

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil A. Krüger

Vorgelegt über
den Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)

**Experimentelle Untersuchungen zum retroviralen Gentransfer in primäre
Chondrozyten des Kaninchens: Entwicklung konstitutiver und Tetrazyklin-
induzierbarer Expressionssysteme**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bettina Wagner

aus
Haan

München, 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM.....	2
2.1	Gentherapie.....	2
2.1.1	Einbringen von DNA in Zellen	3
2.1.1.1	Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie.....	3
2.1.1.2	Gentransfer: <i>Ex-vivo</i> oder <i>In-vivo</i>	4
2.1.2	Gentransfermethoden	4
2.1.2.1	Viraler Gentransfer	4
2.1.2.2	Nicht-viraler Gentransfer.....	6
2.1.3	Die Verwendung von Reportergenen	6
2.1.3.1	β -Galaktosidase	7
2.1.3.2	Green Fluorescent Protein	9
2.2	Retroviren	10
2.2.1	Einteilung	10
2.2.2	Biologie der Retroviren	10
2.2.2.1	Viruspartikel	10
2.2.2.2	Genom und Genomaufbau.....	12
2.2.2.3	Replikation.....	14
2.3	Retroviraler Gentransfer.....	16
2.3.1	Grundlagen des retroviralen Gentransfers.....	16
2.3.2	Verpackungssysteme	17
2.3.3	Vektordesign.....	19
2.3.4	Virushüllen	22
2.4	Regulierbare Genexpression.....	23
2.5	Gentransfer in Chondrozyten	27
2.5.1	Biologie der Chondrozyten.....	27
2.5.2	Grundlagen des Gentransfers in Chondrozyten.....	28
2.5.3	Humanes <i>Bone Morphogenic Protein-2</i>	30
3	MATERIAL UND METHODEN.....	32
3.1	Zielsetzung der Arbeit.....	32
3.2	Molekularbiologische Materialien und Methoden	34
3.2.1	Für Klonierungen verwendete Plasmide	34
3.2.2	Bakterienkultur	36
3.2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	36
3.2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	37
3.2.2.3	Transformation	37
3.2.3	Plasmidpräparation	38
3.2.3.1	Analytische Plasmidpräparation	38
3.2.3.2	Maxipräparation zur Präparation von Plasmid-DNA	38
3.2.3.3	Cäsium-Chlorid-Präparation von Plasmiden.....	38
3.2.4	Konzentrationsbestimmung gelöster DNA.....	41
3.2.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
3.2.4.2	Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung.....	41
3.2.5	Gelelektrophorese.....	41
3.2.6	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	42
3.2.6.1	Analytischer Restriktionsverdau.....	42
3.2.6.2	Präparativer Restriktionsverdau	43
3.2.7	DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen	43

3.2.8	Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA.....	43
3.2.9	Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA	44
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	44
3.3	Zellbiologische Materialien und Methoden.....	44
3.3.1	Verwendete Zelllinien	44
3.3.2	Methoden der Zellkultur.....	45
3.3.2.1	Medien und Zusätze.....	45
3.3.2.2	Zellkulturbedingungen.....	46
3.3.2.3	Zellpassage	46
3.3.2.4	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer	47
3.3.2.5	Das Tet-On-System	47
3.4	Retrovirale Methoden	47
3.4.1	Der retrovirale Vektor pBullet.....	47
3.4.2	Die Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen mittels Transfektion	48
3.4.3	Die Gewinnung retroviraler Überstände	50
3.4.4	Kryokonservierung viraler Überstände	51
3.4.5	Retrovirale Transduktion.....	51
3.4.6	Phoenix-Ampho: Verpackungszelllinie der dritten Generation	51
3.4.7	Die Generierung stabiler Retrovirus-Produzentenzellen mittels retroviraler Transduktion.....	52
3.4.8	Gewinnung retroviraler Überstände von Phoenix-Ampho Viruszelllinien	53
3.4.9	Titerbestimmung <i>nlslacZ</i> -exprimierender Retroviren	53
3.5	Analyse der Transgenexpression.....	54
3.5.1	Histochemischer LacZ Nachweis mittels X-Gal Färbung.....	54
3.5.2	Fotodokumentation.....	55
3.5.3	Durchflusszytometrie	55
3.5.3.1	Nachweis der <i>lacZ</i> Genexpression mittels Fluoreszein- β -D-Galaktopyranosid.....	56
3.5.3.2	Nachweis der <i>egfp</i> Genexpression mittels FACS-Analyse	57
3.5.4	Nachweis der <i>bone morphogenic protein-2</i> Genexpression.....	57
3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
3.7	Northern Blot-Analyse	59
3.7.1	Aufbereitung der Proben	59
3.7.2	Isolierung der Sonden.....	60
3.7.3	Auftrennung der Proben und „Blotting“	60
3.7.4	Hybridisierung	61
3.7.5	Entwicklung des Blots	63
3.8	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	63
3.9	Gewinnung der Knorpelbioplate und Implantation der besiedelten Schwämme	63
3.10	Präparation des Oberschenkelrollkamms und histologische Aufbereitung	64
3.11	Vektorprogramme	64
3.12	Statistische Auswertung	64
4	ERGEBNISSE.....	66
4.1	Klonierung konstitutiv exprimierender retroviraler Vektoren	66
4.1.1	Klonierung des Vektors pBulletLZ	66
4.1.2	Klonierung des Vektors pBulletBMP2.....	66
4.2	Generierung stabiler Phoenix-Ampho Zelllinien	68
4.2.1	Analyse der PhoeLZ Zelllinien	68
4.2.2	Titerbestimmung der PhoeLZ Zelllinien	69
4.2.3	Transduktion primärer Chondrozyten mit PhoeLZ Überständen.....	70
4.3	Transduktionen mit VSV.G-pseudotypisierten Retroviren	70
4.3.1	Titerbestimmung der VSV.G-pseudotypisierten Überstände.....	71

4.3.2	Transduktion primärer Chondrozyten mittels VSV.G-pseudotypisierter Retroviren...	72
4.3.3	Verlauf der Transgenexpression <i>in vitro</i>	73
4.3.4	Transgenexpression <i>in vivo</i>	76
4.4	Retroviraler Gentransfer des Wachstumsfaktors <i>hbmp-2</i>	76
4.5	Tetrazyklin-induzierbare Vektoren.....	82
4.5.1	Die Klonierung des retroviralen Vektors pBulletA.....	82
4.5.2	Klonierung Tetrazyklin-induzierbarer Vektoren.....	83
4.5.2.1	pBulletAR.....	83
4.5.2.2	pBulletARTS	84
4.5.2.2.1	Klonierung des Transgens <i>nslacZ</i> in pBulletARTS	84
4.5.2.2.2	Klonierung des Transgens <i>egfp</i> in pBulletARTS	84
4.5.2.3	pBulletARTAS-2	85
4.5.2.3.1	Klonierung des Transgens <i>nslacZ</i> in pBulletARTAS-2.....	85
4.5.2.3.2	Klonierung des Transgens <i>egfp</i> in pBulletARTAS-2.....	87
4.5.3	Zwischenklonierung: pRc/REGFP	87
4.6	Generierung stabiler Tetrazyklin-induzierbarer Phoenix-Ampho Zelllinien, Markergen <i>nslacZ</i>	88
4.6.1	Verwendung des GALV- <i>envelopes</i>	88
4.6.2	Verwendung des VSV.G- <i>envelopes</i>	90
4.7	Generierung stabiler Tetrazyklin-induzierbarer Phoenix-Ampho Zelllinien, Markergen <i>egfp</i>	92
4.8	Transduktion mit Tetrazyklin-induzierbaren Retroviren.....	93
4.8.1	Transduktionseffizienzen Tetrazyklin-induzierbarer Vektoren.....	94
4.8.2	Einfluss der Induktion auf den Prozentsatz transgenexprimierender Zellen.....	95
4.8.3	Einfluss der Induktion auf die Änderung der Transgenexpressionsstärke	96
4.8.4	Northern Blot-Analyse der transkriptionellen Aktivität der Tet-On-Vektoren.....	98
5	DISKUSSION	103
5.1	Diskussion des Gentransfers in primäre Kaninchenchondrozyten	103
5.2	Diskussion der Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren	107
5.3	Ausblick.....	113
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
7	SUMMARY	116
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	TABELLENVERZEICHNIS	143
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	144
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	145
12	DANKSAGUNG	150

1 EINLEITUNG

Verletzungen des Gelenkknorpels stellen nach wie vor ein großes Problem der Orthopädie dar: Da Gelenkknorpel nach Verletzungen nur eine begrenzte Fähigkeit zur Heilung haben, wird dieser oft nicht vollständig regeneriert. In Folge entstehen häufig Arthrosen. Neue, auf biotechnologischen Verfahren gestützte Therapieansätze wie autologe Chondrozytentransplantation oder Knorpelgewebezüchtungen konnten derzeit noch keine entscheidende Verbesserung im Rahmen der Knorpelregeneration erbringen (BRITTBERG et al., 2001).

Der Transfer von Wachstumsfaktorgenen in Chondrozyten stellt einen möglichen Lösungsansatz dar (EVANS und ROBBINS, 1995). Im Gegensatz zu der lokalen Applikation von rekombinanten Proteinen würde dieser Ansatz eine kontinuierliche Bereitstellung von Wachstumsfaktoren im Bereich der Gelenkknorpelläsion ermöglichen und könnte so zu verbesserten Resultaten führen. Die lokale und im Idealfall regulierte Sekretion von Wachstumsfaktoren durch transduzierte Zellen könnte auf diese Weise die Ergebnisse der Knorpeldefektheilung günstig beeinflussen.

Der effiziente Transfer der DNA und die adäquate Expression der eingebrachten Transgene spielen dabei eine entscheidende Rolle. Bei der Methode der Chondrozytentransplantation ist es nahe liegend, die Qualität des Reparaturgewebes durch *Ex-vivo*-Gentransfer in diese Zellen zu verbessern, während diese in der Zellkultur expandiert werden. Rekombinante Retroviren stellen eine Methode des viralen Gentransfers dar. Retroviraler Gentransfer zeichnet sich vor allem *in vitro* durch eine hohe Effizienz aus und führt infolge der Integration des Vektors in das zelluläre Genom zu einer stabilen Transgenexpression. Diese anhaltende Expression ist aber nicht in allen Fällen notwendig oder erwünscht: So ist nach Heilung eines Knorpeldefektes die konstante Expression des gentherapeutisch eingebrachten Wachstumsfaktors nicht erforderlich und zudem mit unbekanntem Risiken behaftet (CRYSTAL, 1995). Der Einsatz eines regulierbaren Systems für die Transgenexpression nach Gentransfer stellt eine Lösungsmöglichkeit dieses Problems dar.

In dieser Arbeit wird Gentransfer durch rekombinante Retroviren in primäre Chondrozyten des Kaninchens durchgeführt und für den Einsatz nicht-selektionierter Zellpopulationen für die Transplantation optimiert. Zunächst wird dabei das Markergen β -Galaktosidase verwendet, um Transfereffizienz und Transgenexpression zu evaluieren. In einem therapeutischen Ansatz wird anschließend das Gen für den Wachstumsfaktor *Bone Morphogenic Protein-2* transferiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung retroviraler Tetrazyklin-regulierbarer Vektoren, welche alle Elemente des Tet-On-Systems (GOSSEN und BUJARD, 1992; URLINGER et al., 2000) enthalten.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Gentherapie

Gentherapie ist das gezielte Einbringen funktionsfähigen genetischen Materials in Körperzellen mit therapeutischer Zielsetzung. Diese Zielsetzung kann wie z. B. bei monogenetischen Erkrankungen eine Substitutionstherapie darstellen, oder darin liegen, der Zelle eine zusätzliche Funktion zu vermitteln. Dies kann die Übertragung toxischer Gene, z. B. den Transfer der Herpes Simplex Thymidin Kinase (VILE et al., 1994; RAM et al., 1997) oder die gezielte Überexpression von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren (LIEBERMAN et al., 2002b) beinhalten.

