bei jeder weiteren Aufnahme beibehalten werden. Andernfalls wäre ein Vergleich der Fluoreszenzen nicht möglich.

Die Durchflusszytometrie hat sich als effektives Verfahren zur Identifikation fluoreszenzmarkierter Zellen etabliert. Die RGB-markierten Zellen lassen sich ebenfalls mit dem Durchflusszytometer identifizieren. Eine Identifikation von gleichfarbigen Zellklonen bzw. die Sortierung einzelner Klone mit einem *fluorescent activated cell sorting* (FACS)-System ist bei der Vielzahl verschiedener Fluoreszenzmischfarben jedoch technisch anspruchsvoll und erfordert die Entwicklung geeigneter Protokolle.

5.7. Fazit

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die RGB-Markierung als eine neue Technik der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung etabliert werden. Die Methode ermöglicht eine effektive Identifikation und Verfolgung von Zellen und Zellklonen an Hand ihrer individuellen Fluoreszenzfarben. Die Klonalität der RGB-Markierung wurde durch mehrere unabhängige und etablierte Methoden der Klonalitätsanalyse nachgewiesen: (1) *in vitro* Klonierung von Tumorzellen mit nachfolgender Transplantation, (2) serielle Transplantation von Tumoren. In beiden Fällen konnte die Klonalität in unserem Labor zusätzlich auf der Ebene der genomischen Vektorintegrationsstellen molekularbiologisch durch die LM-PCR verifiziert werden (Weber et al. 2011). Außerhalb der vorliegenden Arbeit wurden zudem im hämatopoetischen System *Colony Assays in vitro* sowie *CFU-S Assays in vivo* durchgeführt,

die ebenfalls einen Klonalitätsnachweis erbrachten (Weber et al. 2011). Es lässt sich schlussfolgern, dass die RGB-Markierung stabil ist und sogar die Verfolgung eines Zellklons über längere Zeiträume *in vitro* und *in vivo* erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit Hilfe der RGB-Markierung neue Erkenntnisse in der Leberregeneration und im Wachstum von Tumoren in der Leber erzielt werden können.

Das Prinzip der RGB-Markierung kann mit vergleichbar geringem Aufwand auf viele verschiedene Zellen und Systeme übertragen werden und ermöglicht daher auch eine Anwendung in vielen weiteren Bereichen. Mit Hilfe der RGB-Markierung könnte beispielsweise das klonale Wachstumsverhalten verschiedenster Malignome erforscht werden. Eine denkbare Anwendung wäre eine Verfolgung von Klonen, die in der Lage sind zu metastasieren. Neben der Tumorbilogie stellen auch die Stammzellforschung und die regenerative Medizin mögliche Anwendungsgebiete der neuen Methode dar.

6. Zusammenfassung

Fluoreszenzproteine haben sich in vielen biowissenschaftlichen Anwendungen als effektives Mittel zur Markierung von Zellen bewährt. Mit keinem anderen Marker ist eine derartig schnelle und eindeutige Identifizierung markierter Zellen möglich. Auf Grund einer limitierten Anzahl verfügbarer Fluoreszenzproteine ist eine individuelle Markierung einzelner Zellen mit vielen unterschiedlichen Farben und eine damit verbundene Unterscheidung und Verfolgung einzelner Zellklone innerhalb eines Zellverbandes jedoch nur beschränkt möglich.

