UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation Klinikdirektor: Prof. Dr. Nicolaus Kröger Forschungsabteilung für Zell - und Gentherapie Leiter: Prof. Dr. Boris Fehse

Entwicklung von LeGO-Switch-Vektoren, vielseitigen, induzierbaren lentiviralen All-In-One-Vektoren zur exakten und zuverlässigen Tetracyklin abhängigen Genexpression

Dissertation

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

vorgelegt von:

Rüdiger Klapdor aus Hamburg

Hamburg 2014

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.02.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Claudia Lange

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Rainer Böger

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhal	tsverzeichnis	. 3
2.	Frage	estellung und Zielsetzung	. 5
3.	Einle	eitung	. 5
	3.1.	Gentherapie/Gentransfer	. 5
	3.1.1	. Vektoren	. 6
	3.1.2	. Virale Vektoren	. 8
	3.	1.2.1. Adenovirale Vektoren	10
	3.	1.2.2. Adeno-assoziierte Vektoren (AAV)	10
	3.	1.2.3. Retroviren	11
	3.1.3	. Lentiviraler Gentransfer	13
	3.	1.3.1. HIV-1	13
	3.1.4	. Lentivirale Vektoren	16
	3.1.5	Entwicklung polycistronischer Vektoren	19
	3.1.6	LeGO-Vektoren	22
	3.2.	Genregulation	22
	3.2.1	. Tet-System	23
	3.2.2	Das Proteotunersystem	27
4.	Mate	rialien	29
	4.1.	Enzyme	29
	4.2.	Chemikalien	29
	4.3.	Lösungen	30
	44	Zellkulturmedien	30
	4 5	Kits und DNA-Größenmarker	30
	4.6	Antikörner	31
	47	Zelllinien	31
	4.8	Bakterien	31
	1.0. 1 Q	Nukleinsäuren	31
	491	Oligonukleotide	31
	492	Plasmide	33
	4.9.2. 4 9	2.1 Verwendete bereits im Labor vorhandene Plasmide	33
	4.9	2.2.1. Verwendete, bereits im Labor vorhandene i fastilide	34
	т.) Л 10	Geräte	38
5	Meth	Joden	38
5.	5 1	Molekularhiologische Methoden	38
	511	Restriktionsverdau	38
	512	A garose_Gelelektronhorese	38
	513	Δ uffüllen von 5'DNA-Überhängen nach Restriktionsverdau	30
	514	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	77 10
	515	Ligation von DNA Fragmenten	40 40
	516	Amplification von DNA Fragmenten mittels PCP	+0 /1
	517	Transformation in kompetente <i>E</i> coli Bakterien	13
	518	Überprüfung der Bakterienklane und Extraktion von Plasmid DNA	+J 12
	510	DNA Konzentrationsbestimmung	+3 /3
	5 1 1	0 Sequenzierung von DNA Proben	+3 /2
	5.1.1	7 Zallbiologische Methoden	+3 11
	J.2. 5 7 1	Handhahung dar Zallan	++ 1 /
	5.2.1	Finfrieren und Aufteuen von Zellen	+4 1 /
	5.2.2	Restimming der Zellzehl	+4 15
	5.2.3.	Uarstallung lantiviralar infektiöser Virusportkal	+J 15
	5.2.4	Titration	+J 15
	5.2.5	Transduktion von Zalllinion mit lantiviralen Virgerartikale	+J 16
	J.Z.0		+υ

5.2.7.	Analyse im Durchflusszytometer (FACS)	46
5.2.8.	Zellsortierung am FACS	47
5.2.9.	Selektion von Zellen durch Antibiotika	47
5.2.10	. Berechnung des Induktionsfaktors	48
5.2.11	. Photographieren unter dem Fluoreszenzmikroskop	48
6. Ergebi	nisse	50
6.1. V	/ektorkonstruktion	50
6.1.1.	Konstruktion und Analyse eines Tetracyclin-regulierbaren bicistronischen	
	Vektors	50
6.1.2.	Konstruktion eines tricistronischen Tetracyclin-regulierbaren LeGO-Vektors	54
6.1.3.	Analyse der Rolle der Position des TRE im Vektor in Hinblick auf	
	Induzierbarkeit und Expression	58
6.2. A	Analyse der Induktionseigenschaften des induzierbaren LeGO-Vektors	62
6.2.1.	Analyse der Kinetik der Induktion von LeGO-Switch-Vektoren	62
6.2.2.	Analyse der Doxycyclin-Abhängigkeit des induzierbaren LeGO-Vektors	64
6.2.3.	Analyse der Reversibilität der Induktion des induzierbaren LeGO-Vektors	66
6.3. Ú	Überprüfung des Einflusses des (r)tTR-KRAB-Proteins auf Proliferation und	
Ü	berleben der Zellen	68
6.3.1.	GFP-Verlaufsbeobachtung transduzierter Zellen	69
6.3.2.	GFP-Verlaufsbeobachtung nach Puromycin-Selektion	70
6.3.3.	Analyse des Einflusses des Tet-KRAB-Proteins auf die	
	Proliferationsgeschwindigkeit	71
6.4. F	Funktionserweiterung durch sekundäre Markerregulation	72
6.4.1.	Analyse der Induzierbarkeit des regulierbaren LeGO-Vektors in Kombination	
	mit induzierbarer Markerexpression	73
6.4.2.	Analyse einer posttranslationalen induzierbaren Markerexpression in einem	
	tricistronischen, über Doxycyclin transkriptionell regulierbaren LeGO-Vektor	75
6.4.3.	Analyse der Zeitkinetik der Expression des destabilisierten Markers	76
6.4.4.	Optimierung der Herstellung reiner, induzierbarer Kulturen durch Verwendung	
	eines induzierbaren Markers.	77
6.5.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Expression und Induzierbarkeit der	
re	egulierbaren, tricistronischen LeGO-Vektoren	80
6.6. A	Analyse des induzierbaren LeGO-Vektors in verschiedenen Zelllinien	82
6.7. A	Anwendung des Vektorsystems	84
6.7.1.	Proliferationshemmung durch Dox-induzierte Wiederherstellung der SHIP1-	
	Expression in Jurkat-T-Zellen	84
6.7.2.	Doxycyclin-induzierte Transformation hämatopoetischer Zellen (Ba/F3) durch	
	regulierbare Expression einer aktivierten PI3-Kinase	87
6.7.3.	Induzierbare Hemmung der mutierten PI3K durch SHIP1	89
7. Diskus	ssion	91
7.1. F	Konstruktion eines durch Tetrazyklin induzierbaren LeGO-Vektors	91
7.2. F	Funktion und Toxizität	95
7.3. A	Anwendung im Zellsystem	99
7.4. A	Ausblicke in die Zukunft	100
8. Zusam	menfassung	102
9. Abkür	zungsverzeichnis	103
10. Literat	urverzeichnis	106
11. Danksa	agung	117
12. Lebens	lauf	118
13. Bisher	ge Veröffentlichungen	119
14. Eides	stattliche Versicherung	120
15. Anhan	g	121

2. Fragestellung und Zielsetzung

Seit der Entwicklung der ersten zum Nukleinsäuren-Transport konstruierten Vektoren nahm nicht nur die Anzahl der Vektorsysteme, sondern auch die Diversität des Aufbaus jedes einzelnen Systemes zu. So existiert aktuell eine große Anzahl lentiviraler Vektoren mit jeweils unterschiedlichen Strukturelementen. Diese Vektoren haben ihre Qualität zum Transport von auf Nukleinsäuren basierten Informationen bereits unter Beweis gestellt. Eine wichtige Rolle in der Vektorentwicklung spielt die regulierte Expression von verschiedenen zu untersuchenden Genen. Durch eine große Anzahl an bisher veröffentlichten Regulationssystemen wird versucht, die Expression dieser Gene zu kontrollieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es ein induzierbares lentivirales "All-in-One"-Vektorsystem zu konstruieren und dieses auf dessen Eigenschaften hin zu untersuchen. Dabei sollte dieses System über die einheitliche Grundstruktur der LeGO-Vektoren verfügen, die durch einen modularen Aufbau die Vergleichbarkeit von Ergebnissen und Handhabung lentiviralen Gentransfers verbessern sollen. Zur Regulation sollte das auf dem Tet-Operonmodell aufbauende Regulationssystem, das die humane KRAB-Domäne zur Methylierung von DNA enthält, verwendet werden.

Durch die Optimierung des Vektoraufbaus sollte die ideale Vektorstruktur identifiziert werden, die zu sehr guter Induzierbarkeit, hohen Titern, guter Expressionsstärke und Stabilität führt. Zuerst sollten Experimente zur Evaluation des Einflusses des Vektors auf die Zellproliferation durchgeführt werden. Danach sollte das entwickelte System in Anwendungsbeispielen ausgetestet werden, die Einsatzgebiete für einen Vektor dieser Art darstellen können. Dazu wurden die induzierbare maligne Transformation durch Expression eines Onkogens sowie die induzierbare Wachstumsinhibition durch Expression eines das Wachstum inhibierenden Proteins ausgewählt.

3. Einleitung

3.1.Gentherapie/Gentransfer

Aus der Wissenschaft, aber auch aus der Medizin, sind die Ideen und Konzepte zur Veränderung und Beeinflussung genetischer Strukturen nicht mehr wegzudenken. Von der rein biologischen Grundlagenforschung bis hin zu klinischen Therapieansätzen nimmt der Gentransfer zunehmend eine größere Rolle ein. Besonders in der klinischen Therapie gewinnt dieser nach anfänglichen Rückschlägen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003) wieder deutlich an Bedeutung. In der klinischen Anwendung wird der Gentransfer als Gentherapie bezeichnet.

Anfang der 2000er Jahre wurde die Genomsequenz des Menschen veröffentlicht (Lander et al. 2001). 99% des Genoms wurden sequenziert und ca. 21000 proteinkodierende Sequenzen identifiziert (Clamp et al. 2007).

Trotz großer Fortschritte ist es aber auch heute noch nicht möglich anhand der Sequenzen und der Masse an Informationen, die daraus hergeleitet werden kann, auf alle Eigenschaften und Funktionen eines Proteins zu schließen (Eisenberg et al. 2000; Kinoshita und Nakamura 2003; Ansong et al. 2008; Lander 2011). Das bedeutet, dass man effiziente Methoden benötigt, um die Funktion eines Proteins zu analysieren. Besondere Rollen nehmen dabei die Überexpression eines Gens, die Expression von Mutanten, das Ausschalten oder Reduzieren der natürlichen Expression sowie eine genaue Regulation der Expression ein.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Genetik der 50er und 60er Jahre, der Aufklärung der DNA-Struktur und der Aufschlüsselung des genetischen Codes entwickelte sich das Konzept der Gentherapie (Brandt 2004). Bei der Gentherapie geht es unter anderem darum, durch Einbringen einer gesunden Kopie oder durch das Ausschalten bzw. durch die Korrektur eines defekten Gens, einen lang anhaltenden bzw. dauerhaften Therapieansatz zu finden. Bis heute ist eine große Anzahl verschiedener Ansätze zur Gentherapie beschrieben (Burdach 2006). Für die ca. 21000 Gene des menschlichen Genoms wurden 1800 Mutationen als Ursache für Erbkrankheiten entdeckt (O'Connor und Crystal 2006). Während Therapieoptionen vor gentherapeutischen Interventionen hauptsächlich in der Beeinflussung des Stoffwechsels sowie in dem Proteinersatz durch äußere Zufuhr bestanden, erfolgte mit dem Versuch der Behandlung von ADA-SCID der Beginn der klinischen Gentherapie. Dabei wurde eine über Jahre bestehende Revision des Genfehlers erreicht (Blaese et al. 1995).

Allen Ansätzen gemein ist das Streben nach einem effizienten Gentransfer. Die Anwendung des Transfers in der Klinik erfordert sichere Systeme. Aufgrund dessen wurden verschiedene Systeme entwickelt und angewendet, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden.

3.1.1. Vektoren

Ein grundsätzliches Problem beim Transfer von DNA besteht in ihrer Instabilität außerhalb des Zellkerns. Intravenös injizierte DNA hat eine Halbwertszeit von ca. 10 min (Kawabata et al. 1995). Sie wird nur ineffizient aufgenommen, weist bei Injektion keine Gewebsspezifität auf und wird in der Regel nur transient exprimiert (Seow und Wood 2009).

Um dieses Problem zu umgehen, wurden Transportvehikel entwickelt, die man als Vektoren bezeichnet. Die wichtigen Funktionen eines Vektors sind in erster Linie, der DNA den Transfer in die Zelle und in den Zellkern zu erleichtern, die DNA vor dem schnellen Abbau zu schützen und die Transkription dieser DNA in der gewünschten Zelle zu ermöglichen (Gardlik et al. 2005).

Der Transfer der DNA beruht grundsätzlich auf physikalischen, chemischen oder biologischen Methoden (Schmoll et al. 2006).

Eigenschaft	Nackte DNA	Liposomen	Biologische Liposomen	Episomale Vektoren
Kapazität	Praktisch unbegrenzt	Praktisch unbegrenzt	Hoch, nicht nur DNA	Hoch
			möglich	
Vorteile	Sehr geringe	Keine Integration ins	➤ Geringe	Transfer im natürlichen
	Immunogenität	Genom	Immunogenität	Lokus
	(abhängig vom	Bessere Aufnahme als	Medikamententransfer	Keine Insertion
	Transgen)	Plasmid-DNA	Oberflächenver-	Hohe Kopienzahl
	Anwendung so	Zielgerichtete	änderung für andere	möglich
	häufig wie	Übertragung möglich	Eigenschaften	Natürliche Regulation
	gewünscht			Replikation teilweise
	Sehr geringe			möglich
	Immunantwort,			
	Toxizität			
	Leicht herzustellen			
Nachteile	➤ geringe	➤ schnelle Clearance	Schwierig und teuer	Nicht immer konstante
	Halbwertszeit	Entzündliche	herzustellen	Expression
	➤ schlechte	Toxizität	Kurze Halbwertszeit	Mögliche Einbringung
	Transfereffizienz	➢ Geringe	Kurze Expression	von zu viel
	gezielte Applikation	Transfereffizienz		Informationen
	nur durch direkte	Kurze Expression		➢ Wirkung schwer
	Injektion			vorhersagbar
	➤ kurze Expression			Replikationselemente
	unspezifische			kompliziert
	Integration möglich			
	\rightarrow Mutagenese			
Referenzen	(Reuter und Brand 2006;	Zhang et al. 2005)\$(Wolff	und Budker 2005; Hengge e	t al. 1996; Chen und Huang
	2005; Lowery et al. 2011	; Seow und Wood 2009, 20	09; Hoshiya et al. 2009; Hua	ng et al. 2000; Lufino et al.
	2008; Kazuki et al. 2010)	1		

 Tabelle 1 Vergleich verschiedener nicht-viraler Vektoren

Der optimale Vektor für Gentransfer und Gentherapie müsste folgende Eigenschaften haben:

Er soll sich nicht mehr oder nur gezielt vermehren können (1), keine Rekombination ermöglichen (2), eine gute Regulierbarkeit besitzen (3), keinen unerwünschten Einfluss auf die zelluläre Struktur haben (4), keine transformierende Effekte haben (5), eine hohe Transduktionseffizienz besitzen (6), genug Transportkapazität aufweisen (7) sowie nicht immunogen und nicht toxisch sein (8).

Den perfekten, universellen Vektor gibt es bis heute nicht und wird es wohl nie geben. Jedoch gibt es für verschiedene Einsatzzwecke den jeweils am besten geeigneten Vektor (Wu et al. 2003; Schröder et al. 2002b).

Grundsätzlich kann man zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren unterscheiden. Nichtvirale Gentransfermethoden reichen von der einfachen Verabreichung nackter DNA, z.B. in Form eines Plasmids, bis hin zu hoch komplexen Liposomen und künstlichen Chromosomen (Hu et al. 2004; Reuter und Brand 2006). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Eigenschaften vier verschiedener nicht-viraler Vektoren.

Obwohl in dem Bereich der Entwicklung nicht-viraler Vektoren große Fortschritte gemacht wurden, leidet der große Teil der Methoden in vivo an Ineffizienz (O'Connor und Crystal 2006; Seow und Wood 2009). Dennoch gehört der Ansatz des liposomalen Gentransfers, bei dem DNA in kationische Lipide verpackt wird, mit über 8% aller klinischer Gentherapiestudien (Reuter und Brand 2006) zu einer der wichtigsten Gentransfermethoden, obwohl dessen Effizienz häufig nicht gezeigt werden konnte (O'Connor und Crystal 2006).

Besonders für sehr große Gene, die ihre natürliche Genregulation benötigen, wie z.B. das Dystrophin-Gen, das bei der Duchenne-Muskeldystrophie defekt ist, bieten die nicht-viralen Methoden mit dem Transfer künstlicher, replikationskompetenter Chromosomen einen der wichtigsten therapeutischen Ansätze, obwohl sie noch nicht die Effizienz viralen Transfers erreichen (Hoshiya et al. 2009).

3.1.2. Virale Vektoren

Virale Vektoren werden in 70% aller Gentherapiestudien eingesetzt (Reuter und Brand 2006). Dabei wird die über die Evolution angeeignete und spezialisierte Fähigkeit von Viren genutzt, effektiv zu infizieren, DNA oder RNA zu liefern und die Transkription einzuleiten. Virale Vektoren werden grundsätzlich in in das Genom integrierende und nicht in das Genom integrierende Vektoren unterteilt, wobei diese Einteilung keine strikten Grenzen setzt. Jede Vektor-DNA kann nämlich mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit ins Genom aufgenommen werden. So werden Retroviren als obligat integrierend bezeichnet, eine Integration wird erwartet. Hingegen kann Plasmid-DNA in sehr seltenen Fällen integrieren, eine Integration wird aber nicht erwartet. Durch Veränderung der viralen Struktur kann diese Wahrscheinlichkeit variiert werden, wie z. B. durch die Entwicklung integrationsdefizienter Lentivektoren (IDLV).

Allen viralen Vektoren ist gemein, dass ein großer Teil ihrer natürlichen, virulenten Eigenschaften entfernt werden muss, um genügend Sicherheit für die Anwendung im Menschen zu schaffen.

	Vektor abgeleitet von			
	Adenoviren	Adeno-assoziierte Viren	Retroviren	Herpes Simplex Virus
Kapazität	8,5 kb	4,5 kb	10 kb	30-40 kb
Titer	10 ¹¹ -10 ¹²	10 ⁶ -10 ¹²	10 ⁶ -10 ⁸	$10^4 - 10^{10}$
Zielzellen	Ruhende und proliferierende Zellen	Ruhende und proliferierende Zellen (bes. S-Phase)	Proliferierende (γ- Retroviren), ruhende (Lenti-, Foamyviren) Zellen	Ruhende und proliferierende Zellen
Expression	Transient, Langzeitexpression in mitotisch nicht aktivem Gewebe	Teilweise dauernd Langzeitexpression in mitotisch nicht aktivem Gewebe	Dauernd	Transient
Integration	Episomal	Episomal Mit dem in Vektoren entfernten REP-Gen spezifisch integrierend (siehe 3.1.2.2)	Aktive Loci (Murine Retroviren), zufällig mit Präferenz für aktive Loci (Lentiviren)	Episomal
Nebeneffekte	Immunogen und entzündlich hoch aktiv Akut toxisch (Todesfall 2003 nach Vektorinjektion)	Immunogen und entzündlich Transformation möglich	Transformation möglich Leicht immunogen, mutagen	Immunogen und akut toxisch Abschalten der Genexpression im latenten Stadium
Klinische Studien	> 200 Studien Teilweise erfolgreich	Ca. 30 Studien Teilweise sehr erfolgreich	>200 Studien Teilweise sehr erfolgreich	Ca. 30 Studien Praktisch nicht erfolgreich
Referenzen	(Reuter und Brand 2006; Burdach 2006; O'Connor und Crystal 2006; Gardlik et al. 2005; Seow und Wood 2009; Schröder et al. 2002a; Mitchell et al. 2004; Raper et al.; Grieger und Samulski 2012)			

Tabelle 2 Überblick über die wichtigsten viralen Vektoren

Es gilt für die Entscheidung, welchen Vektor man verwenden möchte, genau abzuwägen, was mit dem Vektor erreichen werden soll, welche Darreichungsform der DNA gewünscht ist und welche Sicherheitsbedingungen erfüllt sein müssen.

Für viele Anwendungen, wie z.B. die dauerhafte Behandlung von Erbkrankheiten sowie für das lang anhaltende Ausschalten zelleigener Genexpression oder für die Analyse von Proteinfunktionen über längere Zeit, werden Vektoren benötigt, die eine lange Verweildauer der DNA in der Zelle sicherstellen und eine fortwährende Transkription der genetischen Information ermöglichen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über häufig verwendete virale Vektoren, die in den nachfolgenden Kapiteln weiter beschrieben werden.

3.1.2.1. Adenovirale Vektoren

Adenoviren gehören zu den nicht integrierenden Vektoren. Ihr Genom aus Doppelstrang-DNA wird im Zellkern abgelegt, aber nicht repliziert, sodass sich die Gesamtmenge der DNA über mehrere Zellteilungen in den Tochterzellen verdünnt. In postmitotischen Geweben wie Neuronen oder Muskelzellen (Modrow et al. 2010) ist eine langwierige Expression möglich (Schröder et al. 2002b), während in sich stark teilenden Zellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, meist nur eine kurze Expression erreicht wird.

3.1.2.2. Adeno-assoziierte Vektoren (AAV)

Um eine Langzeitexpression zu erreichen, können AAV und im Besonderen Retroviren DNA in das Genom der Zelle integrieren, sodass ihre DNA bei jeder Zellteilung mit der zellulären DNA repliziert wird (Gardlik et al. 2005; O'Connor und Crystal 2006). Damit können sie eine stabile Expression über viele Jahre ermöglichen (Raper et al. 2003; McCarty et al. 2004). In Anwesenheit des viralen Proteins Rep kann es zu einer spezifischen Integration im langen Arm des Chromosoms 19 kommen (Burdach 2006). Um mehr Transportkapazität und mehr Sicherheit in der Anwendung zu schaffen, wurden die beiden viralen offenen Leserahmen (Open reading frames, ORF) Rep und Cap aus dem Genom entfernt, sodass bei einer sehr ineffizienten Integration ohne Anwesenheit des REP-Proteins hauptsächlich ein episomaler Gentransfer vorliegt (McCarty et al. 2004; Grieger und Samulski 2012). Daher können AAV eine Langzeitexpression nur in Geweben garantieren, deren Proliferations- bzw. Teilungsrate sehr niedrig ist (Gadner et al. 2006).Das größte Problem bei AAV besteht aber in ihrer für viele Anwendungen zu geringen Verpackungskapazität (siehe Tabelle 2).

3.1.2.3. Retroviren

Retroviren bieten eine zwei- bis dreifach höhere Transportkapazität als AAV. Sie integrieren in das Wirtsgenom mit unterschiedlicher Präferenz: γ-Retroviren wie das Murine Leukämie Virus (MLV) integrieren in aktive Regionen des Genoms, bevorzugt in den Transkriptionsstartbereich (Wu et al. 2003); Lentiviren integrieren im Vergleich dazu mit höherer Wahrscheinlichkeit über die gesamte zelluläre DNA verteilt mit Präferenz für aktive Regionen in ihrer Gesamtheit (Schröder et al. 2002b; Mitchell et al. 2004).

Die besondere Eigenschaft der Vektoren, sich stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, ist zugleich aber auch eine der größten Schwierigkeiten in der Entwicklung sicherer Vektoren. Jede Integration fremder DNA in das zelluläre Genom stellt eine Störung der genomischen Integrität und somit eine Mutation dar. Die Integration an sich kann zum einen zu einer Trennung und gegebenenfalls zu einer Zerstörung von zelluläreren genetischen Strukturen führen. Zum anderen kann sich die Integration von Promotor- und Enhancer-Elementen, die der Vektor enthält, auf die Expression benachbarter Gene auswirken. Durch diese Veränderung des Erbgutes, die sogenannte Insertionsmutagenese, kann es z.B. in Stammzellen hämatopoetischen von einem Wachstumsvorteil über eine Klonalitätsentwicklung bis hin zu einer Leukämieentwicklung kommen. Dieser Fakt wurde zunächst im Mausmodell gezeigt (Li et al. 2002; Baum et al. 2003; Kustikova et al. 2005; Newrzela et al. 2011).

Jede Integration von DNA, sei es mit oder ohne die Transkription beeinflussenden Elementen, kann theoretisch zu einer onkogenen Transformation führen. Selbst Plasmid-DNA integriert mit einer Wahrscheinlichkeit von $<10^{-3}$ in Wirts-DNA. Somit ist jeder Vektor, der DNA transferiert, zur Insertionsmutagenese fähig. Dieses Ereignis tritt lediglich mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit bei verschiedenen Vektoren auf (Mazda et al. 1997; Burdach 2006).

Diese theoretische Überlegung bewies praktische Relevanz während klinischer Studien mit Retroviren. In einer im März 1999 initiierten Studie zur Behandlung von X-linked Severe Combined Immunodeficiency (X-SCID) entwickelten drei von zehn Patienten eine klonale T-Zellexpansion, wovon zwei Patienten erfolgreich therapiert werden konnten (Hacein-Bey-Abina et al. 2002; Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

Grundsätzlich gilt zu bedenken, dass die Überlebens- und die Remissionswahrscheinlichkeit sowie die Rate der Nebenwirkungen vergleichbar oder sogar besser sind als die der einzig möglichen Ersatztherapie, der allogenen Stammzelltransplantation (Burroughs und Woolfrey 2010). Klinische Studien zur Behandlung schwerer Immunkrankheiten wie X-SCID, ADA-SCID und septische Granulomatose (X-CGD) brachten mindenstens 80% der Patienten einen Vorteil (Nienhuis et al. 2006).

Die beschriebenen schweren Nebenwirkungen führten zur Entwicklung verbesserter Vektorsysteme mit deutlich geringer Wahrscheinlichkeit, Insertionsmutagenese auszulösen (Thornhill et al. 2008), siehe Kapitel 3.1.4. In klinischer und wissenschaftlicher Anwendung ist aber zu bedenken, dass diese Klonalitäts- und Tumorentwicklungen trotzdem auftreten können. Dies geschieht besonders dann, wenn die genveränderten Zellen einen Überlebensvorteil besitzen (Nienhuis et al. 2006). Die Wahrscheinlichkeit einer Insertionsmutagenese lässt sich jedoch durch verschieden Maßnahmen reduzieren. Dafür eignet sich zum einen die Verwendung von Vektoren mit einem gegebenenfalls sicheren Insertionsprofil (zum Beispiel Lentiviren gegenüber y-Retroviren). Zum anderen lässt sich eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit auch durch den Einsatz von Selbst-inaktiviertende-Vektoren, sogennanten SIN-Vektoren ohne virale Enhancer und Promotoren, und den Gebrauch von physiologischen Promotoren für die Transgenexpression erreichen (Modlich et al. 2006; Mátrai et al. 2010). Das Vermeiden mehrfacher Vektorintegrationen pro einzelner Zelle ist eine weitere Möglichkeit, das ohnehin geringe Risiko einer Insertionsmutagenese weiter zu verringern (Kustikova et al. 2003; Fehse et al. 2004; Modlich et al. 2005; Staal et al. 2008), insbesondere, da in vivo oft nur eine geringe Transgenexpression notwendig ist (O'Connor und Crystal 2006).

Die permanente Genomintegration retroviraler Vektoren stellt aber auch ein Werkzeug zur Zellmarkierung und (Onko)Genidentifikation dar. Durch die Markierung auf Genomebene lassen sich einzelne Klone exakt verfolgen, da die Integration an einer zufälligen Position erfolgt und somit einen molekularen Marker darstellt. Zudem konnte man durch gezielte Insertionsmutagenese eine Reihe von für die jeweiligen Tumorentitäten wichtigen Onkogenen entdecken. Als Folge hat sich daraus eine eigene Methode zur Zellmarkierung entwickelt (Erkeland et al. 2006).

Wichtig ist, zu differenzieren, welchem Zweck der Vektor dient und in welchem Bereich er eingesetzt werden soll. Besonders für Studien *in vitro* spielt die Insertionsmutagenese selbst mit klassischen γ -Retroviren in der Regel keine Rolle. Mit sicherheitsoptimierten Retro- und Lentiviren ist sie auch bei Langzeitstudien *in vivo* in der Regel nicht relevant (Montini et al. 2006). Damit stellt der retrovirale Gentransfer in der Grundlagenforschung eine effiziente, einfach zu handhabende und sehr etablierte Methode dar, um Genfunktionen über längere Zeit zu untersuchen (Lever et al. 2004).

3.1.3. Lentiviraler Gentransfer

Lentiviren entstammen den sich in ihrem Aufbau sehr ähnelnden Orthoretrovirinae aus der Familie der Retroviridae, die in die Untergruppen α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren und Lentiviren unterteilt werden.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=11632&keep=1&lvl=6&fi lter=genome_filter&p=genome, 15.08.2013, 16:00Uhr)

Retroviren werden seit 30 Jahren als Gentransfervektoren benutzt (Wei et al. 1981). Ihre Eigenschaft, sich stabil in das Genom von Zellen zu integrieren, macht sie zu einem sehr wichtigen Instrument in der Wissenschaft (siehe Kapitel 3.1.2). Dennoch stellten in der Anwendung von γ -Retroviren die relativ niedrigen Titer, die ineffektive Infektion nichtproliferierender Zellen und die Integration in die Transkriptionsstartbereiche schwierige Hindernisse dar (Miller et al. 1990; Roe et al. 1993; Wu et al. 2003; Gardlik et al. 2005).

Die in der Mitte der 90er Jahre entwickelten lentiviralen Vektoren versprachen hingegen neben der Möglichkeit, ruhende, nicht-mitotische Zellen zu transduzieren, gering höhere Titer und ein günstigeres Integrationsprofil (siehe Kapitel 3.1.2) (Lewis et al. 1992; Bukrinsky et al. 1992; Mitchell et al. 2004; Gardlik et al. 2005). Bei gleichen Long-Terminal-Repeat (LTR)-Voraussetzungen zwischen lentiviralen und γ -retroviralen Vektoren wird erst durch eine zehnfach höhere Kopienanzahl an lentiviralen Integrationen pro Zelle die Genotoxizität von γ -Retroviren erreicht (Mátrai et al. 2010).

Lentivirale Vektoren wurden von einer Reihe verschiedener Lentiviren abgeleitet, u.a. dem Human Immundeficiency Virus 1 und 2 (HIV 1, HIV2) (Sadaie et al. 1998), dem Feline Immundeficiency Virus (FIV) (Curran et al. 2000), dem Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) (Azzouz und Mazarakis 2004) und dem Bovine Immundeficiency Virus (BIV) (Takahashi et al. 2002). Im weiteren Text wird der Begriff lentivirale Vektoren als Bezeichnung für die von HIV-1 abgeleiteten Vektoren gebraucht.

3.1.3.1. HIV-1

HIV-1 ist der wohl bekannteste Vertreter der Lentiviren. HIV-1 ist ein humanpathogenes Virus und infiziert das Oberflächenprotein CD4 exprimierende Zellen, die eine entscheidende Rolle im Immunsystem spielen, wie z.B. als T-Helfer-Zellen, Makrophagen und als dendritische Zellen. Die Infektion durch das zytopathische Virus führt zu einem Verlust dieser Zellen. Dieser Verlust bewirkt unbehandelt eine fortschreitende Schwächung des Immunsystems bis hin zu der Ausprägung des erworbenen Immundefektsyndroms, engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) und schließlich zum Tod führen kann (Quinonez und Sutton 2002).

Das ca. 100 nm große Virus besteht aus zwei linearen Einzelstrang RNA-Molekülen mit positiver Polarität, die von einem Capsid aus den für die Replikation wichtigen Proteinen und einer Membran, die die viralen Hüllproteine gp41 und gp120 enthält, umhüllt sind (Schulz 2009).

Wie bei allen Retroviren besteht das virale Genom hauptsächlich aus drei Genen: Dem "Gruppenantigen" *gag*, das alle Strukturproteine wie das Matrix- (p17), das Kapsid- (p24) und das Nukleokapsidprotein (p7) kodiert, dem *pol*, das die Sequenz für die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase enthält, und dem *env*, das für die beiden Hüllproteine gp41 und gp120 kodiert (s. Abbildung 1). Zusätzlich exprimiert HIV durch alternatives Spleißen im Gegensatz zu einfacher strukturierten Retroviren die regulatorischen Proteine *rev* und *tat* sowie die akzessorischen Proteine *vif*, *vpu*, *vpr* und *nef*. Diese besitzen regulatorische und für den viralen Lebenszyklus wichtige Funktionen (Quinonez und Sutton 2002).



Abbildung 1 Schematische Darstellung des Wildtyp-Genoms des HIV-1 und der reversen Transkription. a) Durch die Reverse Transkriptase, ein Enzym mit Ribonuclease H Aktivität, erfolgt die Umschreibung der RNA in DNA. b) Dabei kommt es zur Übertragung der U3 Region 5' vor die U5 und der U5 Region 3' hinter die U3. Damit werden auch die Promotor- und Enhancerelemente dieser Regionen übertragen. Dadurch tritt bei der Transkription der Volllängen-mRNA kein Verlust von genetischem Material ein. Darstellung ausgewählter Strukturen der Provirus-DNA. Abbildung nicht maßstabsgetreu. Modifiziert nach (Pluta und Kacprzak 2009).