Der Gedanke der Gentherapie existiert schon seit mehr als drei Jahrzehnten (TATUM, 1966). Fortschritte in der Methode des Gentransfers wurden erst in den späten 70er Jahren erzielt. Nach ersten genterapeutischen Erfolgen in Fruchtfliegen (RUBIN und SPRADLING, 1982) wurde 1984 die erste genterapeutische Heilung eines genetischen Defektes in Mäusen veröffentlicht, bei denen ein defizientes Wachstumshormon ersetzt werden konnte (HAMMER et al., 1984). Im Jahre 1990 wurde dann die erste Phase I-Gentherapie-Studie am Menschen durchgeführt (ANDERSON et al., 1990): Ziel war die genterapeutische Behandlung des ADA-Mangels mittels *Ex-vivo*-Gentransfer in autologe T-Zellen. Bis heute wurden bereits über 600 klinische Studien mit fast 3500 Patienten durchgeführt (www.WILEY.CO.UK/GENMED). Mit einem Anteil von > 60 % liegt der Schwerpunkt auf der Therapie von Krebserkrankungen, aber auch monogene Erkrankungen, die Therapie von Infektionserkrankungen (z. B. durch das humane Immundefizienz-Virus I, HIV I) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen eine Rolle. Der Gentransfer wird bevorzugt mit Hilfe viraler Vektoren durchgeführt. 1999 ereignete sich im Rahmen einer Studie der erste Todesfall eines Patienten nach adenoviralem Gentransfer, wobei dieser Zwischenfall auf Unzulänglichkeit der Indikationsstellung und Aufklärung zurückzuführen war (GRISHAM, 2000). Im Jahre 2000 wurden in zwei verschiedenen genterapeutischen Studien klinische Erfolge erzielt: Zum einen bei Patienten mit Hämophilie B nach Transfer des Gens für den Gerinnungsfaktor IX mittels Adeno-Assoziierter Viren (AAV) (KAY et al., 2000) und zum anderen bei der Therapie der X-gebundenen humanen Immunschwäche *severe combined immunodeficiency* (SCID) mittels retroviralem Gentransfer der gamma-c Untereinheit des Interleukin Rezeptors in Blutstammzellen (CAVAZZANA-CALVO et al., 2000; HACEIN-BEY-ABINA et al., 2002). Nach anfänglich guten Therapieerfolgen wurden im September 2002 alle weiteren klinischen Studien dieser Therapie gestoppt, da zwei der therapierten Kinder die klinischen

Zeichen einer akuten lymphoblastischen Leukämie zeigten (CHECK, 2002; HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003). Die Ursache war die monoklonale Vermehrung transgener T-Zellen, bei diesem Klon wurde die Integration des retroviralen Vektors in ein Allel des *lmo-2* Gens mit gleichzeitiger Aktivierung von dessen Genexpression festgestellt (SCHMIDT et al., 2002). Es ist bekannt, dass *lmo-2* eine Rolle bei der Entstehung lymphoblastischer Leukämien spielt, obwohl es als alleinige Ursache anscheinend nicht ausreicht (BAUM et al., 2003). Damit beschreibt dieser Fall das Bild der Insertionsmutagenese, ein mögliches Risiko des retroviralen Gentransfers. Die Bedeutung der Gentherapie für die Veterinärmedizin liegt zunächst in der Rolle des Tieres als Modell für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Humanmedizin. Eine darauf basierende Entwicklung neuer Therapieansätze für die Veterinärmedizin ist durchaus denkbar. Beispiele hierfür sind unter anderem Studien zur gentherapeutischen Behandlung der Osteoarthritis des Pferdes mittels adenoviraler Vektoren (FRISBIE et al., 2002) und die Therapie der Hämophilie B beim Hund durch AAV Vektoren (MOUNT et al., 2002). Von großer Bedeutung ist auch die Entwicklung auf DNA basierender Vakzinen. Neben Vakzinen gegen humane Erkrankungen wie HIV I (ROBINSON, 2002) werden auch gezielt Vakzinen für den veterinärmedizinischen Bereich entwickelt. Als Beispiele sind Vakzinen gegen Erkrankungen durch das feline Leukämie-Virus (FeLV) der Katzen (HANLON et al., 2001) und das equine Arteritis-Virus (EAV) der Pferde (GIESE et al., 2002) zu nennen.

2.1.1 Einbringen von DNA in Zellen

2.1.1.1 Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie

Grundsätzlich lassen sich bei der Gentherapie zwei Anwendungsgebiete unterscheiden: Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie. Somatische Therapie bezeichnet dabei die genetische Veränderung ausschließlich von somatischen Zellen (Körperzellen). Da die Keimzellen des Organismus dabei nicht verändert werden, können diese Veränderungen nicht an die nächste Generation weitervererbt werden und bleiben auf das Individuum beschränkt. Die Keimbahntherapie bezeichnet das Einbringen von Erbgut in Keimzellen (d. h. Ei- bzw. Samenzelle). Das aus solchen Zellen entstehende Individuum trägt diese Veränderung außer in den somatischen Zellen auch in der Keimbahn und vererbt diese an folgende Generationen. Methoden zur Veränderung der Keimbahn existieren bisher nur im Tiermodell und werden u. a. zur Erzeugung sogenannter transgener Tiere verwendet. Keimbahntherapie beim Menschen ist nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz verboten.

2.1.1.2 Gentransfer: *Ex-vivo* oder *In-vivo*

Zur Durchführung einer somatischen Gentherapie müssen bestimmte Zelltypen des Organismus gezielt gentechnisch verändert werden. Dabei kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Verfahren unterschieden werden (ANDERSON, 1998): *Ex-vivo*- und *In-vivo*-Gentransfer. Beim *Ex-vivo*-Gentransfer werden die Zellen aus dem Körper entnommen und *in vitro* mit einem Genvektor genetisch verändert. Diese Zellen werden anschließend wieder in den Körper implantiert. Beim *In-vivo*-Gentransfer wird der Genvektor direkt in den Zielorganismus, bzw. das Zielgewebe eingebracht.

2.1.2 Gentransfermethoden

Zur Einschleusung von DNA in Zellen stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung: der virale und der nicht-virale Gentransfer.

Der ideale Vektor für die Gentherapie sollte folgende Eigenschaften aufweisen (SOMIA und VERMA, 2000):

- 1) Einfache und effiziente Herstellung,
- 2) die Expression des transferierten Gens soll bedarfsgerecht sein,
- 3) keine Immunantwort gegen den Vektor,
- 4) keine Toxizität,
- 5) orts- bzw. zellspezifische Expression und
- 6) die Kapazität des Vektors muss für einen Gentransfer ausreichend sein.

Keines der zur Zeit verfügbaren Vektorsysteme erfüllt alle diese Anforderungen. Die Wahl des verwendeten Vektorsystems hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. Wichtig ist zum Beispiel die für einen Effekt notwendige Dauer und Höhe der Transgenexpression und die Möglichkeiten der Vektorapplikation.

2.1.2.1 Viraler Gentransfer

Das Einbringen genetischen Materials in Zellen mittels viraler Vektoren wird als Infektion oder auch Transduktion bezeichnet. Ein viraler Vektor besteht aus einem menschen- oder tierpathogenen Virus, das für die Übertragung eines heterologen (fremden) Gens verändert wurde. Neben der Einführung des zu transportierenden Gens stehen dabei Veränderungen, welche die Pathogenität des Virus betreffen, im Vordergrund. Virale Vektoren für die Gentherapie enthalten in der Regel nur die für die Therapie notwendigen genetischen Informationen, d. h. das Fremdgen und die für eine Infektion notwendige Sequenzen. So enthalten lentivirale Vektoren der neuesten Generation weniger als 5 % des viralen HIV I Genoms

SCHRIFTTUM

(ZUFFEREY et al., 1997). Beim viralen Gentransfer nutzt man die natürliche Infektionsmaschinerie der Viren aus, um die Gene effizient in eine Zelle zu bringen. Da Virusreplikation nur in tierischen- bzw. menschlichen Zellen möglich ist, findet die Generierung viraler Vektoren durch Zellkulturverfahren statt.

Eine Übersicht über die gängigen viralen Vektoren wird in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Eigenschaften viraler Vektorsysteme

(Verändert nach VERMA und SOMIA, 1997; BRAND und STRAUSS, 1998; ROMANO et al., 2000)

kb: Kilobasen

	Retroviren	Lentiviren	Adenoviren	Adeno-assozierte Viren	Vaccinia Viren
maximale Größe des Transgens	7-8 kb	7-8 kb	7-8 kb	4 kb	25 kb
Virustiter (infektiöse Viren/ml)	$10^6 - 10^7$	$10^6 - 10^7$	$> 10^{11}$	$\sim 10^6$	
Weg des Gentransfers	<i>ex vivo</i>	<i>ex vivo/ in vivo</i>	<i>ex vivo/ in vivo</i>	<i>ex vivo/ in vivo</i>	<i>ex vivo/ in vivo</i>
Infektion sich nicht teilender Zellen	nein	ja	ja	ja	ja
Integration	ja	ja	nein	ja	nein
Expressionsdauer	+++	+++	+ / ++	+++	+
Expressionsstärke	+	+	+++	++	+++
Nachteile	Insertionsmutagenese Positionsabhängige Expressionsstärke Bildung replikationskompetenter Viren	Insertionsmutagenese Positionsabhängige Expressionsstärke Bildung replikationskompetenter Viren	bestehende Immunität gegen Adenoviren <i>in vivo</i> / Immunreaktionen	Helfervirus für die Virusproduktion notwendig	aufwendige Herstellung

2.1.2.2 Nicht-viraler Gentransfer

Aufgrund einiger nur schwer überwindbarer Probleme viraler Vektorsysteme, haben nicht-virale Systeme zunehmend an Bedeutung gewonnen. Derart transferierte DNA wird nur in den seltensten Fällen stabil in das zelluläre Genom integriert (LEDLEY, 1995), was in einer transienten Genexpression resultiert. Im Unterschied zum viralen Gentransfer wird nicht-viraler Gentransfer als Transfektion bezeichnet.

Die einfachste Form des nicht-viralen Gentransfers ist die Verwendung nackter DNA. *In vivo* injizierte DNA kann von Zellen aufgenommen werden und exprimiert werden (WOLFF et al., 1990). Die hier nur kurzzeitige Expression ist ausreichend für die Entwicklung von DNA Vakzinen (HANLON et al., 2001; GIESE et al., 2002). Um Gentransfer und -expression effizienter zu machen, wurden zusätzlich physikalische Methoden entwickelt. Hierzu zählen die sogenannte „gene gun“ Methode, bei der an Goldpartikel gebundene DNA in Gewebe oder Zellen geschossen wird (YANG et al., 1990) und die Elektroporation (elektrischer Impuls zur Öffnung der Zellmembran) (ROLS et al., 1998). Weitere nicht-virale Transfermethoden werden biochemisch durchgeführt. Dazu gehört die Lipofektion, bei der negativ geladene DNA an positiv geladene Lipide gebunden wird (FELGNER et al. 1987). Die so entstehenden positiv geladenen Komplexe können *in vitro* und *in vivo* besser von Zellen aufgenommen werden. Die DNA verbleibt dann episomal im Zytoplasma, d. h. sie wird nicht in das zelluläre Genom integriert. Eine Limitation in der Verwendung nicht-viraler Gentransfermethoden liegt in der meist geringen Transfereffizienz und in der transienten, vergleichsweise schwachen Transgenexpression.

2.1.3 Die Verwendung von Reportergenen

Für die Kontrolle des Gentransfers werden Reportergene (auch Markergene genannt) verwendet, die in die Zielzellen eingebracht werden. Solche Gene kodieren zum Beispiel für Enzyme, deren Aktivität nachgewiesen werden kann, oder für ein Protein, welches detektiert wird. Dadurch können Lokalisation, Höhe und Dauer der Genexpression dargestellt werden. Reportergene können von einem Genvektor als alleiniges Transgen, zusätzlich zu einem zweiten Transgen oder fusioniert an ein zweites Gen exprimiert werden. An ein Reportergen werden verschiedene Anforderungen gestellt (KAIN und GANGULY, 2001):

- 1) Das Reporterprotein soll im normalen Zustand nicht im Organismus der Zelle vorhanden oder leicht von endogenen Versionen unterscheidbar sein,
- 2) die Detektion des Reporterproteins soll einfach, schnell und sensitiv sein,

- 3) Änderungen der Reporterkonzentration müssen sicher nachgewiesen werden können und
- 4) das Reporterprotein darf nicht toxisch sein.

Es wurden verschiedene Reportersysteme entwickelt, die diesen Anforderungen in unterschiedlicher Weise gerecht werden. Ein Überblick über einige gebräuchliche Reportergene wird in Tabelle 2 gegeben. Die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Reportergene *β-galactosidase* und *enhanced green fluorescent protein* werden in den Kapiteln 2.1.3.1 und 2.1.3.2 näher beschrieben. Im Folgenden wird für die Bezeichnung einer Gensequenz immer die kursive Schreibweise in kleinen Buchstaben verwendet, während das zugehörige Protein in normaler Schrift mit großem Anfangsbuchstaben geschrieben wird.