In der vorliegenden Dissertation wurde - basierend auf der Dreifarben Theorie - eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung etabliert: die RGB-Markierung. Bei der Methode wurden drei lentivirale Vektoren verwendet, die jeweils ein rotes (*mCherry*), ein grün-gelbes (*Venus*) und ein blaues (*Cerulean*) Fluoreszenzprotein als Transgen exprimieren (RGB-Vektoren). Mit dem Ziel der RGB-Markierung werden die RGB-Vektoren gleichzeitig auf Zielzellen gegeben, wodurch die Vektoren zufällig in unterschiedlichen Kombinationen und Mengen in das Genom einer Zelle integrieren. Die Expressionshöhe der einzelnen Fluoreszenzfarben wird dabei sowohl von der Kopienzahl als auch den jeweiligen Integrationsorten beeinflusst. In der Summe werden in den RGB-markierten Zellen unterschiedliche Mengen der drei Fluoreszenzproteine exprimiert, wodurch in der Addition - analog zur Dreifarben Theorie - eine Vielzahl neuer Fluoreszenzfarben (Mischfarben) in den einzelnen Zellen generiert wird. Da die lentiviralen RGB-Vektoren stabil in das Genom der Zellen integrieren, wird das individuelle Expressionsmuster der drei Fluoreszenzproteine auch an alle Tochterzellen weitergegeben. Alle Zellen, die aus einer einzelnen transduzierten Zelle entstanden sind, können daher anhand ihrer spezifischen (individuellen) Fluoreszenzfarbe identifiziert werden. Die RGB-Markierung ist also nicht nur eine neue Methode der fluoreszenzbasierten Zellmarkierung, sondern darüber hinaus auch eine neuartige Methode zur Verfolgung und Identifikation von Zellklonen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RGB-Markierung zur Verfolgung von Zellklonen in der Leber verwendet: In uPA/SCID-Mäusen konnte die klonale Zusammensetzung der Regeneration einer geschädigten Leber durch transplantierte Leberzellen visualisiert und anhand dessen beurteilt werden. Zudem konnte mit der neuen Methode das klonale Wachstum von Tumoren in der Leber verfolgt werden. Die Klonalität der RGB-Markierung wurde sowohl zell- als auch molekularbiologisch bestätigt. Auch die Stabilität der RGB-Markierung über lange Zeiträume und multiple Zellteilungen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (u.a. durch serielle Transplantationen) nachgewiesen werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae	HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
AML	Akute myeloische Leukämie	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
bp	Basenpaare	HEK	<i>human embryonic kidney</i>
BSA	Rinderserumalbumin	HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-Ethansulfonsäure
BGBI	Bundesgesetzblatt	HPI	<i>hepatic proliferation inhibitor</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid	hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
CD	<i>cluster of differentiation</i>	IE	Infektiöse Einheiten
cDNA	komplementäre DNA	kb	Kilobasen
c	Zenti (10 ⁻²)	KCl	Kaliumchlorid
CMV	Zytomegalie-Virus	l	Liter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
cPPT	Zentraler Polypurintrakt	LeGO	<i>lentiviral gene ontology</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	LM-PCR	<i>ligation-mediated</i> Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	LNGFR	<i>Low-affinity nerve growth factor receptor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LTR	<i>long terminal repeat</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	M	Molar
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent Protein</i>	MCT	Monocrotalin
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure	mg	Milligramm
<i>env</i>	<i>Envelope</i>	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	m	Milli (10 ⁻³)
Fah	Fumarylacetoacetat-Hydrolase	min	Minute(n)
FBS	fötale Rinderserum	MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
g	Gramm	MOI	Multiplizität der Infektionen
<i>g</i>	Gravitationskraft	MRT	Magnetresonanztomografie
<i>gag</i>	Gruppenspezifische Antigene	n	Nano (10 ⁻⁹)
H ₂ O	Wasser	N	normale Lösung
HBS	Präzipitationspuffer	NaCl	Natriumchlorid
HCC	Hepatozelluläres Karzinom	NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
HCl	Salzsäure	p	Pico (10 ⁻¹²)