Abbildung 2 Schematische Darstellung der Struktur und des Lebenszyklus von HIV 1. Der Lebenszyklus von HIV beginnt nach Bindung (1) der Hüllproteine an die zellulären Oberflächenproteine CD4 und je nach Tropismus an z.B. CCR5 mit der über das Glykoprotein gp41 vermittelten Membranfusion zwischen Zelle und Virus (2). Es kommt zur reversen Transkription (3) und zum Transport des Reverse-Transkription-Komplex (RTC) in Richtung Kernmembran. Nach vollständiger reverser Transkription wird der Präintegrationskomplex (PIC), der unter anderem aus der viralen DNA, Reverser Transkriptase und Integrase besteht, ATP-abhängig in den Kern importiert (4). Es kommt zur Integrase-vermittelten Integration (5). Durch die RNA-Polymerase II kommt es durch das Protein Tat gefördert zur Transkription verschieden gespleißter RNA-Varianten (6). Gespleißte und nicht gespleißte RNA wird durch das Protein Rev stabilisiert und exportiert und der "Translationsmaschinerie" zugeführt (7). Ungespleißte genomische RNA-Moleküle, Gag-, Pol- und Env-Proteine lagern sich zusammen (8), binden an die Zellmembran und werden als unreife Vorstufen entlassen (9), die dann durch die Protease in reife Partikel umgewandelt werden (10). Graphik verändert nach Pluta und Kacprzak (2009).

An den 5' und 3' Enden der HIV1-Provirus-DNA befinden sich die langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTRs, long terminal repeats). Sie bestehen aus wiederholten Elementen (R, redundant), die von einer im RNA-Genom nur einzeln vorkommenden Region (U3, U5, unique) umrahmt werden. Diese LTRs enthalten cis-Elemente, wie Promotoren, Enhancer und ein Polyadenylierungssignal. Zusätzlich befinden sich noch weitere Cis-Elemente zwischen beiden LTRs: Das ψ (Packaging Singnal, psi)-Signal für die Verpackung der viralen RNA, der zentrale Polypurintrakt (cPPT), der auf den Kernimport der DNA entscheidenden Einfluss nimmt, und das Rev-Responsible Element (RRE) für den Kernexport der transkribierten RNA. Der Lebenszyklus von HIV ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt.

3.1.4. Lentivirale Vektoren

HIV-1 zeichnet sich im Vergleich zu den γ -Retroviren zum einen durch seine potentiell sichereren Eigenschaften als Gentransfervektor aus (siehe Kapitel 3.1.2.3 und 3.1.3), bereitet zum anderen aber Sorgen als viraler Erreger von AIDS (Lever et al.2004). Um die Effizienz als Vektor zu maximieren, gleichzeitig aber die Gefahr des Kontrollverlustes über den Vektor zu minimieren, wurden verschiedene Veränderungen am viralen Erbgut durchgeführt.

Wie bei allen Vektoren besteht das Ziel bei der Entwicklung viraler Vektoren darin, pathogene Eigenschaften so weit wie möglich aus dem viralen Genom zu entfernen. Bei Lentiviren wird so versucht, die Wahrscheinlichkeit der Entstehung replikationskompetenter Lenti-Viren (RCL) durch Rekombination mit Wildtyp-HIV zu minimieren sowie die transformierenden Eigenschaften der Viren (infolge der Insertionsmutagenese) zu reduzieren. So wurden über verschiedene Entwicklungsschritte die Gene *gag/pol* und *env*, bis auf das Verpackungssignal ψ im *gag* und das RRE im *env*, sowie die sechs akzessorischen Gene (*vif, vpu, vpr, nef, tat, rev*) entfernt (Helseth et al. 1990; Page et al. 1990; Naldini et al. 1996; Dull et al. 1998; Naldini und Verma 2000). Zusätzlich wurde die U3 Region, die Promotor- und Enhancerelemente enthält, aus dem 5'LTR entfernt und durch einen heterologen Promotor für die Transkription ersetzt (Kim et al. 1998), der z.B. gewebsspezifische Expression garantieren kann (Palma et al. 2003). Damit wurde zudem die Expression unabhängig von Tat.

Zusätzlich zum ψ -Verpackungssignal und dem RRE wurden als cis-Elemente der zentrale Polypurintrakt (cPPT) und die zentrale Terminationssequenz (CTS) belassen. Diese spielen eine entscheidende Rolle für den Kernimport, die reverse Transkription und damit für die Infektion von ruhenden Zellen (Quinonez und Sutton 2002).

Weiterhin wurden posttranskriptionelle regulatorische Elemente, wie z.B. das Murmeltier-Hepatitisvirus-Posttranskriptionelle Regulatorische Element (wPRE), 5' vor dem 3' LTR in den Vektor eingesetzt, welches zu einer Titer- und Transgenexpressionssteigerung führte (Zufferey et al. 1999; Logan et al. 2004b). Alle belassenen Virusstrukturen sind entscheidend für Virusproduktion und Transgenexpression (Quinonez und Sutton 2002; Lever et al. 2004). Die Veränderung des HIV-1-Erbgutes, die zu der Entstehung der so genannten Lentivektoren der dritten Generation führte, ist in Abbildung 3b gezeigt. Zur einfachen Produktion und Transfektion wurde die Provirus-DNA mit einem CMV Promotor versehen in ein Plasmid eingefügt (Abbildung 3c).



Abbildung 3 Schematische Darstellung der Veränderung des HIV-1-Genoms zum sichereren und verbesserten lentiviralen Gentransfer. a) Vereinfachte Darstellung des integrierten HIV-1-Provirus. b) Nach einigen Entwicklungsschritten, die die Entfernung ursprünglicher proteinkodierender Sequenzen umfassten, wobei die für die Herstellung und Transduktion wichtigen DNA-Sequenzen aus dem nativen Virusgenom belassen wurden, entstanden lentivirale Vektoren der 3. Generation. c) Durch Veränderung des 3' LTR wurden diese zu Vektoren mit selbst inaktivierendem LTR (SIN) weiterentwickelt. CMV bezeichnet den (nur im Produktionsplasmid vorhandenen) Promotor des Zytomegalievirus; polyA steht für das Signal zur Polyadenylierung. $\Delta U3$ bezeichnet den durch Deletion des U3-Promotors/Enhancers entstandenen SIN-LTR. Darstellung nicht maßstabsgetreu.

Zur Substitution der für die Virusproduktion wichtigen Proteine wurden Helferplasmide entwickelt (siehe Abbildung 4). Auf einem Plasmid sind die Gene *gag/pol* enthalten, auf einem anderen das *Rev*-Gen und auf einem weiteren das *env*-Gen, das je nach gewünschter Pseudotypisierung variieren kann (Quinonez und Sutton 2002).

Im Gegensatz zum Vektorplasmid enthalten die Helferplasmide nicht das Verpackungssignal ψ , sodass keine RNA der viralen Proteine verpackt werden kann. Dadurch soll vermieden werden, dass entstehende Viruspartikel RNA-Sequenzen für die ehemals entfernten Proteine enthalten. Um die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen weiter zu verringern, wurde zudem in den Helferplasmiden die Kodonnutzung der viralen Gene verändert. Insgesamt wurde durch die Transkomplementierung über mehrere unterschiedliche Plasmiden und die alternative Kodonnutzung der viralen Proteine die Möglichkeit der RCL-Entstehung immens reduziert (Naldini und Verma 2000).



Abbildung 4 Schematische Darstellung des Prinzips der Transkomplementierung zur Herstellung lentiviraler Vektoren. Alle DNA-Sequenzen befinden sich auf Plasmiden, die hier zur besseren Übersichtlichkeit ohne die plasmidtypischen, zur Replikation und Selektion wichtigen Strukturen dargestellt sind. Die drei Transkomplementierungsplasmide, die die Sequenzen für die Protease, Reverse Transskriptase und Integrase durch das gag/pol Gen, die Sequenz für das REV-Protein und das gewünschte Hüllprotein (engl. envelope, env) enthalten, weisen keine weiteren lentiviralen Sequenzen mit Ausnahme des RRE und der jeweiligen proteinkodierenden Sequenz auf. Der Vektor zur Transkription der lentiviralen DNA enthält in seinem Plasmid einen CMV-Promotor vor dem 5'LTR, um eine virale RNA inklusive beider LTRs zu erzeugen, die dann als Einzelstrang-RNA in die neuen Viruspartikel übergehen kann. Durch die Transkription der Transkomplementierungsplasmide und die Translation der mRNAs entstehen die für die Virusproduktion notwendigen Proteine.

Das Bestreben nach noch höherer Sicherheit in der Anwendung lentiviraler Vektoren führte zu der Entfernung der Promotor- und Enhancersequenzen aus dem 3'LTR und damit zur Entwicklung sogenannter selbstinaktivierender Vektoren (SIN) (Zufferey et al. 1998; Miyoshi et al. 1998; Schnell et al. 2000), die bei γ -Retroviren trotz deutlich niedrigerem Titer schon früher zur Anwendung gekommen waren (Yu et al. 1986). Während der reversen Transkription führt der Transfer der defekten U3-Region (Δ U3) des 3'LTR in den 5'LTR dazu, dass beide LTRs ihre Promotoraktivität verlieren, sodass der heterologe Promotor, der der Transkription des Transgens dienen soll, der einzige aktive ist (Quinonez und Sutton 2002; Lever et al. 2004). Im Gegensatz zu Konstrukten mit intakten LTRs weisen die SIN-Vektoren eine signifikant verringerte Expression von Volllängen-RNAs auf. Durch geringe Promotor-Restaktivität kann es aber dennoch zu seltenen Volllängen-RNAs kommen (Logan et al. 2004a; Hanawa et al. 2005). Außerdem weisen die SIN-Vektoren noch weniger Gemeinsamkeit mit Wildtyp-HIV auf und reduzieren damit die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationen mit dem Wildtyp-Genom (Pauwels et al. 2009). Aufgrund dieser Punkte ist die Wahrscheinlichkeit der Mobilisierung der Vektor-RNA durch Superinfektion mit Wildtyp-HIV sehr gering (Bukovsky et al. 1999).

Der dritte entscheidende Vorteil ist, dass durch die Entfernung der Promotor- und Enhancerelemente der LTRs, der Hauptdeterminanten für die Genotoxizität des Vektors, die Beeinflussung benachbarter Gene und damit die Gefahr der Transformation durch Insertionsmutagenese deutlich reduziert wird (Pauwels et al. 2009; Mátrai et al. 2010). Nachteilig ist aufzuführen, dass die Verwendung von SIN-Vektoren zu einer leichten Titerreduktion führt und die Herstellung permanenter Produzenten-Zelllinien deutlich erschwert wird (Logan et al. 2004b).

3.1.5. Entwicklung polycistronischer Vektoren

Anstelle der früheren viralen Proteine zwischen den 5' und 3'LTRs besteht die Möglichkeit, Transgene bis zu Größen von 8-10 kb nahezu ohne Titerreduktion in die Vektoren zu klonieren. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass der Titer nicht allein von der Größe eines Transgens, sondern auch von der Art und Sequenz der eingeführten Gene abhängt. Die Grenze von 10 kb lässt sich im Prinzip durch noch größere Genkonstrukte überschreiten, wobei in der Regel ein deutlich schwächerer Titer in Kauf genommen werden muss (Mátrai et al. 2010). Durch das relativ große Verpackungsvolumen ergibt sich auch die Möglichkeit, mehrere Transgene gleichzeitig durch einen Vektor zu exprimieren. Dies ist von Vorteil, da mehrfache Transduktionen nicht nur deutlich ineffizienter sind (Rees et al. 1996), sondern auch ein erhöhtes Risiko durch Insertionsmutagenese implizieren (Fehse et al. 2004). Die Entwicklung polycistronischer Vektoren ist z.B. dann wichtig, wenn Multi-Gen-Defizienzen mit einem einzelnen Vektor ausgeglichen werden sollen (Szymczak et al. 2004). Die Koexpression ist auch vorteilhaft, wenn die transduzierte Zelle, die ein gewünschtes Gen exprimiert, gleichzeitig durch einen Marker identifizierbar sein soll, der zugleich für eine Anreicherung genmodifizierter Zellen genutzt werden kann (Fehse et al. 1998; Fehse et al. 2000; Weber et al. 2008).

So bietet z.B. die zusätzliche Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) die Möglichkeit, die Transduktionsrate abzuschätzen und zeigt durch eine zu dem Transgen stöchiometrische Expression zusätzlich ein ungefähres Bild der Expressionsstärke (Mosser et al. 1997).



Abbildung 5 Schematische Darstellung verschiedener Varianten bicistronischer lentiviraler Vektoren. Zur Zeichenerklärung vergleiche Tahelle 3. Die simultane Expression zweier Gene kann in einem Vektor über die Verbindung durch eine verbindende DNA-Sequenz, wie die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) oder eine 2A-Sequenz, erfolgen. Einige Gene erlauben auch eine direkte Fusion (Fehse et al. 2002). Auch über zwei Promotoren lässt sich eine Koexpression zweier Gene in einem Vektor gewährleisten. Eine Sonderform ist die Verwendung eines "Minipromotors", der zur Funktion auf die direkte Nachbarschaft eines vollständigen Promotors angewiesen ist. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maßstabsgetreu.

In den letzten Jahrzehnten fanden verschiedene Möglichkeiten zur simultanen Expression zweier Transgene Anwendung in der Wissenschaft. Jede zeichnet sich durch eigene Besonderheiten aus, die je nach Anwendung von Vor- oder Nachteil sein können. Es wurden funktionierende retrovirale Vektoren mit bis zu fünf verschiedenen Transgenen konstruiert (Felipe und Izquierdo 2003). Abbildung 5 und Tabelle 3 geben einen Überblick über eine Auswahl verschiedener, in der Wissenschaft verwendeter Arten polycistronischer Vektoren.

Tabelle 3 Darstellung der Eigenschaften polycistronischer Vektoren. ORF steht für den offenen Leserahmen eines Promotors.

Element	Struktur/Entwicklung	Funktion	Eigenschaften	Zusätzliche
	_		_	Referenzen
Zwei Promotoren	 Kombination zweier konstitutiver oder induzierbarer Promotoren mit eigenständigem ORF Zusätzlich Trennung durch poly-A-Signale, Terminator- und Insulatorsequenz 	 Eigenständige Transkription Gezielte Expression durch gewebsspezifische Promotoren 	 Getrennte nicht stöchiometrische Expression In einfachen Konstrukten ohne regulatorische Elemente häufige Interferenz beider Promotoren und unberechenbare bzw. fehlende Expression In aufwendigen Konstrukten mit Terminatorsequenz und poly-A-Signal hohe simultane Expression Im Vergleich sehr groß (deutliche Verkleinerung durch synthetische bidirektionale Promotoren) Mehr als 2 Cistrone nicht sinnvoll 	(Martínez-Salas 1999)
Fusion	 Ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor mit einem ORF aus beiden Proteinen 	 Im Idealfall Kombination beider Eigenschaften eines Proteins ohne Kupplungssequenz 	 Mein die 2 Cistrone incht sinn fehr Meist eingeschränkte oder veränderte Funktion eines oder beider Proteine Nicht ideal, wenn unterschiedlich intrazelluläre Lokalisationen erforderlich sind Geringste Größe Mehr als 2 Cistrone nicht sinnvoll 	(Weber et al. 2010) (Fehse et al. 2002)
Interne Ribosomale Eintrittsstelle, IRES (engl. Internal Ribosome Entry Site) (IRES)	 Größe: ca.130-460bp Zuerst entdeckt in Picornaviren, später in weiteren Viren und Eukaryonten ECMV-IRES zeigt die stärkste Expression 	 Durch komplexe Sekundärstruktur direkte Bindung der 40S Ribosomenuntereinheit Direkte Initiation der Translation unabhängig von Cap-Struktur oder Initiationsfaktoren 	 Stöchiometrische Expression zu vorgeschaltetem Gen (ca. 3:1) Durch Kombination mehrere gleicher IRES-Sequenzen Interferenz und niedrige Titer Expression abhängig von verschiedenen Variablen: Position, Zelltyp und erstem Cistron (6-100%) 	(Martínez-Salas 1999; Douin et al. 2004; Mosser et al. 1997; Rees et al. 1996; Bochkov und Palmenberg 2006)
2A-Sequenz	 18-22 Aminosäuren lang Carboxyterminale Konsensussequenz in allen 2A-Sequenzen Zuerst aus Picornaviren, später aus weiteren Viren 	 Zwischen Glycin und Prolin kommt es zu einem Neuanfang des translatierenden Ribosoms ("Ribosomaler Skip") Keine eigene Translationsinitiation Die ersten 18-21 Aminosäuren bleiben amcarboxyterminalen Ende des ersten Proteins Prolin wird an aminoterminales Ende des zweiten Proteins angefügt Nur an 80S-Ribosomen funktionsfähig 	 Stöchiometrische Expression ca. (1:1) N-terminales Prolin ohne Funktionsbeeinträchtigung C-Terminaler Anhang kann in seltenen Fällen zu Funktionseinbußen führen, z.B. von Tags (flag, myc) Wenn erstes Protein ein Signalpeptid besitzt, besteht die Möglichkeit des Transfers beider Protein in das endoplasmatische Retikulum ("slipstreaming") Durch Aminosäuren-Anhang Identifikation des ersten Proteins durch Antikörper möglich Geringe Größe 	(Holst et al. 2006; Donnelly et al. 2001; Szymczak et al. 2004; Felipe und Ryan 2004; Felipe 2002)

3.1.6. LeGO-Vektoren

Die LeGO (Lentiviral Gene Ontology)-Vektoren wurden 2008 von Weber et al. eingeführt (Weber et al. 2008). Die Vektoren wurden zur einfachen Handhabung (Klonierung) mit einer Reihe unikaler Restriktionsschnittstellen ausgestattet. Aufbauend darauf wurde eine Vielzahl von Vektoren mit unterschiedlichen Marker- und Resistenzgenen generiert (Abbildung 6).



Abbildung 6 Schematische Darstellung der Funktionsweise des LeGO-Systems an dem Vektor LeGO-IG2. Durch die über dem Vektor dargestellten Restriktionsschnittstellen lassen sich die unter dem Vektor dargestellten Bausteine ein- und ausbauen. Zwischen Vektoren mit unterschiedlichen Transgenen existiert somit ein gleicher Vektoraufbau. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenz- und Resistenzmarker lassen sich, besonders bei Simultaninfektion mit verschiedenen Vektoren, die mit den jeweiligen Vektoren transduzierten Zellen identifizieren. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maßstabsgetreu. Modifiziert nach Weber et al. (2008, 2010).

3.2. Genregulation

Eine effiziente, dosierbare konditionelle Genexpression kann von entscheidender Bedeutung in Grundlagenforschung und Klinik sein. Effekte und Funktionen der Proteine können häufig schneller und genauer durch An- und Abschalten analysiert werden, ohne dass komplexe Verfahren angewandt werden müssen. Zudem bringt die dosierte und gezielte Expression entscheidenden Fortschritt für Nutzen und Sicherheit einer effizienten Gentherapie (Weber und Fussenegger 2006). Ein ideales System für die regulierte Genexpression sollte folgende Eigenschaften haben: Es sollte durch eine nebenwirkungsfreie, gut verfügbare und spezifische Induktionssubstanz (engl. Inducer) aktiviert werden (1), ein gutes Signal-zu- Hintergrundverhältnis (engl. Signal-to-Noise-ratio) besitzen, d.h. geringe basale und hohe induzierte Aktivität (2). Die Expression sollte möglichst proportional zu der Konzentration des Inducers (3) sowie reversibel sein (4). Zusätzlich sollte es durch eine einfache Struktur und eine praktikable Handhabung überzeugen (5). Besonders für klinische Anwendungen ist eine niedrige Immunogenität entscheidend (6)(Fussenegger 2001; Toniatti et al. 2004; Weber und Fussenegger 2006). Es gibt eine große Vielfalt an Systemen, die auf verschiedene Inducer, wie z.B. extrazelluläre Stimuli wie Temperatur (Vilaboa et al. 2005), kleine Moleküle (engl. Small Molecules), wie Antibiotika und Hormone (s.u.) oder Metallionen reagieren (Gossen und Bujard 1992). Dabei setzen diese Systeme auf unterschiedlichen Regulationsebenen an – Genom, Transkription, Translation und Posttranslation.

3.2.1. Tet-System

Das Tet-System beruht grundsätzlich auf dem Operatormodell von Bakterien, das die regulierte, von Tetracyclin abhängige Expression des Tetracyclinresistenzgens gewährleistet (Gossen und Bujard 1992, Hillen und Berens 1994).

Das in Abbildung 7 dargestellte Operonprinzip wurde in unterschiedlichen Varianten auf verschiedene Vektorsysteme übertragen .

Durch Fusion des Tet-Repressors (TetR) (N-terminal) mit der Transaktivatordomäne VP16 des Herpes-Simplex-Virus (C-terminal) und Verwendung eines die Tetoperator (TetO) -Sequenz enthaltenden minimalen CMV-Promotors entstand ein System, in dem durch Entfernen von Tetracyclin oder des mehrfach aktiveren Doxycyclins (Toniatti et al. 2004) die Bindung des Tet-VP16-Fusionsproteins an die TetO-Sequenz des Promotors ermöglicht und die Transkription initiiert wurde (Gossen und Bujard 1992). Erst durch die direkte Nachbarschaft der Transaktivatordomäne VP16 erfolgte eine effiziente Transkription durch den minimalen CMV-Promotor. Diese Funktionsweise, bei der durch Addition von Doxycyclin die Expression gehemmt wird, wird als TetOff-System bezeichnet. Durch mehrere Mutationen an dem TetR-Protein wurde das TetOff- zu einem TetOn-System weiterentwickelt, bei dem erst durch Zugabe von Doxycyclin die Bindung an die TetO-Sequenz und durch Transaktivierung die Expression des gewünschten Gens ermöglicht wurde.



Abbildung 7 Schematische Darstellung des Tet-Operonmodells. a) Bei Anwesenheit von Tetracyclin (T) wird das Tet-Repressor-Protein (TET R) gebunden und kann nicht mehr die Transkription des Tetracyclinresistenzgens (TET A) reprimieren, sodass es zur Expression des letzteren und einer dadurch vermittelten Resistenz gegen dieses Antibiotikum kommt. b) In Abwesenheit von Tetracyclin kann das Repressorprotein an die Operatorsequenz (TetO) des TetA-Gens binden und die Expression über die Inhibition der Transkription unterdrücken, solange kein Tetracyclin vorhanden ist. Darstellung nicht maßstabsgetreu.

Die sehr guten pharmakologischen Eigenschaften von Doxycyclin, wie hohe Bioverfügbarkeit, gute Gewebegängigkeit und Eliminierbarkeit für den Organismus (Toniatti et al. 2004) und weitere Optimierungen in Hinblick auf geringere basale Aktivität und besseres Doxycyclin-Ansprechen machten das Tet-System zu dem wohl meistgenutzten und vielversprechendsten Genregulationssystem (Pluta und Kacprzak 2009).

Trotz guter Expressionssteigerungen bis Faktor 500 unter ausgewählten Bedingungen schränkte jedoch die meist noch hohe basale Aktivität im uninduzierten Zustand den Nutzen dieses Systems ein (Fussenegger 2001; Zhou et al. 2007), was zu weiteren Verbesserungen und Veränderungen führte.

Eine der Strategien basierte auf der Fusion des TetR-Proteins mit der Krüppel-assoziierte-Box-Proteindomäne (KRAB) des KOX-1 Gens (Deuschle et al. 1995b). Die ca. 75 Aminosäuren lange KRAB-Domäne, die von beinahe zweidrittel aller menschlichen Zinkfingerproteine getragen wird, führt durch Bindung des Heterochromatin-Proteins 1 (HP-1) zur lokalen Bildung von Heterochromatin über einen Radius von 2-3 kb und damit zu einer Inaktivierung nahe gelegener Polymerase-II und -III Promotoren (Deuschle et al. 1995b). Zusätzlich wurde das mutierte TetR-Protein rtTR-2SM2 mit reversen Eigenschaften, das sich durch hohe Affinität zu Doxycyclin und TetO auszeichnet, mit der KRAB-Domäne fusioniert (Szulc et al. 2006).

Dieses System ist somit als TetOn- und TetOff- System verfügbar, funktioniert mit einer Vielzahl von Promotoren, insbesondere auch shRNA-Promotoren, reagiert auf sehr niedrige Doxycyclin-Konzentrationen (1-10ng/ml), und zeigt eine niedrige Basalaktivität bei guter Expressionsstärke, was zu Induktionsfaktoren von 30-150 führte (Deuschle et al. 1995b; Szulc et al. 2006; Zhou et al. 2007).

Ein großes Problem des ursprünglichen Tet-Systems mit VP16 war, dass Versuche, alle Komponenten in einen einzelnen Vektor zu integrieren, meist aufgrund niedriger Transgenexpression, hoher basaler Aktivität oder kompliziertem Design mit geringem Platz für das Transgen nicht zu dem gewünschten Ergebnis führten (Haack et al. 2004; Szulc et al. 2006; Barde et al. 2006). Ein Zwei-Vektoren-System weist hingegen eine deutlich schwierigere Handhabung auf, insbesondere da nur ein Teil der transduzierten Zellen beide Informationen enthält, und verstärkt die Sicherheitsbedenken bezüglich gehäufter Vektorintegrationen (siehe Kapitel 3.1.5)

Der von Szulc et al. 2006 vorgestellte, über Tetracyclin regulierbare Vektor auf KRAB-Basis konnte eine gute Regulierbarkeit, selbst bei zeitgleichen shRNA- und Transgentranskription, mit geringer Basalaktivität und einer großen zusätzlichen Transportkapazität verbinden (Szulc et al. 2006). Allerdings weisen die Vektoren keinen einheitlichen Aufbau auf und ermöglichen keine dem Transgen zusätzliche Marker- oder Resistenzgenexpression.



Abbildung 8 Schematische Darstellung zweier Varianten des Tet-Systems. a) Aufbau und Funktionsweise des auf zwei Vektoren basierenden Tet-Systems mit der VP16-Transaktivatordomäne. Da dieses System Anwendung in verschiedenen viralen Vektoren findet, ist kein spezifischer viraler Vektor dargestellt. Durch die Addition von Tetrazyklin oder Doxycyclin (T) kann die Bindung des Fusionsproteins aus TET R und VP16-Transaktivatordomäne an die TetO-Sequenz verhindert und die Transkriptionsinitiation gehemmt werden. b) Aufbau und Funktionsweise des auf einem lentiviralen Vektor basierenden TetOn-System von Szulc et al (2006). In Abwesenheit des Inducers führt die Bindung des Fusionsproteins aus TetR und KRAB-Domäne zu einer Heterochromatinbildung über 2-3 kb. Bei Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin dissoziiert das Fusionsprotein von der DNA und eine Transkription des gewünschten Genes kann beginnen. Darstellung als integriertes Provirus. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

3.2.2. Das Proteotunersystem

Wie beschrieben existieren viele Möglichkeiten, die Menge an exprimiertem Protein zu verändern. Einen großen Nachteil der Regulation auf Transkriptionsebene stellt die lange Reaktionszeit des Systems auf Veränderungen der Induktionsbedingungen dar. Je nach Halbwertszeit des Proteins dauern der Abbau des nicht mehr transkribierten Proteins wie auch die Aufsättigung der Proteinkonzentration nach Transkriptionsinitiierung mehrere Tage (Szulc et al. 2006).

Über die Regulation der Proteinstabilität eröffnet sich eine alternative Möglichkeit zur Regulation der Proteinmenge. Durch verschiedene Veränderungen an Proteinsequenzen wurde versucht, deren Halbwertszeit zu verändern. So wurde durch N- und C-terminale Veränderungen am Fluoreszenzprotein GFP erreicht, die Halbwertszeit deutlich zu verkürzen (Deichsel et al. 1999; Andersen et al. 1998). 2006 entwickelten Banaszynski et al. eine N- und C-terminale Peptidsequenz, die eine ligandenabhängige Proteindestabilisierung ermöglicht. Durch Fusion der 12kDa großen Mutante des FK506-und-Rapamycin bindenden Proteins 12 (FKBP 12) F36V L106P an ein gewünschtes Protein wird dessen Halbwertszeit auf wenige Minuten reduziert. Zugleich kann die Halbwertszeit durch die Addition des kleinen Moleküls "Shield1" wieder auf beinahe normale Werte verlängert werden (Banaszynski et al. 2006; Banaszynski et al. 2005; Banaszynski et al. 2008; Banaszynski und Wandless 2006; Sellmyer et al. 2009).

Shield1 ist ein synthetisches Molekül, das praktisch keine Affinität zu dem originalen humanen Protein besitzt und in Zell- und Tiermodellen ohne starke Nebeneffekte eingesetzt wird (Iuliucci et al. 2001; Clackson 1997; Keenan et al. 1998; Sellmyer et al. 2009). Es ist ein 750Da großer, membranpermeabler Ligand, der innerhalb von 15-20 min nach Addition zur Proteinstabilisation führt und vor proteosomalem Abbau schützt (Haugwitz et al. 2008). Einen weiteren Vorteil dieses Systems stellt die Möglichkeit dar, das zu analysierende Protein mittels Antikörpern über die Fusionsdomäne als "Proteintag" zu identifizieren. Dieses Proteindestabiliserungssystem wird als "Proteotuner" von der Firma Clontech vermarktet.



Abbildung 9 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Proteotunersystems. Dargestellt ist eine Polypeptidkette mit fusionierter Destabilisierungs-Domäne. Durch Addition von Shield1 kann dieses Fusionsprotein stabilisiert, d.h. vor proteosomalen Abbau geschützt werden und akkumulieren. Ohne Shield1 besitzt es infolge schneller Degradation im Proteosom eine sehr kurze Halbwertszeit und kann nicht akkumulieren. Modifiziert nach Haugwitz et al. (2008).

4. Materialien

4.1. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme waren ausnahmslos "FastDigest"-Enzyme von Fermentas (St. Leon-Rot). Verwendet wurden jeweils der beigelegte 10x "FastDigest"-Buffer und zur Verdünnung Wasser für Injektionszwecke von der Firma Braun (Melsungen). Als weitere Enzyme von Fermentas (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) mit dazu gehörigem Puffer wurden folgende verwendet:

Enzym:

Puffer:

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase
Klenow Fragment
T4 Polynukleotidkinase
DreamTaq (Green) DNA-Polymerase
Pfu DNA-Polymerase
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

10x FastDigest Buffer
10x Reaction Buffer
10x Reaction Buffer A
10x DreamTaq (Green) Buffer
10X *Pfu* Buffer + 20 mM MgSO₄
5x Phusion HF Buffer

4.2. Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Roth (Karlsruhe) erworben. Weiterhin wurden verwendet:

7-Amino-actinomycin D (7AAD)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Agarose, Ultrapure	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin	Invitrogen
Chloroquin	Invitrogen
Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen
Ethidiumbromid	Invitrogen
Kanamycin	MP Biomedicals (Irvine, USA)
Polybren	Sigma-Aldrich
Shield 1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye)
Puromycin	Sigma-Aldrich
Zeocin	Invitrogen
Ciprobay	Bayer AG (Leverkusen)
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
TAE	Invitrogen

4.3. Lösungen

Zur Kultivierung von Bakterien wurden verwendet:

LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid,in Wasser
LB-Agar	LB-Medium, 15 g/L Agar (Invitrogen)

4.4. Zellkulturmedien

Zur Unterhaltung der Zellkulturen wurden verwendet:

Name	Inhalt	Firma
DMEM	DMEM Glutamaxx	Gibco/Invitrogen
	10% FBS	
	5000 U/mL Penicillin, 5000 μg/mL	
	Streptomycin	
	25nM Hepes	
RPMI 1640	RPMI 1640	Gibco/Invitrogen
	10% FBS	
	4nM Glutamin	
	1nM Natriumpyruvat	
	25mM Hepes	
RPMI 1640 +	RPMI 1640	Gibco/Invitrogen
IL3	10% FBS	
	4nM Glutamin	
	1nM Natriumpyruvat	
	25mM Hepes	
	5% IL3	
DPBS		Gibco/Invitrogen
Typsin 0,05%		Gibco/Invitrogen
EDTA		

4.5. Kits und DNA-Größenmarker

Für einzelne molekularbiologische Arbeiten wurden folgende Kits und DNA-Größenmarker verwendet:

Qiaquick Gel Extraction Kit Qiaquick PCR Purification Kit GeneRuler 100bp DNA Ladder GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus Qiaprep Spin Miniprep Kit Qiagen Plasmid Maxi Kit Qiagen (Hilden) Qiagen Fermentas Fermentas Qiagen Qiagen

4.6. Antikörper

Zur Färbung für die FACS-Analyse wurde folgender Antikörper gebraucht:

APC CD34

Becton Dickinson

4.7. Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die Experimente verwendet:

HEK293T	ATTC-Nummer: CRL-11268
BaF3	DSMZ-Nummer: ACC 300
K562	ATTC-Nummer: CRL-243
NIH3T3	ATTC-Nummer: CRL-1658
Jurkat76	Wolfgang Uckert, Max Delbrück Center for Molecular Medicine; and Institute of Biology, Humboldt University Berlin, Berlin, Germany

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, http://www.atcc.org DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, http://www.dsmz.de

4.8. Bakterien

Zur Transformation und Replikation von Plasmiden wurden *Escherichia-coli* CMK 603 verwendet, die im Labor kompetent für die chemische Transformation gemacht wurden.

4.9. Nukleinsäuren

4.9.1. Oligonukleotide

Die folgenden Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Sie wurden für PCR und Sequenzierungen eingesetzt.

Alle Primer sind aufgeführt von 5' nach 3'. Vorwärtsprimer sind durch das Kürzel Fw und Rückwärtsprimer durch Rv gekennzeichnet.

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und Start- bzw. Stopcodons fett markiert.