2.1.3.1 β-Galaktosidase

Das *lacZ* Gen von *Escherichia coli* (*E. coli*) kodiert für das Enzym β-Galaktosidase, welches die Hydrolyse von β-Galactosiden (Zuckermoleküle) katalysiert. Basierend auf dieser Eigenschaft wurden verschiedene Substanzen für den Nachweis dieses Reportergens entwickelt (vgl. Tabelle 2), wobei der histochemische Nachweis durch X-Gal-Färbung schon im Jahre 1963 durch PEARSON und Mitarbeiter beschrieben wurde. Bei diesem Nachweis entsteht nach Spaltung eines farblosen Substrates (5-Bromo-4-Chlor-3-indoyl β-D-galactopyranosid) durch β-Galaktosidase ein blauer Farbstoff, welcher in einer Zelle nachgewiesen werden kann. Seither hat dieses Reporterenzym einen breiten Einsatz gefunden. Eine häufige Anwendung ist die Verwendung als genetischer Marker für die Lokalisation einzelner Zellen, deren Verbleib *in vivo* nachvollzogen werden soll. Ist das Reportergen stabil in das Zellgenom integriert, können auch die gebildeten Tochterzellen detektiert werden, da das Transgen an die nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben wird (PRICE et al., 1987; GALILEO et al., 1990, KRÜGER et al., 1994). Die Stabilität des blauen Farbstoffes erlaubt es, diesen Nachweis der Genexpression auch für histologische Präparate von Gelenken zu verwenden, die im Anschluss an Fixierung und Färbung über einen längeren Zeitraum Wochen entkalkt werden müssen. Neben dem histochemischen Nachweis in einzelnen Zellen, ist auch die Messung der β-Galaktosidase mittels Fluorescein di-β-D-galactopyranosid (FDG) Markierung im Durchflusszytometer von Bedeutung, da bei dieser Nachweismethode die Zellen nicht fixiert werden müssen und nach der Analyse weiter kultiviert werden können (NOLAN et al., 1988; KRÜGER et al., 1994). Für die Verwendung als Reportergen existieren zwei verschiedene LacZ Formen: 1) Die ursprüngliche zytoplasmatische β-Galaktosidase (cLacZ), welche nach X-Gal-Färbung zu einer Blaufärbung des Zytoplasmas führt. Diese Form ist vor

SCHRIFTTUM

Tabelle 2: Überblick über einige gängige Reportersysteme
(Tabelle modifiziert nach KAIN und GANGULY, 2001)

Genprodukt	Nachweismöglichkeiten	Eigenschaften
Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)	Immunoassay (CAT-ELISA) Chromatographisch nach Umsetzung radioaktiv markierten Acetyl-Coenzym A durch Zelllysate	<i>Stärken:</i> Minimale endogene Aktivität Stabiles Protein <i>Schwächen:</i> Nachweis ist aufwendig und teuer, meist werden radioaktive Substanzen verwendet Geringe Nachweissensitivität
β-Galaktosidase (LacZ)	<i>In-vitro-Assay:</i> Färbung mittels X-Gal-Substrat (5-Bromo-4-Chlor-3-indoyl β-D-galactopyranosid) Kolorimetrisch (Substrat <i>o</i> -nitrophenyl-β-D-galactopyranosid, ONPG) Fluoreszenz (Analyse mittels <i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i> (FACS), Substrat Fluorescein di-β-D-galactopyranosid, FDG) Chemilumineszenz <i>In-vivo-Assay:</i> Histochemischer Nachweis durch X-Gal-Färbung Fluoreszenz (FACS-Analyse isolierter Zellen mit FDG)	<i>Stärken:</i> Viele Nachweismöglichkeiten ermöglichen eine breite Anwendung <i>Schwächen:</i> Endogene Galaktosidase-Aktivität in einigen Zelltypen Relativ großes Gen (< 3 kb), dadurch limitierte Verwendung in einigen Vektorsystemen Immunogenität nachgewiesen (FORG et al., 1998; HOERR et al., 2000)
Green Fluorescent Protein (GFP)	<i>In-vitro-Assay:</i> Fluoreszenz (Fluoreszenz-Mikroskopie, FACS-Analyse) <i>In-vivo-Assay:</i> Fluoreszenz (UV-Licht, Optische Kamera, FACS-Analyse isolierter Zellen)	<i>Stärken:</i> Nachweismöglichkeit in lebenden Zellen Nachweis ohne zusätzliche Probenbehandlung <i>Schwächen:</i> Fluoreszenz <i>in vivo</i> schlecht messbar
Leuchtkäfer-Luziferase (Luc)	<i>In-vitro- und In-vivo-Assay:</i> Biolumineszenz nach Umsetzung des Substrates Luziferin	<i>Stärken:</i> Minimale endogene Aktivität Kostengünstiger Nachweis Nachweis mit guter Sensitivität <i>Schwächen:</i> Kurze Halbwertszeit des Proteins erschwert die Messung, Messungen sind schwer reproduzierbar

allem für die Markierung zytoplasmareicher Zellen von Vorteil. 2) Die nukleäre β -Galaktosidase (*nuclear leader sequence-LacZ*, nlsLacZ). Hier ist eine kurze Signalsequenz des Simian Virus 40 (SV 40) (KALDERON et al., 1984) an das *lacZ* Gen fusioniert. Diese Signalsequenz bewirkt den Transport eines fusionierten Genproduktes vom Zytoplasma einer Zelle in den Zellkern. nlsLacZ führt dementsprechend nach X-Gal-Färbung markierter Zellen zu einer Blaufärbung des Zellkerns (BONNEROT et al., 1987). Diese Variante ist damit besonders gut für die Markierung von Zellen geeignet welche über einen im Verhältnis zum Zytoplasma großen Zellkern verfügen (KRÜGER et al., 1999).

Ein mögliches Problem bei der Verwendung von β -Galaktosidase kann das Vorhandensein endogener Galaktosidasen in einigen Zelltypen darstellen, weshalb die Nachweiskonditionen unter Umständen angepasst werden müssen (YOUNG et al., 1993).

2.1.3.2 Green Fluorescent Protein

Die Klonierung des Gens für das *green fluorescent protein (gfp)* aus *Aequorea Victoria* ermöglichte die Expression von *gfp* in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen (PRASHER et al., 1992). Das GFP-Chromophor wird in einer autokatalytischen Reaktion gebildet, ohne dass ein Kofaktor notwendig wäre. Der Nachweis dieses Reportergens ist also direkt möglich. Obwohl das GFP-Protein in hoher Konzentration toxisch ist (LIU et al., 1999b), zeigt die Generierung *gfp*-exprimierender transgener Tiere die gute Verträglichkeit dieses Reportergens (CHALFIE et al., 1994; HADJANTONAKIS et al., 1998). Dieses ermöglicht die breite Anwendung in lebenden Zellen und Organismen (MISTRELI und SPECTOR, 1997). Wildtyp (wt) GFP fluoresziert nach energetischer Anregung von Aequorin, einem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein (INOUE und TSUJI, 1994). Wt GFP absorbiert UV- und blaues Licht ($\lambda_{\text{mm}} = 395$ und 470 nm) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{mm}} = 509$ nm), welches mittels Fluoreszenzmikroskopie, UV-Licht oder Durchflusszytometrie leicht nachgewiesen und quantifiziert werden kann (KAIN et al., 1995). Das wt *gfp* kodierende Gen aus *Aequorea victoria* ist für die Verwendung als Reportergen durch Mutationen verbessert worden. Das Protein des Gens für *enhanced green fluorescent protein (egfp)* weist eine 35fach stärkere Fluoreszenz als das wt GFP Protein auf und ist für die Expression in Säugetierzellen optimiert worden (CORMACK et al., 1996, ZHANG et al., 1996). Bei dieser Variante wurde die Fluorophorregion derart verändert, dass eine Verschiebung des zuvor zweigipfligen Anregungsmaximums des wt GFP zu 488 nm bei verstärkter Fluoreszenzintensität erreicht wurde (HEIM et al., 1995, CORMACK et al., 1996). Das Protein EGFP emittiert bei Blaulichtanregung (488 nm) eine stabile Grünlicht-Fluoreszenz (507 - 509 nm). Das isolierte

GFP und das daraus abgeleitete EGFP weisen weiterhin eine hohe Stabilität gegenüber äußeren Einwirkungen auf: GFP ist über einen weiten pH-Bereich (pH 7 bis 12,2) und bis zu Temperaturen von 65 °C stabil (ZIMMER, 2002). Mit einer Halbwertszeit von mehr als 24 h akkumuliert das Protein in der Zelle und kann so unter Umständen Änderungen des Expressionslevels maskieren (CHALFIE et al., 1994).

2.2 Retroviren

2.2.1 Einteilung

Eine Übersicht über die Einteilung der Familie der Retroviren wird in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Charakteristische Vertreter der Retroviren
(verändert nach MODROW und FALKE, 1998a)

Unterfamilie	Genus	Vertreter
Onkovirinae	Typ B Retrovirus der Säugetiere	Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV)
	Typ C Retrovirus der Säugetiere	Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) felines Leukämie-Virus (FeLV)
	Typ C Retrovirus der Vögel	Rous-Sarkom-Virus (RSV)
	Typ D Retrovirus	Mason-Pfizer-Affen-Virus
	HTLV-/ BLV-Gruppe	bovines Leukämie-Virus (BLV) humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-1/-2)
Lentivirinae	Lentivirus	humane Immundefizienz-Viren (HIV-1/-2) felines Immundefizienz-Virus (FIV) bovines Immundefizienz-Virus (BIV) Virus der Infektiösen Anämie der Pferde (EIAV)
Spumavirinae	Spumavirus	<i>simian foamy virus</i> (SFV) humane Spumaviren

2.2.2 Biologie der Retroviren

2.2.2.1 Viruspartikel

Das infektiöse Partikel (Virion) der verschiedenen Retroviren hat einen ähnlichen Aufbau (vgl. Abbildung 1). Das Virion hat einen Durchmesser von 100 bis 120 nm und enthält zwei

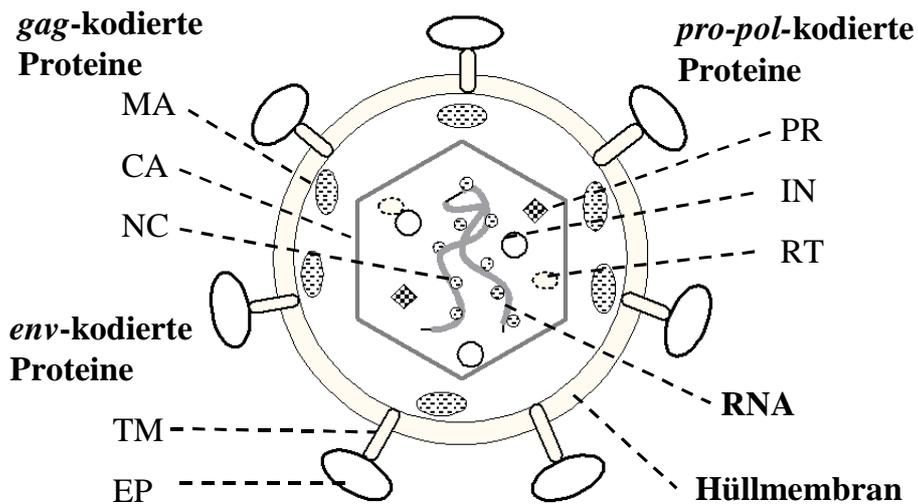


Abbildung 1: Aufbau eines Retroviruspartikel (schematisch)

Vom viralen *gag* Gen kodierte Strukturproteine: Matrixproteine (MA), Nukleokapsidproteine (NC) und Kapsidproteine (CA). *Env*-kodierte Hüllproteine: transmembranenes Protein (TM) und externes Glykoprotein (EP); *pro-pol*-kodierte Proteine: Protease (PR), Integrase (IN), Reverse Transkriptase (RT) (Abbildung modifiziert nach PALU et al., 2000).

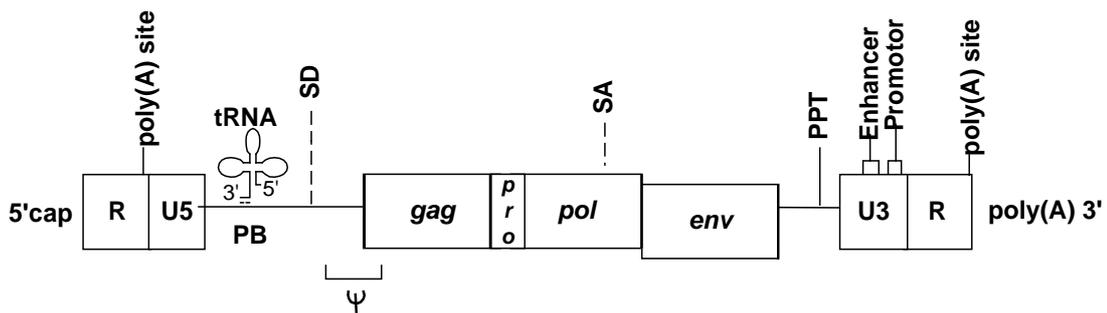
identische Kopien Plus-Strang-RNA, welche als Dimer vorliegen (PRATS et al., 1990). Die virale mRNA bildet einen Komplex mit den so genannten Nukleokapsid Proteinen (NC), welche zu den guppenspezifischen Antigenen (*gag*-Proteine) zählen. Umgeben wird dieser Komplex von dem so genannten Viruskapsid (CA) oder *Core*, welches ebenso aus *gag*-Proteinen besteht und bei Typ C Retroviren die Form eines Ikosaeders hat. In dem Viruscore sind außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) lokalisiert. Matrixproteine (MA) bilden eine Schicht außerhalb des Viruskapsids und interagieren mit der Innenseite der Hüllmembran. Die Hüllmembran des Virus besteht aus einer Lipiddoppelschicht und stammt von der Zytoplasmamembran der virusproduzierenden Zelle. In diese Membran eingelagert sind die viralen Hüllproteine (*envelope* (*env*)-Proteine). Diese Glykoproteine, verantwortlich für die Virusinteraktion mit dem spezifischen Rezeptor, sind die einzigen viralen Proteine auf der Virusoberfläche. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten: Einem transmembranenen Protein (TM), welches in der Hüllmembran verankert ist, und dem externen Glykoprotein (EP), welches an den zellulären Rezeptor bindet (HUNTER und SWANSTROM, 1990).