PFA	Paraformaldehyd	++	homozygot für ein Merkmal
<i>pol</i>	<i>Polymerase</i>	+/-	heterozygot für ein Merkmal
<i>rev</i>	Posttranskriptioneller Transaktivator		
RGB	rot, grün, blau		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RRE	<i>rev-responsible Element</i>		
RSV	<i>Rous Sarcoma-Virus</i>		
SCID	<i>Severe combined Immunodeficiency</i>		
sec	Sekunde(n)		
SFFV	<i>Spleen Focus Forming-Virus</i>		
shRNA	<i>short hairpin-RNA</i>		
SIN	selbst-inaktivierend		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
tCD34	trunkierte Form des Ober- flächenproteins CD34		
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>		
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>		
TNF- α	<i>tumor necrose factor-α</i>		
tRNA	transfer-RNA		
U	<i>Units</i>		
U	<i>Unique</i>		
uPA	<i>Urokinasetype plasminogen Activator</i>		
VSV-G	Glykoprotein des <i>Vesikular- Stomatitis-Virus</i>		
Vv.	Venae		
wPRE	Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionell- regulatorisches Element		
°C	Grad Celsius		
Ψ	englisch <i>packaging signal</i>		
μ	micro (10^{-6})		

8. Literaturverzeichnis

Aiken J, Cima L, Schloo B, Mooney D, Johnson L, Langer R, Vacanti JP (1990): Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes. *J Pediatr Surg* 25(1):140-145.

Al-Hajj M, Clarke MF (2004): Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23(43):7274–7282.

Appelt JU, Giordano FA, Ecker M, Roeder I, Grund N, Hotz-Wagenblatt A, Opelz G, Zeller WJ, Allgayer H, Fruehauf S, Laufs S (2009): QuickMap: a public tool for large-scale gene therapy vector insertion site mapping and analysis. *Gene Ther* 16(7):885–893.

Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Charneau P (2007): HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 26(12):3025–3037.

Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P (2006): The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One* 1:e54.

Barese CN, Dunbar CE (2011): Contributions of gene marking to cell and gene therapies. *Hum. Gene Ther.* 22:659-668.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (2004): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin* 56(2):126–129.

Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101(6):2099–2114.

Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W (1995): Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69(12):7541–7547.

Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B (2006): Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17(3):253–263.

Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D (2002): Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76(3):1488–1495.

Bieniasz PD (2009): The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5(6):550–558.

Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997): HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276(5319):1719–1724.

Bucher NL (1963): Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 15:245–300.

Bucher NL, Swaffield MN (1964): The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* 24:1611–1625.

Bunnell BA, Metzger M, Byrne E, Morgan RA, Donahue RE (1997): Efficient in vivo marking of primary CD4+ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector. *Blood* 15;89(6):1987-1995.

Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17):8033–8037.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802–805.

Chen MF, Hwang TL, Hung CF (1991): Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg* 213(3):227–229.

Dandri M, Burda MR, Török E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J (2001): Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33(4):981–988.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11):8463–8471.

Dunbar CE, Emmons RV (1994): Gene transfer into hematopoietic progenitor and stem cells: progress and problems. *Stem Cells* 12(6):563–576.

Duncan AW, Dorrell C, Grompe M (2009): Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137(2):466–481.

Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr., Thompson JC (1994): The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 733:393–406.

Ezaki T, Koyanagi N, Toyomasu T, Ikeda Y, Sugimachi K (1998): Natural history of hepatectomy regarding liver function: a study of both normal livers and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 45(23):1795–1801.

Fehse B (2006): Insertionsmutagenese – Implikationen & Möglichkeiten der Vermeidung. [Online im Internet] URL: <http://www.dg-gt.de/docs/InsMutFehse.pdf>. [Stand: 11.05.11, 14.28]

Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C (2004): Pois(s)on--it's a question of dose... *Gene Ther* 11(11):879–881.

Fehse B, Li Z, Schade UM, Uhde A, Zander AR (1998): Impact of a new generation of gene transfer markers on gene therapy. *Gene Ther* 5(4):429–430.

Fehse B, Richters A, Putimtseva-Scharf K, Klump H, Li Z, Ostertag W Zander AR, Baum C (2000): CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1(5 Pt 1):448–456.

Fellous TG, Islam S, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, Turnbull DM, Taylor RW, Greaves LC, Chinnery PF, Taylor G, McDonald SA, Wright NA, Alison MR (2009): Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 49(5):1655–1663.