1	5' end tTR- KRAB_FP mit	ATGA <u>ACCGGT</u> GGCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGC
2	Agel (Fw) 5' end rtTR- KRAB FP mit	ATGA <u>ACCGGT</u> GGCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTC
3	AgeI (Fw) 3' end TR- KRAB_RP mit	GTCG <u>GAATTC</u> TTAAACTGATGATTTGATTTCAAATGCAGTCTCTG
4	Mut TR- KRAB_FP mit BlpI / ohne BsrGI	CACT <u>GCTCAGC</u> AGATCGTATACAGAAATGTG
5	(Fw) P121: Fw (kompatibel zu MscI TGGCCA)	<u>CCA</u> CAACC ATG GCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGC
6 7	Rv mit BsrGI-Site P122: Rv mit BstBI und BsrGI-	AATC <u>TGTACA</u> TTAAACTGATGATTTGATTTCAAATGCAGTCTCTG AATC <u>TGTACA</u> TTAAACTGATGATTTGAT <u>TTCGAA</u> TGCAGTCTCTGAATC
8	P123: Fw (mit BamHI Site)	CGAT <u>GGATCC</u> CGCCACC ATG GCTAGATTAGATAAAAGTAAAGT
9	P124: Fw (KRAB Ende mit BstBI + 2A-GFP Anfang	ATATTCGAAATCAAATCATCAGTTGGCTCCGGCGAGGGCCGCGGC
10	P125: Rv (Ende GFP mit EcoRI	TAT <u>GAATTC</u> TTACT <u>TGTACA</u> GCTCGTCCATGCC
11	P126: Fw (BsrGI GFP Ende - EFS	ATA <u>TGTACA</u> AGTAAATCGATTGGCTCCGGTGC
12	Antang) 127: RV (Ende EES mit Xbal Site)	TAT <u>TCTAGA</u> CGCGTCACGACACCTGTGT
13	128: Fw (Anfang tTR-KRAB mit XbaL Site)	CGAT <u>TCTAGA</u> CCGCCACCATGGCTAGATTAGATAAAAGTAAAGT
14	Rv mit BamHI	GTTAGACA <u>GGATCC</u> CCGGGTAC
15	p131 Fw (kompatibel zu MscI)	CCA CAACC ATGGGAGTGC AGGTGGAAAC
16	p132 Rv (in frame für GFP mit mscI (mscI dabei	CTTCCGGTTTTAGAAGCTCCACATC
17	p133 Fw (kompatibel zu	ACTT <u>GGATCC</u> CGCCACC ATG GGAGTGCAGGTGGAAAC
18	p134 Rv (kompatibel zu	AAGT <u>GGATCC</u> TCCGGTTTTAGAAGCTCCAC
19	BamHI) Puro FW mit E2A-	GAGC <u>TGTACA</u> AGGGCAGCGGCGAGGGCCGCGGCAGCCTGCTGACCTGCGGG
20	Sequenz Puro RVmit BsrGI und GEP ende	G ATGTCGAAGAAAATCCGGGTCCCACCGAGTACAAGCCCACCGTGCGGCTG TTACT <u>TGTACA</u> GGGCGCCAGGCTTCCGGGTCA
21	Zeo RV mit BsrGI	TTACT <u>TGTACA</u> GGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGT
22	Primer mTagBFP an IRES Halbe MSCI und IRES	<u>CCA</u> CAACC ATG AGCGAGCTGATTAAGGAGAA

23	p148 3' Zsgreen mutation primer w/o BsrGI	CGTC <u>CTTAAG</u> CAGCAGGTACATGCTCACGTCGC
24	p149 5' Zsgreen mutation primer w/o BsrGI	GCTG <u>CTTAAG</u> GACGGTG GCCGCTTGCG CTGCCAGTTC GACACCG TCTACA AGGCCAA GTCCGTGCCC CGCAAGATGC
25	p150 3' Reverse Primer End with BsrGI	TATA <u>GAATTC</u> TCACT <u>TGTACA</u> AGGCGGAGCCGGAGGCGA
40	SHIP1-1-FW BamH1	AGTC <u>GGATCC</u> ACCATG GTCCCCT GCTGGAAC
41	SHIP1-3570-RV BamH1	CACT <u>GGATCC</u> TCACTGCATGGCAGTCCTG
42	SHIP1-952-RV Sal1	CAGACTCAACGTCGACTTTGAGC
43	SHIP1-2259-FW XhoI	AGTTCCA <u>CTCGAG</u> CTGCTTG
	Primer von	
20	Kristoffer Rieken	
28	SFFV-U3-Ende	GAUCICACAACCCCICACIC
29	aus p73 cs413B IRES- rv Seq-Primer hinter polyC bis auf NotL Site	GGGGCGGAATTTACGTAGC
30	cs532 pLentiLox und LeGO	GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCA
31	Sequenzierung cs413-p16 Seq rv von der IRES aus	GGCCTTATTCCAAGCGGCTT
32	cs697 Fw on IRES-end	TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGT
33	p93 Rv Resistenzen an 2A klonieren (AgeI EcoRI) passt für alle	CGAAGTTATTAGGTCCCTCGACG
34	cs537 Rv Seq auf Lentis	TACCTAGTGGAACCGGAACC
35	p90 Fw auf wPRE	GGACGTCCTTCTGCTACGT
36	p91 Rv Lenti-LTR	GAGCTCCCAGGCTCAGA
37	p137	TATAGGATCCCGCCACCATGGCCCAGTCCAAGCAC
38	p14	GACGAGCTGTACAAGGCCAAG

4.9.2. Plasmide

4.9.2.1. Verwendete, bereits im Labor vorhandene Plasmide

Plasmidname:	Beschreibung:	Herkunft:
LeGO-iG2	Enthält eine "Multiple Klonierungs Stelle" (mulciple cloning site, MCS) auf die eine IRES mit GFP folgt.	Kristoffer Rieken

LeGO-G2A	Enthält EGFP an das eine T2A-Sequnez angeschlossen	Kristoffer Rieken
LeGO 1xT	Enthält dTomato.	Kristoffer Rieken
pBS-Ks-594LTR	Enthält 3-LTR der LeGO- Vektoren	Kristoffer Rieken
LeGO-IG2-Puro+	Enthält ein über eine T2A- Sequenz an das GFP angeschlossenes	Kristoffer Rieken
	Puromycinresistenzgen	
LeGO-IG2-Zeo	Enthält eine Fusion zwischen dem GFP- und dem	Kristoffer Rieken
LeGO-B2	Zeocinresistenzgen Enthält die Sequenz für	Kristoffer Rieken
	mTAG-BFP	
LeGO-Z2	Enthält die Sequenz für ZsGreen	Kristoffer Rieken
pLVUTH-shGATA1-tTR-	Enthält die Sequenz für das	Addgene Plasmid 11650
KRAB	tTR-KRAB-Protein, das TRE und den hUBC-Promotor	(Szulc et al. 2006)
pLVPT-tTR-KRP	Enthält die Sequenz für das tTR-KRAB-Protein und TRE	Addgene Plasmid 11642 (Szulc et al. 2006)
pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	Enthält die Sequenz für das rtTR-KRAB-Protein	Addgene Plasmid 11779 (Szulc et al. 2006)

4.9.2.2. Selbst klonierte Plasmide (der Übersicht wegen nicht unter Ergebnisse dargestellt)

pG2A-TRE

LeGO-Vektor, der die Sequenz des TRE in der 3'LTR enthält. Ausschneiden des TRE aus pLUVTH-shGATA1-tTR-KRAB über BamHI und EcoRI. Nach angeschlossenem Auffüllen der Überhänge wurde das TRE Fragment in das mit SnaBI aufgeschnittene Plasmid pBS-Ks-594LTR gesetzt. Anschließend wurde über KpnI und ScaI die das TRE enthaltende 3'LTR in das Plasmid pG2A eingesetzt.

pG2A-tTR/rtTR-KRAB (iLeGO-G2A)

Aus den Plasmiden pLUVTH-shGATA1-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 wurden über PCR mit den Primern 1-4 jeweils zwei Fragmente gewonnen. Durch mutierte Primer wurde die in beiden Proteinen enthaltende BsrGI-Schnittstelle entfernt. Vor beide Proteine wurde eine AgeI und an das Ende eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die überlappenden Sequenzen beider Fragmente enthielten jeweils eine BlpI-Schnittstelle. Nach Verdau mit BlpI und jeweils AgeI oder EcoRI wurden beide Fragmente über eine Drei-Fragment-Ligation in das mit EcoRI und AgeI aufgeschnittende Plasmid pG2A-TRE eingesetzt. Durch Aufschneiden des dabei entstandenen Plasmids mit EcoRI, nachfolgendes Auffüllen der Enden und Blunt-Ligation wurde die EcoRI-Schnittstelle entfernt.

piG2A-tTR/rtTR.KRAB (iLeGO-iG2A)

Das (r)tTR-KRAB und TRE enthaltende Fragment aus pG2A-(r)tTR-KRAB wurde über BsrGI und ScaI in das Plasmid pIG2 kloniert.

piG2A-dT-(r)tTR-KRAB (iLeGO-iG2A-dt)

Aus dem Plasmid LeGO 1xT wurde über BamHI und EcoRI die Sequenz für dTomato herausgeschnitten und in den Vektor piG2A-tTR-KRAB übertragen. Über AgeI und BlpI wurde die Sequenz des tTR-Proteins in pIG2A-dt-tTR durch das rtTR-Protein aus pIG2ArtTR-KRAB ausgetauscht.

piG2-(r)tTR-KRAB-Puro+

Über PCR mit den Primern 3 und 8 Gewinnung eines Fragments mit der Sequenz für (r)tTR-KRAB umrandet von einer BamHI- und EcoRI-Schnittstelle. Nach Verdau mit beiden Enzymen wurden die Fragmente jeweils in das mit EcoRI und BamHI aufgeschnittenePlasmid pIG2-Puro+ kloniert.

piG2-TRE

Die tTR-KRAB Sequenz wurde über PvuII und NotI durch die Originalsequenz aus dem Plasmid pIG2 ausgetauscht.

Plasmid IV pG2A-tTR-KRAB-EFS

Über die Enzyme NotI und BamHI wurde die Sequenz des Promotors des Spleen focus forming virus (SFFV) durch die des EFS-Promotors aus pEFS-G2 ausgetauscht.

Plasmid I GFP-IRES-KRAB

Das aus der PCR mit den Primern 5 und 6 auf pG2A-tTR tTR-KRAB enthaltende Fragment wurde an der neu eingebrachten BsrGI Schnittstelle aufgeschnitten und in das mit BsrGI und MscI aufgeschnittene Plasmidrückgrat von piG2-TRE einkloniert.

Plasmid II GFP-EFS-KRAB

Über PCR auf pEFS-G2 mit Primern 11 und 12 wurde ein Fragment mit der Sequenz des EFS-Promotors gewonnen, das an den Enden eine XbaI und eine BsrGI Schnittstelle enthält. Über Primer 3 und 13 wurde aus pG2A-tTR-KRAB ein die tTR-KRAB enthaltendes Fragment mit den Schnittstellen XbaI und EcoRI gewonnen. In einer Drei-Fragment-Ligation wurden beide PCR-Fragmente in das mit EcoRI und BsrGI aufgeschnittene Plasmid pG2A-TRE kloniert.

Plasmid III KRAB-2A-GFP

Über die Primer 7 und 17 wurde aus pG2A-tTR-KRAB ein tTR-KRAB enthaltendes Fragment mit den Schnittstellen BamHI und BstBI gewonnen. Zusammen mit einem Fragment über die Primer 9 und 10 aus pG/BSD+ (mit GDNF-E2A-Fragment), das ein GFP-Fragment mit vorne anhängender E2A-Sequenz und die Schnittstellen BstBI und EcoRI enthält, wurde eine Drei-Fragment-Ligation in das mit EcoRI und BamHI aufgeschnittene Plasmid pG2A-TRE durchgeführt.

pEFSiG2-tTR-KRAB/ phUBCiG2-tTR-KRAB

Über die Enzyme Scal und BamHI wurden Fragmente für den EFS-Promotor aus pEFSG2 und für den hUBC-Promotor aus pluVTH-shGATA1-tTR-KRAB gewonnen und in das mit gleichen Enzymen aufgeschnittene piG2-tTR-KRAB kloniert.

pEFSiG2-tTR-KRAB nLTR/ phUBCiG2-tTR-KRAB nLTR

Über KpnI und ScaI wurde die das TRE enthaltende 3'LTR aus pLVPT-tTR-KRAB in pEFSiG2-tTR-KRAB und phUBCiG2-tTR-KRAB kloniert.

piG2-tCD34-tTR-KRAB/pEFSiG2-tCD34-tTR-KRAB (nLTR)/ phUBCiG2-tCD34-tTR-KRAB (nLTR)

Die Sequenz für das tCD34 wurde aus dem Plasmid Pit-tCD34 GFP2 über NheI und PmlI in pIG2-tTR-KRAB und über EcoRI und PmlI in pEFSiG2-tTR-KRAB (nLTR) und phUBCiG2-tTR-KRAB (nLTR) kloniert.

piG2-tCD34-tTR-KRAB nTRE (TRE vor SFFV-Promotor)

Das TRE-Fragment wurde aus pLUVTH-shGATA1-tTR-KRAB über die Enzyme BamHI und EcoRI geschnitten, mit dem Klenow-Fragment wurden die Einzelstrangüberhänge aufgefüllt. Anschließend wurde dieses in den mit NotI und XbaI aufgeschnittenen und geblunteten pG2AtTR-KRAB kloniert. In einem zweiten Schritt wurde das neu eingesetzte TRE über ScaI und NheI in piG2-tTR-KRAB kloniert.

piG2-tCD34-tTR nSFFV (TRE im SFFV-Promotor)

Wieder wurde aus plUVTH-shGATA1-tTR-KRAB über BamHI und EcoRI und nachfolgendem Blunten ein TRE-Fragment gewonnen, das daraufhin in den mit SmaI aufgeschnittenen piG2tCD34-tTR-KRAB kloniert wurde.

piG2-tCD34-tTR-KRAB cTRE (TRE zwischen Promotor und tCD34)

Über plUVTH-shGATA1-tTR-KRAB wurde das TRE Fragment mit den Enzymen BamHI und EcoRI gewonnen. Anschließend wurde es in den mit gleichen Enzymen geschnittenen piG2tCD34-tTR-KRAB kloniert.

piG2-SHIP1-tTR-KRAB

Über BamHI wurde die SHIP1-Sequenz aus pIG2-SHIP1 gewonnen und in pIG2-tTR-KRAB über das genannte Enzym kloniert.

piG2-SHIP1-tTR-KRAB (iLeGO-iG2A-SHIP1)

Über PCR mit Primern 40, 41,42 43 wurden das Anfangs- und Endfragment des SHIP1-ORF ohne 5' und 3' UTR gewonnen, wobei aber ein mittlerer Teil von ca. 1300 bp fehlt. Das Anfangsfragment, das an den Schnittstellen BamHI und SalI geschnitten wurde, und das Endfragment, das an den Schnittstellen XhoI und BamHI geschnitten wurde, wurden in den mit BamHI aufgeschnittenen piG2-tTR-KRAB kloniert. In einem zweiten Schritt wurde das gewonnene Plasmid in drei unterschiedliche Fragmente geschnitten. Eines enthielt das Plasmidrückgrat von BamHI nach NheI, eines die Anfangssequenz von SHIP1 von NheI bis BspEI und das dritte die Endsequenz von SHIP1 von SbfI bis BamHI. In einer Vier-Fragment-Ligation wurden die drei Fragmente zusammen mit dem aus piG2-SHIP1-tTR-KRAB über BspEI und Sbf1 gewonnenen Mittelstück der SHIP1-Sequenz ligiert.

pDDG2A-tTR-KRAB (iLeGO-DDG2A)

Das die Sequenz für die "Destabilisation Domain" enthaltende Fragment wurde über PCR mit den Primern 17 und 18 aus pL106P-Luc-ENTR1A gewonnen. Über das Enzym BamHI wurde es in das Plasmid pG2A-tTR-KRAB kloniert.

piDDG2A-tTR-KRAB (iLeGO-iDDG2A)

Über die Primer 15 und 16 wurde ein die "Destabilisation Domain" enthaltendes PCR-Fragment gewonnen. Dieses wurde daraufhin in das mit MscI aufgeschnittene und dephosphorylierte Plasmid piG2-tTR-KRAB kloniert.
piDDG2A-dt-tTR-KRAB (iLeGO-iDDG2A-dt

Über NheI und EcoRI wurde das dTomato enthaltende Fragment aus piG2A-dt-tTR-KRAB in pIDDG2A-tTR-KRAB kloniert.

pIZ2

Über die Primer 23,24,25,37 wurden aus pZ2 zwei Fragmente des ZsGreen-Gens amplifiziert. Das eine enthielt 5' eine BamHI- und am Ende eine 3'-Schnittstelle, das zweite 5' eine AflII und 3' eine BamHI. So konnte durch PCR-Mutagenese die BsrGI-Schnittstelle im ZsGreen entfernt werden. In einer Drei-Fragment-Ligation in das ursprüngliche Grundgerüst wurde die Klonierung vollendet. Über eine weitere PCR wurde aus dem neuen Konstrukt die ZsGreen-Sequenz gewonnen, wobei eine halbe MscI-Schnittstelle mit kurzer IRES-Sequenz vorne und eine BsrGI vor dem Stoppkodon am Ende eingeführt wurde. Über einen Verdau mit BsrGI wurde das Fragment in den mit BsrGI und MscI aufgeschnittenen pIG2 transferiert.

piZ2A-tTR-KRAB (iLeGO-iZ2A)

Über MscI und BsrGI wurde die GFP-Sequenz in pIG2-tTR durch die von ZsGReen aus pIZ2 ausgetauscht.

piDDZ2A-tTR-KRAB (iLeGO-iDDZ2A)

In den mit MscI aufgeschnittenen und mit der FastAP dephosphorylierten piZ2A-tTR-KRAB wurde das über die Primer 15 und 16 aus pL106P-Luc-ENTR1A gewonnene Fragment mit der Sequenz für die "Destabilisation Domain" eingefügt.

piDDZ2A-tTR-KRAB-Puro+ (iLeGO-iDDZ2A-puro+)

Über PCR mit den Primern 19 und 20 wurde aus pIG2-Puro+ ein Fragment gewonnen, das vor der Sequenz für das Puromycin-Resistenzgen die Sequenz für die E2A-Sequenz enthielt und eine BsrGI-Schnittstelle vor dem Stoppkodon mit gleicher Sequenz, wie das ZsGreen, besaß. Über den Verdau mit BsrGI wurde das Fragment in das Plasmid piZ2A-tTR-KRAB kloniert.

piDDZ2A-tTR-KRAB-Zeo (iLeGO-iDDZ2A-Zeo)

Mit den Primern 21 und 38 wurde aus piG2-Zeo ein PCR-Fragment gewonnen, bei dem die BsrGI-Schnittstelle vor dem Stoppkodon liegt, mit gleicher Sequenz wie beim ZsGreen. Über den Verdau mit BsrGI wurde es in das Plasmid piZ2A-tTR-KRAB kloniert.

pIB2

Durch eine PCR mit den Primern 22 und 33 wurde vorne an die Sequenz des mTagBFP eine halbe MscI-Schnittstelle sowie das Endstück der IRES angefügt. Über Verdau mit MscI und BsrGI wurde es in den Vektor piG2 anstelle des EGFP kloniert.

piB2-p110aH1047R

Über NheI und PmlI wurde die Sequenz für die katalytische Untereinheit der mutierten PI3K aus dem Plasmid piG2-p110aH1047R in das Plasmid piB2 kloniert.

piDDZ2A-p110aH1047R-tTR-KRAB-Puro+ (iLeGO-iDDZ2A-H1047R-puro+)

Über NheI und PmlI wurde die Sequenz für die katalytische Untereinheit der mutierten PI3K aus dem Plasmid piG2-p110aH1047R in das Plasmid piDDZ2A-tTR-KRAB-Puro+ kloniert.

piDDZ2A-p110a-tTR-KRAB-Puro+ (iLeGO-iDDZ2A-p110a-puro+)

Über NheI und PmlI wurde die Sequenz für die katalytische Untereinheit der PI3K aus dem Plasmid pIG2-p110a in das Plasmid piDDZ2A-tTR-KRAB-Puro+ kloniert.

4.10. Geräte

Für die Datenerhebung waren folgender Geräte besonders wichtig:

- Durchflusszytometer: FACSCanto II Flow Cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg
- Durchflusszytometer mit Sortierfunktion: BD FACSAria Flow Cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg
- Mikroskop: Axiovert S 100, Carl Zeiss AG, Oberkochen
- DNA-Konzentrationsmessung: Nano-Drop-Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

5. Methoden

5.1. Molekularbiologische Methoden

5.1.1. Restriktionsverdau

Grundsätzlich wurde für den Restriktionsverdau mit den FastDigest-Enzymen folgendes

Protokoll verwendet. Die Inkubationszeit hing vom jeweiligen Enzym ab. Bei einigen Restriktionsverdauen wurde, um einen möglischst kompletten Verdau zu gewährleisten, die Inkubationszeit bis auf zwei Stunden verlängert.

Plasmid-DNA	0,4-3µg	
FD-Puffer	1,5µl	
FD-Enzym	0,5-1,5µl (max.3µl)	
H ₂ O	bis 15µl	
Inkubation 20min bei 37°C		

5.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Agarosegele wurde Agarose durch mehrmaliges Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Hauptsächlich wurden Gele mit einer Konzentration von 0,8% Agarose verwendet. In wenigen Fällen, falls besonders kleine Fragmenten erwartet wurden oder eine sehr kurze Laufdauer gewünscht war, wurde die Konzentration bis auf 1,5% erhöht oder auf 0,5% gesenkt. Die Agarose wurde durch mehrmaliges Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Kurz vor dem Gießen wurden 2µl Ethidiumbromid (10mg/ml) für 50ml Gel hinzugefügt.

Als Größenstandard wurde hauptsächlich der GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus verwendet. Die angelegte Spannung betrug bezogen auf die Länge des Gels 9V/cm.



Abbildung 10: Beispiel eines Agarose-Gels (als s/w invertierte Darstellung) mit Proben eines Restriktionsverdaus zur Kontrolle einer Klonierung. Alle Proben wurden mit den Enzymen XhoI und BsrGI verdaut. Es stellten sich zwei unterschiedliche Varianten an Ursprungs-DNA dar. Proben 1,2,5,6 und 7 zeigten gleich große Banden und ließen auf ein Plasmid, Proben 3, 4 und 8 auf ein anderes schließen. Anhand des DNA-Größenstandards (1kb DNA ladder plus) ließen sich die ungefähren Größen der einzelnen Banden ablesen. Dabei verhält sich der Logarithmus der Größe umgekehrt proportional zur zurückgelegten Wegstrecke auf dem Gel.

Anschließend wurden über einen UV-Transilluminator die durch das interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierenden DNA-Fragmente als "Banden" sichtbar gemacht und photographiert. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel für durch eine DNA-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennte DNA-Fragmente unter UV-Licht (schwarz/weiß-invertiert).

Für die weitere Bearbeitung der DNA wurden die gewünschten Fragmente unter sehr schwacher UV-Intensität, damit der durch UV-Licht bedingte Schaden der DNA möglichst gering ist, mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten und über das Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

5.1.3. Auffüllen von 5'DNA-Überhängen nach Restriktionsverdau

Um zwei Fragmente mit inkompatiblen 5'Überhängen miteinander zu ligieren, wurden die jeweils fehlenden Basen des komplementären Stranges enzymatisch aufgefüllt und beide Fragmente wurden "gebluntet". Dazu wurde das Klenow-Fragment, das größere der beiden Proteinfragmente der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli (E. coli)*, verwendet.

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Restriktionsenzyme je nach verwendetem Enzym durch adäquates Erhitzen inaktiviert. Anschließend wurden Klenow-Fragment, dNTP, Puffer und Wasser nach nebenstehendem Protokoll hinzugefügt und

für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach Firmenangaben von Fermentas hat das Klenow-Fragment in dem Fast-Digest-Puffer (FD-Puffer), der für den Restriktionsverdau (siehe Kapitel 5.1.1) verwendet wurde, 100% Aktivität, weshalb kein Pufferwechsel erfolgte. Für die direkte Weiterverwendung des Ansatzes wurde das Klenowfragment bei 75°C für 10 min inaktiviert.

5.1.4. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA ist entscheidend, wenn Klonierungen mit Fragmenten gemacht werden sollen, die entweder keinen Einzelstrangüberhang besitzen, sog. Blunt-Ends, oder durch kompatible Enden am 5'- und 3'-Ende Selbstligationen ermöglichen. Durch die Dephosphorylierung am 5`-Ende fehlt die nötige Aktivierungsenergie bei der Ligation. Zur Dephosphorylierung von DNA-Enden wurde die FastAP Themosensitive Alkaline Phosphatase verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Restriktionsverdaus vorgegangen, wobei 1µl H₂O durch die gleiche Menge FastAP ersetzt wurde. Dadurch erfolgte simultan zum Verdau auch die Dephosphorylierung der neu entstandenen DNA-Enden.

5.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Als Enzym für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von Fermentas verwendet. Sie stammt aus mit dem T4-Phagen infizierten *E.coli*-Bakterien. Es wurde grundsätzlich folgendes nebenstehendes Protokoll verwendet.

Ein zweites oder drittes Fragment wurde je nach Größe in ein- bis vierfacher molarer Menge zur linearisierten Vektor- oder Plasmid-DNA eingesetzt. Bei Vierfach-Ligationen wurde die Ligationsdauer bis auf 5 Stunden verlängert.

Linear-DNA	20-100ng		
Insert-DNA	4:1 (Molares Verhältnis zur Linear-		
DNA)			
10x T4-DNA-			
Ligase-Puffer	1µ1		
T4-DNA-Ligase	1u		
H_2O	bis 10µ1		
Inkubation für 10-120min bei 16°C			

5.1.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase-Chain-Reactio, PCR) dient zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten, wobei mindestens zwei, die gewünschte zu vervielfältigende Sequenz umschließende, ausreichend lange Sequenzen bekannt sein müssen, die für die Primerbindung geeignet sind. Einen schematischen Überblick über den Ablauf und die Funktionsweise einer PCR gibt Abbildung 11.

Template-DNA	50-100ng	Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Forward-Primer	1µM	Denaturierung	95°C	30 sec
Reverse-Primer	1µM	Annealing	Primer abhängig	30 sec
10x Pfu-Puffer	5µ1	Extension	2°C	2 min/kb
mit MgSO4		Finale Extension	72°C	10 min
Pfu-DNA-Polymerase2,5u				
10mM dNTP-MIX	5µ1			
H ₂ O	bis 50µl			

Zur Durchführung einer PCR wurde hauptsächlich die Pfu-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Für die Amplifikation besonders großer Fragmente, bei der die Wahrscheinlichkeit für Fehler weiter reduziert werden sollte, wurde die Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase verwendet, die 50fach genauer als die Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und 6mal genauer als die Pfu-DNA-Polymerase ist. Es wurde nach oben stehendem Protokoll vorgegangen. Wenn bei Verwendung des oben genannten Protokolls kein zufrieden stellendes Ergebnis erreicht wurde, wurden einzelne Parameter systematisch verändert, wie das Anpassen der Konzentrationen der einzelnen Reagenzpartner oder das Ändern der Temperaturen und Zeiten der Reaktionsschritte. Die Annealing-Temperatur wurde ca. 4°C unter die durch das Programm "pDRAW" (Acaclone Software, http://www.acaclone.com/) berechnete gesetzt. Die Proben wurden nach dem Durchlauf der PCR auf 4°C gekühlt und anschließend mit der Gelelektrophorese analysiert. Für die Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen.



Abbildung 11:Schematische Darstellung des Ablaufes und der Funktionsweise einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Ursprungs-DNA, die sog. Template-DNA wird im ersten Schritt bei 95°C denaturiert, wobei sich die komplementären DNA-Stränge voneinander trennen. Durch Senken der Temperatur auf die sog. Annealing-Temperatur, die abhängig vom verwendeten Primer ist, können die jeweiligen Primer an die einzelnen DNA-Stränge binden (Anlagerung, engl. Annealing). Durch Erhöhen der Temperatur auf 72°C kann die jeweilige, aus thermophilen Bakterien gewonnene DNA-Polymerase mit der Elongation der Primer beginnen. Dadurch hat man nun eine Kopie der 3' nach den Primern liegenden DNA-Bereichen. Die auf dieser Kopie aufbauenden Zyklen replizieren nun nur noch den durch die Primer eingeschlossennen DNA-Bereich ohne die 5' vor den Primern gelegenen DNA-Sequenzen. Durch Wiederholung des Zyklus, der aus Denaturierung, Annealing und Extension besteht, wird eine exponentielle Vervielfachung der durch die Primer eingeschlossenen DNA-Sequenz erreicht. Modifiziert nach <u>http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/186.htm</u>, (08.07.2013, 18:00).

Falls eine sehr gute Reinheit der PCR-Fragmente erreicht werden sollte (ohne Kontamination durch Ursprungs-DNA), wurde das Endgemisch komplett über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 5.1.2) aufgereinigt.

Falls dieses nicht erforderlich war und eine direkte, anschließende Verarbeitung im Sinne einer Dephosphorylierung oder eines Restriktionsverdaus gewünscht war, wurde das PCR-Purification-Kit von Qiagen zur Aufreinigung verwendet und das Reaktionsprodukt anschließend der gewünschten Weiterverarbeitung zugeführt.

5.1.7. Transformation in kompetente E.-coli-Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA, z.B. nach erfolgter Ligation, wurden chemisch kompetente *E.-coli*-Bakterien mit der Calciumchlorid-Methode transformiert. Nach Auftauen von bei -80°C gelagerten, chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien auf Eis, wurden der Bakteriensuspension ca. 100ng DNA in maximal 10µl Reaktionsgemisch hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis zur bakteriellen Aufnahme der DNA inkubiert. Darauf folgend wurde das Bakterien-DNA-Gemisch für 2 Minuten bei 42° (*,,heat shock*") zur Schließung der Membranporen erhitzt. Nach diesem Hitzeschock erfolgte eine Inkubation in LB-Medium ohne Antibiotikazusatz für 1 Stunde im Schüttler bei 37°C. Nach dieser Inkubation wurden 50-100µl der Suspension auf einer LB-Agarplatte mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und für 11-13 Stunden bei 37°C inkubiert.

5.1.8. Überprüfung der Bakterienklone und Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Einzelne Bakterienklone wurden nach der Bebrütung für 11-13 Stunden mit sterilen Pipettenspitzen einzeln von der Agar-Platte gepickt und in 2-4ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin für 11-13 Stunden im Schüttelinkubator weiter inkubiert. Über das Qiagen Plasmid-DNA Miniprep Kit erfolgte die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien. Mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese wurden die erhaltenen Plasmide in Hinblick auf Aufbau und Größe analysiert.

5.1.9. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Nano-Drop-Photometer. Nach Initialisierung mit 1μ l H₂O und Bestimmung der Extinktion des jeweiligen Puffers über Analyse von 1μ l dessen, wurde 1μ l des DNA-Gemisches aufgeladen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

5.1.10. Sequenzierung von DNA-Proben

Es wurden $0,75-1,5\mu$ g Plasmid-DNA in 15μ l H₂O und 30pmol des entsprechenden Primer in 15μ l H₂O an MFG-Eurofins zur Sequenzierung verschickt.

5.2. Zellbiologische Methoden

5.2.1. Handhabung der Zellen

Alle Zellen wurden grundsätzlich bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die einzelnen Zelllinien alle 48-72h im Verhältnis 1:10 – 1:4 geteilt und mit neuem Medium ausgesät. Suspensionszelllinien wurden nach Resuspension im alten Medium im gewünschten Verhältnis geteilt und mit neuem Medium versorgt. Adhärente Zellen wurden nach Waschen mit PBS mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche abgelöst. Die Trypsinierung wurde nach sichtbarer Ablösung der Zellen mit dem jeweiligen mit Serum versetzten Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis geteilt und in neuem Medium ausgesät.

Das Waschen der Zellen erfolgte nach Suspension der Zellen durch Zentrifugation über fünf Minuten bei 400xg, durch Entfernen des alten Überstandes und durch die anschließende Resuspension in PBS oder frischem Medium. Zum Auswaschen von Doxycyclin wurden die Zellen zwei- bis dreimal hintereinander mit PBS gewaschen, wobei der alte Überstand nach Zentrifugation und Abgießen noch mit einer Pipette abpippetiert wurde, um das restliche Doxycyclin so stark wie möglich zu verdünnen.

5.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese erst zu einem Pellet abzentrifugiert. Nach Resuspension in 1ml gekühltem FCS mit 10% DMSO und Überführung in ein spezielles Einfriergefäß ("Kryotube") wurden sie in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehälter bei -80°C langsam (mit einer Rate von ca. 1K pro Minute) abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das gewünschte Kryotube aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37° langsam aufgetaut. Sobald beinahe der gesamte Gefäßinhalt aufgetaut war, wurden die Zellen zur Verdünnung des DMSO tropfenweise in 5ml Medium pipettiert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation wurden die Zellen im gewünschten Medium resuspendiert und nach Bedarf ausgesät.

5.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (Gesamtfläche 0,025 mm², Tiefe 0,1 mm, 4 Großquadranten mit je 16 Kleinquadranten) verwendet. Nach Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau und ggf. Dilution der gut durchmischten Zellsuspension erfolgte die Zählung unter dem Mikroskop. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus der Anzahl der sich in allen vier Großquadranten befindlichen Zellen multipliziert mit 10⁴. Falls eine Dilution erfolgte, musste das Ergebnis mit dem Dilutionsfaktor multipliziert werden.

5.2.4. Herstellung lentiviraler, infektiöser Viruspartkel

Zur Produktion von lentiviralen Viruspartikeln wurden HEK293T-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll, bereitgestellt von Kristoffer Riecken (geb. Weber), auf <u>www.lentigo-vectors.de</u> (08.07.2013, 18:00Uhr), s. Anhang.

5.2.5. Titration

Die Titration des Virusüberstandes erfolgte auf HEK293T-Zellen oder jeder anderen gewünschten Zelle, die durch das pseudotypisierte Virus transduziert werden kann, nach dem Protokoll, bereitgestellt von Kristoffer Riecken, auf <u>www.lentigo-vectors.de</u> (08.07.2013, 18:00Uhr), siehe Anhang.