2.2.2.2 Genom und Genomaufbau

Das Genom der Retroviren besteht aus Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNA), welche von der virusproduzierenden Zelle gebildet wird und somit die Charakteristika eukaryotischer messenger RNA (mRNA) (5'-Cap-Struktur, 3'-Polyadenylierung) aufweist. Die Größe der viralen RNA des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) beträgt dabei etwa 7000 Basen (SHINNICK et al., 1981). Nach der reversen Transkription durch die virale Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA und nachfolgender Integration in das zelluläre Genom als sogenanntes Provirus, enthält die provirale DNA an beiden Enden des Genoms die so genannten *long terminal repeats* (LTR) (COFFIN, 1984). Hier sind die viralen Elemente für die Genexpression, reverse Transkription und Integration in das Wirtszellgenom lokalisiert. Die LTRs können weiter in U3 (*unique 3' RNA-Sequenz*), R (*redundant RNA-Sequenz*) und U5 (*unique 5' RNA-Sequenz*) Region unterteilt werden. Die in viraler RNA nur einfach vorhandenen U5 und U3 Regionen werden während der reversen Transkription verdoppelt. Die R Region liegt in der viralen RNA in identischer Basenfolge und Orientierung an beiden Enden des Genoms und stellt so die notwendige Homologiesequenz für den Strangwechsel während der reversen Transkription dar. Je nachdem, ob neben den Genen *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pro* (Protease), *pol* (Polymerase) und *env* (Hüllproteine) noch Gene für akzessorische Proteine enthalten sind, können Retroviren in einfache und komplexe Retroviren eingeteilt werden (HU und PATHAK, 2000). Die virale RNA eines einfach aufgebauten Retrovirus, wie z. B Mo-MLV, hat folgenden Aufbau (vgl. Abbildung 2):

- 1) Das 5'-Ende und das 3'-Ende werden von der R Region gebildet. Nach Integration in das zelluläre Genom stellt sie am 5'-Ende des viralen Genoms den Startpunkt der Transkription in DNA ausgehend von der viralen U3 Region dar. Sie enthält außerdem ein Polyadenylierungssignal und führt so am 3'-Ende zum Abbruch der Transkription.
- 2) Die U5 Region, welche nach ihrer Lage am 5'-Ende der viralen RNA benannt ist, enthält die Sequenzen für den Start der reversen Transkription.
- 3) Unmittelbar anschließend an die U5 Region befindet sich im Virusbackbone eine Primer-Bindungsstelle (PB), deren Sequenz komplementär zu dem 3'-Ende einer zellulären transfer RNA (tRNA) ist.
- 4) Das Verpackungssignal (Ψ) besteht aus Sequenzen, die mit den viralen Proteinen interagieren, um eine spezifische Verpackung der viralen RNA zu erreichen (LINIAL und MILLER, 1990). Das Mo-MLV- Ψ liegt in der 5'-nichttranslatierten Region zwischen der PB und dem *gag* Gen und ist auch ausreichend, um fremde RNA in

A RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels



B Integrierte Provirus DNA

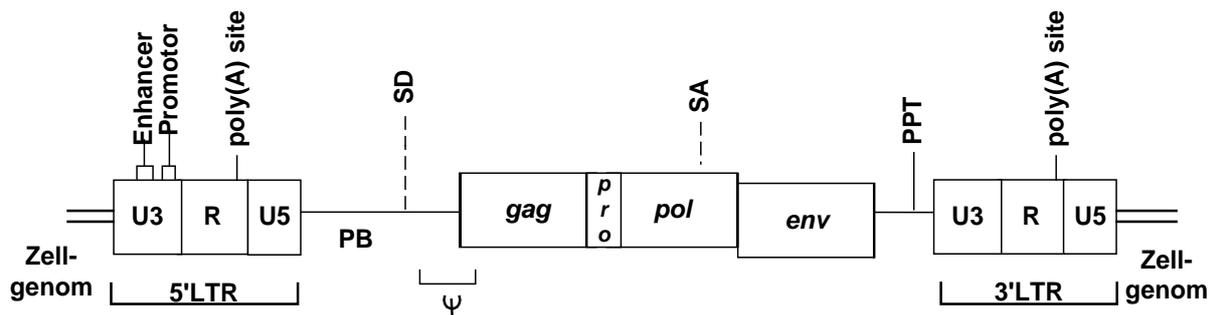


Abbildung 2: Genomorganisation der Retroviren

Dargestellt ist die Struktur eines einfach aufgebauten Typ C Retrovirus (Säugetiere) A: Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen im viralen RNA-Genom. Das Genom ist am 5'-Ende mit einer cap-Gruppe modifiziert, das 3'-Ende ist polyadenyliert. An die PB-Region (Primer-Bindungsstelle) ist eine tRNA gebunden, Ψ : Verpackungssignal, gibt die Sequenzfolge an, über welche das RNA-Genom mit den Nukleokapsidproteinen während der Morphogenese wechselwirkt. R: wiederholte (*redundant*) Regionen; U3 und U5: besondere (*unique*) Regionen am 3'- beziehungsweise 5'-Ende; PPT: Polypurintrakt. *gag*, *pro*, *pol* und *env*: die für die *gag*-, *pro/pol*- und *env*-Proteine kodierenden Gene. SA und SD kennzeichnen die Lage der Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen für die Synthese jener mRNAs, von denen die *env*-Proteine translatiert werden; tRNA: transfer Ribonukleinsäure. B: Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen im Genom des Provirus nach Integration in das Wirtszellgenom. LTR: *long terminal repeat* (Abbildung modifiziert nach MODROW und FALKE, 1998b).

virale Partikel zu verpacken (MANN et al., 1983; ADAM und MILLER, 1988). Die Sequenz, welche das Mo-MLV Verpackungssignal und die in das *gag* Gen hineinreichende Sequenz enthält, wird erweitertes Verpackungssignal, Ψ_+ , genannt (BENDER et al., 1987).

- 5) Im Anschluss befindet sich die genkodierende Region. Das *gag* Gen am 5'-Ende kodiert für das *gag*-Polyprotein, welches durch die virale Protease in verschiedene Proteine, die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, gespalten wird. Das *pol* Gen kodiert für die Reverse Transkriptase und die Integrase. Die Reverse Transkriptase katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in eine doppelsträngige DNA mit Hilfe einer als Primer fungierenden zellulären tRNA (BALTIMORE, 1976; TEMIN, 1976),

die Integrase katalysiert die Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Die Sequenz, welche für die virale Protease kodiert (*pro*), liegt zwischen *gag* und *pol*. In allen Retroviren wird subgenomische gespleißte mRNA benutzt, um die *env* Gene zu exprimieren. Der Spleißdonor liegt dabei vor der Ψ -Sequenz, der Spleißakzeptor unmittelbar vor dem *env* Gen. Das *env* Gen kodiert für ein env-Polyprotein, welches durch eine zelluläre Protease in das transmembrane Protein und das externe Glykoprotein gespalten wird.

- 6) Die Region zwischen *env* und 3'LTR enthält eine purinreiche Region, den Polypurintrakt (PPT). Dieser ist für die Initiation der Zweitstrangsynthese bei der reversen Transkription wichtig.
- 7) Die U3 Region, benannt nach ihrer Lage am 3'-Ende der viralen RNA, enthält die viralen Promotor- und Enhancer-Sequenzen (DOUGHERTY und TEMIN, 1987). Nach der Umschreibung der RNA in doppelsträngige DNA ist diese Region auch in der 5'LTR vorhanden und steuert die virale Genexpression.

2.2.2.3 Replikation

Die Vorgänge bei der Infektion einer Zelle durch ein replikationsfähiges Retrovirus sind in der Abbildung 3 dargestellt. Die Infektion beginnt mit der spezifischen Interaktion der viralen Hüllproteine mit den zellulären Rezeptorkomplexen (Adsorption). Nach Fusion von Virus und Zellmembran wird das retrovirale Kapsid aufgenommen und in das Zytoplasma entlassen. Konformationsänderungen innerhalb des Kapsids bewirken die Aktivierung der Reversen Transkriptase, die das virale Provirus, die doppelsträngige DNA-Kopie der genomischen viralen RNA, synthetisiert (reverse Transkription). Das virale Provirus bleibt auch bei den weiteren Vorgängen mit den Kapsidkomponenten verbunden und wird als Komplex mit ihnen, einschließlich der viralen Integrase, in den Kern transportiert (BOWERMAN et al., 1989). Bei Maus-Leukämie-Viren (MLV) erfolgt dieser Transport nur bei Auflösung der Kernmembran während der Mitose (ROE et al., 1993). Deshalb ist die Infektion auf sich teilende Zellen begrenzt (MILLER et al., 1990). Andere Retroviren wie z. B. Lentiviren besitzen Kernlokalisierungssignale (u. a. im Matrixprotein) und können daher auch durch die intakte Kernmembran sich nicht teilender Zellen gelangen (LEWIS und EMERMAN, 1994; NALDINI et al., 1996). Die virale Integrase vermittelt die Integration der viralen Provirus DNA in das zelluläre Genom. Der Ort der Integration ist nicht spezifisch und kann prinzipiell in allen Teilen des Genoms liegen. Hierbei werden Orte aktiver Transkription bevorzugt (SCHERDIN et al., 1990), weshalb auch von „hot spots“ und „cold spots“ der Integration

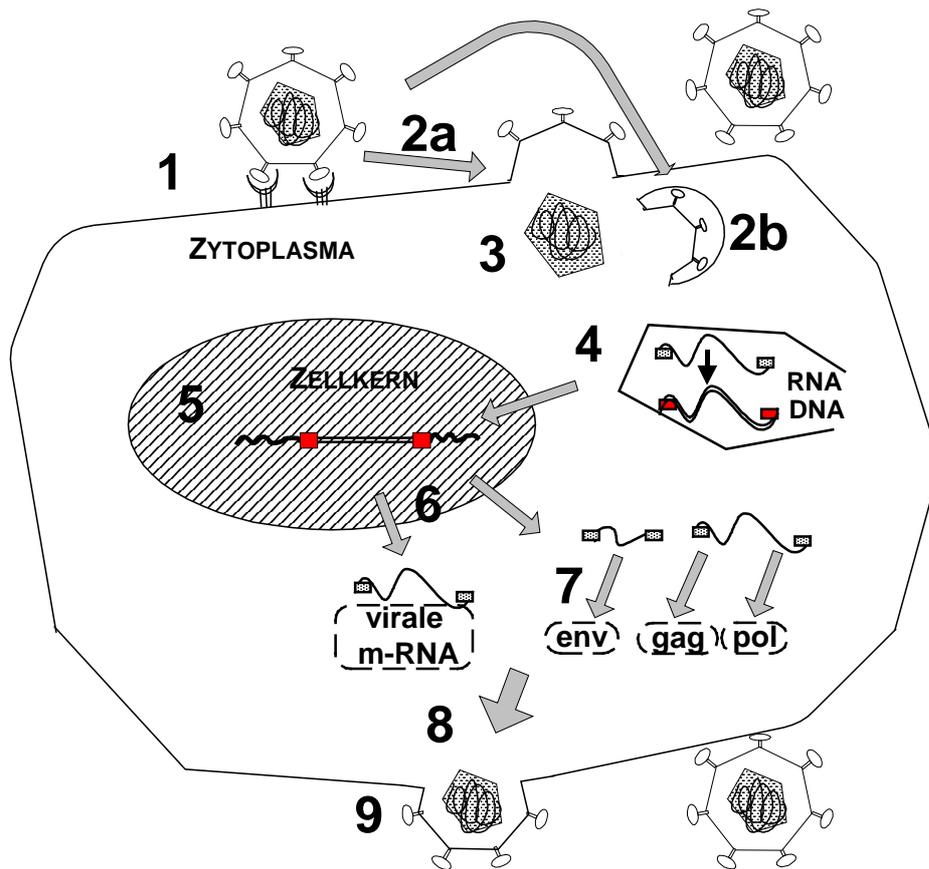


Abbildung 3: Schema des retroviralen Replikationszyklus

Nach Bindung an Membranstrukturen oder den Rezeptor (1, Adsorption) kommt es zum Eindringen des Virions entweder durch direkte Membranfusion (2a) oder rezeptorvermittelte Endozytose (2b) und zur Freisetzung des Nukleokapsids (3). Einer der beiden (identischen) RNA-Genomstränge wird dann revers in doppelsträngige DNA transkribiert (4). Es folgt die Integration ins Wirtszellgenom (5, sogenanntes Provirus) und anschließend die Transkription (6). Die gebildete mRNA (volle Länge und gespleißte RNA) dient zur Translation der Virusproteine (7), die beim Vorgang der Zusammenlagerung (8) in die Viruspartikel eingebaut werden. Zwei Stränge nicht-gespleißte mRNA je Viruspartikel werden als virales Genom in die reifenden Nukleokapside verpackt. Anschließend kommt es zur Knospung und Freisetzung der neugebildeten Viruspartikel (9).

gesprochen wird (WITHERS-WARD et al., 1994). Die LTRs, die das integrierte Genom zu beiden Seiten flankieren, beinhalten wichtige Steuerungselemente wie Promotor, Enhancer und Polyadenylierungssignal, die für die Initiation und Termination der Transkription durch die zelleigene RNA-Polymerase II verantwortlich sind (COFFIN, 1984). Während der Transkription werden zwei mRNA-Formen gebildet, zum einen eine gespleißte Form, die als Matrix für die Translation des *env* Gens fungiert und zum anderen eine nicht-gespleißte Form für die Synthese der *gag*-, *pro*- und *pol*-Proteine. Die nicht-gespleißte Form dient gleichzeitig als virale genomische RNA. Die viralen Strukturproteine und Enzyme werden während der Translation im Zytoplasma durch zelleigene Strukturen gebildet. Das Verpackungssignal Ψ ermöglicht dann die spezifische Zusammenlagerung der viralen genomischen RNA mit den synthetisierten viralen Strukturproteinen im Zytoplasma der Zelle. In der Folge kommt es zur

Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche, wobei die Viruspartikel von der zellulären Membran umhüllt werden. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt über die Spaltung der gag- und gag/pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease (BOLOGNESI et al., 1978).