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC (1998): Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338(20):1422–1426.

Fox IJ, Chowdhury NR, Gupta S, Kondapalli R, Schilsky ML, Stockert RJ, Chowdhury JR (1995): Conditional immortalization of Gunn rat hepatocytes: an ex vivo model for evaluating methods for bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene transfer. In: *Hepatology* 21 (3), S. 837–846.

FrancaVilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, Van Thiel DH, Starzl TE (1988): Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 20(1 Suppl 1):494–497.

Frecha C, Costa C, Lévy C, Nègre D, Russell SJ, Maisner A, Salles G, Peng KW, Cosset FL, Verhoeyen E (2009): Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 114(15):3173–3180.

Gabriel R, Eckenberg R, Paruzynski A, Bartholomae CC, Nowrouzi A, Arens A, Howe SJ, Recchia A, Cattoglio C, Wang W, Faber K, Schwarzwaelder K, Kirsten R, Deichmann A, Ball CR, Balaggan KS, Yáñez-Muñoz RJ, Ali RR, Gaspar HB, Biasco L, Aiuti A, Cesana D, Montini E, Naldini L, Cohen-Haguenaer O, Mavilio F, Thrasher AJ, Glimm H, von Kalle C, Saurin W, Schmidt M (2009): Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med* 15(12):1431–1436.

Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI (2008): The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18(2):203–217.

Ganten D, Ruckpaul K (2001): *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*. 1. Auflage. Berlin: Springer-Verlag.

Giannini C, Morosan S, Tralhao JG, Guidotti JE, Battaglia S, Mollier K, Hannoun L, Kremsdorf D, Gilgenkrantz H, Charneau P (2003): A highly efficient, stable, and rapid approach for ex vivo human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector. *Hepatology* 38(1):114–122.

Gilgenkrantz H (2010): Rodent models of liver repopulation. *Methods Mol Biol* 640:475–490.

Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE, et al. (1995): A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1(11):1148–1154.

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM (1994): Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6(4):335–341.

Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM (1999): Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 19(1):15–26.

Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z (1994): Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 58(8):951–952.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I,

- Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2008): Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118(9):3132–3142.
- Hanawa H, Kelly PF, Nathwani AC, Persons DA, Vandergriff JA, Hargrove P, Vanin EF, Nienhuis AW (2002): Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. *Mol Ther* 5(3):242–251.
- Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL (1990): Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 62(3):447–456.
- Higgins GM and Anderson RM (1931): Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*(12):186–202.
- Hope TJ, Huang XJ, McDonald D, Parslow TG (1990): Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19):7787–7791.
- Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, Gilmour KC, Adams S, Thornhill SI, Parsley KL, Staal FJ, Gale RE, Linch DC, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb DK, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar HB, Thrasher AJ (2008): Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118(9):3143–3150.
- Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ, Gupta S (2006): Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 44(6):1411–1420.
- Jovanovic L, Delahunt B, McIver B, Eberhardt NL, Grebe SK (2003): Thyroid gland clonality revisited: the embryonal patch size of the normal human thyroid gland is very large, suggesting X-chromosome inactivation tumor clonality studies of thyroid tumors have to be interpreted with caution. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7):3284–3291.
- von Kalle C, Kiem HP, Goehle S, Darovsky B, Heimfeld S, Torok-Storb B, Storb R, Schuening FG. (1994): Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* 84(9):2890-2897.
- Kim BH, Sung SR, Choi EH, Kim YI, Kim KJ, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Lee JI, Chang R (2000): Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term in vitro passage. *Exp Mol Med* 32(1):29–37.
- Kimura M, Takatsuki A, Yamaguchi I (1994): Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1219(3):653–659.
- Klein KC, Reed JC, Lingappa JR (2007): Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag. *AIDS Rev* 9(3):150–161.
- Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE (2001): Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12(15):1893–1905.