Abbildung 12: Beispiel für FACS-Bilder (siehe Kapitel 5.2.7) einer Titrationsreihe. *Titriert wurde auf 50000 NIH3T3-Zellen mit den angegebenen Volumina des zu testenden Virus-Überstandes. Zur Produktion des Virus wurde der Vektor piG2-HRASV verwendet. Am FACS wurden jeweils 20000 Zellen aufgenommen.*

5.2.6. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen Viruspartikeln

Die Transduktion von Zellen erfolgte analog der Titration. Nach Berechnung des Titers wurde anhand der gewünschten Anzahl an Viruspartikeln pro zu transduzierende Zelle (Multiplicity Of Infektion, MOI) die Menge an Überstand ausgerechnet. Je nach Versuch und gewünschter Menge an transduzierten Zellen wurden $5x10^4$ bis $1x10^6$ Zellen in 24-Lochplatten bis zu 10cm-Schalen im gewünschten Medium mit 8µg/ml Polybren ausgesät. Danach wurde eisgekühlter, frisch aufgetauter Virusüberstand in erforderlicher Menge hinzugegeben und die Platten anschließend für 1h bei 1000xg und 24°C (Raumtemperatur) zentrifugiert. Bei adhärenten Zellen wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt, um das Polybren zu verdünnen. Zu Suspensionszellen wurde durch Addition von Medium das Polybren zweifach verdünnt.

5.2.7. Analyse im Durchflusszytometer (FACS)

Die Zellen wurden grundsätzlich auf die gleiche Art und Weise für das FACS (engl. fluorescence activated cell sorting) vorbereitet. Dazu wurden adhärente Zellen trypsiniert und in Suspension genommen, Suspensionszellen nur im gewünschten Volumen resuspendiert. Durch Zentrifugieren und Resuspension in PBS wurden die Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet.



Abbildung 13 Beispielhafte Bilder einer FACS-Analyse. Analysiert wurden K562-Zellen, die nach Transduktion GFP exprimierten. Durch Auftragen des "Seitwärts-Streulicht" (engl. Side Scatters, SSC), das ein Indikator für die Granularität einer Zelle ist, gegen das "Vorwärts-Streulicht" (engl. Forward Scatter, FSC), als Maß für die Zellgröße, entstand ein Bild von dem Zustand und der Größe der Zellen (a). In weiteren Diagrammen kann man die Zellen je nach gewünschter Fluoreszenz analysieren. So erfolgte hier durch die Analyse im FITC-A-Kanal die Darstellung der Fluoreszenz von GFP in Abhängigkeit zum FSC (b).

Neben den Fluoreszenzprotein-exprimierenden Zellen wurden jeweils immer parallel kultivierte parentale Zellen analysiert, um die Hintergrundfluoreszenz und die korrekten Messfenster (engl. Gates) bestimmen zu können. Zur Analyse wurde das Programm BD FACSDIVA Software (Becton Dickinson, Heidelberg) gebraucht.

Zur Färbung mit Antikörpern oder 7AAD, die zur Darstellung apoptotischer Zellen dient, wurde die nach Herstellerangaben vorgegebene Menge der jeweiligen Substanz zu den in PBS suspendierten Zellen hinzugegeben und für 30-40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen. Mit parentalen Kontrollzellen erfolgte eine gleichartige Behandlung aus oben genannten Gründen. Zur Kompensation wurde die dem Programm eigene Funktion verwendet.

5.2.8. Zellsortierung am FACS

Die Vorbereitung der Proben erfolgte in gleicher Weise wie zur Analyse am FACS. Nur wurden nun sterile Röhrchen verwendet. Sortiert wurde über die Fluoreszenz der einzelnen Zellen. Dabei wurden die Analysefenster je nach Intention gesetzt: Bei Wunsch auf maximale Reinheit wurden die Analysefenster sehr eng auf die stark exprimierenden Zellen gesetzt, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit nicht exprimierenden Zellen reduziert wurde. Zur Darstellung der gesamten transduzierten Population wurde das Analysefenster sehr weit gefasst um eine repräsentative Verteilung aller jeweils transduzierten Zellen zu haben. Nach dem Sortieren wurde dem Medium Ciprofloxacin hinzugefügt und die Zellen wurden unter diesen antibiotischen Bedingungen für 7 Tage gehalten und vermehrt.

5.2.9. Selektion von Zellen durch Antibiotika

Die Selektion von Zellen über Antibiotika erfolgte über Zeocin und Puromycin. Die das jeweilige Resistenzgen exprimierenden Zellen erhielten durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums einen Selektionsvorteil. Dabei wurden je nach Anwendung und Zellen $0,5\mu$ g- 2μ g/ml Puromycin und 100μ g/ml Zeocin verwendet. Die Zellen wurden normalerweise über 7 Tage unter Selektionsbedingungen gehalten, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde und die Zellen je nach Dichte und Zellart geteilt wurden.

5.2.10. Berechnung des Induktionsfaktors

Wenn keine 100% transduzierten Kulturen zur Berechnung des Induktionsfaktors der jeweiligen Proteinregulationssysteme vorhanden waren, wurde zuerst die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) nur der transduzierten Zellen unter den einzelnen Induktionsbedingungen berechnet. Durch folgende Formel erfolgte ausgehend von der gesamten Population die Berechnung der MFI der Zellen, die im induzierten Zustand den Fluoreszenzmarker exprimieren. Die in der Formel bezeichneten Analysefenster entsprechen denen aus Abbildung 14.

MFI (korrigiert) = ((%P2(-DOX) / %P2(+DOX)) * MFI P2 (-DOX)+((%P2 (+DOX)-%P2(-DOX) / %P2(+DOX))*MFI (NotP2))



Abbildung 14 Beispiel für die Gates bei der Berechnung des Induktionsfaktors an HEK293T-Zellen. Über o.g. Formel wird die MFI der unter induzierten Bedingungen (+DOX) als positiv erkennbaren Zellen, die hier durch das P2-Gate markiert sind, im uninduzierten Zustand (-DOX) berechnet. Tranduziert wurden die Zellen mit dem Vektor pDDG2A-tTR-KRAB. Die FACS-Bilder repräsentieren 20000 analysierte Zellen.

Zur Bestimmung des maximalen Faktors wurde von der errechneten MFI, sowie der MFI im induzierten Zustand die Autofluoreszenz der untransduzierten Kontrollzellen abgezogen. Der Quotient aus MFI im induzierten Zustand geteilt durch die im uninduzierten Zustand ergab den Induktionsfaktor.

5.2.11. Photographieren unter dem Fluoreszenzmikroskop

Adhärente und Suspensionszellen wurden mindestens 24 Stunden vor dem Photographieren ausgesät. Dabei wurden alle zu vergleichenden Kulturen in gleicher Weise behandelt und mit gleicher Zellzahl ausgesät. Die Zellen wurden in 12- und 6-Lochplatten photographiert. Dieses erfolgte mit 4- und 10-facher Vergrößerung bei Phasenkontrast- und den gewünschten Fluoreszenzfiltern. Die Belichtungszeit variierte je nach Fluoreszenz der Zellen. Zu vergleichende Zellen wurden aber jeweils gleich behandelt.



Abbildung 15: Beispielphotos durch das Fluoreszenzmikroskop. Photographiert sind unter vierfacher Vergrößerung mit unterschiedlichen Filtern HEK293T-Zellen, die GFP und dTomato exprimieren.

6. Ergebnisse

6.1. Vektorkonstruktion

Das erste Ziel bestand in der Entwicklung eines auf dem LeGO-System aufbauenden Grundvektors, der für alle weiteren Versuche und Analysen benutzt werden konnte. Hierfür wurden in mehreren Schritten eine Vielfalt verschiedener Vektoren unterschiedlichen genetischen Aufbaus konstruiert, die anschließend auf Induzierbarkeit, Expressionsstärke, basale Aktivität im uninduzierten Zustand und Titer analysiert wurden. Die Plasmide und die Klonierungswege sind zur besseren Übersicht unter Kapitel 4.9.2.2 dargestellt. Dabei war es wichtig, die Grundstruktur der LeGO-Vektoren, die einfache Klonierungsstrategien, eine sehr gute Modulierbarkeit und leichte Handhabung ermöglicht, zu erhalten.

6.1.1. Konstruktion und Analyse eines Tetracyclin-regulierbaren bicistronischen Vektors

Der erste Schritt umfasste die Integration regulatorischer Elemente in die LeGO-Vektoren LeGO-IG2 und LeGO-G2A. Hierfür wurden fünf verschiedene bicistronische Vektoren konstruiert, die die DNA-Sequenz für den Marker GFP und das tTR-KRAB-Protein als transkiptionellen Repressor enthielten. Das Tetracyclin Response Element (TRE) als DNA-Erkennungssequenz für das tTR-KRAB-Protein wurde bei allen Vektoren an gleicher Stelle in den 3'LTR integriert. Mit dem Ziel einer effizienten Koexpression beider zu exprimierender Proteine wurden drei verschiedene, bei retroviralen Vektoren gebräuchliche Strategien verwendet (Felipe 2002), vergleiche Kapitel 3.1.5.

Abbildung 16 gibt zum besseren Verständnis einen Überblick über die verschiedenen Vektoren; die Klonierung der einzelnen Vektoren ist zum Zwecke der Übersichtlichkeit in Kapitel 4.9.2.2 beschrieben. Die Restriktionsschnittstellen, die die einfache Klonierung und Modulierbarkeit der LeGO-Vektoren ermöglichen, wurden bei allen Veränderungen erhalten. Auf Basis des LeGO-iG2 wurde Vektor I kloniert, wobei das tTR-KRAB an die Position des ursprünglichen GFP hinter und das GFP selbst vor die IRES gesetzt wurde. In Vektor II wurde die IRES durch den Promotor des humanen Elongationsfaktor 1a-(EFS) ersetzt, der für eine von dem Transgen bzw. Marker unabhängige Transkription des tTR-KRAB-Proteins sorgt. In den Vektoren III bis V wurden beide Proteine in unterschiedlicher Reihenfolge auf Basis des LeGO-G2A über eine 2A-Sequenz miteinander verbunden. Zudem wurde in Vektor IV der LeGO-typische SFFV-Promotor durch den EFS-Promotor ersetzt, um einen möglichen Einfluss des Promotors auf die Regulation und Expression zu analysieren.

Dabei lag die Konzentration bewusst auf dem TetOn-System, das über das tTR-KRAB-Fusionsprotein reguliert wird und bei Zugabe von Doxycyclin zu einer Induktion der Expression führt. Dieses System wird für einen großen Teil der möglichen Anwendungen bevorzugt (Pluta und Kacprzak 2009), da eine Doxycyclinzugabe nur dann nötig ist, wenn eine Expressionsinduktion gewünscht wird. Zudem können für das TetOff-System angesichts der sehr ähnlichen Struktur, Funktion und früheren Ergebnisse ähnliche Eigenschaften vermutet werden (Szulc et al. 2006).



Abbildung 16: Schematischer Überblick zur Entwicklung bicistronische induzierbarer LeGO-Vektoren. a) Grundstruktur eines bicistronischen, regulierbaren LeGO-Vektors. Eines der beiden Proteine stellt einen Marker, z.B. GFP, das andere den Tet-KRAB-Repressor tTR-KRAB da. TRE beschreibt das TRE-Element, das die DNA-Erkennungssequenz des Repressorproteins ist. (b) Überblick über die fünf verschiedenen, auf a) aufbauenden bicistronischen Vektoren. Alle enthalten neben dem TRE die Sequenz für die Proteine GFP und tTR-KRAB. Darstellung der Vektoren als integriertes Provirus. Abbildungen nicht maßstabsgetreu.

Zur Analyse der Funktionalität wurden HEK293T-Zellen mit den einzelnen Vektoren transduziert. Nach Induktion mit $1\mu g/ml$ Doxycyclin über drei Tage wurden über FACS die Transduktionsraten kontrolliert und nur Kulturen mit weniger als 30% GFP-positiven Zellen zur weiteren Analyse verwendet. Durch niedrige Transduktionsraten wurde versucht, die Anzahl mehrfach transduzierter Zellen zu reduzieren, um positive oder negative Interferenzen zwischen den einzelnen Integrationen zu reduzieren.

Bei einer Transduktionsrate von 20% liegt in beinahe 90% der transduzierten Zellen nur eine Kopie pro Zelle vor; bei 40 % Transduktionrate reduziert sich der Anteil auf beinahe 80%, wobei zudem der Anteil an Zellen mit Vielfachintegrationen steigt (Fehse et al. 2004).

An Tag drei nach Transduktion wurden alle Zellen zweifach mit PBS gewaschen und im Anschluss in zwei unterschiedliche Populationen geteilt. Eine wurde im uninduzierten Zustand mit 1‰ Ethanol als Kontrolle und die andere im induzierten Zustand mit 1µg/ml Doxycyclin gehalten. Nach 14 Tagen wurden alle Proben final auf ihre GFP-Expression im FACS analysiert. Dabei wurde das Gate, also das Analysefenster, zur Bestimmung der GFPpositiven Zellen anhand der untransduzierten Kontrollzellen gesetzt.



Abbildung 17: Repräsentative FACS-Bilder der bicistronischen, induzierbaren LeGO-Vektoren. *HEK293T-Zellen nach 14 tägiger Inkubation mit 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol. Nach Transduktion von HEK293T-Zellen und dreitägiger Inkubaion wurden die einzelnen Kulturen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend 14 Tage mit 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol inkubiert. Bei der anschließenden FACS-Analyse wurde das Gate zur Bestimmung der GFP-positiven Zellen anhand der uninfizierten Kontrollzellen gesetzt. Es wurden jeweils 20000 Ereignisse pro Probe aufgenommen.*

Vektor III zeigte weder in dem Anteil GFP-positiver Zellen noch in der MFI einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Induktionsbedingungen, weshalb er in der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt wurde.

Wie in Abbildung 18a) zu sehen ist, wies der Vektor in dem das GFP über eine IRES mit dem tTR-KRAB-Fusionsprotein verbunden ist, die stärkste Expression von GFP auf. Durch die hohe Aktivität im nicht-induzierten Zustand wurde aber im Vergleich zu den anderen Vektoren kein hoher Induktionsfaktor (siehe Abbildung 18b)) erreicht. In Vektor II, in dem eine vom GFP unabhängige Transkription des tTR-KRAB Regulators über den EFS-Promotor ermöglicht wird, wurde hingegen trotz deutlich niedriger maximaler Expression ein signifikant besseres Verhältnis der GFP-Expression zwischen beiden Induktionsbedingungen erreicht.

Dennoch war, wie Abbildung 18c) gezeigt, ein relativ hoher Anteil der Zellen GFP-positiv, obgleich die MFI und damit der GFP-Gehalt der einzelnen Zellen deutlich abgenommen hat, was an der Verschiebung der Population nach unten in den FACS-Bildern in Abbildung 17 zu erkennen ist. So zeigte sich zwischen Vektor I und II ein ähnlicher Induktionsfaktor in Bezug auf den Prozentsatz GFP-positiver Zellen, aber nicht im Vergleich der MFI zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand.



Abbildung 18: Vektor V zeigt den besten Induktionsfaktor an GFP-Expression zwischen induziertem und uninduziertem Zustand. Vergleich der MFI von GFP (a) und des Anteils an GFP pos. Zellen (c) der verschiedenen Vektoren mit und ohne Doxycyclin. Darstellung der Verhältnisse der MFI GFP (b) und des Anteils an GFP pos. Zellen (d) zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen mit drei Proben. Die Beschriftung der Vektoren entspricht der von Abbildung 16.

Die beiden Vektoren IV und V, in denen GFP über eine 2A-Sequenz mit tTR-KRAB verbunden ist, wiesen eine deutlich bessere Schaltbarkeit in Bezug auf GFP-positive Zellen und die MFI im Vergleich zu I und II auf. Vektor IV, angetrieben durch den EFS-Promotor, wies zwar eine signifikant bessere Induzierbarkeit bezogen auf die GFP-positiven Zellen als Vektor V mit dem SFFV-Promotor auf (siehe Abbildung 18d)), erreichte aber nur 17% der Expressionsstärke von Vektor V.

Durch den nur sehr geringen Unterschied der MFI im uninduzierten Zustand, resultierte die Induktion von Vektor V mit dem SFFV-Promotor in einem 3,9fach höheren Faktor (Abbildung 18b). Obwohl Vektor I 2,6fach höher im induzierten Zustand exprimiert als Vektor V, konnte durch die niedrige basale Aktivität von Vektor V (Abbildung 17) dieser einen 9,7fach höheren Induktionsfaktor erzeugen.

Aufgrund der starken Expression, der guten Schaltbarkeit und geringen basalen Aktivität wurde die Verbindung von Marker und tTR-KRAB-Repressor über eine 2A-Sequenz für die weiteren Versuche verwendet.

6.1.2. Konstruktion eines tricistronischen Tetracyclin-regulierbaren LeGO-Vektors

Das Ziel war einen induzierbaren Vektor zu konstruieren, der neben dem Transgen ein Markergen exprimieren kann. Durch diesen Aufbau sollte ermöglicht werden, nicht nur die Transduktionseffizienz abzuschätzen, sondern zusätzlich ein Bild von der Stärke der Transgenexpression und der Regulierbarkeit des Vektors in der jeweiligen Zelle zu bekommen. Auf Basis des LeGO-iG2 wurde an das hinter der IRES liegende GFP die 2AtTR-KRAB-Sequenz aus Vekor V kloniert. Durch die direkte Anbindung über die IRES sollte nun die GFP- und tTR-KRAB-Expression parallel zur Expression der vor der IRES liegenden kodierenden Sequenz gewährleistet werden. Durch die Beibehaltung der für die LeGO-Vektoren typischen Restriktionsschnittstellen sollten Klonierung und Modulierbarkeit sich nicht ändern. Die Wahl der IRES als Verbindung zwischen Transgen und Marker sollte mögliche posttranslationale Probleme durch die von der 2A-Sequenz angehängten Aminosäuren für das Transgen verhindern (Donnelly et al. 2001; Felipe 2002).

Es wurden insgesamt fünf auf diesem Grundprinzip aufbauende Vektoren kloniert, die in Abbildung 19 schematisch dargestellt sind. In zwei Vektoren wurde der SFFV-Promotor durch den humanen Ubiquitinpromotor (hUBC) ausgetauscht, sowie in zwei anderen Vektoren durch den EFS-Promotor. Zusätzlich wurde an Stelle unseres TRE enthaltenden 3'LTR der aus dem Plasmid pLVPT-tTR-KRAB (Szulc et al. 2006) stammende kloniert, um einen möglichen Einfluss der veränderten Position des TRE in der 3'LTR zu untersuchen. Als Transgen wurde die trunkierte Version des Oberflächenmarkers CD34 (tCD34) benutzt, welche sich sehr gut als Gentransfermarker eignet (Fehse et al. 2000).



Abbildung 19: Schematischer Überblick zur Entwicklung tricistronischer induzierbarer LeGO-Vektoren. a) Darstellung des allgemeinen strukturellen Aufbaus eines tricistronischen Tetracyclin-regulierbaren LeGO-Vektors. b) Fünf verschiedene auf a) aufbauende Vektoren zur Analyse von Expression und Schaltbarkeit des tricistronischen, Tet-regulierbaren LeGO-Vektors. nTRE: 3'LTR aus pLVPT-tTR-KRAB. Darstellung als integriertes Provirus, nicht maßstabsgetreu.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben behandelt. Es wurden wieder HEK293T Zellen mit den oben gezeigten Vektoren transduziert. Niedrig transduzierte Kulturen wurden nach dreitägiger Induktion ausgewählt und über 14 Tage unter 1µg/ml Doxycyclin und als Kontrolle mit 1‰ Ethanol gehalten. Anschließend wurde die GFP- und tCD34-Expression im Fluoreszenzzytometer gemessen.

Der den SFFV-Promotor enthaltende Vektor zeigt eine gegenüber allen anderen Konstrukten signifikant (p<0,05) höhere Expression von GFP wie in Abbildung 21a) zu sehen. Im Vergleich zu dem SFFV-Promotor führte der hUBC-Promotor zu einer ca. 1,4-fachen Reduktion der Expressionsstärke, der EFS-Promotor zu einer 4,1-fachen Reduktion. Die basale Aktivität im nicht-induzierten Zustand unterschied sich zwischen den Vektoren mit SFFV- und hUBC-Promotor nicht signifikant (p>0,05). Das Konstrukt, das über den EFS-Promotor transkribiert wurde, zeigte eine 1,9fach niedrigere basale Expression als das SFFV-Konstrukt. Aus diesen Ergebnissen resultierten in der Induktionsfaktorenanalyse in Abbildung 21b) ähnliche Faktorunterschiede wie bei der Expressionsstärke.



Abbildung 20: Repräsentative FACS-Bilder der tricistronischen, induzierbaren LeGO-Vektoren. *HEK293T-Zellen nach 14 tägiger Inkubation mit 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol. Die Analysefenster wurden anhand nicht transduzierter Kontrollzellen gesetzt. Es wurden jeweils 20000 Zellen aufgenommen. Nach Transduktion von HEK293T-Zellen und dreitägiger Inkubaion wurden die einzelnen Kulturen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend 14Tage mit 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol inkubiert. Bei der anschließenden FACS-Analyse wurde das Analysefenster zur Bestimmung der GFP- und tCD34-positiven Zellen anhand der uninfizierten Kontrollzellen gesetzt. tCD34 wurde mit Anti-CD34-APC-Antikörpern angefärbt.*

Die Veränderung der TRE-Position in der 3'LTR durch Übernahme der LTR aus dem Plasmid von Szulc et al. (2006) resultierte in keinem signifikanten (p<0,05) Unterschied der Expressionsstärke. Aber durch die höhere basale Aktivität im uninduzierten Zustand enstand bei dem Vektor mit hUBC-Promotor eine tendenzielle und bei dem Vektor mit EFS-Promotor eine signifikante (p<0,05) Reduktion des Induktionsfaktors.

In den FACS-Bildern aus Abbildung 20 und dem Diagramm in Abbildung 22 ist zu erkennen, dass eine beinahe lineare, also stöchiometrische Korrelation zwischen tCD34- und GFP-Expression über die IRES bestand, was in der Literatur bereits beschrieben wurde (Douin et al. 2004). Während bei den stark exprimierenden SFFV- und hUBC-Promotoren Verhältnisse von 1,17 bzw. 1,14 vorlagen, was für eine sehr vergleichbare Expression beider Marker spricht, ließen sich in den Zellen, die über den EFS-Promotor die Transgene exprimierten, 2,8fach weniger Zellen über GFP als über tCD34 identifizieren. (Abbildung 22).

Das FACS-Bild entsprach im induzierten Zustand desto mehr dem Bild einer Ursprungsgeraden, je stärker der Promotor war. Dieser Umstand zeigte sich im Falle des Vektors mit EFS-Promotor in einem höheren Anteil tCD34-positiver aber noch GFPnegativer Zellen an allen tCD34-positiven Zellen im Vergleich zum Vektor mit SFFV-Promotor.





Abbildung 21: Vergleichende Analyse der fünf tricistronischen induzierbaren LeGO-Vektoren in HEK293T-Zellen. Vergleich der MFI von GFP (a) und des Anteils an GFP-positiven Zellen (c) der verschiedenen Vektoren nach Inkubation mit und ohne Doxycyclin. Darstellung der Verhältnisse der MFI GFP (b) und des Anteils an GFP-positiver Zellen (d) zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.

Weiterhin zeigten die FACS-Bilder, dass unabhängig vom Promotor im uninduzierten Zustand, neben den nichtregulierbaren GFP und tCD34 exprimierenden Zellen, 1-2% nur tCD34 exprimierende vorhanden waren.

Wie ähnlich auch in Kapitel 6.4.4 gezeigt und genauer analysiert, ermöglichten diese tricistronischen Vektoren eine zu einer induzierbaren Transgenexpression simultane Markerexpression. Der Marker kann hierbei als Indikator für die Transduktionsrate, Expression und Induzierbarkeit der Transgenexpression dienen.

Der nun hergestellte LeGO-Vektor wurde mit dem Präfix "i" versehen, was diesen als induzierbaren LeGO-Vektor kennzeichnet. Der Vektor mit SFFV-Promotor, IRES und tCD34 erhielt nun den Namen iLeGO-iG-tCD34. Als Gruppenbezeichnung wurde der Name "LeGO-SWITCH"-Vekoren gewählt.



Abbildung 22 Verhältnis der über tCD34 und GFP als positiv erkennbaren HEK293T-Zellen bei Induktion.

6.1.3. Analyse der Rolle der Position des TRE im Vektor in Hinblick auf Induzierbarkeit und Expression

Als nächstes wurde der Einfluss der unterschiedlichen Position des TRE innerhalb des Vektors untersucht. Die über Heterochromatinbildung funktionierende *Silencer*-Aktivität des KRAB-Proteins ist in der Literatur für Promotoren in eukaryotischer DNA für einen Bereich von 2-3 kB beschrieben. Da das TRE selbst im Konstrukt ohne Transgen einen Abstand zum Transkriptionsstart von über 3400 Basen bezogen auf das 3' gelegene und über 2000 Basen bezogen auf das 5' gelegene TRE hat, wurde untersucht, ob eine dem Promotor näher gelegene Variante bessere Ergebnisse erzielen kann. Dazu wurden, aufbauend auf dem Vektor iLeGO-tCD34, insgesamt sieben verschiedene Vektoren, die das TRE an unterschiedlicher Stelle enthielten, kloniert. Das TRE wurde in diesen Vektoren entweder vor, in oder direkt hinter den Promotor kloniert. Abbildung 23a) gibt einen schematischen Überblick über vier Vektoren mit singulärem TRE. Die verschiedenen Konstrukte wurden der Einfachheit halber mit TRE 1-4 durchnummeriert. Drei weitere Vektoren enthielten zusätzlich zum TRE in Promotornähe noch das originale TRE in der 3'LTR.



Abbildung 23 Eine Veränderung der TRE-Position kann zu schlechterer Expression des Transgens und geringeren Induktionfaktoren führen. a) Schematischer Überblick über vier verschiedene, induzierbare LeGO-Vektoren mit TRE an unterschiedlicher Position im Vektor. Darstellung als integriertes Provirus, nicht maßstabsgetreu. b) Vergleich der MFI von GFP (b) und des Anteils an GFP pos. Zellen (c) der verschiedenen Vektoren mit und ohne Doxycyclin. Darstellung der Verhältnisse der MFI GFP (d) und des Anteils an GFP pos. Zellen (e) zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand. Analyse von mit den einzelnen Vektoren transduzierten HEK293T-Zellen nach 14 Tagen Inkubation mit $\mu g/ml$ Doxycyclin oder 1‰ Ethanol. Es wurden jeweils 20000 Zellen aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unterschiedlichen Kulturen.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Position des TRE auf die Expression von Transgen (nicht gezeigt) und Marker sowie die Induzierbarkeit des Vektors entscheidenden Einfluss hat. Wie in Abbildung 23b) zu sehen ist, führte die Integration des TRE zwischen Promotor und Transgen (TRE2) zu einer signifikanten Minderung der Expression und Induzierbarkeit des GFP im Vergleich zu dem Originalvektor (TRE1).

Trotz der Reduktion der Induzierbarkeit auf Ebene der MFI, zeigte sich eine tendenziell bessere Regulierbarkeit auf Ebene der durch GFP identifizierbaren Zellen.

Zwischen den Vektoren mit der TRE-Integration in der 3'LTR (TRE1) und jener unmittelbar 5' vor dem SFFV-Promotor (TRE3) waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, höchstens Tendenzen in Bezug auf Expression und Schaltbarkeit. Kleine Unterschiede in dem Anteil an GFP-positiven Zellen bei Analyse im nicht-induzierten Zustand sind aufgrund der strengen "Gatingstrategie", die an parentalen, nicht transduzierten Zellen gesetzt wurde, mit Vorsicht zu betrachten. Dieses begründet sich darin, dass sehr geringe Veränderungen der Zellfluoreszenz in den niedrigen Expressionsbereichen zu größeren Veränderungen in Prozentzahlen, aber nur zu geringen Änderungen der MFI führen. Zur Entscheidung über den weiter zu nutzenden Vektor wurde zwischen beiden Werten der Induzierbarkeit abgewogen, wobei der Schaltbarkeit auf Proteinebene ein höherer Stellenwert zugemessen wurde, da diese von der Gatingstrategie weniger abhängig ist. Zusätzlich zeigte TRE1 eine signifikant höhere GFP-Expression im induzierten Zustand als TRE3.

Das Konstrukt mit dem in den SFFV-Promotor integrierten TRE (TRE4) zeigte eine signifikant (p<0.05) niedrigere Expression von GFP und Induzierbarkeit der MFI von GFP gegenüber dem Vektor TRE 1.

Die Klonierung der zusätzlichen TRE-Positionen aus dem Vektor TRE1, sodass nach reverser Transkription drei TRE-Kopien vorlagen, resultierte in den in Abbildung 24 dargestellten Ergebnissen. Die Vektoren wiesen auch im Vergleich zu dem Vektor, der nur das TRE in der 3'LTR enthält (TRE1), das während der reversen Transkription vor den 5'LTR in nahe Umgebung zu dem Promotor platziert wird, Induzierbarkeit durch Doxycyclin auf. Aber der Vergleich zwischen Abbildung 23b) und c) zeigt, dass die Induktionsfaktoren der Vektoren mit zweifacher TRE-Integration nicht nur im Vergleich zu TRE1 mit einfacher Integration in den 3'LTR sondern auch zu den vergleichbaren Vektoren mit singulärem TRE an anderen Positionen niedriger waren. Nur TRE2, der ein TRE zwischen Promotor und Transgen besitzt, zeigte keine signifikanten (p>0,05) Unterschiede der Induktion zwischen einfacher Und zweifacher TRE-Integration. Zu erkennen im Vergleich von Abbildung 23b) und Abbildung 24a) ist zudem, dass der Vektor TRE3 mit doppelter TRE-Integration signifikant (p< 0,01) höher im induzierten Zustand GFP exprimiert als der Partnervektor mit einfacher Integration.





Abbildung 24: Mehrfache TRE-Integrationen in einem Vektor führen zu einer Erniedrigung der Induzierbarkeit und niedrigeren Titern. *a) Vergleich der MFI von GFP und des Verhältnisses der MFI-GFP zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand (b) der verschiedenen Vektoren mit zusätzlicher TRE-Integration im Vergleich zu dem original Vektor TRE 1. Die Beschriftungen entsprechen denen aus Abbildung 23. c) Vergleich der Titer der einzelnen Vektoren mit einfacher und doppelter TRE-Integration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus fühf unterschiedlichen Kulturen von HEK293T-Zellen.*

In Abbildung 24c) sind die durchschnittlichen Titer der einzelnen Vektoren in HEK293T-Zellen dargestellt. Alle drei Vektoren mit singulärem TRE wiesen signifikant (p<0,01) höhere Titer als die mit doppelter Integration auf. Während TRE2 und TRE4 Unterschiede um die Faktoren 6,8 bzw. 16,3 aufwiesen, führte die doppelte TRE-Integratin in TRE 3 zu einer über 200fachen Reduktion des Titers. Bis auf den Fall, dass das TRE zwischen Promotor und Transgen platziert wurde, wodurch eine 43,9fache Reduktion des Titers im Vergleich zum ursprünglichen Konstrukt TRE1 bewirkt wurde, resultierten keine signifikanten (p>0,05) Titerunterschiede zwischen den TRE-Variationen, die nur eine TRE-Integration aufwiesen.

Es wurde weiter mit Vektor TRE 1 gearbeitet, da er einen hohen Titer, starke Expression und Regulierbarkeit zeigte und keine signifikanten Verbesserungen durch eine Umpositionierung des TRE erreicht werden konnten.

6.2. Analyse der Induktionseigenschaften des induzierbaren LeGO-Vektors

6.2.1. Analyse der Kinetik der Induktion von LeGO-Switch-Vektoren

Zur Analyse der Zeitkinetik der Induktion der regulierbaren LeGO-Vektoren wurden die Vektoren iLeGO-G2A mit tTR-KRAB und rtTR-KRAB verwendet. Hier wurden sowohl das TetOn- als auch das TetOff-System verwendet und verglichen, um mögliche Unterschiede in deren Eigenschaften aufzuzeigen und so die Wahl des geeigneten Systems für die jeweils gewünschte Anwendung zu erleichtern.

Für die Analyse der Induktionskinetik der Transgenexpression wurden HEK293T-Zellen mit dem jeweiligen Vektor niedrig transduziert. Anschließend wurden die Kulturen positiv im induzierten und anschließend negativ im uninduzierten Zustand über GFP am FACS sortiert, um relativ reine Kulturen aus regulierbaren Zellen zu gewinnen. Diese wurden anschließend über mehr als zwei Wochen zum einen unter 1µg/ml Doxycyclin und zum anderen unter 1‰ Ethanol gehalten. Anschließend wurden die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen und unter den jeweils entgegengesetzten Induktionsbedingungen über zwei Wochen jeden Tag per FACS analysiert. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 25 zu sehen.

Im TetOn- sowie im TetOff-System war ein sehr schnelles Anschalten der Expression zu sehen. Nach drei Tagen waren bereits 79,2% bzw. 81,2% der transduzierten Zellen als GFP- positiv zu identifizieren.

In der Anschaltkinetik sah man in beiden Systemen einen deutlichen Unterschied zwischen den Zeitverläufen der GFP-Positivität und der anhand der MFI von GFP bestimmten Expressionshöhe in den Zellen. Im Gegensatz zu der sehr schnellen Induktion des Tet-Systems bzw. der sehr schnellen Identifikation GFP-positiver Zellen stand die länger dauernde Aufsättigung mit GFP bis zum Erreichen eines Sättigungszustands (Steady-State) über 10-14 Tage.



Abbildung 25: TetOn- und TetOff-System weisen ähnliche Kinetiken der Induktion auf. Analyse des TetOn- und TetOff-System im bicistronischen LeGO-Vektor auf die Änderung des Prozentanteils GFP-positiver Zellen in a) und c) und der MFI der GFP-Expression in b) und d) nach Wechsel der Induktionsbedingungen. Der Wechsel der Induktionsbedingungen geschah zwischen $1\mu g/ml$ Doxycyclin (+DOX) und 1‰ Ethanol (-DOX). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.