2.3 Retroviraler Gentransfer

2.3.1 Grundlagen des retroviralen Gentransfers

Für retroviralen Gentransfer werden hauptsächlich Typ C Retroviren, meist von dem Maus-Leukämie-Virus abgeleitet, verwendet. Es wurden allerdings auch Vektoren auf Grundlage der anderen Virusunterfamilien entwickelt: Lentivirale Vektoren, die auf HIV I (NALDINI et al., 1996), FIV (POESCHLA et al., 1998) und BIV (MATUKONIS et al., 2002) basieren und Vektoren aus der Gruppe der Spumaviren (RUSSEL und MILLER, 1996; SCHWANTES et al., 2002). Im Zusammenhang mit retroviralem Gentransfer bezeichnet der Begriff „retroviraler Vektor“ ein modifiziertes Virus, welches die therapeutischen Gene und die so genannten *cis*-agierenden Elemente enthält. *Cis*-agierenden Elemente sind retrovirale Sequenzen, die direkt in einem infektiösen Virus benötigt werden. Da Retroviren potentiell pathogen sind, werden für die meisten klinischen Anwendungen replikationsdefiziente Viren verwendet. Diese beinhalten die fremden Transgene, können aber nach einer Infektion keine neuen Partikel bilden und keine viralen Gene übertragen. Um dies zu erreichen werden die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* für die Virusproduktion in Form von Hilfskonstrukten *in trans*, also ohne räumlichen Bezug, zur Verfügung gestellt. Da diese Gene über kein virales Verpackungssignal verfügen, wird ihre Sequenz nicht in das Virion verpackt. Das therapeutische Gen wird mit einem Vektor zur Verfügung gestellt, welcher die Grundstruktur des viralen Genoms aufweist und nur die notwendigen regulatorischen Sequenzen für die Verpackung in virale Partikel, reverse Transkription und Integration enthält (*cis*-agierende Sequenzen). Nur die genetische Information dieses Vektors wird später als virale mRNA in das Virion verpackt. Auf diese Weise ist der retrovirale Vektor alleine nicht in der Lage, die für die Replikation notwendigen Proteine zu erzeugen. MLV-abgeleitete Viren haben die Eigenschaft, nur sich teilende Zellen infizieren können (MILLER et al., 1990; ROE et al., 1993). Die Transduktion von Geweben, die aus sich nicht-teilenden Zellen bestehen (z. B. Muskel-, Leber- und Lungengewebe) ist *in vivo* daher schwer möglich. Die Verwendung retroviralen Gentransfers ist daher in erster Linie auf die Anwendung *in vitro*, also in der Zellkultur, beschränkt wobei sich dieser häufig durch eine hohe Effizienz auszeichnet

(VERMA und SOMIA, 1997). Retroviraler Gentransfer führt durch die stabile Integration zu einer langanhaltenden Transgenexpression. Die Integration des retroviralen Provirus in das Zellgenom birgt allerdings das Risiko der so genannten Insertionsmutagenese (TEMIN, 1990; STOCKING et al., 1993; LI et al., 2002). Hierbei werden benachbarte zelleigene Gene durch die viralen Promotor- und Enhancersequenzen aktiviert, ein Phänomen welches auch in der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren zur Therapie der SCID bei Kindern beobachtet wurde (vgl. Kapitel 2.1). Innerhalb retroviraler Vektoren, die mehrere Promotoren enthalten, kann das so genannte Phänomen der *promotor interference* auftreten, wobei interne Promotoren des Vektors durch die viralen Promotor- und Enhancersequenzen beeinflusst werden (EMERMAN und TEMIN, 1984, XU et al., 1989; WU et al., 1996). Des Weiteren wird die Stärke der Transgenexpression vom Integrationsort im Chromatin beeinflusst (JAENISCH et al., 1981). Ein weiterer Nachteil ist die begrenzte Verpackungskapazität des retroviralen Virions, was die Wahl des Transgens einschränkt (ANDERSON, 1998). Die Generierung retroviraler Partikel ist nur in intakten Zellen möglich, weshalb hierfür Zellkultursysteme verwendet werden. Grundsätzlich können hierbei zwei verschiedene Vorgehensweisen unterschieden werden: Die Verwendung retroviraler Verpackungszellen und die transiente, d. h. vorübergehende, Virusproduktion mittels Transfektion.

2.3.2 Verpackungssysteme

Für MLV-Vektoren sind verschiedene Typen Verpackungszellen entwickelt worden, die in „Generationen“ eingeteilt werden können (PALU et al., 2000). Retrovirale Verpackungszellen enthalten die Gene für alle retroviralen Proteine, welche für die Produktion infektiöser, replikationsdefizienter Retroviren notwendig sind. Die genetische Information für diese Proteine sind dabei *in trans* von dem später einzubringenden retroviralen Vektor angeordnet. Das Einbringen eines retroviralen Vektors, welcher die entsprechenden Signalelemente enthält, führt dann in diesen Zellen zur Bildung replikationsdefizienter infektiöser Partikel. Die Verpackungszelllinien der ersten Generation enthalten sogenannte „one-genome“ Hilfskonstrukte. Die viralen Gene werden hier von einem einzigen Hilfskonstrukt exprimiert. Dieses Hilfskonstrukt entspricht klonierter proviraler DNA, welche kein Verpackungssignal enthält. Beispiele hierfür sind die ecotrope Verpackungszelllinie Ψ -2 (MANN et al., 1983) und die amphotrope Linie PA12 (MILLER et al., 1985). Ein wichtiger Nachteil solcher Verpackungszellen ist die verhältnismäßig einfache Bildung replikationskompetenter Retroviren, da hierfür nur eine Rekombination zwischen Hilfskonstrukt und viralem Vektor notwendig ist (CONE und MULLIGAN, 1984; MILLER und BUTTIMORE, 1986). Um diese Gefahr zu

verringern, wurden in der zweiten Generation von Verpackungszelllinien im Hilfskonstrukt die 3'LTR durch ein Polyadenylierungssignal ausgetauscht und Teile der 5'LTR deletiert. Ein Beispiel ist die amphotrope Linie PA317 (MILLER und BUTTIMORE, 1986).

Weitere Modifikationen, bei denen die viralen Gene auf zwei unabhängige Hilfskonstrukte verteilt werden (sog. „split genome“ Hilfskonstrukte (HU und PATHAK, 2000)) führten zur dritten Generation von Verpackungszelllinien. Zu diesen Zelltypen gehören die Linien ΨCRIP (DANOS und MULLIGAN, 1988), GP+envAM12 (MARKOWITZ et al., 1988) und die Zelllinie Phoenix-Ampho (www.stanford.edu/group/nolan), welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. Ein Hilfskonstrukt enthält die Information für die Gene *gag* und *pol*, während die vom *env* Gen kodierten Hüllproteine auf einem anderen liegen. Dadurch sind drei Rekombinationen notwendig, um ein replikationskompetentes Retrovirus zu generieren. Aber auch bei solchen Verpackungszelllinien ist die Bildung replikationskompetenter Retroviren beschrieben worden (CHONG und VILE, 1996; CHONG et al., 1998).

Mit der Entwicklung effizienter Transfektionsmethoden wurden auch transiente Transfektionssysteme für die Herstellung retroviraler Partikel entwickelt. In diesen Systemen werden die viralen Gene grundsätzlich von zwei unterschiedlichen Konstrukten exprimiert. Zum einen von dem sogenannten *gag-pol*-Plasmid für die Expression der viralen Enzyme und Strukturproteine, und zum anderen von einem *env*-Plasmid für die Expression der Hüllproteine. Diese beiden Konstrukte haben in der Regel nur geringe Sequenzhomologien und enthalten so wenig virale Sequenzen wie möglich. Das retrovirale Vektorplasmid wird zusammen mit den beiden Hilfskonstrukten in Zellen transfiziert und virusenthaltende Zellüberstände werden wenige Tage nach der Transfektion geerntet. Dieses System wurde erfolgreich für MLV-abgeleitete Vektoren, lentivirale Vektoren und Spumavirus-Vektoren etabliert (SONEOKA et al., 1995; TROBRIDGE und RUSSEL, 1998; YANG et al., 1999). Es bietet den Vorteil, weniger arbeitsintensiv und vor allem viel schneller als die Etablierung einer stabilen Virusproduzentenzelllinie zu sein. Wichtig ist dabei vor allem, dass Retroviren ohne eukaryotische Selektionsmarker generiert werden können, da die Proteine dieser Gene teilweise immunogen sind (RIDDELL et al., 1996). Dadurch, dass der Zwang einen solchen Marker in den retroviralen Vektor zu integrieren entfällt, wird die retrovirale Vektorkonstruktion vereinfacht. Mit diesen Systemen können für Retroviren sehr hohe virale Titer erreicht werden ($> 10^7$ IP/ml, YANG et al., 1999). Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt darin, dass verschiedene Virushüllen verwendet werden können, darunter auch solche, deren Expression für eine Zelle unter normalen Umständen toxisch ist (z. B. die Hülle des Vesikulären-Stomatitis-Virus, YEE et al., 1994).

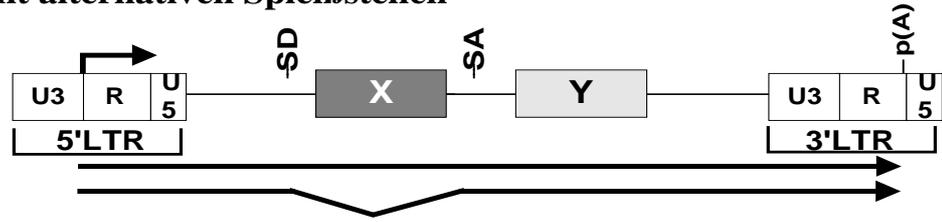
2.3.3 Vektordesign

Um diese retrovirale Vektoren in Bakterien amplifizieren zu können, liegen sie in bakterieller Plasmidform vor und haben ein Plasmidbackbone, welches ein bakterielles „*origin of replication*“ als Startpunkt der bakteriellen Replikation und ein bakterielles Resistenzgen enthält.