- Kustikova OS, Baum C, Fehse B (2008): Retroviral integration site analysis in hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol* 430:255–267.
- Kustikova O, Fehse B, Modlich U, Yang M, Düllmann J, Kamino K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Li Z, Baum C (2005): Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 308(5725):1171–1174.
- Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C, Fehse B (2003): Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* 102(12):3934–3937.
- Lange C, Li Z, Fang L, Baum C, Fehse B (2007): CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem Cells Dev* 16(2):297–304.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367(6464):645–648.
- Lecluyse EL, Alexandre E (2010): Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640:57–82.
- Leedham SJ, Wright NA (2008): Human tumour clonality assessment--flawed but necessary. *J Pathol* 215 (4):351–354.
- Li WC, Ralphs KL, Tosh D (2010): Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol* 633:185–196.
- Lindeman GJ, Visvader JE (2010): Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia Pac J Clin Oncol* 6 (2):89–97.
- Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. (2007): Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450(7166):56–62.
- Logan AC, Haas DL, Kafri T, Kohn DB (2004): Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* 78(16):8421–8436.
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1989): Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338(6213):348–350.
- Lütgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW, Fuchs E, Murray JM, Petersen J, Dandri M (2010): In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology* 52(1):16–24.
- Lütgehetmann M (2006): Optimierung der PLLA Matrix basierten heterotopen Hepatozyten-Transplantation mittels Tissue Engineering, eine Langzeit in vivo Studie. Dissertation Medizin. Universität Hamburg.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006): Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6(12):924–935.

- Meuleman P, Leroux-Roels G (2008): The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 80(3):231–238.
- Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, Leroux-Roels G (2005): Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41(4):847–856.
- Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990): Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10(8):4239–4242.
- Milyavsky M, Shats I, Erez N, Tang X, Senderovich S, Meerson A, Tabach Y, Goldfinger N, Ginsberg D, Harris CC, Rotter V (2003): Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 63(21):7147–7157.
- Mitelman F, Heim S (1987): The significance of karyotypic changes in human neoplasia. *Haematologica* 72(6 Suppl):29–33.
- Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, Kamino K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Kuehlcke K, Bunting KD, Schmidt S, Deichmann A, von Kalle C, Fehse B, Baum C (2005): Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 105(11):4235–4246.
- Modrow S, Falke D, Truyen U (2003): *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Müller LU, Milsom MD, Kim MO, Schambach A, Schuesler T, Williams DA (2008): Rapid lentiviral transduction preserves the engraftment potential of Fanca(-/-) hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 16(6):1154–1160.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259):263–267.
- Nguyen TH, Ferry N (2004): Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther* 11 Suppl 1:S76-84.
- Oren R, Zajicek G, Maaravi Y, Kenet G, Karmely F, Hubert A, Raanani P, Arber N (1997): Methimazole slows hepatocyte streaming in rats. *Dig Dis Sci* 42(7):1433–1437.
- Ostertag W, Seliger B, Kollek R, Stocking C, Bergholz U, Smadja-Joffe F (1986): The myeloproliferative sarcoma virus retains transforming functions after introduction of a dominant selectable marker gene. *J Gen Virol* 67 (Pt 7):1361–1371.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M (1999): The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol* 155(6): 2135–2143.
- Pauwels K, Gijssbers R, Toelen J, Schambach A, Willard-Gallo K, Verheust C, Debyser Z, Herman P (2009): State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther* 9(6):459–474.
- Pear W (2001): Transient transfection methods for preparation of high-titer retroviral supernatants. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 9: S. Unit9.11.

- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8392–8396.
- Petersen J, Dandri M, Gupta S, Rogler CE (1998): Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):310–315.
- Poznansky M, Lever A, Bergeron L, Haseltine W, Sodroski J (1991): Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* 65(1):532–536.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (6859):105–111.
- Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL (1995): Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):4942–4946.
- Rieger MA, Hoppe PS, Smejkal BM, Eitelhuber AC, Schroeder T (2009): Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science*. 325(5937):217-218.
- Risques RA, Moreno V, Marcuello E, Petriz J, Cancelas JA, Sancho FJ, Torregrosa A, Capella G, Peinado MA (2001): Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer. *Lab Invest* 81(3):307–315.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 12(5):2099–2108.
- Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE (2000): Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model. *Leukemia* 14(5):889–897.
- Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C (2009): Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69(13):5331–5339.
- Rous P (1911): A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 13(4):397–411.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33(3):401–406.
- Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL (1991): Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66(2):245–256.
- Satoh E, Hara Y, Fuji N, Li XK, Teramoto K, Arai S, Kimura H (2005): Comparison of the vector systems for gene transduction into rat dendritic cells and peritoneal exudate cells. *Transplant Proc* 37(4):1953–1956.
- Schambach A, Bohne J, Baum C, Hermann FG, Egerer L, von Laer D, Giroglou T (2006): Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and

promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther* 13(7):641–645.

Schmidt M, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Zaoui K, Ball C, Pilz I, Braun S, Glimm H, von Kalle C (2007): High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat Methods* 4(12):1051–1057.

Schneider A, Attaran M, Meier PN, Strassburg C, Manns MP, Ott M, Barthold M, Arseniev L, Becker T, Panning B (2006): Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning. *Transplantation* 82(8):1115–1116.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. (2002): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110(4):521-529.

Seglen PO (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29–83.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004): Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12):1567–1572.

Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW (2007): Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 120 (Pt 24):4247–4260.

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2(12):905–909.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015):396–401.

Sorge J, Wright D, Erdman VD, Cutting AE (1984): Amphotropic retrovirus vector system for human cell gene transfer. *Mol Cell Biol* 4(9):1730–1737.

Steigerwald SD, Pfeifer GP, Riggs AD (1990): Ligation-mediated PCR improves the sensitivity of methylation analysis by restriction enzymes and detection of specific DNA strand breaks. *Nucleic Acids Res* 18(6):1435–1439.

Stevenson M (2002): Molecular biology of lentivirus-mediated gene transfer. *Curr Top Microbiol Immunol* 261:1–30.

Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, Tao W, Berman A, Broxmeyer HE, Keenan RJ, Glick BS (2008): A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods* 5(11):955–957.

Strang BL, Ikeda Y, Cosset FL, Collins MK, Takeuchi Y (2004): Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells. *Gene Ther* 11(7):591–598.

Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ (1999): Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 19(1):39–48.

Treschow A, Unger C, Aints A, Felldin U, Aschan J, Dilber MS (2007): OuaSelect, a novel ouabain-resistant human marker gene that allows efficient cell selection within 48 h. *Gene Ther* 14(22):1564–1572.

- Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509–544.
- Vafaizadeh V, Klemmt P, Brendel C, Weber K, Doebele C, Britt K, Grez M, Fehse B, Desrivières S, Groner B (2010): Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem Cells* 28(5):928–938.
- De Vos J, Bagnis C, Bonnafoux L, Requirand G, Jourdan M, Imbert MC, Jourdan E, Rossi JF, Mannoni P, Klein B (2003): Comparison of murine leukemia virus, human immunodeficiency virus, and adeno-associated virus vectors for gene transfer in multiple myeloma: lentiviral vectors demonstrate a striking capacity to transduce low-proliferating primary tumor cells. *Hum Gene Ther* 14(18):1727–1739.
- Wagener C, Müller O (2009): *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Wang JC, Dick JE (2005): Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15(9):494–501.
- Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW, Liu J (2004): Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World J Gastroenterol* 10(5):699–702.
- Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I (2009): Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl* 15(1):7–14.
- Weber K (2005): Entwicklung lentiviraler Vektoren für den effizienten Transfer von siRNAs in hämatopoetische Stammzellen. Diplomarbeit Biochemie/Molekularbiologie. Universität Hamburg.
- Weber K (2010): Entwicklung eines modularen Vektorsystems für die parallele Analyse mehrerer Gene in Säugerzellen. Dissertation Biochemie/Molekularbiologie. Universität Hamburg.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008): A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16(4):698–706.
- Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B (2010): Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther* 17(4):511–520.
- Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, Volz T, Cornils K, Niebuhr B, Träger M, Lütgehetmann M, Pollok JM, Stocking C, Dandri M, Benten D, Fehse B (2011) RGB marking facilitates multi-color clonal cell tracking. *Nat Med* 17(4): 504-509.
- Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA (2003): Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 124(2):432–444.
- Wei CM, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM (1981): Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39(3):935–944.
- Wiznerowicz M, Trono D (2005): Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* 23(1):42–47.