In der Abschaltkinetik sah man einen leicht entgegengesetzten Verlauf. Während hier ein sehr steiler Abfall in der MFI zu erkennen war, sah man im Vergleich einen langsameren Abfall der Kurve für den Anteil GFP-positiver Zellen. Durch die lange Halbwertszeit des GFP von über 24 Stunden (Lin et al. 2001) erreicht man erst nach 14 Tagen die maximal und minimal erreichbaren Werte. Im Vergleich der Systeme TetOn und TetOff untereinander fiel bei sehr ähnlicher Kinetik doch die signifikant (p<0,01) unterschiedliche Expressionsstärke in Abbildung 25b) und Abbildung 25d) auf. Im TetOn-System wurden im maximal induzierten Zustand fast doppelt so hohe MFI-Werte erreicht bei gleichem Anteil GFP-positiver Zellen.

Zudem fiel auf, dass das TetOff-System früher abschaltete, wenn man die Induktionsbedingungen veränderte, was an der Linksverschiebung der GFP-Prozentkurve im Vergleich zur Kurve des TetOn-Systems zu erkennen ist. Ein entgegengesetzter Effekt bei der Anschaltkinetik war in den GFP-Prozentkurven nicht festzustellen. Nur in den MFI-Kurven kann man bei gleicher Skalierung eine Linksverschiebung und deutlich höhere Expression des TetOn-Systems feststellen.

6.2.2. Analyse der Doxycyclin-Abhängigkeit des induzierbaren LeGO-Vektors

Um die Abhängigkeit der Expression der Vektoren von unterschiedlichen Doxycylin-Konzentrationen zu überprüfen, wurde eine Doxycyclin-Titration durchgeführt. Es wurden dieselben, mit den beiden verschiedenen induzierbaren Vektoren transduzierten HEK293T-Zellen genommen wie in der Kinetikanalyse. Die Zellen wurden, nachdem sie jeweils über zwei Wochen unter uninduzierten Bedingungen gehalten wurden, zweifach mit PBS-Puffer gewaschen und unter verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen wieder ausgesät. Es erfolgte eine Inkubation über 14 Tage und eine anschließende FACS-Analyse auf GFP (Abbildung 26).



Abbildung 26: Repräsentative FACS-Bilder von HEK293T-Zellen transduziert mit dem iLeGO-G2A mit TetOn-System unter unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen. Analyse nach 14tägiger Induktion mit den jeweiligen Doxycyclin-Konzentrationen.

In beiden Systemen zeigte sich ein sehr sensitives Verhalten auf Doxycyclinaddition und eine konzentrationsabhängige Expressionsstärke. Besonders sensitiv war das TetOn-System. Schon bei einer Doxycyclin-Konzentration von 10ng/µl waren 99% der exprimierenden Zellen über ihre GFP-Expression identifizierbar. Hingegen waren die mit dem TetOff-System versehenen Zellen erst bei einer Doxycyclin-Konzentration von 500ng/µl zu 95% nicht mehr von den untransduzierten Zellen unterscheidbar.

Dieser Zustand ist deutlich in Abbildung 27a) an der Verschiebung der Wendepunkte beider Kurven auf der X-Achse zu erkennen.

Der EC50-Wert (die Konzentration bei der 50% des Systems aktiviert ist) des TetOff-Systems liegt bei 13 ng/µl und damit gegenüber dem des TetOn-Systems mit 1 ng/µl 13fach höher. Die Einstellung von Konzentrationen zwischen 0,1-10 ng/µl für das TetOn- und 0,1-200 ng/µl für das TetOff-System ermöglichte eine Regulation der Expressionsstärke, wie in dem MFI Verlauf in Abbildung 27b) und den dazu gehörigen FACS-Bildern in Abbildung 26 gezeigt. Die FACS-Bilder zeigten, dass die Erhöhung der Doxycyclin-Konzentration zu einem simultanen Anstieg von GFP-positiven Zellen und der GFP-Expression führte. Bei den unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen wiesen die Zellen unterschiedlich hohe Expressionsstärken auf.

Dieser Sachverhalt wurde durch den direkten Vergleich der Kurve für den Anteil GFPpositiver Zellen und der MFI der mit dem TetOn-System transduzierten Zellen verdeutlicht. Wie im Diagramm in Abbildung 28 an der Rechtsverschiebung der Kurve der MFI gegenüber der des Anteils an GFP-positiven Zellen zu erkennen ist, war es möglich, obwohl beinahe alle GFP-exprimierenden Zellen schon als GFP-positiv erkennbar waren, deren Expression durch höhere Mengen an Doxycyclin noch zu steigern.



Abbildung 27: TetOn- wie TetOff-System sprechen bereits auf $0,1\mu g/ml$ Doxycyclin an. Darstellung der Abhängigkeit der Anzahl an GFP-positiven Zellen (a) und der MFI (b) von mit den jeweiligen Vektoren (LeGOiG2A mit tTR-KRAB oder rtTR-KRAB) transduzierten Zellen von unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.



Abbildung 28: Vergleich der Kurve GFP-positiver Zellen mit der der MFI von HEK293T-Zellen. Analyse nach Transduktion mit iLeGO-G2A bei unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen (siehe Abbildung 27).

6.2.3. Analyse der Reversibilität der Induktion des induzierbaren LeGO-Vektors

Um zu überprüfen, ob die von Doxycyclin abhängige Induktion der transduzierten Zellen auch reversibel ist, wurden dieselben HEK293T-Zellen wie in den Versuchen zur Zeitkinetik und Doxycyclin-Abhängigkeit eingesetzt und in 14-tägigem Rhythmus der jeweils gegensätzlichen Induktionsbedingung zugeführt. Es wurden entweder 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol verwendet.

Das TetOn- sowie das TetOff-System zeigten über insgesamt 24 Wochen einen stabilen Verlauf: In Abbildung 29a) und c) ist zu erkennen, dass die Zahl der GFP-positiven Zellen sich über die 168 Tage um 17,2% (TetOn) bzw. 10,3% (TetOff) reduzierte. Ein ähnlicher Rückgang an GFP-positiven Zellen ist nicht nur im induzierten, sondern auch im nicht-induzierten Zustand zu erkennen, wobei dieser, aufgrund des anfänglich höheren Anteils an nicht regulierbaren Zellen, beim TetOff-System leichter nachzuvollziehen ist. Äußerst stabil zeigt sich in Abbildung 29b) und d) die Höhe der GFP-Expression. Über den gesamten Zeitraum blieben die maximalen und minimalen MFI-Werte mit Schwankungen nach oben und unten bis 30% konstant. Die daraus resultierenden Induktionsfaktoren reduzierten sich über den gesamten Zeitraum nicht.



Abbildung 29:Über den Verlauf von zwölf Induktionszyklen à 14 Tagen zeigten die iLeGO-G2A mit TetOn- und TetOff- System stabile Induzierbarkeit. a) und c) stellen die Reversibilität bei Betrachtung der GFP-positiven Zellen und b) und d) bei Betrachtung der MFI GFP dar. Die roten und blauen Linien entsprechen parallel gehaltenen Kulturen, die unter entgegengesetzten Induktionsbedingungen in den Versuch übernommen wurden. Die Zellen wurden transduziert mit iLeGO-G2A (tTR und rtTR) und alle zwei Wochen (1 Zyklus) unter entgegengesetzten Induktionsbedingungen gehalten mit entweder 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol. Bei jedem Wechsel der Induktionsbedingungen erfolgte eine FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.

Dies zeigt sich auch in Abbildung 30. Hier wurde der Induktionsfaktor des TetOn-Systems zwischen der induzierten und nicht-induzierten Kultur pro Zyklus bestimmt. Da die transduzierten Zellen im uninduzierten Zustand häufig gleiche oder auch niedrigere MFI-Werte als die Kontrollzellen aufwiesen, wurde bei der Faktorberechnung darauf verzichtet die Autofluoreszenz von der MFI der einzelnen Kulturen abzuziehen. Dies führt natürlich zu einer deutlichen Unterschätzung des Induktionsfaktors.

In dieser Abbildung wird deutlich, dass der Induktionsfaktor über den langen Zeitraum und trotz des häufigen Umschaltens nicht abnimmt, sondern sogar ansteigt.



Abbildung 30: Über 12 Induktionszyklen kam es zu keiner Reduktion des Induktionsfaktors. Ein Zyklus entspricht 14 Tagen. Die Autofluoreszenz wurde zur besseren Vergleichbarkeit bei der Berechnung aufgrund der Gleichheit vieler Werte im uninduzierten Zustand mit denen der Kontrollzellen nicht abgezogen. Dadurch wird der tatsächliche Induktionsfaktor unterschätzt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwertes.

6.3. Überprüfung des Einflusses des (r)tTR-KRAB-Proteins auf Proliferation und Überleben der Zellen

Um zu überprüfen, ob das tTR- oder rtTR-KRAB-Protein positive oder negative Folgen auf das Zellwachstum und -überleben haben, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Hierfür wurden K562-Zellen mit LeGO-iG2-Puro+-Vektoren, die als Transgen das tTR-KRAB- und rtTR-KRAB-Protein enthielten, und piG2-Puro+ als Vektorkontrolle mit jeweils vergleichbaren Transduktionsraten transduziert. Anschließend wurden die Zellen am FACS auf GFP-positive Zellen hin sortiert.



Abbildung 31: Graphiken zum Versuchsaufbau der (r)tTR-KRAB-Toxizitätstestung. *a) Vereinfachter schematischer Überblick über den verwendeten LeGO-Vektor piG2-Puro+, in dessen "multipler Klonierungsstelle" (MCS) das tTR-KRAB bzw. rtTR-KRAB einkloniert wurden. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maßstabsgetreu. b) Ablauf der Zellvorbereitung für die Toxizitätsexperimente.*

6.3.1. GFP-Verlaufsbeobachtung transduzierter Zellen

In diesem Experiment wurden die Zellen über 91 Tage in Kultur gehalten und jede Woche am FACS im Hinblick auf die GFP-Expression analysiert. In Abbildung 32a) ist ein signifikant (p<001) höherer Unterschied im Verlust an GFP-positiven Zellen in den Kulturen, die das KRAB-Fusionsprotein exprimieren, im Vergleich zu den nur GFP-exprimierenden Zellen zu erkennen. Nach der Trendlinienberechnung wiesen die Kurven für die Zellen mit tTR-KRAB einen 5,8-fach und für die Zellen mit rtTR-KRAB einen 7,9-fach stärkeren Abfall als die mit der Vektorkontrolle transduzierten Zellen auf. Ein signifikanter (p>0,05) Unterschied zwischen den Kurven für tTR-KRAB und rtTR-KRAB war nicht festzustellen, allenfalls eine Tendenz für einen weniger starken Abfall der tTR-KRAB exprimierenden Zellen.

Um zu überprüfen, ob der Verlust an GFP-positiven Zellen durch vermehrten Zelltod der Zellen während der (r)tTR-KRAB-Expression erklärbar ist, wurde eine Färbung mit 7AAD durchgeführt.

Als Kontrollzellen wurden K562-Zellen nach Exposition mit 30% Ethanol analysiert, die zu 97% mit 7AAD angefärbt wurden. Bei der in Abbildung 32b) ausgewerteten Färbung konnte weder ein Unterschied zwischen den einzelnen transduzierten Kulturen noch zu den parallel gehaltenen parentalen Zellen festgestellt werden.



Abbildung 32 Die Prävalenz an GFP-positiven Zellen nimmt im Verlauf der Expression von (r)tTR-KRAB ab. a) Verlauf des Anteils an GFP-positiven Zellen der mit den Vektoren aus Abbildung 31a) transduzierten Kulturen. Die Zellen wurden, nachdem sie auf GFP-positive Zellen am FACS sortiert worden waren, ausgesät und über 91 Tage verlaufsbeobachtet. Dieses geschah durch wöchentliche FACS-Analysen. Die gestrichelten Linien entsprechen den berechneten Regressionsgeraden, deren Formeln links unten angegeben sind. b) 7AAD-Färbung der unterschiedlichen Kulturen. K562 + 30% Ethanol dienten als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

6.3.2. GFP-Verlaufsbeobachtung nach Puromycin-Selektion

Da nach der Zellsortierung am FACS immer noch 2-5% der Zellen aller Kulturen keine eindeutige GFP-Expression aufwiesen, konnte nicht exakt zwischen einer wachstumsinhibierenden bzw. einer möglichen toxischen Wirkung des Tet-KRAB-Fusionsproteins differenziert werden. Selbst in der Vektorkontrolle war ein Abfall GFP-exprimierender Zellen um 7,8% über die 91 Tage feststellbar. Ein direkter Vergleich war erschwert, da die Vektorkontrolle 1,3% (TetOn) bzw. 2,1% (TetOff) weniger nicht GFP-exprimierende Zellen enthielt.

Um reinere Kulturen zu erzeugen, wurde mit einem Teil der jeweiligen Kulturen eine Selektion über Puromycin ausgeführt. Dieses erfolgte durch eine Inkubation der Zellen mit $1\mu g/ml$ Puromycin über eine Woche, um die nicht-transduzierten, nicht die Puromycinresistenz exprimierenden Zellen zu entfernen. Anschließend wurde jede Kultur jeweils mit und ohne Puromycin ausgesät und deren Entwicklung über 10 Wochen beobachtet.



Abbildung 33: Nach Puromycin-Selektion erfolgte eine geringere Reduktion an GFP-positiven Zellen. Die Selektion erfolgte mit $1\mu g/ml$ über 7 Tage. Anschließend wurden die einzelnen Kulturen über 70 Tage ohne Puromycin kultiviert und alle 7 Tage am FACS analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die tTR-Kurve aus Abbildung 33 hier eingefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.

In Abbildung 33 fällt auf, dass die Kurve für den Anteil an GFP-positiven Zellen deutlich langsamer abfällt als nach der alleinigen Aufreinigung durch das Sortieren am FACS. In den mit dem Kontrollvektor transduzierten K562-Zellen war nur eine sehr geringe Abnahme der GFP exprimierenden Zellen um ca. 1% zu erkennen.

Der Anteil GFP-positiver Zellen in den Kulturen mit KRAB-Fusionsprotein reduzierte sich über 10 Wochen um ca. 10 %. Nach der Trendlinienberechnung verlief der Abfall an GFP-positiven Zellen durchschnittlich um den Faktor 17 bzw. 19 schneller, wenn die Zellen zusätzlich rtTR-KRAB bzw. tTR-KRAB exprimierten. Ein signifikanter (p>0,05) Unterschied zwischen den tTR-KRAB und rtTR-KRAB exprimierenden Kulturen konnte nicht gezeigt werden.

6.3.3. Analyse des Einflusses des Tet-KRAB-Proteins auf die Proliferationsgeschwindigkeit

Nach den beiden vorigen Experimenten blieb die Frage offen, ob die Expression des Repressor-Fusionsproteins einen direkten hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Zur Klärung dieser Frage wurde daher ein Proliferationsassay durchgeführt. Es wurden dieselben Zellen aus Kapitel 5.3.1 nach einmaliger Sortierung verwendet. Es wurden jeweils 10000 Zellen ausgesät und über 10 Tage jeden Tag mit der Neubauer Zählkammer gezählt.



Abbildung 34: Im Zellproliferationsassay kam es bei Expression der KRAB-Fusionsproteine zu einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit. Ausgesät wurden 10000 Zellen, nachdem sie über GFP am FACS sortiert worden waren. Die Zählung erfolgte über 10 Tage täglich in der Neubauer-Zählkammer. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Kulturen.

In dem in Abbildung 34 dargestellten Proliferationsassay ließ sich ein signifikanter Unterschied (p<0,05) in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den mit (r)tTR-KRAB transduzierten Vektoren und der Vektorkontrolle beobachten. Über den zehntägigen Analysezeitraum zeigte sich eine Zellzahldifferenz von ca. 15%. Wie in den vorigen Experimenten zum Einfluss der Tet-KRAB-Fusionsproteine auf die Zellpopulation zeigte sich auch im Proliferationsassay kein Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Repressor-Fusionsproteinen. Ebenfalls kein Unterschied konnte zwischen den parentalen Zellen und den mit der Vektorkontrolle transduzierten Zellen festgestellt werden.

6.4. Funktionserweiterung durch sekundäre Markerregulation

Wie in den Experimenten in Kapitel 5.1.2 gezeigt, ermöglichen die induzierbaren LeGO-Vektoren eine regulierbare Transgenexpression und eine dazu stöchiometrische Markerexpression.



Abbildung 35: Schematische Darstellung zweier induzierbare LeGO-Vektoren mit einem zusätzlich posttranslational regulierbaren Fluoreszenzmarker. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maßstabsgetreu.

Die Markerexpression bietet nicht nur die Möglichkeit, die Transduktionseffizienz und Expressionsstärke abzuschätzen, sondern ermöglicht auch ein Bild von der Induzierbarkeit des Vektorsystems in den jeweiligen Zellen zu bekommen. Dadurch wird erreicht, dass über Sortierung am FACS nicht nur die Zellen auf Marker- und damit Transgenexpression selektioniert werden können, sondern auch die nicht regulierbaren Zellen, die im uninduzierten Zustand noch Marker exprimieren, entfernt werden können. Aufgrund der langen Halbwertszeit von GFP von über 24 Stunden (Lin et al. 2001) werden bis zur Analyse der maximalen Schaltbarkeit bzw. bis zum kompletten Abfall der GFP-Menge nach Abschalten der Expression je nach maximaler GFP-Expression bis zu zwei Wochen benötigt
(vgl. Abbildung 25a). Zur Produktion besonders reiner, induzierbarer Kulturen, die im induzierten Zustand auf Marker-exprimierende Zellen und im uninduzierten Zustand auf nicht-exprimierende Zellen sortiert werden sollen, werden mit diesem Vektor aufgrund der beschriebenen Limitationen bis zu 14 Tage benötigt.

Mit dem Ziel, dieses Problem zu lösen, wurde das Proteotunersystem der Firma Clontech verwendet, um durch induzierbare Proteindestabilisierung eine zusätzliche posttranslationale Regulationsmöglichkeit zu erhalten. Für Fusionsproteine mit dieser Domäne sind Halbwertszeiten von weniger als 20 Minuten beschrieben (Banaszynski et al. 2006).

Zunächst wurde ein Fusionsgen aus dem Marker und der Destabilisierungsdomäne kloniert ohne die Modularität des LeGO-Vektors zu reduzieren (Abbildung 35). Die nun mit DD (Destabilisierungsdomäne) gekennzeichneten Vektoren wurden in HEK293T-Zellen auf ihre Eigenschaften getestet.

6.4.1. Analyse der Induzierbarkeit des regulierbaren LeGO-Vektors in Kombination mit induzierbarer Markerexpression

Um die Eigenschaften des kombinierten Vektors zu testen, wurden HEK293T-Zellen in drei Ansätzen mit einer MOI zwischen 0,05 und 0,1 transduziert, um wie in den Experimenten zur Vektorkonstruktion einfach transduzierte Zellen zu erhalten. Verwendet wurde der doppelt induzierbare, bicistronische LeGO-Vektor aus Abbildung 35b). Anschließend wurden beide Regulationssysteme mit Doxycyclin 1µg/ml und Shield1 500 nM induziert. Im induzierten Zustand wurden die Zellen auf GFP-positive Zellen am FACS sortiert. Dabei wurde das Analysefenster an den untransduzierten Zellen orientiert, wie in Abbildung 36 gezeigt, damit die sortierten Zellen ein möglichst vergleichbares Bild für alle GFP-positiven Zellen abgeben und keine Selektion auf besonders stark exprimierende Zellen erfolgt. Somit sollten mögliche Fehler durch die Berücksichtigung nur hoch exprimierender Zellen vermieden werden. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in allen vier verschiedenen Induktionsbedingungen (siehe Abbildung 36) gehalten. Am Tag 6 wurden die Zellen auf ihre GFP-Expression hin am FACS analysiert.

Durch die Analyse unter den vier verschiedenen Induktionsbedingungen ließ sich der jeweilige individuelle Effekt der einzelnen Induktionssysteme unabhängig voneinander sowie in Kombination untersuchen.

An den FACS-Bildern in Abbildung 36 ist sehr deutlich ein Effekt der Destabilisierungs-Domäne zu erkennen. Selbst im durch Doxycyclin induzierten Zustand war in Abwesenheit des stabilisierenden Moleküls Shield1 eine deutliche Fluoreszenzminderung der GFP-exprimierenden Zellen zu beobachten, auch wenn 68,7% der GFP exprimierenden Zellen weiterhin als GFP-positiv identifizierbar waren. Dieser Effekt der Destabilisierungs-Domäne war auch dann zu erkennen, wenn keine Induktion über das tTR-KRAB-System (bzw. Doxycyclin) erfolgte. Die Zellen, die sich nicht über Doxycyclin regulieren ließen, zeigten nach Destabilisierung bzw. Entfernen von Shield1 eine Reduktion der Fluoreszenz, sodass anstelle von 1,5% nur noch 0,6% GFP exprimierende Zellen identifizierbar waren und fast gar keine mehr mit hoher Expression.



Abbildung 36: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Induzierbarkeit des über die Destabilisierungs-Domäne (DD) und das tTR-KRAB-System regulierbaren LeGO-Vectoren. a) HEK293T-Zellen wurden mit einer MOI unter 0,1 transduziert. Verwendet wurde der in Abbildung 35a) gezeigte, bicistronische LeGO-Vektoren. Die Sortierung am FACS erfolgte nach Inkubation mit 1µg/ml Doxycyclin und 500nM Shield1. b) Repräsentative FACS-Bilder der sortierten Kulturen nach 6 Tagen Inkubation unter den dargestellten Induktionsbedingungen (1µg/ml Doxycyclin, 500nM Shield1). Die geschweiften Klammern sollen von maximaler Induktion aus betrachtet den jeweiligen Effekt der genannten Systeme darstellen. tTR-KRAB verweist auf die transkriptionelle Regulation über das Tet-System, DD auf die posttranslationale über die Destabilisierungs-Domäne.

Durch die alleinige Regulation auf posttranslationaler Ebene (Proteindestabilisierung über Shield1) konnte im induzierten Zustand eine Reduktion der MFI um den Faktor 28 erreicht werden. Obwohl auch in Abwesenheit von Shield 1 noch ca. 70% der ursprünglich GFP-positiven Zellen anhand dieses Markerproteins im FACS identifizierbar waren, wiesen diese eine deutlich niedrigere GFP-Menge auf (Abbildung 36). Das tTR-KRAB-System führte zu einer Reduktion der GFP-positiven Zellen um mehr als 98%, unabhängig von der Präsenz des Shield1. In Anwesenheit von Shield1 wiesen die verbliebenen 1,5% GFP-positiven Zellen allerdings eine relativ hohe Expression auf (vergleichbar mit den doppelt induzierten Zellen). Durch die Kombination der transkriptionalen Regulation des tTR-KRAB und der posttranslationalen der Destabilisierungs-Domäne konnte die beste Regulation erreicht werden. Wie im FACS-Bild in Abbildung 36 zu sehen, waren nur sehr wenige Zellen als GFP-positiv identifizierbar und wiesen eine im Vergleich zu der doppelt induzierten Population verminderte Expression auf.

6.4.2. Analyse einer posttranslationalen induzierbaren Markerexpression in einem tricistronischen, über Doxycyclin transkriptionell regulierbaren LeGO-Vektor

Mit dem Vektor iLeGO-iG2-dT (vgl. Abbildung 35b) sollte überprüft werden, ob eine von der transkriptionalen Regulation des tTR-KRAB unabhängige Regulation des Markers funktioniert und Vorteile mit sich führt.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit dem tricistronischen Vektor aus Abbildung 35b) transduziert. Die Zellen wurden nach zwei Wochen Inkubation in den in Abbildung 37 gezeigten, vier unterschiedlichen Induktionsbedingungen am FACS analysiert. Dabei wurde aber das Shield1 erst 24 Stunden vor der Analyse hinzugefügt.

Das dTomato wurde in diesem Vektor nur über das tTR-KRAB auf transkriptioneller Ebene reguliert, während die Stabilität des GFP zusätzlich über das Destabilisierungs-Domäne auf posttranslationaler Ebene kontrolliert werden konnte.

In den FACS-Bildern aus Abbildung 37 zeigte sich eine von der MFI des dTomato unabhängige Regulation der MFI des GFP bei Addition oder Entfernen von Shield1.

Ähnlich wie in Abbildung 20 zeigte auch das DD-GFP-Fusionsprotein eine zu dem dTomato proportionale Expression, die ein Identifizieren der dTomato exprimierenden Zellen ermöglichte. Ohne Shield1 ließ sich auch weiterhin ein großer Teil der dTomato-positiven Zellen noch über GFP identifizieren, doch wiesen diese im Vergleich zu den Zellen, die mit Shield1 inkubiert wurden, eine deutlich reduzierte MFI auf (siehe Kapitel 6.4.4).



Abbildung 37: Repräsentative FACS-Bilder von mit dem angezeigten, doppelt induzierbaren Vektor transduzierten HEK293T-Zellen. Analyse nach 14 Tagen Inkubation in den unterschiedlichen Induktionsbedingungen. Shield1 wurde jeweils erst 24 Stunden vor Analyse hinzugefügt. Es wurden jeweils 20000 Zellen aufgenommen. DOX: 1µg/ml Doxycyclin, Shield1: 500nM Shield1.

6.4.3. Analyse der Zeitkinetik der Expression des destabilisierten Markers

Mit dem Ziel der Analyse der Kinetik der Nachweisbarkeit des destabilisierten GFP im FACS wurden K562-Zellen mit dem in Abbildung 38 gezeigten Vektor transduziert. Nach Inkubation mit 1µg Doxycyclin und 500 nM Shield 1 erfolgte ein zweifaches Waschen mit PBS-Puffer und eine anschließende Aussaat ohne Doxycyclin und Shield1. Zu den in Abbildung 38 gezeigten Zeitpunkten erfolgten FACS-Analysen zur Verlaufsbeobachtung. Das dTomato spiegelte in diesem Fall die alleinige Regulation durch das tTR-KRAB-System wieder, das mit der Destabilisierungs-Domäne fusionierte GFP die zusätzliche posttranslationale Regulation. Schon nach 24 Stunden konnte der komplette Effekt der Regulation über die Fluoreszenz des GFP abgelesen werden (Abbildung 38). Erst nach der 10-fachen Zeit war auch für das nicht destabilisierte dTomato der maximale Effekt zu sehen.



Abbildung 38: Die Destabilisierungsdomäne ermöglicht eine Depletion an Markerprotein innerhalb von 24 Stunden. Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Expression von GFP und dTomato im Zeitverlauf. Die Daten wurden durch FACS-Analyse von K562-Zellen, die mit dem oben gezeigten Vektor transduziert wurden, nach Entfernung von Doxycyclin und Shield1 an Stunde 0 erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

6.4.4. Optimierung der Herstellung reiner, induzierbarer Kulturen durch Verwendung eines induzierbaren Markers.

Eine Methode zur Herstellung besonders reiner Kulturen besteht darin, die mit den induzierbaren LeGO-Vektoren transduzierten Zellen zweimal, sequentiell am FACS zu sortieren: Nach einer Sortierung auf die Marker-exprimierenden Zellen im induzierten Zustand folgt eine zweite ohne Induktion. Hierbei werden die nicht Marker-exprimierenden Zellen ausgewählt, da solche Zellen, die immer noch den Marker exprimieren, keine komplette Regulation aufweisen. Aufgrund der in der Einleitung zu Kapitel 6.4 dargestellten Probleme wurde in diesem Experiment getestet, in welchem Umfang ein induzierbarer Marker diese Prozedur erleichtern und beschleunigen kann. Die Idee bestand darin, durch die Destabilisierung des GFP und die damit verbundene Reduktion der Halbwertszeit die Schaltbarkeit des tTR-KRAB-Systems schneller analysierbar zu machen.

Die Notwendigkeit dieses Ansatzes ergibt sich aus den in Abbildung 38 dargestellten Ergebnissen, nach denen infolge der langen Halbwertzeit der Fluoreszenzproteine ein vollständiger Induktionszyklus 10-14 Tage dauert (siehe Kapitel 6.2.1).

Es wurden HEK293T-Zellen mit den in Abbildung 39 genannten Vektoren mit einer MOI von 0,1 transduziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium ohne Induktoren für zwei Tage kultiviert.

Es erfolgte die Zugabe von 500 nM Shield1 und 24 Stunden später eine Sortierung am FACS auf die GFP-negativen Zellen. Da sich die Zellen je nach transduziertem Vektor unterschiedlich in Hinblick auf die Induktionskinetik verhielten und dieser Unterschied in diesem Versuch auf das Gesamtergebnis hin untersucht werden sollte, wurde für beide die gleiche Bedingung gesetzt: In dieser Sortierung wurden die 10% der Zellen, die am stärksten GFP exprimieren, entfernt (siehe Abbildung 40). Diese Entscheidung beruhte auf der Tatsache, dass in den vorherigen Experimenten bisher maximal 1-2% der Zellen nicht regulierbar waren. Nach der Sortierung wurde 1 μ g/ml Doxycyclin dem Medium hinzugefügt. Nach zweitägiger Inkubation erfolgte erneut die Zugabe von 500 nM Shield1 und 24 Stunden später eine Sortierung auf GFP-positive Zellen.



Abbildung 39: Schema zum Versuchsaufbau zur Optimierung der Herstellung besonders reiner, induzierbarer Kulturen. Verwendet wurden jeweils die tricistronischen, induzierbaren LeGO-Vektoren, die dTomato als Transgen und GFP als Marker exprimieren. In dem Vektor iLeGO-iDDG2A-dt ist das GFP posttranslational noch zusätzlich durch die Destabilisierungs-Domäne (DD) über Shield1 regulierbar.

Nun wurden die Zellen in zwei Populationen geteilt, die entweder mit 1µg/ml DOX oder 1‰ Ethanol für 14 Tage inkubiert wurden. Abbildung 40 bestätigt die Zeitkinetik in Abbildung 38. Durch Destabilisierung während der Aufhebung der Induktion des tTR-KRAB-Systems und anschließender 24-stündiger Stabilisierung des GFP ließ sich innerhalb der vier Tage eine gute Trennung zwischen regulierbaren und nicht regulierbaren Zellen zeigen. Die Zellen, die das unveränderte GFP exprimieren, zeigten hingegen noch eine deutlich höhere MFI ohne genaue Trennung der Populationen, obwohl sich auch Zellen mit besonders hoher MFI identifizieren ließen.



Abbildung 40: Repräsentative FACS-Bilder für die Gatingstrategie bei der Sortierung auf die negativen, in diesem Fall regulierbaren Zellen. DDGFP bezeichnet den tricistronischen Vector, der das durch die Destabilisierungs-Domäne regulierbare GFP enthält, im Vergleich zu dem, der das unveränderte GFP exprimiert. Sortiert wurden die in Gate P5 liegenden Zellen. Das Gate wurde so gesetzt, dass es die 90% der Zellen einschließt, die die geringste MFI aufweisen.



Abbildung 41: Durch die Verwendung eines destabilisierbaren Markers können innerhalb kurzer Zeiträume deutlich höhere Induktionsfaktoren erreicht werden. a) Darstellung der dTomato-Expression im induzierten und nicht-induzierten Zustand nach zweimaliger Sortierung. Vergleich zwischen mit den dTomato-kodierenden, tricistronischen induzierbaren LeGO-Vekoren transduzierten Zellen, die entweder das DDGFP-Fusionsprotein oder das unveränderte GFP als Marker enthielten. b) Darstellung des Faktors zwischen der MFI des dTomato der induzierten und nicht-induzierten Zellen. Zur exakten Faktorberechnung wurde von der MFI im induzierten und uninduzierten Zustand die MFI der parallel gehaltenen Parentalzellen abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Nach den zwei beschriebenen Sortierungen und 14-tägiger Inkubation erfolgte eine Analyse am FACS.

Als vergleichbarer Parameter zur Bestimmung der Effizienz wurde der Induktionsfaktor von dTomato gewählt. Die Expression und Regulation dieses Markers erfolgte in beiden Vektoren auf gleiche Weise, über den gleichen Promotor und das tTR-KRAB-System. Die Auswertung dieser Daten ist in Abbildung 41 gezeigt. Der Vergleich der maximalen dTomato-Expression im induzierten Zustand, also unter Zugabe von Doxycyclin, zeigte, wie in Abbuldung 41a zu sehen, eine niedrigere Expression der HEK293T-Zellen, die mit dem Vektor mit DDGFP transduziert worden sind. Im uninduzierten Zustand, ohne Doxycyclin, wies die MFI von dTomato in dem mit DDGFP gekennzeichneten Vektor einen 16-fach niedrigeren Wert auf. Der Induktionsfaktor der einzelnen Vektoren in HEK293T-Zellen, der den Quotienten aus der MFI im induzierten zu der MFI im uninduzierten Zustand darstellt, wird in Abbildung 41b gezeigt. Durch die Verwendung des destabilisierbaren Markers ließ sich ein 15,9-fach höherer Induktionsfaktor innerhalb dieser acht Tage erzeugen. Der Vektor mit dem unveränderten Marker ließ sich nach zweimaliger Sortierung um den Faktor 101 induzieren. Durch die Verwendung eines induzierbaren Markers ließ sich hingegen nur über Regulation durch das tTR-KRAB-System innerhalb des kurzen Zeitraums eine Induktion um den Faktor 1604 erreichen. Somit kann die Verwendung eines destabilisierten Markers die Herstellung besonders gut induzierbarer Kulturen deutlich beschleunigen.

6.5. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Expression und Induzierbarkeit der regulierbaren, tricistronischen LeGO-Vektoren

Eine Identifikation transduzierter Zellen über das Fluoreszenzmikroskop erlaubt eine schnelle und einfache Beurteilung von Transduktion, Expression und Regulierbarkeit. Besonders für die Darstellung transduzierter Zellen *in situ* (im Gewebe) kann eine mikroskopische Darstellung sehr hilfreich sein. Die im Experiment aus Kapitel 6.4.4 aufgereinigten HEK293T-Zellen, die mit dem Vektor iLeGO-iDDG2A-dt transduziert worden waren, der das destabilisierbare GFP aufweist, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation über 14 Tage in den jeweils dargestellten Induktionsbedingungen photographiert. Das Shield1 wurde jeweils 24 Stunden vor dem Mikroskopieren den Zellen zugeführt. In Abbildung 42 sind repräsentative Photos dargestellt. Sowohl über dTomato als auch über GFP ließen sich die transduzierten Zellen unter dem Mikroskop darstellen. Ohne Doxycyclin, also im uninduzierten Zustand, zeigten sich in einer Aufnahme keine dTomato-exprimierenden Zellen, in einer zweiten Aufnahme nur zwei dTomato-exprimierende Zellen (s. Pfeilmarkierung), die sich, bei Stabilisierung des GFP mit Shield1, auch mit dem FITC-Filter darstellen ließen.



Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopie von HEK293T-Zellen, die nach Transduktion mit dem Vektor iLeGO-iDDG2A-dt transduziert und, wie in Abbildung 39 dargestellt, aufgereinigt wurden. PH bezeichnet die Phasenkontrastaufnahme. FITC entspricht dem Filter zur Darstellung von GFP, PE für dTomato. Die Aufnahmen wurden bei vierfacher Vergrößerung gemacht.

6.6. Analyse des induzierbaren LeGO-Vektors in verschiedenen Zelllinien

Zur Überprüfung, ob die bisher gezeigten Funktionen in verschiedenen Zelllinien vergleichbar sind oder sich grundlegend unterscheiden, wurden drei verschiedene Zelllinien mit einem tricistronischen induzierbaren LeGO-Vektor transduziert. Verwendet wurde erneut der Vektor iLeGO-iDDG2A-dt, da in diesem nicht nur eine simultane transkriptionelle Regulation von Transgen und Marker erfolgt, sondern zudem eine posttranslationale Beeinflussung der Markerproteinmenge durch induzierbare Destabilisierung ermöglicht wird. Diese induzierbare Markerexpression hatte sich in der Herstellung reiner induzierbarer Zellkulturen im Experiment aus Kapitel 6.4.4 bereits als vorteilhaft herausgestellt.

Es wurden HEK293T-, NIH3T3- und K562-Zellen ausgesät. Diese wurden jeweils mit einer MOI von 0,1, 0,5, 1, 10 und 20 transduziert. Am Tag nach der Transduktion wurden alle Zellen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend parallel in 1µg/ml Doxycyclin bzw. 1‰ Ethanol gehalten. Um sicher zu stellen, dass selbst das dTomato mit seiner langen Halbwertszeit (siehe Abbildung 38) vollständig abgebaut war, wurden die Zellen erst drei Wochen nach Induktion am FACS analysiert. Nach der Analyse wurden den induzierten Zellen 500 nM Shield1 zur Stabilisierung des GFP hinzugefügt. Zwei Tage später wurden alle Zellen unter gleichen Bedingungen am FACS noch einmal gemessen.

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass der induzierbare LeGO-Vektor in verschiedenen Zelllinien sehr gut funktionierte. In unterschiedlichen Zelllinien wie humanen embryonalen Nierenzellen, Maus-Fibroblasten und humanen Leukämiezellen zeigte der Vektor zwar unterschiedliche Expressionsstärken, aber jeweils eine sehr gute Regulierbarkeit. HEK293T-Zellen wiesen die höchste Expression von dTomato und GFP auf. NIH3T3-Zellen exprimierten dTomato um den Faktor 1,7 niedriger als die HEK293T-Zellen aber noch 1,2-fach höher als K562-Zellen. In allen Zellen erfolgte eine simultane Expression von GFP. Dieses führte ohne Stabilisierung mit Shield1 zu einer niedrigen MFI, die durch Zugabe von Shield1 deutlich gesteigert werden konnte. Der Mittelwert aller drei Zelllinien aus dem Quotienten zwischen der MFI des GFP vor und nach Zugabe von Shield1 ergab einen Induktionsfaktor von 10,9 mit einer Standardabweichung von 1,4. Dieses zeigte das gleichartige Verhalten der Destabilisierungsdomäne in den unterschiedlichen Zelllinien. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden FACS-Analysen an den unterschiedlichen Zeitpunkten herzustellen, wurden auch die MFI von dTomato gezeigt, die keine signifikanten Unterschiede zu der MFI aus der früheren Analyse aufwiesen.



Abbildung 43: Funktionalität des durch Doxycyclin regulierbaren, induzierbaren, tricistronischen LeGO-Vektors in drei verschiedenen Zelllinien. *HEK293T- und NIH3T3-Zellen wurden jeweils mit MOI 10, die K562-Zellen mit MOI 20 transduziert, um vergleichbare Transduktionsraten zu erreichen. Nach Transduktion erfolgte jeweils eine Teilung in zwei Kulturen, die entweder mit 1µg/ml Doxycyclin oder 1‰ Ethanol inkubiert wurden. Nach drei Wochen wurden die einzelnen Kulturen das erste Mal am FACS analysiert und nach anschließender Inkubation mit 500 nM Shield1 für 48 Stunden ein zweites Mal. Dargestellt sind die Mittelwerte* \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 44 ist am Beispiel von HEK293T-Zellen die Induktion bei Verwendung unterschiedlicher MOI gezeigt. Die maximale Expressionsstärke sowie die Anzahl transduzierter und Marker produzierender Zellen stieg mit höherer MOI konsequent an, die Expressionsstärke und die Zahl noch als positiv zu erkennender Zellen im nicht-induzierten Zustand blieben hingegen weitestgehend konstant. In dem Anteil der Zellen, die durch GFP als transduziert erkennbar waren, konnte zwischen der Analyse mit und ohne Stabilisierung des GFP durch Shield1 kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Hingegen zeigte sich durchschnittlich ein deutlicher 7,7-facher Unterschied in der MFI des GFP zwischen beiden Bedingungen.



Abbildung 44 Transduktion von HEK293T-Zellen mit dem Vektor iLeGO-iDDG2A-dt bei unterschiedlicher MOI. Die Zellen wurden in gleicher Weise hergestellt wie in Abbildung 43. a) zeigt die MFI von dTomato und GFP bei den verschiedenen Transduktionsraten unter den angezeigten Induktionsbedingungen. In b) ist der Anteil an als dTomato bzw. GFP-positiv identifizierbaren Zellen dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

6.7. Anwendung des Vektorsystems

6.7.1. Proliferationshemmung durch Dox-induzierte Wiederherstellung der SHIP1-Expression in Jurkat-T-Zellen

Die Inositol-5-Phosphatase SHIP1 spielt in der Signaltransduktion und Zellproliferation von hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle, eine Funktion als Tumorsupressor, aber auch als Tumorprogressor wird diskutiert (Ker 2008). SHIP1 kann durch Dephosphorylierungen von Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat zu Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat und Inositol(1,2,4,5)tetrakisphoshat zu Inositol(1,3,4)trisphosphat eine erniedrigte Aktivität der

Proteinkinase Akt bewirken, was zu einer Verlangsamung der Zellproliferation führt. Eine mögliche Rolle von SHIP1 in der Leukämogenese wurde nahegelegt, da die Tyrosinkinase BCR-ABL, die für die Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie von Bedeutung ist, eine Reduktion der Expression bzw. Stabilität von SHIP1 bewirkt (Sattler et al. 1999a) und in Zellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie Mutationen von SHIP1 detektiert wurden (Lo et al. 2009). Die humane T-Zelllinie Jurkat, die von einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie von SHIP1 auf (Lo et al. 2009).

Die Funktionalität des induzierbaren, tricistronischen LeGO-Vektors sollte nun in Jurkat-Zellen gezeigt werden. Durch die induzierbare Expression von SHIP1 in diesen Zellen sollte der mögliche Einfluss der Phosphatase auf die Zellproliferation untersucht werden.

Es wurde der in Abbildung 45 gezeigte Vektor kloniert und die Jurkatzelllinie JURKAT76 mit diesem und der Vektorkontrolle transduziert. Verwendet wurde eine MOI von fünf.



Abbildung 45 Schematische Darstellung des SHIP-1 exprimierenden, induzierbaren LeGO-Vektor iLeGO-iG2A-SHIP1. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maβstabsgetreu.



Abbildung 46 Proliferationshemmung von Jurkatzellen durch induzierbare SHIP1-Expression. Unterschied in der Zellproliferation nach siebentägigem Wachstum unter der jeweiligen Doxycyclinkonzentration. Darstellung in Relation zu den Kulturen, die keine Induktion durch Doxycyclin erhielten. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen mit jeweils zwei Kulturen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus zwei verschiedenen Versuchen.



Abbildung 47 Vergleich von GFP-Expression und Proliferationshemmung von Jurkatzellen nach Transduktion mit SHIP1 und Inkubation mit Doxycyclin. Die Jurkatzellen wurden in gleicher Weise behandelt wie in dem Experiment aus Abbildung 46Abbildung 46. Die Zellen wurden nach der Zellzählung am FACS zu den jeweiligen Zeitpunkten auf ihre GFP-Expression hin untersucht.

Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, zeigte sich eine von der Doxycyclin-Konzentration abhängige Inhibition des Wachstums der Jurkat-Zellen, die mit SHIP1 transduziert worden sind. Schon bei einer Doxycyclinkonzentration von 5ng/ml zeigte sich bei den mit SHIP1 transduzierten Zellen ein hoch signifikanter Unterschied (p<0,01) in der Proliferation im Vergleich zu den ohne Doxycyclinzugabe gehaltenen Zellen sowie zu den Vektor-Kontrollzellen bei gleicher Doxycyclinkonzentration. Nach Addition von 100 ng/µl Doxycyclin reduzierte sich die Proliferation der SHIP1-exprimierenden Zellen um 26,1%.

In einem ähnlichen Experiment zeigte sich parallel zu der Proliferationshemmung auch eine höhere GFP-Expression in den Zellen, die mit höherer Doxycyclin-Konzentration inkubiert wurden (Abbildung 47), sodass die Expression des GFP mit der Wachstumshemmung zu korrelieren scheint.

6.7.2. Doxycyclin-induzierte Transformation hämatopoetischer Zellen (Ba/F3) durch regulierbare Expression einer aktivierten PI3-Kinase

Im nächsten Ansatz wurde anstelle des proliferationshemmenden SHIP-1 die proliferationsfördernde Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) analysiert. Mit dem Vektor iLeGO-IDDZ2A-H1047R-puro+ (s. Abbildung 48), der für eine mutierte, konstitutiv aktive katalytische Untereinheit der PI3K kodiert, wurden murine Ba/F3-Zellen transduziert. Zusätzlich wurden als Kontrolle die katalytische Untereinheit der Wildtyp PI3K (engl. PI3K catalytic unit, PI3KCA) in den Vektor kloniert. Die Ba/F3-Zellen brauchen als essenziellen externen Wachstumsfaktor die Zugabe von Interleukin-3 (IL3) zum Medium. Während Transduktion und Selektion wurde dieses dem Medium zugefügt. 24 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und in Medium ohne Doxycyclin und Shield1 gehalten. Weitere 24 Stunden später wurden 500nM Shield 1 hinzugefügt. Einen Tag später wurden die Zellen auf alle Zsgreen-negativen Zellen sortiert. Die sortierten Zellen wurden nach dreitägiger Induktion mit 1µg/ml Doxycyclin unter 1µg/ml Puromycin für drei Tage selektioniert. Nach 24-stündiger Induktion mit Shield1 wurden die ZsGreen-positiven Zellen am Sorter in unterschiedlicher Zellzahl in 96-Loch-Platten mit IL3freiem Medium ausgesät und für 14 Tage mit oder ohne 1µg/ml Doxycyclin gehalten. Danach erfolgte die Auszählung der positiven Klone. Neben der mutierten Form wurden auch der Wildtyp der PI3K sowie eine Vektorkontrolle untersucht. Die Berechnung der Frequenzen faktor-unabhängigen Wachstums erfolgte durch Verdünnung und Anwendung der Poissonverteilung, korrigiert durch den Klonierungsfaktor unter Anwesenheit von IL3 (Stocking et al. 1993).

1111111		/////////					P					(())))))		
- CINI	TDE	NTD			IDEC	nn	ZaCroon	2 4	nura	2 4	+TD VDAD	CINI	TDE	NATO-
SIN	INC	0004000	SFFV	H1047 h	INES	$\nu \nu$	Zsureen	ZA	puro	ZA		JIN	INE	200 A 200
							e		-					

Abbildung 48 Schematische Abbildung des die konstitutiv aktive Mutante der PI3K kodierenden induzierbaren LeGO-Vektors. DD steht für die Destabilisierungs-Domäne des Proteotunersystems. Puro bezeichnet das Puromycin-Resistenzgen. Darstellung als integriertes Provirus. Nicht maßstabsgetreu.

Weder die Vektorkontrolle noch die Ba/F3-Zellen, die mit der Wildtyp PI3K transduziert wurden, zeigten klonale Proliferation in Abwesenheit von Interleukin-3. In IL-3-haltigem Medium zeigten die die unterschiedliche Konstrukte tragenden Zellen ähnliche klonale Proliferationsraten. Ohne IL-3 wuchsen nur die Zellen, die die mutierte Form der PI3K (H1047R) exprimierten, an.



Abbildung 49 Die induzierte Expression der mutierten PI3K führt zur effizienten Transformation von Ba/F3-Zellen. Vergleich zwischen der Vektor-Kontrolle, dem Wildtyp (PI3KCA) und der mutierten Form (PI3K H1047R), Ba/F3-Zellen wurden mit dem in Abbildung 48 gezeigten Vektor und mit den in der Legende dargestellten Transgenen transduziert. Nach Sortierung der Zellen erfolgte die Zellablage in 96-Loch-Platten mit und ohne Zugabe von IL3. Nach 14 Tagen erfolgte die Auszählung der Transformationen mit und ohne Doxycyclinbehandlung. PID3KCA wt steht für die Wildtypvariatne der katalytischen Untereinheit der PI3K. PI3K H1047R stellt eine konstitutiv aktivierte Form der katalytischen Untereinheit der PI3K dar. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus zwei verschiedenen Versuchen.

Wie in Abbildung 49 zu sehen, steigt mit zunehmender Anzahl ausgesäter Zellen auch die Anzahl an Kolonien. Aber in jedem Experiment ist der signifikante (p<0,01) Unterschied der Proliferation zwischen induziertem (+DOX) und nicht-induziertem (-DOX) Zustand zu erkennen. Bei einer hohen Anzahl ausgesäter Zellen pro Loch steigt die Anzahl von Klonen ohne Zugabe von Doxycyclin, wie zu erwarten, überpropotional an.



Abbildung 50 Die Transformationseffizienz ist doxycyclinabhängig regulierbar. Vergleich der Transformationseffizienz der die mutierte PI3K exprimierenden Ba/F3-Zellen zwischen induzierten und uninduzierten Bedingungen bei 100 ausgesäten Zellen pro Loch und 1 μ g/ μ l Doxycyclin.

Bei 100 ausgesäten Zellen ergeben sich die in Abbildung 50 dargestellten Transfomationseffizienzen. Es zeigte sich eine fast 30fach höhere Transformationseffizienz bei Proliferation unter Zugabe von Doxycyclin im Gegensatz zu uninduzierten Bedingungen.

6.7.3. Induzierbare Hemmung der mutierten PI3K durch SHIP1

In diesem Experiment wurde untersucht, ob das Faktor-unabhängige Wachstum, das von der konstitutiv aktiven PI3K in Ba/F3-Zellen ausgelöst wird, durch SHIP1 beeinflußt wird. Hierfür wurden erneut Ba/F3-Zellen verwendet, die mit dem die mutierte PI3K-kodierenden Vektor LeGO-IB2-H1047R-ZEO und der Vektorkontrolle transduziert wurden. Nach Selektion mit Zeocin und zusätzlichem Sortieren auf mTAG-BFP-exprimierende Zellen wurde mit dem Vektor iLeGO-IDDZ2-SHIP1-puro+ und dessen Vektorkontrolle transduziert. Nach eintägiger Induktion mit 1µg/ml Doxycyclin wurden die Zellen mit 1µg/ml Puromycin selektioniert. Dabei wurden die Zellen durchgängig in IL-3-haltigem Medium gehalten. Nach dreitägiger Selektion erfolgte nach zweimaligem Waschen in PBS am FACSorter die Zellablage in 96-Loch-Platten. Dabei wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät.

Eine Einzelzellablage erfolgte von der Vektorkontrolle und den SHIP1-exprimierenden Zellen in IL-3-haltigem Medium zur Bestimmung der Klonierungsfähigkeit. Zudem wurden die Zellen mit aufsteigenden Zellzahlen in Medium ohne IL-3 und mit oder ohne $1\mu g/ml$ Doxycyclin ausgesät und für 14 Tage inkubiert.

In Abbildung 51 ist zu erkennen, dass die zusätzliche Expression von SHIP1 zu einer Reduktion der positiven Kolonien führt. Auch in der Vektorkontrolle kam es unter Doxycyclin zu einer tendenziellen Verringerung der positiven Kolonien, doch zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p>0.5). Bei 30 ausgesäten Zellen lag die Transformationseffizienz der SHIP1 exprimierenden Zellen ohne Doxycyclin bei 1,4⁻⁰¹. Wenn mit Doxycyclin inkubiert wurde, reduzierte sich die Transformationseffizienz um den Faktor 10 auf 1,4⁻⁰². Auch in diesem Versuch, wie in dem aus Kapitel 5.7.2, ist zu erkennen, dass, der inhibitorische Effekt nicht mehr eindeutig zu erkennen ist, sobald die Anzahl ausgesäter Zellen sehr hoch wird. Aber selbst, wenn 1000 Zellen pro Loch ausgesät wurden, konnten anschließend lichtmikroskopisch verminderte Zellzahlen unter induzierten Bedingungen gesehen werden, obwohl in jedem Loch Zellen anwuschsen. In weiteren Versuchen, hier nicht gezeigt, erfolgte die Verifizierung dieser ersten Ergebnisse, sowie die Analyse der Proteinexpression der PI3K und SHIP1 und der in der Signaltransduktion nachfolgenden Proteine.



Abbildung 51 Die induzierbare Expression von SHIP1 hemmt das PI3-Kinase vermittelte Auswachsen IL-3-unabhängiger Zellen. Ba/F3-Zellen (in IL3 haltigem Medium) wurden mit LeGO-IB2-H1047R-ZEO transduziert. Anschließend Selektion mit Zeocin und Transduktion mit iLeGO-IDDZ2-SHIP1-puro+ und Vektorkontrolle. Unter Induktionsbedingungen Selektion mit Puromycin. Einzellzellablage am FACS und Inkubation in IL3 freiem Medium unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Doxycyclin wurde mit einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. FACS-Analyse nach 14 Tagen.

7. Diskussion

7.1. Konstruktion eines durch Tetrazyklin induzierbaren LeGO-Vektors

LeGO-Vektoren haben durch ihre Modulierbarkeit und Vielseitigkeit seit fünf Jahren eine große Popularität gewonnen (Li et al. 2011; Preukschas et al. 2012; Sutlu et al. 2012). Durch die ausgewählten Restriktionsschnittstellen und die große Anzahl an passenden Marker- und Resistenzgenen stellte die Entwicklung der LeGO-Vektoren einen wichtigen Schritt in der Entwicklung lentiviraler Vektoren mit besonderem Wert für Zellmarkierung und -verfolgung dar (Barese und Dunbar 2011).

Eine wichtige Methode in der Analyse von Genfunktionen stellt die Regulation der Expression dar - sei es durch regulierte Expression eines Transgens oder einer shRNA. Für bestimmte Fragestellungen kann es entscheidend sein, die Expression eines Transgens erst zu einem definierten Zeitpunkt zu starten oder sogar die Expression während der Virusproduktion zu verhindern, z.B. um toxische Wirkungen des Transgens auf die Produzentenzellen auszuschließen. Es wurden verschiedene lentivirale Vektoren entwickelt, die auf unterschiedlichste Weise regulierbar sind. Dabei wurde hauptsächlich in einem Zwei-Vektoren-System das TetOn-System verwendet (Reiser et al. 2000; Vigna et al. 2002; Gascon et al. 2008). Gegelegentlich fanden auch andere Regulationssysteme Verwendung, wie z.B. durch Mifepriston (Sirin und Park 2003). Ein wichtiger Schritt war die Entwicklung der "Allin-one"-Vektoren, bei denen nur ein einzelner Vektor zur Transgen- und Regulatorexpression nötig ist (Szulc et al. 2006; Benabdellah et al. 2011; Yamaguchi et al. 2012). Allerdings wiesen selbst Vektoren, die in einem Labor entwickelt wurden, für das TetOn- und TetOff-System einen unterschiedlichen Vektoraufbau ohne Vergleichbarkeit und Modulierbarkeit auf (Szulc et al. 2006). Ebenso fehlte meist die Möglichkeit, neben einem Transgen einen Marker zu exprimieren. Selbst wenn ein zusätzlicher Marker mit einem Transgen kombiniert wurde, unterlag dieser meist keiner Regulation und ließ keine direkten Rückschlüsse auf die Regulation der integrierten Expressionskassette zu.

In dieser Arbeit wurde über mehrere Entwicklungsstufen ein Vektor entwickelt, der die verschiedenen Vorteile in einem Vektor vereinigt. Als bicistronisches Konstrukt, das eine regulierbare Transgen- bzw. Markerexpression ermöglichen soll, erwies sich dabei am geeignetsten der iLeGO-G2A, in dem initiiert durch einen SFFV-Promotor Marker und tTR-KRAB, die über eine 2A-Sequenz miteinander verbunden sind, transkribiert werden.

Für die 2A-Sequenz wie für die IRES ist mehrfach beschrieben, dass die Expression der verbundenen Proteinsequenzen deutlich von den jeweiligen Proteinpartnern, dem Promotor und der Zelle abhängig sein kann, wobei der 2A-Sequenz eine stabileres Verhalten zugesprochen wird (Chinnasamy et al. 2006; Gao et al. 2012). So ist für die 2A-Sequenz beschrieben, dass bis auf 6-8% nicht gespaltene Produkte eine äquimolare Expression der Proteine vor und hinter der Sequenz ermöglicht wird (Felipe et al. 1999; Chinnasamy et al. 2006). Allerdings muss für jedes Protein geprüft werden, ob eine Beeinträchtigung der Funktion des ersten Proteins durch die angehängten ca. 20 Aminosäuren oder des zweiten Proteins durch das vorgeschaltete Prolin auftritt. Der C-terminale Aminosäurenanhang am tTR-KRAB-Protein könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in dem Vektor III (tTR-KRAB-2A-GFP) keine Regulation über Doxycyclin mehr möglich war. Dennoch zeigte Vektor III eine höhere GFP-Expression als Vektor V (GFP-2A-tTR-KRAB). Dieser Umstand kann durch die beschriebene Abhängigkeit der Funktion der 2A-Sequenz von den jeweiligen Transgenen begründet sein. Da aber selbst im induzierten Zustand eine geringe Bindung und ggf. Transkriptionsinhibition des tTR-KRAB an die TRE-Sequenz nicht komplett ausgeschlossen werden kann, kann durch die Funktionslosigkeit des tTR-KRAB, höchstwahrscheinlich durch den Aminosäureanhang vermittelt, ebenso ein positiver Effekt auf die Expressionsstärke möglich sein.

Woher die Unterschiede in Regulation und Expression durch eine Verbindung des GFP mit tTR-KRAB über eine 2A-Sequenz im Gegensatz zu der IRES kommen, ist nicht sicher. Eine mögliche Ursache liegt wohl auch hier in der Abhängigkeit der Funktion beider Verbindungen von den einzelnen Proteinsequenzen. Die deutlich bessere Regulierbarkeit über die 2A-Sequenz kann zudem durch das bessere Verhältnis zwischen GFP und tTR-KRAB (siehe Kapitel 3.1.5) begründet sein. Gegen das Argument, das deutlich höhere Mengen an tTR-KRAB die Regulation verbessern, sprechen aber die guten Ergebnisse der tricistronischen Konstrukte, bei denen das tTR-KRAB nach einer IRES und einer 2A-Sequenz positioniert ist.

Nur in der Regulierbarkeit in Bezug auf den Anteil GFP-positiver Zellen weist der Vektor IV (EFS-GFP-2A-tTR-KRAB) bessere Induzierbarkeit als der durch den SFFV angetriebene auf. Ein wichtiger Faktor für dieses Phänomen scheint die niedrigere Expressionstärke, in diesem Fall 17% weniger im Vergleich zu SFFV, zu sein. Da das Analysefenster zur Bestimmung des Anteils positiver Zellen anhand nicht transduzierter Zellen in einer logarithmischen Skalierung gesetzt wird, muss die Hintergrundaktivität des Konstruktes hoch genug sein, um sich von den untransduzierten Zellen zu unterscheiden.

Sehr geringe Änderungen an der Größe des Analysefensters können große Änderungen in der Auswertung nach sich ziehen. Somit kann aus diesem Ergebnis nicht gefolgert werden, dass durch den EFS- Promotor eine bessere Induktion ermöglicht wird.

Wichtiger und nicht in dieser Art abhängig von der Gatingstrategie ist der Einfluss der Induktion auf die MFI. Hier zeigt das über den SFFV angetriebene Konstrukt mit einem 3,9fach höheren Faktor im Vergleich zu dem Vektor mit EFS-Promotor deutlich bessere Ergebnisse.

Die Konstruktion bicistronischer Vektoren durch die Verwendung zweier Promotoren führte zu niedriger Expression des Markers im Vergleich zum IRES-Vektor und erhöhter Aktivität im nicht-induzierten Zustand im Vergleich zum SFFV-2A-Vektor. Wahrscheinlich führt die Promotorinterferenz zu der verminderten Expression und zu einer verminderten Methylierung und Aufhebung der Induktion. Höchstwahrscheinlich würde erst ein komplexer Aufbau des Vektors mit Insulatorsequenzen zu besseren Ergebnissen führen (Tian und Andreadis 2009).

Gerade für die Konstruktion tricistronischer Vektoren stellt die Verbindung des Markers mit dem tTR-KRAB über eine 2A-Sequenz die ideale Verbindung dar (Felipe 2002; Felipe und Izquierdo 2003; Gao et al. 2012). Über das LeGO-System steht eine Vielzahl an Marker- und Resistenzgenen zur passgenauen Klonierung vor die 2A-Sequenz zur Verfügung (Weber et al. 2008; Weber et al. 2010). Alle getesteten Markergene zeigten gute Funktionalität. Das tTR-KRAB-Protein zeigt gute Funktion, wenn es auf eine 2A-Sequenz folgend exprimiert wird. Die 2A-Sequenz weist eine deutlich geringere Größe als die IRES auf und lässt somit mehr Platz für kodierende oder regulatorische DNA-Sequenzen. Hingegen stellt die IRES eine gute Verbindung zwischen Transgen und Marker dar. Während das Protein vor der IRES nicht besteht bei Verwendung einer 2A-Sequenz durch die o.g. modifiziert wird, Proteinmodifikationen eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Funktionsverlustes, insbesondere der Veränderung und Zerstörung von Signalpeptiden (Felipe und Ryan 2004). Zudem bietet die IRES in Verbindung mit der multiplen Klonierungsstelle deutlich einfachere Klonierungsmöglichkeiten. Während das vor der 2A-Sequenz liegende Protein in passender Kodonsequenz kloniert werden muss, sodass die Aminosäuren der 2A-Sequenz direkt ohne Stoppkodon an die der vorhergehenden Proteinsequenz anschließen, bietet die MCS eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten, die einen Faktor für die einfache Handhabbarkeit der LeGO-Vektoren darstellen.

Da die für die LeGO-Vektoren passenden Markergene allesamt durch ihre Schnittstellen an die IRES anschließen, stellt die strenge Klonierungsstrategie hinter der IRES keine sonderliche Einschränkung in der Anwendung dar (Weber et al. 2008).

Diese Überlegungen in Addition zu den Ergebnissen zur Konstruktion der bicistronischen Vektoren führten zum Aufbau der tricistronischen Vektoren nach dem Schema Transgen-IRES-Marker-2A-tTR-KRAB. In diesem Vektor konnte die Vielseitigkeit der LeGO-Vektoren bewahrt werden. Das Transgen kann in der MCS vor der IRES eingesetzt werden, der Marker und ggf. ein Resistenzgen können zwischen IRES (MSCI) und 2A-Sequenz (BsrGI) ausgetauscht werden. Ebenso kann das tTR-KRAB (TetOn) gegen rtTR-KRAB (TetOff) über einen einfachen Klonierungsschritt ersetzt werden. Auch der Promotor kann nach Belieben geändert werden. Der SFFV-Promotor zeigte die stärkste Expression und die beste Regulation.

Dieser Vektoraufbau ermöglicht nun eine zu dem Transgen stöchiometrische Expression des Markers. In den meisten bisher publizierten *All-in-one*-Vektoren gibt es keine oder nur eine meist nicht stöchiometrische Markerexpression zusätzlich zu der des Transgens. Bei Fehlen eines Markers bietet sich in der Regel keine einfache Möglichkeit, transduzierte Zellen zu identifizieren und damit die Transduktionsrate zu bestimmen oder transduzierte Zellen zu sortieren. Erst durch eine zum Transgen proportionale Expression des Markers lässt sich die Expressionsstärke abschätzen und durch die gleichzeitige Regulation des Markers die Induktion nachweisen sowie ggf. durch Sortieren (siehe Kapitel 6.4.4) verbessern. Ersetzte man die IRES durch einen zweiten Promotor, würde die proportionale Koexpression von Transgen und Marker verloren gehen. Der in dieser Arbeit vorgestellte tricistronische Vektor iLeGO-iG2A erlaubt die Koexpression von Marker und Transgen über eine IRES. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Markerexpression proportional zur Transgenexpression ist und dass die transduzierten Zellen über den Marker identifiziert werden konnten.

Allerdings kann es auch von Nachteil sein, wenn die Markerexpression an die Regulation des Vektors gebunden ist. So wird die Identifikation der transduzierten Zellen im uninduzierten Zustand, z.B. wenn aus experimentellen Gründen keine Transgenexpression erwünscht ist, sehr schwierig. Hingegen bietet der Marker, wenn er derselben Regulation wie das Transgen unterliegt, auch hier die Möglichkeit, nicht zu regulierende Zellen durch die Expression im uninduzierten Zustand zu identifizieren.

Bis zu zwei Prozent der Zellen wiesen bei Verwendung des tricistronischen Vektors eine Expression des tCD34, also des Transgens, aber keine Markerexpression auf. Dieses lässt sich in Verbindung mit den Ergebnissen von Bulliard et al (2006) bringen, die Mutationen in der IRES mit nachfolgendem Funktionsverlust und fehlender Expression des folgenden Proteins für ein Versagen der Regulation durch tTR-KRAB verantwortlich machten.

Natürlich können auch weitere Mutationen, wie z.B. im Markergen zu diesem Ergebnis führen. Dadurch, dass in unserem Vektor der Marker bzw. das Resistenzgen verbunden über die 2A-Sequenz mit tTR-KRAB hinter der IRES liegt, lassen sich durch Sortieren bzw. Selektion die Zellen mit fehlerhafter IRES entfernen. Dieses stellt einen weiteren Vorteil für die Verwendung nur eines Promotor bzw. einer Transkriptionskassette zur Erstellung eines multicistronischen *All-in-One-*Vektors dar.

Interessant ist, dass nur geringe Veränderungen der Position des TRE in dem LTR zu Funktionsveränderungen führen können. Alleine durch die geringe Modifikation zu dem Originalvektor von Szulc et al. (2006), die in dieser Arbeit vorgestellt wurde, zeigte sich eine Tendenz für, teilweise sogar signifikant reduzierte Hintergrundaktivität. Obwohl eine Wirkungsreichweite des KRAB-Proteins von 2-3 kb beschrieben ist (Deuschle et al. 1995a), und in unserem Vektor nach reverser Transkription Abstände bis zu 2 kb bestehen, führte weder eine nähere Positionierung des TRE an den Promotor noch eine Integration in den Promotor zu einer Funktionsverbesserung. Das Problem der von Urbinate et al (2009) beschriebenen Titerreduktion durch große Insertionen in den 3'LTR zeigte sich in unserem Vektor nicht (Urbinati et al. 2009). Die Kombination der TRE-Integrationen in 3'LTR mit einer weiteren in Promotornähe führte zu keiner Funktionsverbesserung, aber zu einer signifikanten Titerreduktion, was durch homologe Rekombination zwischen den einzelnen Sequenzen während der reversen Transkription erklärt werden kann (Delviks-Frankenberry et al. 2011).

7.2. Funktion und Toxizität

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, zeichnet einen optimalen induzierbaren Vektor aus, dass die Induktion reversibel, schnell und durch unterschiedliche Induktormengen auf einstellbarem Expressionsniveau regulierbar sein soll. Unser Vektor zeigt diese Eigenschaften, ähnlich wie bei Szulc et al (2006). Durch Analyse mit destabilisiertem GFP in Verbindung mit dem Proteotunersystem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aufhebung der Induktion des Vektors innerhalb von 24 Stunden erfolgt. Der lange Prozess der Aufhebung der Induktion über 7-10 Tage, wie es in anderen Publikationen und Ergebnissen beobachtbar war, lässt sich auf die lange Halbwertszeit des GFP zurückführen.

Wichtig für einen optimalen Vektor ist eine geringe Toxizität. Zellen, die mit Vektoren transduziert wurden, die das tTR-KRAB vor der IRES produzierten, zeigten einen signifikant höheren Verlust an Marker-exprimierenden Zellen und eine verringertes Wachstum.

Dieses Verhalten lässt auf eine Beeinflussung der Zellen durch das tTR-KRAB schließen. Dieser Zusammenhang wurde in diesem Ausmaß bisher noch nicht beschrieben.