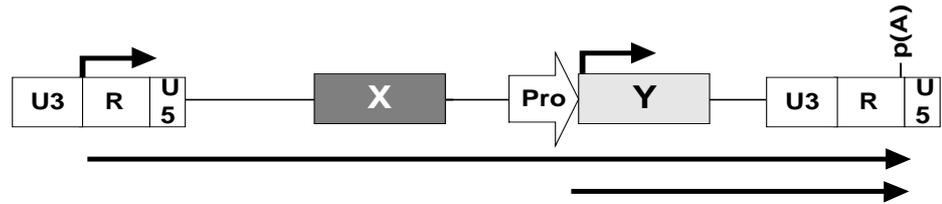
Retrovirale Vektoren können unter verschiedenen Gesichtspunkten in Gruppen unterteilt werden. Eine Unterscheidungsmöglichkeit bezieht sich auf die Anzahl der enthaltenden Transgene (*Cistron*), wonach die Vektoren als *monocistronisch* (diese enthalten nur ein Transgen), *dicistronisch* (diese enthalten zwei Transgene) usw. bezeichnet werden. In vielen dicistronischen Vektoren, wie z. B. pLXSN (MILLER und ROSMAN, 1989), stellt eines der Transgene einen eukaryotischen Selektionsmarker dar, mit dessen Hilfe infizierte Zellen *in vitro* selektioniert werden können. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist das Neomycin-Resistenz Gen (SOUTHERN und BERG, 1982). Es gibt verschiedene Möglichkeiten für die Konstruktion retroviraler Vektoren, die mehrere Transgene oder Proteine exprimieren: 1) Ein einzelner Promotor exprimiert verschiedener Proteine von unterschiedlich gespleißten mRNAs (Abbildung 4 A), 2) Die Verwendung mehrerer Promotoren für die Transkription verschiedener Gene (Abbildung 4 B) und 3) Die Verwendung einer *internal ribosomal entry site*-Sequenz (IRES) für die Expression verschiedener Proteine von einer mRNA (Abbildung 4 C). Da die retrovirale Replikation einen RNA-Zwischenschritt einschließt (das virale Genom in der Form einer mRNA), müssen alle Vektorkonstruktionen die Synthese einer mRNA erlauben, die die Länge des gesamten viralen Genoms umfasst. Aus diesem Grunde dürfen z. B. in Transkriptionsrichtung des viralen Promotors (sogenannte *sense* Orientierung) keine zusätzlichen Polyadenylierungssignale (p(A)-Signale) zwischen die R Regionen der LTRs platziert werden. Eine derartige Anordnung würde die Synthese verkürzter, subgenomischer mRNA Transkripte verursachen, die nicht zu der Bildung infektiöser Viren führen (SHIMOTOHNO und TEMIN, 1981; MILLER et al., 1983). Ebenfalls ist es notwendig Transgene, die in *antisense* Orientierung (entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung des viralen Promotors der 5'LTR) eingefügt werden, mit einem zusätzlichen p(A)-Signal zu versehen. Ohne p(A)-Signal entstehen mRNA Transkripte, die sich über die gesamte Länge des für die virale mRNA kodierenden Abschnitts erstrecken (bis zur R Region der 5'LTR). Diese mRNA bindet verstärkt an die gegenläufig orientierte virale mRNA, welche als virales Genom für die Viruspartikelbildung benötigt wird. Dies führt zu einer verminderten Virussynthese (sogenannte *antisense inhibition*). Eine Sonderform stellen die so genannten „selbstinaktivierenden Vektoren“ (SIN-Vektor) dar, in deren Provirus in der 5'LTR kein

Promotor mehr vorhanden ist. Bei dieser Vektorkonstruktion dient alleine der interne Promotor der Transgenexpression (Abbildung 4 D) (DOUGHERTY und TEMIN, 1987). Eine andere Einteilung retroviraler Vektoren in Single- und Double-copy-Vektoren kann aufgrund der retroviralen Replikation vorgenommen werden. Single-copy-Vektoren sind solche Vektoren, bei denen das Transgen im Zuge der viralen Replikation als einzelne Kopie im integrierten Provirus vorhanden ist. Die Vektordiagramme A bis D der Abbildung 4 stellen solche Vektoren als Provirus dar. Sind in einem Vektor noch zusätzliche Spleißdonor und – akzeptorsequenzen enthalten, entstehen zusätzlich die entsprechenden Transkripte, wodurch eine verstärkte Transgenexpression bewirkt wird (KRALL und KOHN, 1996). Der Umstand, dass die LTR-Sequenzen retroviraler Vektoren während der reversen Transkription kopiert und so verdoppelt werden wird genutzt, um Vektoren zu konstruieren, deren Provirus nach der Integration zwei Kopien des Transgens enthalten. Solche Vektortypen werden Double-copy-Vektoren genannt. Wie bei HANTZOPOULOS et al., 1989 beschrieben wird hierdurch eine erhöhte Transgenexpression erzielt. Bei einer Strategie wird das Transgen vor (d. h. in 5'-Richtung) dem viralen Promotor in die U3 Region der 3'LTR platziert (HANTZOPOULOS et al., 1989). Bei Infektion wird diese U3 Region in die 5'LTR des Provirus kopiert (Abbildung 4 F). Da das Transgen an dieser Position nicht von dem viralen Promotor expimiert werden kann, muss es über einen eigenen Promotor verfügen. Die Orientierung dieser Expressionskassette ist beliebig. Bei einer anderen Strategie wird das Transgen in die R Region der 3'LTR platziert (ADAM et al., 1995). An dieser Position wird es von dem viralen Promotor expimiert, ein zusätzlicher Promotor ist also nicht notwendig (Abbildung 4 E). Ein Nachteil dieser Position ist, dass das Transgen auch in doppelter Kopie im viralen Partikel vorliegt, was wegen des eingeschränkten Verpackungsvolumens retroviraler Partikel von Nachteil ist. Double-copy-Vektoren bieten die Möglichkeit, unabhängig voneinander zwei verschiedene Transgene in den Vektor zu isertieren und so dicistronische Vektoren zu konstruieren (PAULUS et al., 1996). Ein Nachteil dieser Vektorkonstruktion ist der im Allgemeinen geringere Virustiter als bei vergleichbaren Single-copy-Vektoren (HANTZOPOULOS et al., 1989; ADAM et al., 1995; PAULUS et al., 1996).

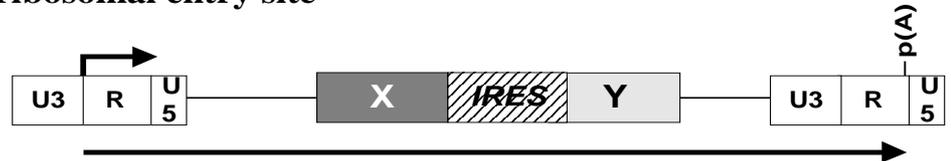
A Vektor mit alternativen Spleißstellen



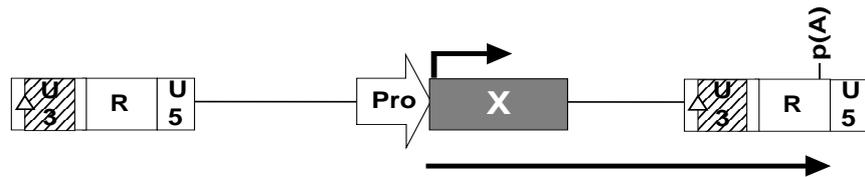
B Vektor mit mehreren Promotoren



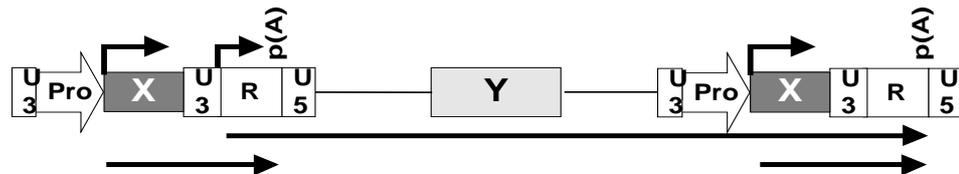
C Internal ribosomal entry site



D SIN-Vektor



E Double-copy-Vektor, Transgen in der R Region



F Double-copy-Vektor, Promotor und Transgen in der U3 Region

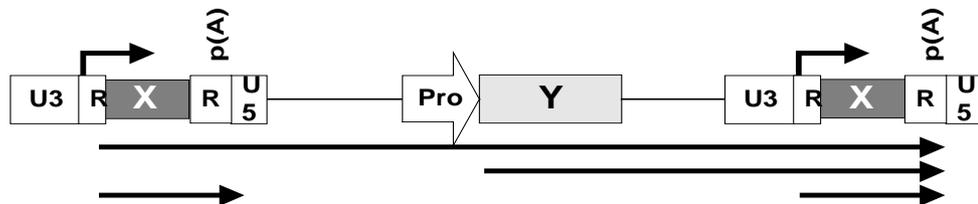


Abbildung 4: Darstellung typischer retroviraler Vektoren nach Integration in das zelluläre Genom (Provirus)

X und Y: Kennzeichnung der Position des Transgens; Pro: Promotor; IRES: *internal ribosomal entry site*; SD und SA: Spleißdonor bzw. -akzeptor; p(A): Polyadenylierungssignal; LTR: *long terminal repeat*; U3, R, U5: Abschnitte der LTR. Pfeile über den Diagrammen kennzeichnen Promotoren und deren Transkriptionsrichtung, Pfeile unter den Diagrammen bezeichnen die transkribierten mRNAs (Abbildung modifiziert nach MILLER, 1997).

2.3.4 Virushüllen

Durch die vom *env* Gen codierten Glykoproteine wird die Spezifität der Viren für bestimmte Zelltypen festgelegt. Diese Spezifität ergibt sich durch die Wechselwirkung der Hüllproteine mit ihren korrespondierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die viralen Vektorpartikel können durch Einbau viraler Glykoproteine verschiedener Spezies in ihre Hülle so modifiziert werden, dass sich ihr Art- und Gewebetropismus ändert bzw. erweitert (MILLER, 1996). Der Tropismus ist dann der desjenigen Virus, welches die Hüllproteine liefert (WEISS et al., 1977). Die Modifikation der retroviralen Partikel mit verschiedenen Virushüllen nennt man auch Pseudotypisierung (ZAVADA, 1972). Ihr Ziel ist die effiziente Transduktion bestimmter Zelltypen durch retrovirale Vektoren. Retroviren, welche über die Hüllproteine des ecotropen Maus-Leukämie-Virus verfügen, nutzen einen Transporter für kationische Aminosäuren (mCAT-1) als Rezeptor (KIM et al., 1991). Ihr ecotropes Infektionsspektrum beschränkt sich auf die Zellen von Nagetieren. Virale Partikel mit amphotroper Hülle, wie die des Moloney-Maus-Leukämie-Virus, infizieren Zellen über das Phosphat-Transportprotein Ram 1 (Pit2) (KAVANAUGH et al., 1994). Wegen der weiten Verbreitung dieses Rezeptors können solche Viren ein breites Spektrum an Zelltypen infizieren (CONE und MULLIGAN, 1984; DELOUIS et al., 1990). Vektoren mit der Hülle des Gibbonaffen-Leukämie-Virus (GALV) infizieren Zellen über das Phosphat-Transportprotein Glvr-1 (Pit1), das mit Pit2 verwandt ist, aber ein anderes gewebespezifisches Expressionsmuster zeigt (KAVANAUGH et al., 1994). Pit1 ist besonders stark auf Knochenmarkszellen exprimiert, Viren mit GALV-Hülle transduzieren z. B. myeloide und lymphoide Zellen zu höheren Raten als amphotrope Viren (BAUER et al., 1995; BUNNELL et al., 1997). Zellen der Maus sind durch GALV umhüllte Viren nicht infizierbar. Die Pseudotypisierung von Retroviren ist nicht auf die Hüllproteine anderer Retroviren beschränkt. Das G-Protein des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV.G), einem Rhabdovirus, kann ebenfalls die viralen *env*-Proteine ersetzen (EMI et al., 1991). Im Gegensatz zu den anderen Hüllproteinen, findet bei VSV.G der Viruseintritt in die Zelle mittels Membranfusion nach Bindung an Phospholipidkomponenten der Zellmembran statt (MASTROMARINO et al., 1987). Da in diesem Fall die virale Infektion nicht von der Anwesenheit spezifischer Rezeptorproteine abhängig ist, besteht ein sehr großes Wirtsspektrum (YEE et al., 1994). VSV.G-pseudotypisierte Viren haben außerdem den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu anderen Retroviren mittels Ultrazentrifugation konzentriert werden können (BURNS et al., 1993). Nachteil des VSV.G ist, dass seine Expression toxisch für die Zellen ist (YEE et al., 1994). Deshalb ist die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie, welche VSV.G als Hüllprotein exprimiert, nur mittels regulierbarer VSV.G-Expression möglich

(CHEN et al., 1996; ORY et al., 1996). Virusgenerierung mittels transienter Transfektion ist aber problemlos (YEE et al., 1994).

2.4 Regulierbare Genexpression

Für viele Anwendungen ist eine regulierbare Genexpression von Vorteil:

- 1) Für die Erforschung der Genregulation und Genfunktion während der Entwicklung,
- 2) für die Analyse der Funktion spezifischer Gene an verschiedenen biologischen Prozessen,
- 3) für die Expression von Genprodukten, die toxisch oder wachstumshemmend wirken und
- 4) für die Expression von Genprodukten, die nur für einen begrenzten Zeitraum benötigt werden.

Für den Einsatz in der Gentherapie soll das ideale regulierbare System folgende Eigenschaften aufweisen: 1) Spezifität, d. h. es sollte nicht mit endogenen Aktivatoren oder zellulären Reaktionswegen interferieren, 2) Effektivität im Sinne niedriger Basis-Expressionslevel im reprimierten Zustand bei zugleich hoher Expression nach Induktion, wobei dieser Zustand reversibel sein soll und 3) Dosis-Abhängigkeit, also eine modulierbare Expressionsstärke (SAEZ et al., 1997). Außerdem muss der von außen zugegebene Ligand für klinische Anwendungen geeignet sein. Es existieren verschiedene solche Systeme, die z. T. auch in retroviralen Vektoren verwendet werden:

- Die Tetrazyklin-regulierbaren Systeme (GOSSEN und BUJARD, 1992),
- das FK506/Rapamycin-induzierbare System (POLLOCK et al., 2000),
- das RU486/Mifepristone-induzierbare System, welches auf einem mutierten humanen Progesteronrezeptor basiert (WANG et al., 1994) und
- verschiedene Ecdyson-induzierbare Systeme, welche auf dem nukleären Rezeptor für das Steroidhormon Ecdyson von Insekten basieren (KOELLE et al., 1991; SUHR et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde ein Tetrazyklin-regulierbares System verwendet, welches im Folgenden detaillierter beschrieben wird.