Zajicek G, Oren R, Weinreb M Jr (1985): The streaming liver. *Liver* 5(6):293–300.

Zhang B, Metharom P, Jullie H, Ellem KA, Cleghorn G, West MJ, Wei MQ (2004): The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther* 2(1):6.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73(4):2886–2892.

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998): Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72(12):9873–9880.

Zur Hausen, H. (1967): Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* 1(6):1174–1185.

9. Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, Volz T, Cornils K, Niebuhr B, Träger M, Lütgehetmann M, Pollok JM, Stocking C, Dandri M, Benten D, Fehse B (2011): RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med* 17(4):504–509.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Boris Fehse und Dr. Kristoffer Weber, unter deren Anleitung ich die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation durchführen konnte. Ich danke ihnen für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen, die Betreuung und all das, was ich bei ihnen über das wissenschaftliche Arbeiten und die Biomedizin lernen durfte. Nicht zu vergessen bleibt die tolle Zeit im und außerhalb des Labors sowie das Rätseln über wissenschaftliche und technische Kniffelein.

PD Dr. Daniel Benten danke ich sehr für die Betreuung der Zelltransplantationsversuche und für die spannenden wissenschaftlichen Gespräche und Ideen.

Dr. Kerstin Cornils verdanke ich meinen Zweitnamen „Tommi“, den ich im Labor gerne getragen habe. Einen großen Dank nicht nur für den Namen, sondern auch für die Unterstützung im Bereich der Molekularbiologie und all den Spaß im Labor.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe - speziell bei Ulrike Mock, Dr. Stefan Horn, Regine Thiele, Almut Uhde, Constanze Siggel, Dr. Ercan Akgün, Anita Badbaran, Rüdiger Klapdor, Belinda Ikogho, Tanja Sonntag, Dr. Thomas Stübig, PD Dr. Claudia Lange, Dr. Bärbel Brunswig-Spickenheier, Melanie Lachmann, Birgit Ramme und Ioanna Trivaii - bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und das tolle Arbeitsklima.

Der Arbeitsgruppe von PD Dr. Maura Dandri danke ich für Bereitstellung des uPA-Mausmodells. PD Dr. Maura Dandri, Dr. Tassilo Volz, Dr. Marc Lühthgehetmann und Michael Warlich danke ich für spannende wissenschaftliche Diskussionen und die Hilfe im Bereich der Leberzellkultivierung und der Transplantation von primären Leberzellen.

Zudem danke ich Dr. Henning Wege, Jan-Enno Puchert, Dr. Oliver Bruns, PD Dr. Jörg-Matthias Pollok und PD Dr. Harald Itrich für ihre Unterstützung und ihren Rat.

Dem Sonderforschungsbereich 841 „Leberentzündung: Infektion, Immunregulation und Konsequenzen“ danke ich für die Förderung meiner Arbeit und die Möglichkeit diese im Rahmen des integrierten Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“ durchzuführen zu können.

Besonders danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Martin und meiner Schwester Martha für ihre Unterstützung und ihre Liebe.

Meiner Liebe Dana danke ich für ihren Rückhalt, ihre Unterstützung und ihre Motivation, die ich brauche, um meine Aufgaben zu meistern. Es ist schön zu wissen, dass es sie in meinem Leben gibt.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.