Hingegen konnten bei Verwendung der induzierbaren Vektoren, bei denen das tTR-KRAB am Ende der Transkriptionskassette liegt, stabil exprimierende Zellen erzeugt werden. Ein Einfluss der Menge an tTR-KRAB ist zu vermuten, da die Expression dieses Proteins vor der IRES bis zu dreifach höher als die des dahinter liegenden ist (Mosser et al. 1997). Da sich keine erhöhte Letalität der Zellen, die tTR-KRAB exprimieren, in der 7AAD-Färbung zeigte, lassen sich das langsamere Wachstum der tTR-KRAB hochexprimierenden Zellen und der Verlust der Transkription als Gründe für dieses Phänomen heranführen. Dennoch ist weiter zu klären, ob dieser negative Effekt des tTR-KRAB bei *in vitro-* oder *in vivo-*Experimenten, in denen durch die Position des tTR-KRAB am Ende der Expressionskassette eine geringere Expressionsstärke des Proteins erreicht wird, Einfluss nimmt. Transgene Mäuse wurden bereits beschrieben, was die Bedeutung dieses Phänomens zumindest relativiert (Szulc et al. 2006).

Zur Charakterisierung eines Induktionssystems dienen meist der Induktionsfaktor und die Hintergrundaktivität im uninduzierten Zustand. Bisher existiert kein System, das überhaupt keine Hintergrundaktivität aufweist. Für den tTR-KRAB-enthaltenden *All-in-one*-Vektor ist bisher ein Anteil von nicht-regulierbaren Zellen in Massenkulturen von 1,4 % beschrieben (Bulliard et al. 2006); jedoch kann dieser Anteil je nach Transduktionsrate variieren. Durch zusätzliche Transduktion mit einem Vektor, der ein weiteres tTR-KRAB-Gen einbrachte, wurden diese nicht-regulierbaren Zellen wieder regulierbar. Letztere Beobachtung ließ sich damit erklären, dass die nicht-regulierbaren Zellen aufgrund von Mutationen entstanden waren (Bulliard et al. 2006). Dies bedeutet zugleich, dass das Auftreten eines kleinen Anteils nicht-regulierbarer Zellen selbst durch optimierte Gestaltung des Vektors nicht verhindert werden kann, da es sich bei den Mutationen um eine inherente Eigenschaft retroviraler Vektoren handelt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz verfolgt, diese nicht-regulierbaren Zellen zu entfernen.

Die Entfernung dieser Zellen wird dadurch ermöglicht, dass parallel zu einer Transgen- eine Markerexpression erfolgt und der Marker der Regulation durch das tTR-KRAB unterliegt. Somit können die nicht regulierbaren Zellen im uninduzierten Zustand an ihrer Markerexpression identifiziert werden. Dies zeigt erneut, dass die parallel regulierte Markerexpression einen Vorteil der LeGO-Switch-Vektoren darstellt.

Durch Einsatz des Proteotunersystems zur induzierbaren Destabilisierung des Markerproteins wurde dieses Prinzip weiter optimiert.

Durch diese Neuerung konnten die nicht-regulierbaren Zellen in einem Prozess über einen Zeitraum von sieben Tagen entfernt werden und auf diese Weise eine um den Faktor 10 bessere Induzierbarkeit erreicht werden. Wobei hier einzuräumen ist, dass das Experiment die Vorteile der schnellen Markerdestabilisierung herausarbeiten sollte, sodass grundlegend keine bessere Schaltbarkeit des tTR-KRAB-Systems anzunehmen ist, wenn genügend Zeit zum Anund Abschalten des Systems zur Verfügung steht. Ohne die Destabilisierungsdomäne ist die Halbwertszeit des GFP bis zu 60mal länger und es werden für das bei uns beschriebene Sortierungsverfahren mehrere Wochen benötigt.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung des induzierbaren, destabilisierten GFP ist, dass sehr hohe Markerproteinkonzentrationen vermieden werden, solange sie nicht erwünscht sind. Somit könnten mögliche toxische Effekte dieser Proteine verhindert werden. Wenn aber eine hohe Markerexpression benötigt wird, kann diese durch einfache Zugabe von Shield1 erreicht werden.

Wie bereits bei Almog et al (2009) beschrieben, ergibt sich durch die Kombination aus dem Tet-Operonmodell und dem Proteotunersystem die Möglichkeit, den Induktionsfaktor des Gesamtsystems deutlich zu verbessern. Auch in dieser Arbeit konnten wir einen deutlichen Effekt zeigen. Allerdings gilt es bei jeder Fusion zweier Peptidsequenzen zu überprüfen, ob die Funktion beider Partner anschließend noch gewährleistet ist (Banaszynski et al. 2006). Für einige Proteine konnte bisher *in vitro* wie auch *in vivo* die Funktionalität dieses Systems gezeigt werden (Banaszynski et al. 2006; Banaszynski et al. 2008; Bhanot et al. 2010). Durch die Möglichkeit über BamHI die Destabilisierungsdomäne in die MCS zu klonieren, erfolgte also bei passendem Transgen eine Erweiterung des LeGO-Systems.

Durch optimale Vektorgestaltung und zweimalige Sortierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Induktionsfaktor in Massenkulturen bei alleiniger Regulation über das Tet-System deutlich in Relation zu bisherigen Ergebnissen verbessert werden konnte. Dieser Prozess kann durch die Verwendung eines destabilisierbaren Markers deutlich beschleunigt werden. In Heinz et al. (2011) ist ein maximaler Faktor für *All-in-One*-Vektoren mit Tet-System von 500, selbst nach klonaler Selektion, beschrieben. Heinz et al konnten diesen Faktor in einem γ -retroviralen Vektor deutlich erhöhen. Der Vektor von Heinz et al. (2011) beruht auf einem optimierten γ -retroviralen, nicht lentiviralen, Vektor, der einen bidirektionalen optimierten Promotor und einen optimierten Tet-Aktivator enthält. Die Messung des Induktionsfaktors erfolgte über die Bestimmung der Luciferase-Aktivität. Dabei ist zu bemerken, dass die Verwendung unterschiedlicher Indikatoren zur Bestimmung des Induktionsfaktors zu stark variierenden Ergebnissen führen kann.

Dadurch wird die Vergleichbarkeit unter verschiedenen Vektoren deutlich erschwert und die Aussagekraft absoluter Zahlen einschränkt (Giry-Laterrière et al. 2011).

Bei Barde et al. (2006) sind Induktionsfaktoren eines optimierten *All-in-One*-Vektors bis 100 beschrieben. Es erfolgte ein Vergleich verschiedener Konstrukte, wobei die alleinige Verwendung des Tet-Transaktivators rtTA-2MS2 bessere Resultate erzielte als die gleichzeitige Regulation durch rtTR-2MS2 und den Tet-Transrepressor tTS^{KID}, der die KRAB-Domäne aus dem Protein Kid1 enthält. Eine Autoregulation, parallele Marker- oder Resistenzgenexpression fand bei beiden vorgestellten Vektoren nicht statt.

Durch die optimierte Gestaltung des induzierbaren LeGO-Vektors, durch einen separat induzierbaren Marker und durch Zellsortieren konnten wir Faktoren in Massenkulturen über 1600 erreichen. Zudem bietet kein bisher publizierter All-in-One-Vektor die modularen Gestaltungsmöglichkeiten, die Verwendung dieser Bausteine aus Markerund Resistenzgenen, sowie die Möglichkeit der zum Transgen simultanen und geregelten Markerexpression. Durch das tTR-KRAB-System ist im Gegensatz zum Transaktivatorsystem gleichzeitig zur oder anstelle der Transgenregulation auch eine shRNA-Regulation möglich. Der Promotor kann beliebig ausgetauscht werden, wobei kein spezieller, modifizierter Promotor mit Tet-Operonsequenz benötigt wird. So können zum Beispiel gewebespezifische Promotoren eingesetzt werden, um einen weitere Ebene der Regulation einzufügen. Zudem unterliegt der ganze Vektor einer Autoregulation. Im uninduzierten Zustand erfolgt nur eine sehr geringe Transgen- und tTR-KRAB-Expression, die im FACS nicht messbar ist. Dieses wiederum könnte Vorteile bezüglich der Beeinflussung des Zellstoffwechsels und der Immunogenität mit sich führen, da im uninduzierten Zustand praktisch keine Belastung der Zelle durch zusätzlich exprimierte Proteine erfolgt.

Die Vorteile bei Verwendung autoregulatorischer *All-in-One*-Vektoren wurden bereits beschrieben, wobei hier die Autoregulation über den Tet-Transaktivator rtTA erfolgte (Markusic et al. 2005b).

Giry-Laterrière et al. (2011) stellten als erste Gruppe einen *All-in-One*-Vektor vor, der zusätzlich zu einem Transgen die Expression eines Marker- oder Resistenzgens ermöglichte und dabei gute Induktionsfaktoren versprach. Verwendet wurde der Transaktivator rtTA-2SM2. Zur Expression wurden zwei Promotoren verwendet, ein Transaktivator-abhängiger pTF-Promotor zur Expression des Transgens und ein EFS-Promotor zur dauerhaften Transkription von Marker-, Resistenzgen und Transaktivator, die jeweils über 2A-Sequenzen miteinander verbunden wurden. Erreicht wurden Induktionsfaktoren bis zu 200.

Obwohl, gerade auch durch die Verwendung einfacher Klonierungsstrategien, dieser Vektor durch die Verwendung von Marker- und Resistenzgen deutliche Verbesserungen in der Anwendung versprach, ermöglichte er keine direkte Analyse der Induzierbarkeit, bei Verwendung eines nicht einfach detektierbaren Transgens, keine sh-RNA-Expression und keine Autoregulation, sodass eine dauerhafte Expression von Marker und Transaktivator vorlag.. Ebenso kann in jenem Vektor nicht jeder beliebige Promotor zur Expression des Transgens verwendet werden. Da der Marker separat vom Transgen transkribiert wird, zeigt eine Markerexpression auch nicht zwangsläufig eine Koexpression des Transgens an. Wenn durch Mutationen des Transaktivators, der verbindenden 2A-Sequenz oder des pTF-Promotors diese nicht mehr funktionieren, erfolgt keine Transgenexpression trotz vorhandener Markerexpression. In unserem Vektor könnte dieser Fall nur durch Mutationen im Transgen eintreten, eine unabhängige Transkription der mRNA des Markergens ist dagegen ausgeschlossen.

7.3. Anwendung im Zellsystem

Bei der Anwendung in einer humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinie und in murinen Ba/F3-Zellen zeigte unser Vektor gute Ergebnisse. Durch die über Doxycyclin induzierte Expression von SHIP1 konnte eine von der Konzentration abhängige Proliferationshemmung in Jurkat-Zellen erreicht werden. Schon bei einer Konzentration von 1 ng/µ1 Doxycyclin, wie sie auch für andere durch Tetrazyklin regulierte Vektoren beschrieben wurde (Szulc et al. 2006; Giry-Laterrière et al. 2011), zeigte sich eine Wikung, die sich in einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate der Jurkat-Zellen darstellte. Dieser Effekt konnte dosisabhängig bis zu einer Konzentration von 100 ng/µ1 gesteigert werden. Interessant ist, dass die GFP-Expression nur bis 1 ng/ml als ansteigend im FACS identifizierbar war. Möglicherweise spielt hierbei die um ca. sechs Stunden kürzere bei ungefähr 18 Stunden liegende Halbwertszeit des SHIP1 eine Rolle (Sattler et al. 1999b). Im uninduzierten Zustand konnte kein Unterschied zur Vektorkontrolle festgestellt werden. Dieser Fakt zeigt die gute Regulierbarkeit des induzierbaren LeGO-Vektors auch ohne Sortierung.

Bei Expression der konstitutiv aktiven mutierten Form der PI3-Kinase in Ba/F3-Zellen, die zu von IL3 unabhängigem Wachstum führt, konnten die nicht regulierbaren Zellen durch einen Wachstumsvorteil in IL-3-freiem Medium überleben, während die regulierbaren Zellen starben. Dennoch konnte auch hier gezeigt werden, dass die induzierbaren Zellen einer strengen Regulation unterliegen.

Dieser Unterschied lässt sich an den deutlich unterschiedlichen Transformationsraten bei Anund Abwesenheit von Doxycyclin im Medium ablesen. In einem späteren Versuch von Stefan Horn mit den gleichen Zellen konnte gezeigt werden, dass durch weitere Aufreinigung der Zellen durch Sortieren und Selektion die Differenz noch weiter verbessert werden kann und Induktionsfaktoren über 100 erreicht werden können. Der Versuch zur induzierbaren Transformation durch Doxycyclin abhängige Expression der konstitutiv aktiven Form der PI3K zeigte zum einen die gute Funktionalität der Autoregulation, aber auch die Bedeutung der nicht regulierbaren Zellen. Gerade die Ergebnisse aus dem Experiment, in dem mehr als 100 Zellen pro Loch ausgesät wurden, sind schwierig zu interpretieren, da, wenn nicht 100% regulierbar sind, rein statistisch mehrere nicht-regulierbare Zellen pro Loch vorhanden waren. Ein effizientes Sortieren erscheint entscheidend für die Funktionsweise des Systems. Gute Funktionalität zeigte das System in der Untersuchung auf den Einfluss von SHIP1 in der durch die PI3K geförderten Proliferation. Durch die Variabilität der LeGO-Vektoren ließen sich die Fluoreszenzproteine so kombinieren, dass diese gut voneinander differenzierbar waren. Durch Doxycyclin ließ sich daraufhin eine unabhängige Regulation des induzierbaren Vektors ohne Beeinflussung des anderen erreichen. Dies unterstreicht die Funktiontionalität und Vielseitigkeit dieses Systems, da diese LeGO-Vektoren so eine vielfältige Anwendung ermöglichen. Durch die einfachen Klonierungsoptionen lassen sich schnell und unkompliziert die gewünschten Vektoren produzieren. Durch die Verwendung unterschiedlicher Marker können mehrer Vektoren in einer Zelle angewandt werden, wobei jeder einzelne identifiziert werden kann. Durch die zusätzliche Ebene der transkiptionellen oder translationalen Regulation ergibt sich somit ein sehr vielfältiges System.

7.4. Ausblicke in die Zukunft

Mit der Entwicklung des LeGO-SWITCH Vektorsystems steht ein Werkzeug für mannigfaltige Einsatzmöglichkeiten in der Grundlagenforschung zur Verfügung. Dabei soll die Entwicklung dieses Vektors durch diese Arbeit keinen Abschluss finden, sondern die Grundlage für weitere Entwicklungen darstellen.

Eine Erweiterung des Systems könnte durch Einführung weiterer Repressorproteine erfolgen. Neben dem Tet-Operonmodell wurden weitere Modelle auf Basis von Antibiotikaresistenzen entwickelt, die ähnliche Eigenschaften bezüglich Regulation und Expression wie das Tet-System haben (Weber et al. 2002; Mitta et al. 2005; Weber und Fussenegger 2006). Die Repressorproteine ließen sich bei Verwendung der ausgewählten Klonierungsstrategien gut gegeneinander austauschen. Durch Verwendung mehrere Regulationssysteme könnten komplexe Regulationen in Zellen ermöglich werden (Karlsson et al. 2012). Gerade durch die Verwendung der LeGO-Vektoren, die mit Marker- und Resistenzgen ausgestattet sind, könnte die Anwendung mehrerer Vektoren in einer Zelle deutlich vereinfacht werden.

Durch Kombination unterschiedlicher Repressorproteine und Resistenzgene auf zwei verschiedenen Vektoren könnte man ein bivektorielles System entwickeln, in dem man durch alleinige Selektion durch Antibiotika die nicht-regulierbaren Zellen innerhalb kurzer Zeit eliminieren könnte.

Ebenso könnte durch die Verwendung einer alternativen Destabilisierungsdomäne, die über das Antibiotikum Trimethoprim stabilisiert wird, ein weiterer Zugewinn an Funktion erreicht werden (Iwamoto et al. 2010; Tai et al. 2012). Markerprotein und Transgenprodukt könnten durch zwei unterschiedliche *Small molecules* stabilisiert werden; dadurch könnte der Vorgang der Zellidentifikation über den Marker bzw. das Resistenzprotein von der Erhöhung der Transgenmenge entkoppelt werden. Dennoch könnte der Vorteil der deutlich besseren Induktion durch Kombination aus Destabilisierungsdomäne und Tet-System erhalten bleiben.

Durch stetige Vergrößerung der Auswahl an Markergenen steigt nicht nur die Vielseitigkeit sondern auch die Funktionalität (Stepanenko et al. 2011; Vizcaino-Caston et al. 2012). Durch Einführung des ZsGreen, was unter vergleichbaren Bedingungen in der FACS Analyse 1,5-2-fach "heller" als GFP ist, konnte die Identifikation schwach exprimierender Zellen deutlich verbessert werden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres wichtiges Projekt wird die Anwendung *in vivo* und ggf. die Prüfung auf klinische Anwendbarkeit sein. Schon Szulc et al. (2006) konnten zeigen, dass das tTR-KRAB-System *in vivo* funktioniert und sich sogar zur Herstellung transgener Tiere eignet. Der einzige Rückschlag bestand in der Entdeckung, dass die Aktivität des tTR-KRAB-Protein in der frühen Embryogenese bei Mäusen zu einer Methylierung des Promotors und damit zu einer irreversiblen Inaktivierung des Systems führen kann (Wiznerowicz et al. 2007).

Ein wichtiger Kritikpunkt am Tet-System besteht in der Gefahr einer Immunantwort *in vivo*. Dabei kann eine konsequente und gut steuerbare Regulierbarkeit einer therapeutischen Genexpression *in vivo* von entscheidener Bedeutung sein, wie z.B. bei der Sekretion von Hormonen und Transkriptionsfaktoren. Besonders die Fusion aus dem bakteriellen Tet-Repressor und dem viralen VP16-Transaktivator scheint durch die starke Immunogenität des VP16-Proteins eingeschränkt verwendbar. Dabei beruht diese Beobachtung auf Ergebnissen in Primaten bei intramuskulärer Injektion (Favre et al. 2002; Latta-Mahieu et al. 2002).

Bei der Anwendung in Mäusen gab es Hinweise auf geringe Immunogenität (Barde et al. 2006). Um die Immunogenität zu verringern, wurde versucht, humanisierte Proteine zur Fusion zu verwenden. Allerdings können durch die Fusion auch wieder neue Erkennungssequenzen für das Immunsystem entstehen (Rivera et al. 1996).

Da das KRAB-Protein humanen Ursprungs ist, besteht rein theoretisch ein geringeres Risiko zur Auslösung einer Immunantwort im Vergleich zum viralen VP16-Transaktivator. Ein weiterer Vorteil für die Anwendung *in vivo* kann durch den autoregulatorischen Vektor erhofft werden, da dieser neben der Transgenexpression auch die des tTR-KRAB unterbindet (Markusic et al. 2005a). Die Modulierbarkeit, Vielseitigkeit, Handlichkeit und gute Funktionalität dieses Vektorsystems, die in dieser Arbeit herausgearbeitet wurden, stellt ein wichtiges Instrument für die Grundlagenforschung dar, indem es die Vorteile verschiedener Vektorsysteme in einem kombiniert.

8. Zusammenfassung

Die induzierbare Expression verschiedener zu untersuchender Gene stellt ein sehr wichtiges Untersuchungsmittel der Genprodukte und damit zusammenhängender Prozesse dar. Viele bisherige Arbeiten haben neue und sehr innovative Methoden entwickelt, die eine induzierbare Expression ermöglichen. Diese Arbeit sollte aus der Kombination einzelner Methoden ein modulares sowie gut und leicht zu händelndes System entwickeln.

Mit dieser Arbeit konnte ein mit der Modularität und Vielseitigkeit der LeGO-Vektoren ausgestattetes induzierbare lentivirales Vektorsystem entwickelt werden, dessen Eigenschaften einen Einsatz in vielerlei Bereichen zulassen, wobei die Struktur und Funktionsweise eine hohe Vielseitigkeit sowie eine bessere Vergleichbarkeit der Anwendung ermöglichen. Durch die Vielzahl an Restriktionsschnittstellen, in die eine Reihe an Fluoreszenzmarkern, Resistenzgenen, Promotoren, Regulationsfaktoren und Transgenen passend einkloniert werden kann, ist dieser Vektor eine wichtige Entwicklung. Zudem stellen die Erweiterungen dieses Vektorsystems durch sekundäre Markerregulation neue Möglichkeiten in der Vektorgestaltung dar, die die Herstellung gut induzierbarer Zellen deutlich verkürzen und erleichtern können.

Diese Vektorplattform mit den in dieser Arbeit beschriebenen Vorteilen, wie Modularität, simultane Transgen- und Markerexpression mit der Möglichkeit zur shRNA-Expression, guter Expression, hoher Induzierbarkeit und stabilem Induktionsverhalten bildet somit eine vielversprechende Basis für den vielfältigen Einsatz in Grundlagenforschung und möglicherweise auch in klinischen Bereichen.

9. Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosindesaminase
AIDS	Engl . aquired immune D deficiency syndrome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Engl. cluster of differentiation
cDNA	Engl. complementary DNA
С	Centi (10 ⁻²)
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	Engl. central polypurine tract
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl. desoxyribonuclein acid
ED	Effektivdosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Elongationsfaktor 1a-Promotor
env	Engl. envelope
etc.	Et cetera
FACS	Engl. fluorescence activated cell sorting
FBS	Engl. fetal bovine serum
g	Gramm
xg	Gravitationskraft
gag	Engl. group specific antigens
H ₂ O	Wasser
HBS	Engl. hepes buffered saline
HC1	Chlorwasserstoff
HEK	Engl. Human embryonic kidney
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HEPES	2-N-Hydroxyethylpiperazin-2- Ethansulfonsäure
hUBC	Humaner Ubiquitinpromoter
IRES	Engl. internal ribosomal entry side
K	Kelvin
kDA	KiloDalton

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
1	Liter
LeGO	Engl. lentiviral gene ontology
LTR	Engl. long terminal repeat
М	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
m	Milli (10 ⁻³)
min	Minute(n)
MLV	Engl. murine leukemia virus
MOI	Engl. multiplicity of infection
MRT	Magnetresonanztomografie
N	Nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
ORF	Engl. open reading frame
р	Pico (10 ⁻¹²)
PCR	Engl. polyerase chain reaction
pI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PolyA	Polyadenylierungssignal
pol	Polymerase
Rev	Engl. regulator of virion expression
RTC	Reversetranskriptionskomplex
RNA	Engl. ribonuclein acid
rpm	Engl. rounds per minute
RRE	Rev responsive element
S.	Seite(n)
SCID	Engl. severe combined
	Immunodefiency
SFFV	Engl. Spleen Focus Forming Virus
shRNA	Engl. short hairpin-RNA
SIN	Selbst-Inaktivierend
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tCD34	trunkierte Form des Ober-
	flächenproteins CD34
tRNA	Transfer-RNA

U	Engl. units
U	Engl. unique
VSV-G	Glykoprotein des Vesikular-
	Stomatitis-Virus
wPRE	Engl. woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Ψ(PSI)	Engl. packaging signal
μ	micro (10^{-6})

10. Literaturverzeichnis

Andersen, J. B.; Sternberg, C.; Poulsen, L. K.; Bjorn, S. P.; Givskov, M.; Molin, S. (1998): New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), S. 2240–2246.

Ansong, Charles; Purvine, Samuel O.; Adkins, Joshua N.; Lipton, Mary S.; Smith, Richard D. (2008): Proteogenomics: needs and roles to be filled by proteomics in genome annotation. In: *Briefings in functional genomics proteomics* 7 (1), S. 50–62.

Azzouz, M.; Mazarakis, N. (2004): Non-primate EIAV-based lentiviral vectors as gene delivery system for motor neuron diseases. In: *Curr Gene Ther* 4 (3), S. 277–286.

Banaszynski, Laura A.; Chen, Ling-Chun; Maynard-Smith, Lystranne A.; Ooi, A. G. Lisa; Wandless, Thomas J. (2006): A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. In: *Cell* 126 (5), S. 995–1004.

Banaszynski, Laura A.; Liu, Corey W.; Wandless, Thomas J. (2005): Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. In: J. Am. Chem. Soc. 127 (13), S. 4715–4721.

Banaszynski, Laura A.; Sellmyer, Mark A.; Contag, Christopher H.; Wandless, Thomas J.; Thorne, Steve H. (2008): Chemical control of protein stability and function in living mice. In: *Nat. Med.* 14 (10), S. 1123–1127.

Banaszynski, Laura A.; Wandless, Thomas J. (2006): Conditional control of protein function. In: *Chem. Biol.* 13 (1), S. 11–21.

Barde, Isabelle; Zanta-Boussif, Maria Antonietta; Paisant, Sylvain; Leboeuf, Marylene; Rameau, Philippe; Delenda, Christophe; Danos, Olivier (2006): Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. In: *Mol. Ther* 13 (2), S. 382–390.

Barese, Cecilia N.; Dunbar, Cynthia E. (2011): Contributions of Gene Marking to Cell and Gene Therapies. In: *Human Gene Therapy* 22 (6), S. 659–668.

Baum, Christopher; Dullmann, Jochen; Li, Zhixiong; Fehse, Boris; Meyer, Johann; Williams, David A.; Kalle, Christof von (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. In: *Blood* 101 (6), S. 2099–2114.

Benabdellah, Karim; Cobo, Marién; Muñoz, Pilar; Toscano, Miguel G.; Martin, Francisco; van Wijnen, Andre (2011): Development of an All-in-One Lentiviral Vector System Based on the Original TetR for the Easy Generation of Tet-ON Cell Lines. In: *PLoS ONE* 6 (8), S. e23734.

Bhanot, Haymanti; Young, Ashley M.; Overmeyer, Jean H.; Maltese, William A. (2010): Induction of nonapoptotic cell death by activated Ras requires inverse regulation of Rac1 and Arf6. In: *Mol. Cancer Res.* 8 (10), S. 1358–1374.

Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M. et al. (1995): T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5235), S. 475–480.

Bochkov, Yury A.; Palmenberg, Ann C. (2006): Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. In: *BioTechniques* 41 (3), S. 283-4, 286, 288 passim.

Brandt, C. (2004): Metapher und Experiment: von der Virusforschung zum genetischen Code: Wallstein-Verlag. Online verfügbar unter http://books.google.de/books?id=tZzQXtH9oDkC.

Bukovsky, A. A.; Song, J. P.; Naldini, L. (1999): Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. In: *J. Virol* 73 (8), S. 7087–7092.

Bukrinsky, M. I.; Sharova, N.; Dempsey, M. P.; Stanwick, T. L.; Bukrinskaya, A. G.; Haggerty, S.; Stevenson, M. (1992): Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89 (14), S. 6580–6584.

Bulliard, Y.; Wiznerowicz, M.; Barde, I.; Trono, D. (2006): KRAB Can Repress Lentivirus Proviral Transcription Independently of Integration Site. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (47), S. 35742–35746.

Burdach, Stefan (2006): Gentherapie. In: Helmut Gadner, Gerhard Gaedicke, Charlotte Niemeyer und Jörg Ritter (Hg.): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie: Springer Berlin Heidelberg, S. 620–633.

Burroughs, Lauri; Woolfrey, Ann (2010): Hematopoietic cell transplantation for treatment of primary immune deficiencies. In: *Cellular therapy and transplantation* 2 (8).

Chen, Weihsu Claire; Huang, Leaf (2005): Non-viral vector as vaccine carrier. In: *Advances in genetics* 54, S. 315–337.

Chinnasamy, Dhanalakshmi; Milsom, Michael D.; Shaffer, James; Neuenfeldt, James; Shaaban, Aimen F.; Margison, Geoffrey P. et al. (2006): Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. In: *Virol J* 3 (1), S. 14.

Clackson, T. (1997): Controlling mammalian gene expression with small molecules. In: *Curr Opin Chem Biol* 1 (2), S. 210–218.

Clamp, Michele; Fry, Ben; Kamal, Mike; Xie, Xiaohui; Cuff, James; Lin, Michael F. et al. (2007): Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49), S. 19428–19433.

Curran, M. A.; Kaiser, S. M.; Achacoso, P. L.; Nolan, G. P. (2000): Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. In: *Mol. Ther* 1 (1), S. 31–38.

Deichsel, H.; Friedel, S.; Detterbeck, A.; Coyne, C.; Hamker, U.; MacWilliams, H. K. (1999): Green fluorescent proteins with short half-lives as reporters in Dictyostelium discoideum. In: *Dev. Genes Evol.* 209 (1), S. 63–68.

Delviks-Frankenberry, Krista; Galli, Andrea; Nikolaitchik, Olga; Mens, Helene; Pathak, Vinay K.; Hu, Wei-Shau (2011): Mechanisms and Factors that Influence High Frequency Retroviral Recombination. In: *Viruses* 3 (9), S. 1650–1680.

Deuschle, U.; Meyer, W. K.; Thiesen, H. J. (1995a): Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (4), S. 1907–1914.

Donnelly, M. L.; Hughes, L. E.; Luke, G.; Mendoza, H.; Dam, E. ten; Gani, D.; Ryan, M. D. (2001): The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. In: *J. Gen. Virol* 82 (Pt 5), S. 1027–1041.

Douin, Victorine; Bornes, Stephanie; Creancier, Laurent; Rochaix, Philippe; Favre, Gilles; Prats, Anne-Catherine; Couderc, Bettina (2004): Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. In: *BMC Biotechnol* 4, S. 16.

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

Eisenberg, D.; Marcotte, E. M.; Xenarios, I.; Yeates, T. O. (2000): Protein function in the post-genomic era. In: *Nature* 405 (6788), S. 823–826.

Erkeland, Stefan J.; Verhaak, Roel G. W.; Valk, Peter J. M.; Delwel, Ruud; Löwenberg, Bob; Touw, Ivo P. (2006): Significance of murine retroviral mutagenesis for identification of disease genes in human acute myeloid leukemia. In: *Cancer Res* 66 (2), S. 622–626.

Favre, David; Blouin, Véronique; Provost, Nathalie; Spisek, Radec; Porrot, Françoise; Bohl, Delphine et al. (2002): Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. In: *J. Virol.* 76 (22), S. 11605–11611.

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

Fehse, B.; Kustikova, O. S.; Li, Z.; Wahlers, A.; Bohn, W.; Beyer, W. R. et al. (2002): A novel 'sort-suicide' fusion gene vector for T cell manipulation. In: *Gene Ther.* 9 (23), S. 1633–1638.

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

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

Felipe, P. de (2002): Polycistronic viral vectors. In: Curr Gene Ther 2 (3), S. 355–378.

Felipe, P. de; Martin, V.; Cortes, M. L.; Ryan, M.; Izquierdo, M. (1999): Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy. In: *Gene Ther* 6 (2), S. 198–208.

Felipe, Pablo de; Izquierdo, Marta (2003): Construction and characterization of pentacistronic retrovirus vectors. In: *J. Gen. Virol* 84 (Pt 5), S. 1281–1285.

Felipe, Pablo de; Ryan, Martin D. (2004): Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. In: *Traffic* 5 (8), S. 616–626.

Fussenegger, M. (2001): The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. In: *Biotechnol. Prog* 17 (1), S. 1–51.

Gadner, Helmut; Gaedicke, Gerhard; Niemeyer, Charlotte; Ritter, Jörg (Hg.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie: Springer Berlin Heidelberg.

Gao, Steven Y.; Jack, Michelle M.; O'Neill, Christopher; van Wijnen, Andre (2012): Towards Optimising the Production of and Expression from Polycistronic Vectors in Embryonic Stem Cells. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e48668.

Gardlik, Roman; Palffy, Roland; Hodosy, Julius; Lukacs, Jan; Turna, Jan; Celec, Peter (2005): Vectors and delivery systems in gene therapy. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 11 (4), S. RA110-21.
Gascon, Sergio; Paez-Gomez, Juan A.; Diaz-Guerra, Margarita; Scheiffele, Peter; Scholl, Francisco G. (2008): Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. In: *J Neurosci Methods* 168 (1), S. 104–112.

Giry-Laterrière, Marc; Cherpin, Ophélie; Kim, Yong-Sik; Jensen, Jan; Salmon, Patrick (2011): Polyswitch lentivectors: "all-in-one" lentiviral vectors for drug-inducible gene expression, live selection, and recombination cloning. In: *Hum. Gene Ther.* 22 (10), S. 1255–1267.

Gossen, M.; Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89 (12), S. 5547–5551.

Grieger, Joshua C.; Samulski, R. Jude (2012): Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. In: *Methods Enzymol* 507, S. 229–254.

Haack, Karin; Cockrell, Adam S.; Ma, Hong; Israeli, David; Ho, Steffan N.; McCown, Thomas J.; Kafri, Tal (2004): Transactivator and structurally optimized inducible lentiviral vectors. In: *Mol. Ther* 10 (3), S. 585–596.

Hacein-Bey-Abina, S.; Kalle, C. von; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P. et al. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. In: *Science* 302 (5644), S. 415–419.

Hacein-Bey-Abina, Salima; Le Deist, Françoise; Carlier, Frédérique; Bouneaud, Cécile; Hue, Christophe; Villartay, Jean-Pierre de et al. (2002): Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. In: *N. Engl. J. Med* 346 (16), S. 1185–1193.

Hanawa, Hideki; Persons, Derek A.; Nienhuis, Arthur W. (2005): Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. In: *J. Virol* 79 (13), S. 8410–8421.

Haugwitz, Michael; Nourzaie, Omar; Gandlur, Suvarna; Sagawa, Hiroaki (2008): ProteoTuner: a novel system with rapid kinetics enables reversible control of protein levels in cells and organisms. In: *BioTechniques* 44 (3), S. 432–433.

Heinz, Niels; Schambach, Axel; Galla, Melanie; Maetzig, Tobias; Baum, Christopher; Loew, Rainer; Schiedlmeier, Bernhard (2011): Retroviral and transposon-based tet-regulated all-inone vectors with reduced background expression and improved dynamic range. In: *Hum. Gene Ther.* 22 (2), S. 166–176.

Helseth, E.; Kowalski, M.; Gabuzda, D.; Olshevsky, U.; Haseltine, W.; Sodroski, J. (1990): Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. In: *J. Virol* 64 (5), S. 2416–2420.

Hengge, U. R.; Walker, P. S.; Vogel, J. C. (1996): Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. In: *The Journal of clinical investigation* 97 (12), S. 2911–2916.

Hillen, W.; Berens, C. (1994): Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. In: *Annu. Rev. Microbiol* 48, S. 345–369.