Seit seiner Erstbeschreibung vor über zehn Jahren wurde das Tetrazyklin-regulierbare System (GOSSEN und BUJARD, 1992) ständig weiterentwickelt und wird heute vielfältig verwendet (CORBEL und ROSSI, 2002). Bei den Tetrazyklin-regulierbaren Systemen, Tet-On- und Tet-Off-System, kommt ein heterologes bakterielles Regulationssystem zum Einsatz, welches in eukaryotischen Zellen ansonsten nicht existiert (GOSSEN und BUJARD, 1992; GOSSEN et

al., 1995; BARON et al., 1997; URLINGER et al., 2000). Das System basiert auf zwei Regulationselementen, die vom Tetrazyklin-Resistenz Operon des *E. coli* Tn10-Transposons abgeleitet sind: Dem Tet-Repressor Protein (TetR) und der Tet-Operator Sequenz (*tetO*), an die TetR bindet. Tetrazyklin und einige seiner Derivate wie z. B. Doxyzyklin fungieren als regulierender Ligand. In *E. coli* wird über dieses System die Resistenz gegen Tetrazykline (Tcs) vermittelt: Nach Bindung an TetR wird die Transkription des Tetrazyklin-Antiporter Proteins TetA angeschaltet. TetA bewerkstelligt den aktiven Export des Antibiotikums durch die Zytoplasmamembran (HILLEN und BERENS, 1994). In den modifizierten Tetrazyklin-regulierbaren Systemen für eukaryotische Zellen wird TetR mit einer transaktivatorischen Domäne fusioniert, welche die eukaryotische Transkription positiv (aktivierend) beeinflusst. Diese Transaktivatoren (Fusionsproteine) funktionieren so wie die ursprünglichen bakteriellen TetR Proteine: Sie binden Tetrazyklin-abhängig an Operatorsequenzen (*tetO*) des *tet* Operon. In den Tetrazyklin-regulierbaren Systemen bilden sieben *tetO* Sequenzen das Tet-responsive Element (TRE), welches mit einem minimalen eukaryotischen Promotor (minimaler *intermediate early* Cytomegalievirus Promotor, $P_{\min\text{CMV}}$) ligiert ist. Dieser Promotor heißt Tet-responsive Promotor (P_{hCMV^*}). Transkription der nachgeschalteten Gene ist nur nach Bindung des Transaktivatorproteins möglich (HILLEN und BERENS, 1994). In der Originalversion dieses Systems wird durch die Zugabe von Tcs die Bindung des Transaktivators (tTA) an den Promotor und damit die Aktivierung der Transkription verhindert. Dieser Effekt wird durch eine Tc-abhängige Konformationsänderung von tTA verursacht, die dazu führt, dass dieser in Anwesenheit von Tcs nicht mehr an P_{hCMV^*} binden kann. Dieser Effekt ist reversibel. Da in diesem System die Transkription des Transgens durch die Zugabe von Tcs unterbunden wird, wird es als Tet-Off-System bezeichnet (GOSEN und BUJARD, 1992). In einer zweiten Variante, die als Tet-On-System bezeichnet wird und auf einer mutierten TetR-Sequenz beruht, ist der Transaktivator erst in Verbindung mit Tetrazyklin-Molekülen in der Lage, an den Promotor zu binden und die Transkription zu starten (GOSEN et al., 1995). Da dieses Transaktivatormolekül revers zum originalen tTA agiert, wird es als reverser Transaktivator (rtTA) bezeichnet. Die Transaktivatoren der ersten Generation waren eine Fusion mit dem C-terminalen Anteil des VP16-Transaktivators des Herpes Simplex Virus mit TetR (GOSEN und BUJARD, 1992; GOSEN et al., 1995). Hohe intrazelluläre Konzentrationen des VP16-Proteins sind allerdings zytotoxisch, was die Verwendung dieser Transaktivatoren limitiert (BERGER et al., 1992; KELLEHER et al., 1990). Der entsprechende rtTA zeigt zudem eine Restaffinität für das TRE-Element in Abwesenheit von Tcs, was zu einer erhöhten basalen Expression des Transgens führt (BOHL et al., 1998; RIZZUTO et al., 1999).

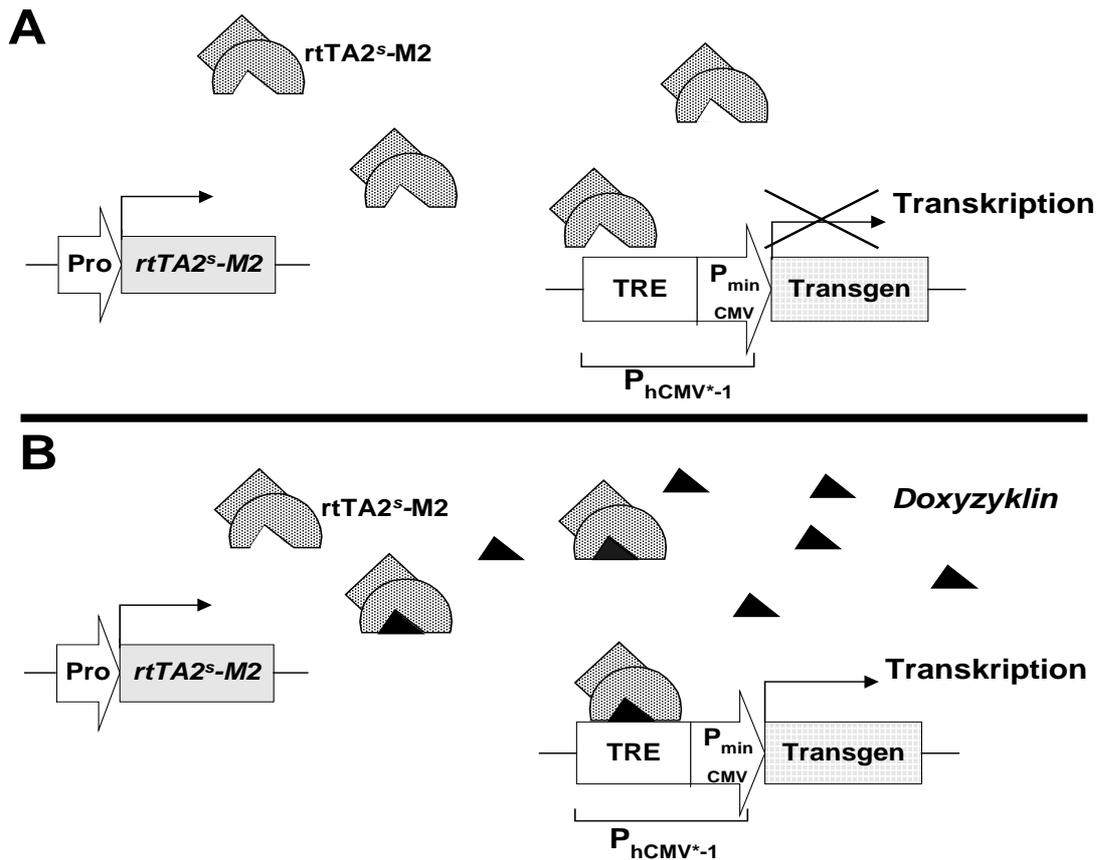


Abbildung 5: Regulation der Transgenexpression im Tet-On-System

A: reprimierter Zustand, ohne Doxyzyklin ist das Protein des reversen Transaktivators ($rtTA2^s-M2$) nicht in der Lage, an die TRE-Sequenz innerhalb des Tet-responsiven Promotors (P_{hcmv^*-1}) zu binden und diesen zu aktivieren. Die Transkription des Transgens findet nicht statt. B: Induzierter Zustand, die Zugabe von Doxyzyklin führt zu einer Konformationsänderung des reversen Transaktivators, welcher an die TRE-Sequenz des Tet-responsiven Promotors bindet und die Transkription des nachgeschalteten Transgens aktiviert. Pro: Promotorsequenz; TRE: Sequenz des Tet-responsiven Elements; P_{min}^{CMV} : Sequenz des minimalen *intermediate early* Cytomegalievirus Promotors; Pfeile bezeichnen Start und Richtung der Transkription (Abbildung modifiziert nach GOSSSEN und BUJARD, 2002).

Aus diesen Gründen wurden Modifikationen der VP16-Domäne vorgenommen, was zu der Entwicklung der Transaktivatoren der zweiten Generation führte (BARON et al., 1997; URLINGER et al., 2000). Die zwei neuen Versionen des reversen Transaktivators, $rtTA2^s-S2$ und $rtTA2^s-M2$, zeigen eine niedrigere Basalaktivität in Abwesenheit von Tetrazyklinen *in vitro* und *in vivo* (URLINGER et al., 2000; KNOTT et al., 2002; LAMARTINA et al., 2002; LAMARTINA et al., 2003). Um die Basalexpression des Tet-On-Systems im nicht-induzierten Zustand zu vermindern, kann zusätzlich der Tetrazyklin-abhängige *transcriptional silencer* eingesetzt werden. Dieses Element stellt ein Fusionsprotein aus einem modifizierten tTA mit *transcriptional silencing* Domänen dar und bindet in Abwesenheit von Tcs an den Tet-responsiven Promotor (FREUNDLIEB et al., 1999). Dadurch wird eine Tc-unabhängige Aktivierung durch den reversen Transaktivator verhindert. Der erfolgreiche Einsatz in

verschiedenen Systemen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert (ZHU et al., 2001; PEREZ et al., 2002; SALUCCI et al., 2002).

Als Ligand wird im Tet-System in der Regel Doxyzyklin eingesetzt, welches vor allem im Tet-On-System eine höhere Affinität als Tetracyclin zeigt (GOSSEN et al., 1995). Maximale Aktivierung wird hier beim reversen Transaktivator rtTA2^s-M2 in der Zellkultur nach acht Stunden bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml Medium erreicht (URLINGER et al., 2000). In solch niedrigen Dosen ist Doxyzyklin *in vitro* nicht toxisch (GOSSEN et al., 1995; URLINGER et al., 2000). *In vivo* lagern sich diese Substanzen allerdings während des Körperwachstums in den Knochen und Zähnen ab (COHLAN, 1977). Doxyzyklin zeigt eine gute Gewebepenetration, einschließlich Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Übertritt in die Milch (PASSMAN und FISHMAN, 1994; SCHULTZE et al., 1996). Es hat mit 12 bis 24 h eine längere Halbwertszeit als Tetracyclin (4 bis 12 h). Aufgrund seiner Wasserlöslichkeit ist Doxyzyklin für die Verwendung *in vivo* über das Trinkwasser applizierbar, für die Verwendung unter Zellkulturbedingungen *in vitro* lässt es sich leicht den Zellkulturmedien zusetzen (RIOND und RIVIERE, 1988). LAMARTINA und Mitarbeiter konnten in *In-vivo*-Experimenten unter Verwendung des reversen Transaktivators rtTA2^s-M2 zudem eine dosisabhängige Expression verschiedener Transgene zeigen (LAMARTINA et al., 2003).

Welches System, Tet-Off oder Tet-On, gewählt wird, hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. *In vitro* sind beide Systeme als gleichwertig zu betrachten: die Genexpression lässt sich über ein vielfaches regulieren, Kinetik und Induktion sind schnell. Soll aber ein Gen die meiste Zeit abgeschaltet sein und nur gelegentlich angeschaltet werden, ist das Tet-On-System vorzuziehen. Im Gegenzug dazu ist das Tet-Off-System besser geeignet, wenn ein Gen nur zwischenzeitlich abgeschaltet werden soll (BARON und BUJARD, 2000).

Um eine regulierbare Genexpression zu erzielen, müssen beide regulatorischen Einheiten in die Zielzelle eingebracht werden. In vielen Ansätzen wurden beide Komponenten getrennt voneinander eingebracht (BOHL et al., 1998; ROSSI et al., 1998; PITZER et al., 1999). Obwohl in diesem Zwei-Schritt System nach Selektion einzelner Zellklone gute Regulationseigenschaften des gewünschten Gens gezeigt werden konnten, sind doch immer doppelte Transduktionen einer Zielzelle notwendig. Diese Vorgehensweise ist für immortalisierte Zelllinien durchaus praktikabel, die Verwendung bei primären Zellen ist dagegen schwieriger. Diese sind im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien häufig schwerer zu transduzieren oder transfizieren und sie neigen nach einer gewissen Zeit in der Zellkultur dazu, ihre typischen Charakteristika zu verlieren.

Dieser Nachteil wird durch den Einsatz retroviraler Vektoren zum Teil ausgeglichen, da hier infolge der retroviralen Integration eine Selektion stabil transfizierter Zellklone entfällt. Die Verwendung von Vektoren, bei denen der Transfer beider Komponenten mit einem einzigen Konstrukt vollzogen wird, stellt eine weitere Möglichkeit der Verbesserung des Transfers von Tetrazyklin-regulierbaren Vektoren dar (HOFMANN et al., 1996; HWANG et al., 1996; PAULUS et al., 1996; DUGRAY et al., 2001).

Es ist beschrieben, dass der Integrationsort in das zelluläre Genom einen starken Einfluss auf die Regulation des Tet-Systems in integrierten Vektoren hat. Klone einer Zelllinie, die das Tet-System enthalten, zeigen infolgedessen starke Unterschiede in der Regulation (BARON und BUJARD, 2000; VIGNA et al., 2002).