Holst, Jeff; Szymczak-Workman, Andrea L.; Vignali, Kate M.; Burton, Amanda R.; Workman, Creg J.; Vignali, Dario A. A. (2006): Generation of T-cell receptor retrogenic mice. In: *Nat Protoc* 1 (1), S. 406–417.

Hoshiya, Hidetoshi; Kazuki, Yasuhiro; Abe, Satoshi; Takiguchi, Masato; Kajitani, Naoyo; Watanabe, Yoshinori et al. (2009): A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (2), S. 309–317.

Huang, Y.; Liu, D. P.; Wu, L.; Li, T. C.; Wu, M.; Feng, D. X.; Liang, C. C. (2000): Proper developmental control of human globin genes reproduced by transgenic mice containing a 160-kb BAC carrying the human beta-globin locus. In: *Blood cells, molecules diseases* 26 (6), S. 598–610.

Hu, Chun-Song; Hong, Jun-Yan; Douglas, W. Losordo (2004): Principles of safety, efficacy and stability in gene therapy-review. In: *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 12 (3), S. 392–396.

Iuliucci, J. D.; Oliver, S. D.; Morley, S.; Ward, C.; Ward, J.; Dalgarno, D. et al. (2001): Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. In: *J Clin Pharmacol* 41 (8), S. 870–879.

Iwamoto, Mari; Bjorklund, Tomas; Lundberg, Cecilia; Kirik, Deniz; Wandless, Thomas J. (2010): A general chemical method to regulate protein stability in the mammalian central nervous system. In: *Chem Biol* 17 (9), S. 981–988.

Karlsson, Maria; Weber, Wilfried; Fussenegger, Martin (2012): Design and construction of synthetic gene networks in mammalian cells. In: *Methods Mol Biol* 813, S. 359–376.

Kawabata, K.; Takakura, Y.; Hashida, M. (1995): The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. In: *Pharmaceutical research* 12 (6), S. 825–830.

Kazuki, Y.; Hoshiya, H.; Takiguchi, M.; Abe, S.; Iida, Y.; Osaki, M. et al. (2010): Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. In: *Gene therapy*.

Keenan, T.; Yaeger, D. R.; Courage, N. L.; Rollins, C. T.; Pavone, M. E.; Rivera, V. M. et al. (1998): Synthesis and activity of bivalent FKBP12 ligands for the regulated dimerization of proteins. In: *Bioorg. Med. Chem.* 6 (8), S. 1309–1335.

Kerr WG. (2008): A role for SHIP in stem cell biology and transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*; 3 (2):99-106.

Kim, V. N.; Mitrophanous, K.; Kingsman, S. M.; Kingsman, A. J. (1998): Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. In: *J. Virol* 72 (1), S. 811–816.

Kinoshita, Kengo; Nakamura, Haruki (2003): Protein informatics towards function identification. In: *Current opinion in structural biology* 13 (3), S. 396–400.

Kustikova, Olga S.; Wahlers, Anke; Kuhlcke, Klaus; Stahle, Birgit; Zander, Axel R.; Baum, Christopher; Fehse, Boris (2003): Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. In: *Blood* 102 (12), S. 3934–3937.

Kustikova, Olga; Fehse, Boris; Modlich, Ute; Yang, Min; Düllmann, Jochen; Kamino, Kenji et al. (2005): Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. In: *Science* 308 (5725), S. 1171–1174.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J. et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921.

Lander, Eric S. (2011): Initial impact of the sequencing of the human genome. In: *Nature* 470 (7333), S. 187–197.

Latta-Mahieu, Martine; Rolland, Magali; Caillet, Catherine; Wang, Manping; Kennel, Philippe; Mahfouz, Irene et al. (2002): Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. In: *Hum Gene Ther* 13 (13), S. 1611–1620.

Lever, Andrew M. L.; Strappe, Padraig M.; Zhao, Jing (2004): Lentiviral vectors. In: *J. Biomed. Sci* 11 (4), S. 439–449.

Lewis, P.; Hensel, M.; Emerman, M. (1992): Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. In: *EMBO J* 11 (8), S. 3053–3058.

Li, Feng-Yen; Chaigne-Delalande, Benjamin; Kanellopoulou, Chrysi; Davis, Jeremiah C.; Matthews, Helen F.; Douek, Daniel C. et al. (2011): Second messenger role for Mg2+ revealed by human T-cell immunodeficiency. In: *Nature* 475 (7357), S. 471–476.

Lin, X.; Gately, D. P.; Hom, D.; Mishima, M.; Los, G.; Howell, S. B. (2001): Quantification of tumor cell injury in vitro and in vivo using expression of green fluorescent protein under the control of the GADD153 promoter. In: *Int. J. Cancer* 91 (4), S. 555–562.

Li, Zhixiong; Düllmann, Jochen; Schiedlmeier, Bernd; Schmidt, Manfred; Kalle, Christof von; Meyer, Johann et al. (2002): Murine leukemia induced by retroviral gene marking. In: *Science* 296 (5567), S. 497.

Logan, Aaron C.; Haas, Dennis L.; Kafri, Tal; Kohn, Donald B. (2004a): Integrated selfinactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. In: *J. Virol* 78 (16), S. 8421–8436.

Logan, Aaron C.; Nightingale, Sarah J.; Haas, Dennis L.; Cho, Gerald J.; Pepper, Karen A.; Kohn, Donald B. (2004b): Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. In: *Hum. Gene Ther* 15 (10), S. 976–988.

Lo, Tony C. T.; Barnhill, Lisa M.; Kim, Youngjin; Nakae, Elizabeth Ann; Yu, Alice L.; Diccianni, Mitchell B. (2009): Inactivation of SHIP1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia due to mutation and extensive alternative splicing. In: *Leuk. Res.* 33 (11), S. 1562–1566.

Lowery, Amanda; Onishko, Halina; Hallahan, Dennis E.; Han, Zhaozhong (2011): Tumortargeted delivery of liposome-encapsulated doxorubicin by use of a peptide that selectively binds to irradiated tumors. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 150 (1), S. 117–124.

Lufino, Michele M. P.; Edser, Pauline A. H.; Wade-Martins, Richard (2008): Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (9), S. 1525–1538.

Markusic, David; Oude-Elferink, Ronald; Das, Atze T.; Berkhout, Ben; Seppen, Jurgen (2005a): Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter. In: *Nucleic Acids Res* 33 (6), S. e63.

Markusic, David; Oude-Elferink, Ronald; Das, Atze T.; Berkhout, Ben; Seppen, Jurgen (2005b): Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter. In: *Nucleic Acids Res.* 33 (6), S. e63.

Martínez-Salas, E. (1999): Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. In: *Curr. Opin. Biotechnol* 10 (5), S. 458–464.

Mátrai, Janka; Chuah, Marinee K. L.; VandenDriessche, Thierry (2010): Recent advances in lentiviral vector development and applications. In: *Mol. Ther* 18 (3), S. 477–490.

Mazda, O.; Satoh, E.; Yasutomi, K.; Imanishi, J. (1997): Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors. In: *J. Immunol. Methods* 204 (2), S. 143–151.

McCarty, Douglas M.; Young, Samuel M.; Samulski, R. Jude (2004): Integration of adenoassociated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. In: *Annu. Rev. Genet* 38, S. 819–845.

Miller, D. G.; Adam, M. A.; Miller, A. D. (1990): Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. In: *Mol. Cell. Biol* 10 (8), S. 4239–4242.

Mitchell, Rick S.; Beitzel, Brett F.; Schroder, Astrid R. W.; Shinn, Paul; Chen, Huaming; Berry, Charles C. et al. (2004): Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. In: *PLoS Biol* 2 (8), S. E234.

Mitta, Barbara; Weber, Cornelia C.; Fussenegger, Martin (2005): In vivo transduction of HIV-1-derived lentiviral particles engineered for macrolide-adjustable transgene expression. In: *J Gene Med* 7 (11), S. 1400–1408.

Miyoshi, H.; Blömer, U.; Takahashi, M.; Gage, F. H.; Verma, I. M. (1998): Development of a self-inactivating lentivirus vector. In: *J. Virol* 72 (10), S. 8150–8157.

Modlich, Ute; Bohne, Jens; Schmidt, Manfred; Kalle, Christof von; Knöss, Sabine; Schambach, Axel; Baum, Christopher (2006): Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. In: *Blood* 108 (8), S. 2545–2553.

Modlich, Ute; Kustikova, Olga S.; Schmidt, Manfred; Rudolph, Cornelia; Meyer, Johann; Li, Zhixiong et al. (2005): Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. In: *Blood* 105 (11), S. 4235–4246.

Modrow, Susanne; Falke, Dietrich; Truyen, Uwe; Schätzl, Hermann (2010): Transformation und Tumorbildung. In: Molekulare Virologie: Spektrum Akademischer Verlag, S. 45–52. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5_6.

Montini, Eugenio; Cesana, Daniela; Schmidt, Manfred; Sanvito, Francesca; Ponzoni, Maurilio; Bartholomae, Cynthia et al. (2006): Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. In: *Nat. Biotechnol* 24 (6), S. 687–696.

Mosser, D. D.; Caron, A. W.; Bourget, L.; Jolicoeur, P.; Massie, B. (1997): Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. In: *BioTechniques* 22 (1), S. 150-4, 156, 158-61.

Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H. et al. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: *Science* 272 (5259), S. 263–267.

Naldini, L.; Verma, I. M. (2000): Lentiviral vectors. In: Adv. Virus Res 55, S. 599-609.

Newrzela, Sebastian; Cornils, Kerstin; Heinrich, Tim; Schläger, Julia; Yi, Ji-Hee; Lysenko, Olga et al. (2011): Retroviral insertional mutagenesis can contribute to immortalization of mature T lymphocytes. In: *Mol. Med.* 17 (11-12), S. 1223–1232.

Nienhuis, Arthur W.; Dunbar, Cynthia E.; Sorrentino, Brian P. (2006): Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. In: *Mol. Ther* 13 (6), S. 1031–1049.

O'Connor, Timothy P.; Crystal, Ronald G. (2006): Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. In: *Nature reviews. Genetics* 7 (4), S. 261–276.

Page, K. A.; Landau, N. R.; Littman, D. R. (1990): Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. In: *J. Virol* 64 (11), S. 5270–5276.

Palma, Michele de; Venneri, Mary Anna; Naldini, Luigi (2003): In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. In: *Hum. Gene Ther* 14 (12), S. 1193–1206.

Pauwels, Katia; Gijsbers, Rik; Toelen, Jaan; Schambach, Axel; Willard-Gallo, Karen; Verheust, Céline et al. (2009): State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. In: *Curr Gene Ther* 9 (6), S. 459–474.

Pluta, Krzysztof; Kacprzak, Magdalena Marta (2009): Use of HIV as a gene transfer vector. In: *Acta Biochim. Pol* 56 (4), S. 531–595.

Preukschas, Michael; Hagel, Christian; Schulte, Alexander; Weber, Kristoffer; Lamszus, Katrin; Sievert, Henning et al. (2012): Expression of Eukaryotic Initiation Factor 5A and Hypusine Forming Enzymes in Glioblastoma Patient Samples: Implications for New Targeted Therapies. In: *PLoS ONE* 7 (8), S. e43468.

Quinonez, Ricardo; Sutton, Richard E. (2002): Lentiviral vectors for gene delivery into cells. In: *DNA Cell Biol* 21 (12), S. 937–951.

Raper, Steven E.; Chirmule, Narendra; Lee, Frank S.; Wivel, Nelson A.; Bagg, Adam; Gao, Guang-ping et al.(2003): Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. In: *Mol. Genet. Metab* 80 (1-2), S. 148–158.

Rees, S.; Coote, J.; Stables, J.; Goodson, S.; Harris, S.; Lee, M. G. (1996): Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. In: *BioTechniques* 20 (1), S. 102-4, 106, 108-10.

Reiser, J.; Lai, Z.; Zhang, X. Y.; Brady, R. O. (2000): Development of multigene and regulated lentivirus vectors. In: *J Virol* 74 (22), S. 10589–10599.

Reuter, Peter; Brand, K. (2006): Gentransfer und Gentherapie. In: Springer Lexikon Diagnose & Therapie: Springer Berlin Heidelberg, S. 465–474. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/3-540-37357-8_33.

Rivera, V. M.; Clackson, T.; Natesan, S.; Pollock, R.; Amara, J. F.; Keenan, T. et al. (1996): A humanized system for pharmacologic control of gene expression. In: *Nat Med* 2 (9), S. 1028–1032.

Roe, T.; Reynolds, T. C.; Yu, G.; Brown, P. O. (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. In: *EMBO J* 12 (5), S. 2099–2108.

Sadaie, M. R.; Zamani, M.; Whang, S.; Sistron, N.; Arya, S. K. (1998): Towards developing HIV-2 lentivirus-based retroviral vectors for gene therapy: dual gene expression in the context of HIV-2 LTR and Tat. In: *J. Med. Virol* 54 (2), S. 118–128.

Sattler, M.; Verma, S.; Byrne, C. H.; Shrikhande, G.; Winkler, T.; Algate, P. A. et al. (1999a): BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (11), S. 7473–7480.

Sattler, M.; Verma, S.; Byrne, C. H.; Shrikhande, G.; Winkler, T.; Algate, P. A. et al. (1999b): BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (11), S. 7473–7480.

Schmoll, Hans-Joachim; Höffken, Klaus; Possinger, Kurt (Hg.) (2006): Gen- und "Anti"-Gentherapie. In: Kompendium Internistische Onkologie: Springer Berlin Heidelberg, S. 836–846. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/3-540-31303-6_53.

Schnell, T.; Foley, P.; Wirth, M.; Münch, J.; Uberla, K. (2000): Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. In: *Hum. Gene Ther* 11 (3), S. 439–447.

Schröder, Astrid R. W.; Shinn, Paul; Chen, Huaming; Berry, Charles; Ecker, Joseph R.; Bushman, Frederic (2002a): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. In: *Cell* 110 (4), S. 521–529.

Schröder, Astrid R. W.; Shinn, Paul; Chen, Huaming; Berry, Charles; Ecker, Joseph R.; Bushman, Frederic (2002b): HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. In: *Cell* 110 (4), S. 521–529.

Schulz, Thomas F. (2009): Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2). In: Helmut Hahn, Stefan H. E. Kaufmann, Thomas F. Schulz und Sebastian Suerbaum (Hg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 520–535. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-46362-7_67.

Sellmyer, Mark A.; Thorne, Steve H.; Banaszynski, Laura A.; Contag, Christopher H.; Wandless, Thomas J. (2009): A general method for conditional regulation of protein stability in living animals. In: *Cold Spring Harb Protoc* 2009 (3), S. pdb.prot5173.

Seow, Yiqi; Wood, Matthew J. (2009): Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (5), S. 767–777.

Sirin, Olga; Park, Frank (2003): Regulating gene expression using self-inactivating lentiviral vectors containing the mifepristone-inducible system. In: *Gene* 323, S. 67–77.

Staal, F. J. T.; Pike-Overzet, K.; Ng, Y. Y.; van Dongen, J. J. M. (2008): Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: a question of vectors, inserts and dosage? In: *Leukemia* 22 (10), S. 1849–1852.

Stepanenko, Olesya V.; Stepanenko, Olga V.; Shcherbakova, Daria M.; Kuznetsova, Irina M.; Turoverov, Konstantin K.; Verkhusha, Vladislav V. (2011): Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. In: *BioTechniques* 51 (5), S. 313-4, 316, 318 passim.

Stocking C; Bergholz U; Friel J; Klingler K; Wagener T; Starke C; Kitamura T; Miyajima A; Ostertag W (1993): Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. In: *Growth Factors* 8 (3):197-209

Sutlu, Tolga; Nyström, Sanna; Gilljam, Mari; Stellan, Birgitta; Applequist, Steven E.; Alici, Evren (2012): Inhibition of Intracellular Antiviral Defense Mechanisms Augments Lentiviral Transduction of Human Natural Killer Cells: Implications for Gene Therapy. In: *Human Gene Therapy* 23 (10), S. 1090–1100.

Szulc, Jolanta; Wiznerowicz, Maciej; Sauvain, Marc-Olivier; Trono, Didier; Aebischer, Patrick (2006): A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. In: *Nat. Methods* 3 (2), S. 109–116.

Szymczak, Andrea L.; Workman, Creg J.; Wang, Yao; Vignali, Kate M.; Dilioglou, Smaroula; Vanin, Elio F.; Vignali, Dario A. A. (2004): Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. In: *Nat. Biotechnol* 22 (5), S. 589–594. Tai, Khalid; Quintino, Luis; Isaksson, Christina; Gussing, Fredrik; Lundberg, Cecilia (2012): Destabilizing domains mediate reversible transgene expression in the brain. In: *PLoS ONE* 7 (9), S. e46269.

Takahashi, Kyoichi; Luo, Tianci; Saishin, Yoshitsugu; Saishin, Yumiko; Sung, Jennifer; Hackett, Sean et al. (2002): Sustained transduction of ocular cells with a bovine immunodeficiency viral vector. In: *Hum. Gene Ther* 13 (11), S. 1305–1316.

Thornhill, Susannah I.; Schambach, Axel; Howe, Steven J.; Ulaganathan, Meera; Grassman, Elke; Williams, David et al. (2008): Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. In: *Mol. Ther* 16 (3), S. 590–598.

Tian, J.; Andreadis, S. T. (2009): Independent and high-level dual-gene expression in adult stem-progenitor cells from a single lentiviral vector. In: *Gene Ther* 16 (7), S. 874–884.

Toniatti, C.; Bujard, H.; Cortese, R.; Ciliberto, G. (2004): Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. In: *Gene Ther* 11 (8), S. 649–657.

Urbinati, Fabrizia; Arumugam, Paritha; Higashimoto, Tomoyasu; Perumbeti, Anil; Mitts, Kyle; Xia, Ping; Malik, Punam (2009): Mechanism of Reduction in Titers From Lentivirus Vectors Carrying Large Inserts in the 3'LTR. In: *Mol Ther* 17 (9), S. 1527–1536.

Vigna, Elisa; Cavalieri, Simona; Ailles, Laurie; Geuna, Massimo; Loew, Rainer; Bujard, Hermann; Naldini, Luigi (2002): Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. In: *Mol Ther* 5 (3), S. 252–261.

Vilaboa, Nuria; Fenna, Mary; Munson, John; Roberts, Stephen M.; Voellmy, Richard (2005): Novel gene switches for targeted and timed expression of proteins of interest. In: *Mol. Ther* 12 (2), S. 290–298.

Vizcaino-Caston, Isaac; Wyre, Chris; Overton, Tim W. (2012): Fluorescent proteins in microbial biotechnology--new proteins and new applications. In: *Biotechnol Lett* 34 (2), S. 175–186.

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. In: *Gene Ther* 17 (4), S. 511–520.

Weber, Kristoffer; Bartsch, Udo; Stocking, Carol; Fehse, Boris (2008): A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. In: *Mol. Ther* 16 (4), S. 698–706.

Weber, Wilfried; Fussenegger, Martin (2006): Pharmacologic transgene control systems for gene therapy. In: *J Gene Med* 8 (5), S. 535–556.

Weber, Wilfried; Fux, Cornelia; Daoud-el Baba, Marie; Keller, Bettina; Weber, Cornelia C.; Kramer, Beat P. et al. (2002): Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. In: *Nat Biotechnol* 20 (9), S. 901–907.

Wei, C. M.; Gibson, M.; Spear, P. G.; Scolnick, E. M. (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. In: *J. Virol* 39 (3), S. 935–944.

Wiznerowicz, Maciej; Jakobsson, Johan; Szulc, Jolanta; Liao, Shunyao; Quazzola, Alexandra; Beermann, Friedrich et al. (2007): The Kruppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis. In: *J. Biol. Chem.* 282 (47), S. 34535–34541.

Wolff, Jon A.; Budker, Vladimir (2005): The mechanism of naked DNA uptake and expression. In: *Advances in genetics* 54, S. 3–20.

Wu, Xiaolin; Li, Yuan; Crise, Bruce; Burgess, Shawn M. (2003): Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. In: *Science* 300 (5626), S. 1749–1751.

Yamaguchi, Tomoyuki; Hamanaka, Sanae; Kamiya, Akihide; Okabe, Motohito; Kawarai, Mami; Wakiyama, Yukiko et al. (2012): Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. In: *PLoS ONE* 7 (7), S. e41007.

Yu, S. F.; Rüden, T. von; Kantoff, P. W.; Garber, C.; Seiberg, M.; Rüther, U. et al. (1986): Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83 (10), S. 3194–3198.

Zhang, Jing-Shi; Liu, Feng; Huang, Leaf (2005): Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. In: *Advanced drug delivery reviews* 57 (5), S. 689–698.

Zhou, Betty Ying; Ye, Zhaohui; Chen, Guibin; Gao, Zhigang Peter; Zhang, Yu A.; Cheng, Linzhao (2007): Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. In: *Stem Cells* 25 (3), S. 779–789.

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

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

11. Danksagung

Zum einen möchte ich allen Kollegen und Freunden aus dem Labor danken, die mich auf dem Weg zu dieser Arbeit begleitet haben, mich mit Rat und Tat unterstützten und diesen großen Einblick und ersten Schritt in die Wissenschaft ermöglichten

Herrn Prof. Dr. Boris Fehse möchte ich ganz besonders danken, dass er mich jungen begeisterten Studenten bei sich im Labor aufgenommen hat, und mir die Möglichkeit gab, in einem so innovativen und zukunftsträchtigen Forschungsgebiet Grundlagenforschung zu betreiben. Dabei gebührt ihm besonderem Dank, dass ich jederzeit mit einer Frage, einer Idee zur Diskussion in sein Zimmer kommen konnte und ich so sehr viel für die wissenschaftliche Arbeit und das wissenschaftliche Denken lernen konnte. Zudem ermöglichte er mir diese Ergebnisse auf dem ESGCT in Versailles vorzustellen.

Sehr großen Dank möchte ich gegenüber Dr. Stefan Horn betonen. Von Anfang an nahm er sich die Zeit sich intensiv mit mir, meinen Ergebnissen und meinen Ideen auseinander zu setzen. Er wies mich mit großer Sorgfalt in den Großteil der molekular- und zellbiologischen Methoden ein, sodass ich neben Kenntnis dieser Verfahren zu eigenständigem Arbeiten und Forschen angeleitet wurde, was von entscheidender Bedeutung war. Zudem half er bei der Auswertung einiger Versuche und pflegte sorgfältigst meine Zellen, als ich im Urlaub war.

Frau Dr. Kerstin Cornils und Herrn Dr. Kristoffer Rieken möchte ich sehr dafür danken, dass sie mir jederzeit mit ihrem Wissen zur Seite standen und für die insgesamt viele Stunden dauernden, kreativen Gespräche, die sich von innovativen Ideen für die Forschung bis zu neusten technischen Entwicklungen und neuer Musik erstreckten. Zudem stellte Dr. Rieken mir die so deklarierten Plasmide und Primer für die Klonierungen zur Verfügung.

Weiterhin möchte ich Frau PD Dr. Claudia Lange für ihre nüchternen, klaren und doch immer ermutigenden Anregungen danken. Sie konnte die Diskussionen über die Ergebnisse immer mit einem scharfen, weiterführenden Kommentar aufwerten.

Dr. med. Thomas Stübig danke ich für die vielen interessanten, philopophischen und weiterführenden wissenschaftlichen Gespräche, die wir abends und am Wochenende führen konnten.

Ich möchte Frau Dipl. Ing. Regine Thiel, Frau Melanie Lachmann und Constanze Siggel besonders dafür danken, dass sie immer wieder bereit waren, mit ihrer Erfahrung mir am FACS zur Seite zu stehen und mir die vielen spontanen Sort-Termine zu ermöglichen.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, besonders meinem Vater und meinen Geschwistern, und meinen Freunden danken. Sie haben mich stets unterstützt und gefördert und haben es überhaupt erst ermöglicht, dass ich so viele Abende und Wochenenden mich mit diesem spannenden Thema auseinandersetzen konnte. Besonderer Dank gebührt meinem Vater, der mir stets als Vorbild helfend zur Seite stand und mir mit seiner Erfahrung in jeder schwierigen Situation helfende und klärende Ratschläge gab. Zudem danke ich ihm dafür, dass er diese Arbeit Korrektur las.

Dieser Dank gilt auch meiner Freundin, Lisa-Kristin Eilers, die sich nicht nur die Zeit nahm diese Arbeit zu korrigieren, sondern mich auch immer durch die richtigen Worte zu unterstützen wusste.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V. möchte ich für die Unterstützung zur Kongressreise nach Versailles danken.

12. Lebenslauf

Enfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13. Bisherige Veröffentlichungen

Eigene Veröffentlichungen

Publikationen

Publikationen über das Thema der Dissertation sind in Arbeit

Beckmeier L, Klapdor R, Soergel P, Kundu S, Hillemanns P, Hertel H. Evaluation of active camera control systems in gynecological surgery: construction, handling, comfort, surgeries and results. Arch Gynecol Obstet. 2014 Feb;289(2):341-8. doi: 10.1007/s00404-013-3004-8

Klapdor R, Mücke J, Schneider M, Länger F, Gratz KF, Hillemanns P, Hertel H. Value and advantages of preoperative sentinel lymph node imaging with SPECT/CT in cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2014 Feb;24(2):295-302.

Isthmocervical labeling and SPECT/CT for optimized sentinel detection in endometrial cancer: technique, experience, and results: Mücke J*, Klapdor R*, Schneider M, Länger F, Gratz KF, Hillemanns P, Hertel H, submitted

Abstracts/Poster

Rüdiger Klapdor, Kristoffer Weber, Johannes Polke, Adele Mucci, Boris Fehse, Stefan Horn: Generation of LeGO-SWITCH, an inducible all-in-one lentiviral vector for stringent tetcontrollable gene expression. Human Gene Therapy 23 (10): A125-A126 (2012).

S. Horn, R. Klapdor, J. Polke, K. Riecken, A. Uhde, B. Fehse, Generation of a conditional cell transformation model by using novel all-in-one lentiviral vectors (LeGO-SWITCH) for stringent tet-controllable gene expression. XXth Annual Meeting, German Society for Gene Therapy, DG-GT, Ulm, Germany, March 20-22, 2014.

S. Horn, R. Klapdor, K. Riecken, J. Polke, A. Mucci, B. Fehse, Generation of LeGO-SWITCH, an all-in-one lentiviral vector for stringent tet-controllable gene expression. XIXth Annual Meeting, German Society for Gene Therapy DG-GT, Hamburg, Germany, February 28 –March 03, 2013.

S. Horn, R. Klapdor, K. Weber, J. Polke, A. Mucci, B. Fehse, Generation of LeGO-SWITCH, an all-in-one lentiviral vector for stringent tet-controllable gene expression. XIX. Wilsede Meeting: modern trends in human leukemia, Wilsede, Germany, June 16-20, 2012.

R. Klapdor, K. Weber, J. Polke, A. Mucci, B. Fehse, S. Horn. Generation of LeGO-SWITCH, an inducible all-in-one lentiviral vector for stringent tet-controllable gene expression. European Society for Gene and Cell Therapy ESGCT XXth Anniversary Congress, Versailles, France, October 25-29, 2012

14. Eidesstattliche Versicherung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

15. Anhang

Lentiviral Gene Ontology Vectors, http://www.LentiGO-Vectors.de

Transfection of 293T cells

- Calcium Phosphate transfection reagents (self-made or kits, e.g. Promega ProFection or Sigma #CAPHOS):
 - 2x Precipitation-buffer (2x HBS)
 - H₂O
 - 2.0M CaCl₂ (maybe 2.5M in some kits)
- Medium: DMEM with Glutamine and high Glucose (4.5g/l)
 - + 10% FBS
 - + 1mM Sodium Pyruvate
 - + 20mM HEPES (or 25mM)
 - + Penicillin/Streptomycin
- 25mM Chloroquine in PBS (= 1000x stock solution. Available e.g. from Sigma)

• Plasmids	 Vector-Plasmid: Gag/Pol-Plasmid: Rev-Plasmid: 	10 - 20 μg/dish (depends on specific construct) 10 μg/dish pMDLg/pRRE 5 μg/dish pRSV-Rev
	- Envelope-Plasmid: (only one of them)	2 μg/dish phCMV-VSV-G 8 μg/dish phCMV-RD114/TR 4 μg/dish Eco-Env (#522, K73) 4 μg/dish phCMV-GALV-C _{4070A}

Day 1:

• In the afternoon seed 5 x 10^6 293T cells per 10cm dish (one dish per vector construct)

Day 2:

Early:

- Thaw reagents and plasmids, they should be at room temperature. Warm up the medium.
- Dilute plasmids in water to 437.5µl then add 62.5µl 2,0M-CaCl₂-solution (or 50µl if 2.5M).
- Fill 500µl of 2x HBS into 15ml conical-bottom tube.
- Add DNA/CaCl₂-solution to 2x HBS drop wise, while blowing air through HBS with pasteur pipette.
- Incubate the mixture for 10 to 20min at room temperature.
- Remove old medium from the cells.
- Add 10ml medium including 25µM Chloroquine (the Chloroquine is used in this step only).
- Add DNA-mixture drop wise to the cells, swirl gently.
- Incubate the cells for 6-12h in incubator.

Late:

- Change medium to 8ml.
- From now on harvest the medium every ~12 hours, it contains the viral particles.

Day 3:

Early:

- Harvest the supernatant (supernatant 1) with a syringe and filter it through 0.45µm or 0.22µm syringe-filter into 2ml tubes. For the titration an additional tube with only ~300µl supernatant is needed.
- Add 8ml medium to the cells for the second supernatant.
- Quickly freeze the virus-containing supernatant at -80°C.

Late:

- Optional: Use fluorescence microscope to check transfection, cells should be already very bright.
- Harvest supernatant 2 in the same way (don't forget the small aliquot for the titration).
- Add 8ml medium over night.

Day 4:

- Early: harvest supernatant 3
- Late: harvest supernatant 4 and discard the cells.

Alternatively harvest only two supernatants every 24 hours, this is only recommended when using VSV-G. Use 10ml medium per supernatant in that case.

bereitgestellt von Kristoffer Riecken, auf <u>www.lentigo-vectors.de</u> (08.07.2013, 18:00Uhr)

December 13, 2007

Titration of Lenti-Vectors

- Medium: DMEM with Glutamine and high Glucose (4.5g/l)
 - + 10% FBS
 - + 1mM Sodium Pyruvate
 - + 20mM HEPES (or 25mM)
 - + Penicillin/Streptomycin
- 8mg/ml Polybrene in PBS (= 1000x stock solution. Available e.g. from Sigma)

Day 1:

- Seed 50,000 293T cells per well in 500µL medium in 24-well plate (or NIH-3T3 cells for Eco pseudotypes).
- Wait for the cells to attach (2 to 5 hours).
- Add Polybrene to final concentration of 8µg/ml (or change medium, 500µl per well with 8µg/ml Polybrene)
- Add viral particles containing supernatant to the cells, e.g. 1ul per well in triplicate. Doing this the first time try the following amounts: 0.1µl; 1µl; 10µl and 100µl per well (see information below).
- Centrifuge the plate for 1 hour, 1000g, 24°C.

Day 2:

• Change medium, use 1ml per well (without Polybrene).

Day 4:

• Analyze the cells in a flow cytometer and calculate the titer.

Calculation of the titer

The titer should be calculated from wells showing between 5% and 20% positive cells ideally. Higher transduction rates lead to multiple integrations per cell and thus underestimation of the titer [Fehse et al. 2004, Pois(s)on - it's a question of dose..., Gene Ther. 11(11)]. Therefore different amounts of supernatant have to be used for the titration, 0.1µl for high titer constructs (e.g. containing eGFP only) and 1µl for standard constructs. 10µl and up may be necessary for low titer constructs co-expressing problematic cDNAs.

T = N*P/V T: titer N: number of plated cells V: volume of added supernatant P: proportion of transduced cells

Example:

1µl of supernatant yielded 12% of GFP-positive cells. That means that at the time point of transduction 12% of the 50000 cells got transduced by a vector particle.

 $T = 50\ 000 \ * \ 0.12 \ / \ 0.001 ml = 6 \ x10^6 \ /ml$

It is difficult to compare the titer between different laboratories. For example some labs do not perform the centrifugation step (called spinoculation or spin-inoculation) or do not use Polybrene or use Protamine sulfate instead et cetera. Also very important is the cell type that is used for a titration, on different cell lines the titer may differ more than 10-fold. There is no "titer of a vector preparation", there is only a "titer of a vector preparation titrated under conditions XY on cell line Z".

bereitgestellt von Kristoffer Riecken, auf <u>www.lentigo-vectors.de</u> (08.07.2013, 18:00Uhr)

What is the "MOI"?

The <u>multiplicity of infection</u> is a common term which indicates the number of vector particles per cell used in a transduction. For example, a MOI of 1 means the addition 10^4 vector particles to 10^4 cells.

That's easy, but: The term MOI is used in two slightly different ways which may make a great difference:

A:

The transduced cell type is <u>the same</u> cell type that has been used for the titration. In this case a MOI of 1 results in a mean number of vector integrations per cell of 1 as estimated by quantitative PCR (assuming lentis can integrate in every step of cell cycle). The transduction rate in this case will be around 40 - 50% because of multiple integrations per cell [Fehse et al. 2004, Pois(s)on - it's a question of dose..., Gene Ther. 11(11)]. A MOI of 20 then results in a mean number of vector integrations per cell of 20. This is a strict interpretation of the term MOI.

B:

The transduced cell type is <u>not</u> the same cell type that has been used for the titration. In this case the MOI doesn't tell anything about the expectable transduction rate or the mean number of vector integrations per cell since the transducability/susceptibility of different cell types may differ far more than 10-fold. Now the MOI is used to specify the amount of vector used in an experiment, which is always dependant on the titration method in that specific lab. While Lab-A needs a MOI of 30 to transduce neurons to 20%, Lab-B may need a MOI of 110 – and both may mean the same but titer their vectors in a different way. In this experiment the neurons may have a mean number of vector integrations per cell below 1 although the MOI was 110.

bereitgestellt von Kristoffer Riecken, auf www.lentigo-vectors.de (08.07.2013, 18:00Uhr)