Es ist schon von verschiedenen Seiten beschrieben worden, dass der Zelltyp Einfluss auf die Regulierbarkeit Tetrazyklin-regulierbarer Systeme (sowohl Tet-On als auch Tet-Off) hat (ACKLAND-BERGLUND und LEIB, 1995; HOWE et al., 1995; PAULUS et al., 1996; BARON und BUJARD, 2000).

2.5 Gentransfer in Chondrozyten

2.5.1 Biologie der Chondrozyten

Gelenkknorpel (hyaliner Knorpel) ist die dünne Schicht, welche die Enden der Knochen in beweglichen Gelenken bedeckt. Die Ernährung des Knorpels geschieht über die Synovialflüssigkeit der Gelenkhöhle und durch den subchondralen Knochen direkt im Anschluss an den Knorpel. Den zellulären Anteil des Knorpels bilden die Chondrozyten, die nur 1 % des Volumens ausmachen. Die Chondrozyten sind von zellulärer Matrix umgeben, die sie selber bilden. Diese Matrix besteht zu 80 % aus Wasser, in der Trockensubstanz des hyalinen Knorpels sind 65 % Kollagen, vorwiegend Typ II und 15 bis 18 % Proteoglykane enthalten (KÜNZEL und KNOSPE, 1990). Hyaliner Knorpel ist frei von Gefäßen und Nerven. Verletzungen, die nur die Knorpelschicht betreffen, sind deshalb schmerzfrei. Akute Verletzungen des Gelenkknorpels werden als Präarthrose bezeichnet, die im Laufe der Zeit in eine Arthrose übergehen kann (MANKIN, 1982; RADIN und BURR, 1984; BUCKWALTER und MANKIN, 1998b). Nur in Fällen von kleinen Knorpelschäden mit minimalem Verlust der Matrix sind Chondrozyten in der Lage, durch Neusynthese von Kollagenen und Proteoglykanen die Knorpeloberfläche komplett wiederherzustellen (CONVERY et al., 1972; BUCKWALTER und MANKIN, 1998a). Die Einstufung adulter Gelenkchondrozyten als terminal differenziert und postmitotisch bezieht sich auf die *In-vivo*-Situation. Werden solche

Zellen nach enzymatischer Behandlung des Gewebes in zweidimensionale Kultur genommen, ändern sich Zellform, Proliferationsverhalten und das Syntheseprofil der Kollagene (vermehrte Synthese von Kollagen Typ I) und Proteoglykane (ABBOTT und HOLZER, 1966; BENYA et al., 1978; VON DER MARK et al., 1977). Dieser Prozess wird als Dedifferenzierung bezeichnet. In dreidimensionaler Kultur ist dieser Vorgang reversibel (BONAVENTURE et al., 1994; LIU et al., 1999a).

2.5.2 Grundlagen des Gentransfers in Chondrozyten

Die dichte Matrix um die Chondrozyten behindert den *In-vivo*-Gentransfer in diese Zellen. Der Umstand, dass sich diese Zellen *in vivo* nicht teilen, macht zudem einen retroviralen Gentransfer unmöglich. Der erfolgreiche *In-situ*-Transfer von Markergenen wurde durch die Verwendung eines Sendai Virus, welches durch Liposomen umhüllt wurde (TOMITA et al., 1997) und mittels Adeno-assoziiierter Viren erreicht (ARAI et al., 2000). Die Effizienz dieses Transfers beträgt über 30 bzw. 46 % der Zellen.

Gewinnung und Kultivierung primärer Chondrozyten ist eine etablierte Methode, autologe Chondrozytentransplantation für die Therapie von Defekten wird bereits klinisch angewendet (BRITTBERG et al., 2001). Die Zellen werden dabei entweder in Zellsuspension unter einen Periostlappen appliziert oder nach Besiedelung einer Matrix in dreidimensionaler Form implantiert (BRITTBERG et al., 1994).

Ex-vivo-Gentransfer in Chondrozyten ist mit verschiedenen Verfahren möglich und mit nicht-viralen und viralen Vektoren beschrieben worden (HANNALLAH et al., 2002). Wie bei MADRY und TRIPPEL, 2000 und HIRSCHMANN et al., 2002 beschrieben, wird die Effizienz des Gentransfers nicht nur durch das verwendete Vektorsystem, sondern auch durch die Spezies der Chondrozytenspender beeinflusst.

Nicht-viraler Gentransfer wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt. DINSER und Mitarbeiter (2001) berichten über die erfolgreiche Transduktion von 42 % boviner Chondrozyten mittels Lipid-vermittelter Transfektion. Diese Transduktionsrate boviner Chondrozyten wird auch von MADRY und TRIPPEL, 2000 erreicht, während humane Chondrozyten nur zu 20 % transduziert werden. GOOMER et al., 2001 erzielen über 70 % Transduktion bei Chondrozyten des Kaninchens mit der Verwendung von Komplexen aus DNA, Transferrin-poly-l-Lysin und kationischen Liposomen. Viraler Gentransfer wird unter anderem erfolgreich durch Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren durchgeführt (DINSER et al., 2001; BROWER-TOLAND et al., 2001; BARAGI et al., 1997; DOHERTY et al., 1998; SHULER et al., 2000; MADRY et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit des viralen

Gentransfers in Chondrozyten, ist die Transduktion mittels rekombinanter retroviraler Vektoren. Im Vergleich zu adenoviraler Transduktion oder nicht-viraler Transfektion, führt diese Methode auch ohne Selektion zu einer stabilen Integration des Vektors in das zelluläre Genom und damit zu stabiler, langanhaltender Transgenexpression. Retroviraler Gentransfer in Chondrozyten des Kaninchens wurde von KANG et al., 1997, ADACHI et al., 2002 und HIRSCHMANN et al., 2002 beschrieben. Diese Arbeitsgruppen charakterisieren den retroviralen Gentransfer durch den Einsatz von Markergenen.

Für einen *Ex-vivo*-Gentransfer werden primäre Zellen vom Tier oder Patienten gewonnen, kultiviert und in der Kultur genetisch verändert. Der Gentransfer muss dabei sehr effizient sein, da oft nur wenig Zellmaterial für zur Verfügung steht. Da die transduzierten Zellen anschließend für die Implantation in Knorpeldefekte verwendet werden sollen, spielt der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle. Zweidimensionale Kultur führt bei primären Chondrozyten zu Dedifferenzierung, nach längerer Zeit in Kultur stellen sie zudem das Wachstum ein (ABBOTT und HOLZER, 1966; BENYA et al., 1978). Selektionsverfahren in der Zellkultur, wie z. B. von KANG et al., 1997 durchgeführt, benötigen zusätzlich Zeit. Während einer solchen Selektion besteht außerdem die Möglichkeit, dass das Transgen des Retrovirus, welches keinem Selektionsdruck unterworfen ist (in diesem Fall das Markergen) nicht mehr exprimiert wird (EMERMAN und TEMIN, 1984; SCHOTT et al., 1996). Die Selektion mittels FACS-Sortierung ist auf Markergene wie *lacZ* und *egfp* und auf mittels Antikörper markierbare Transgene beschränkt. Die Etablierung von Gentransfersystemen mit ausreichender Effizienz auch ohne Selektion ist daher notwendig.

Bisher basieren genterapeutische Strategien auf Vektoren, in denen das gewählte therapeutische Gen konstitutiv aktiv ist. Es gibt jedoch viele genterapeutische Ansätze, für die es von Vorteil ist, das Expressionsniveau direkt kontrollieren und gegebenenfalls anpassen zu können. Dies gilt neben *In-vitro*-Applikationen auch für den Einsatz im Tiermodell.

Die langanhaltende Expression eines therapeutischen Transgens für die Reparatur von Knorpeldefekten ist unter Umständen nicht notwendig oder wünschenswert. VAN BEUNINGEN et al., 1994 beobachteten z. B. die Bildung von Osteophyten nach Applikation von TGF- β . Weitere Studien sind deshalb notwendig, um optimale Dauer und Dosis der Transgenexpression zu bestimmen. Der Einsatz stabil integrierter Tetrazyklin-regulierbarer Vektoren, stellt dafür einen möglichen Ansatz dar.

2.5.3 Humanes *Bone Morphogenic Protein-2*

In den 60er und 70er Jahren beobachtete URIST, dass Extrakte aus demineralisierten Knochen neue Knochenbildung im Muskelgewebe von Mäusen verursachen (URIST, 1965; URIST et al., 1973). Dieser Prozess spiegelt dabei den normalen Ablauf der Knorpel- und Knochenbildung wieder (REDDI und HUGGINS, 1972; REDDI, 1981). Die aktiven Komponenten wurden als Proteine identifiziert und *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) genannt. Im Jahre 1988 wurden die komplementären DNAs für das humane *bmp-1*, *bmp-2* und *bmp-3* isoliert (WOZNEY et al., 1988). Aufgrund ihrer Struktur werden BMPs zu der Transforming growth factor- β Familie (TGF- β) gerechnet, einer Gruppe sezernierter Faktoren (HOGAN, 1996; KINGSLEY, 1994). Proteine der TGF- β Familie werden als großes Vorläuferprotein synthetisiert (dargestellt in Abbildung 6). Dieses besteht aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und einer *carboxy terminal region*. Das Signalpeptid ist für die Sekretion des Proteins verantwortlich, die Prodomäne ist für Proteinfaltung, Dimerbildung und Regulation der biologischen Aktivität notwendig. Das reife Protein besteht aus der verhältnismäßig kurzen *carboxy terminal region*. BMPs bilden über Disulfidbrücken miteinander Homo- oder Heterodimere. Von diesen wird die *carboxy terminal region* intrazellulär als aktive Form proteolytisch abgespalten (KINGSLEY, 1994). Das Vorläuferprotein des humanen BMP-2 ist 396 Aminosäuren groß und hat ein Molekulargewicht von 44702 Da (SWISS-PROT Datenbank, P12642). Das reife BMP-2 Peptid des Kaninchens ist homolog zu der humanen Form (SWISS-PROT Datenbank, O46564). Die Länge des Peptides beträgt 114 Aminosäuren (vgl. Abbildung 6). Die biologische Wirkung der aktiven Form der BMPs (Dimer aus zwei *carboxy terminal regions*) wird lokal über die Bindung an zelluläre Serin/Threonin Rezeptoren (Typ I und Typ II) vermittelt, was zu einer intrazellulären Signalkaskade durch Signalproteine (SMAD-Proteine) führt (LIU et al., 1995; KAWABATA et al., 1998). Die biologischen Eigenschaften von BMP-2 beziehen sich vor allen Dingen auf die Knochen- und Knorpelbildung, sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch im Erwachsenenalter. Im Embryo zeigt sich die Expression neben anderen Organen vor allem im sich entwickelnden Skelettgewebe (ROSEN et al., 1989; LYONS et al., 1990). Die Ausschaltung dieses Gens führt zu frühem embryonalen Fruchttod (ZHANG und BRADLEY, 1996). Im Erwachsenenalter steht die Knorpel- und Knochenbildung im Vordergrund (URIST, 1965; WOZNEY et al., 1988). BMP-2 ist in verschiedenen präklinischen Studien in der Orthopädie zum Einsatz gekommen, wobei in den meisten Fällen rekombinantes Protein verwendet wurde (HOFFMANN et al., 2001;

LIEBERMAN et al., 2002a und b). Dieser Einsatz erstreckt sich auf die Verwendung in der Heilung von Knochendefekten kritischer Größe (YASKO et al., 1992; GERHART et al., 1993; BOSTROM et al., 1996; SCIADINI und JOHNSON, 2000), die Verwendung für die Frakturheilung (BALTZER et al., 2000) und für spinale Fusionen (BODEN et al., 2000; LIEBERMAN et al., 2002a). Es wurde unter anderem gezeigt, dass BMP-2 *in vitro* einen fördernden Einfluss auf die Produktion von Matrixproteinen durch Chondrozyten hat (LUYTEN et al., 1992; SAILOR et al., 1996; SMITH et al., 2000; CARLBERG et al., 2001; MARTIN et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BMP-2 als rekombinantes Protein *in vivo* die Proteoglykansynthese in Gelenkknorpel erhöht (GLANSBEEK et al., 1997). SELLERS und Mitarbeiter zeigten den positiven Effekt von rekombinantem BMP-2 auf die Heilung osteochondraler Knorpeldefekte am Kaninchen (SELLERS et al., 1997 und 2000). In diesem Modell wurden Kollagenschwämme, die mit 5 mg rekombinantem hBMP-2 beschichtet waren, in bis in den Knochen hineinreichende Defekte implantiert. Im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren zeigten die Defekte der behandelten Tiere auch nach über einem Jahr ein besseres histologisches Erscheinungsbild und eine gesteigerte Bildung von Kollagen Typ II (Hinweis auf die Bildung hyalinen Knorpels). Die Dicke des neu gebildeten Knorpels betrug dabei allerdings nur 70 % des unverletzten Knorpels. Dieses Zytokin stellt somit einen möglichen Kandidaten für den therapeutischen Gentransfer in Chondrozyten dar, um die Heilung von Knorpeldefekten zu verbessern.

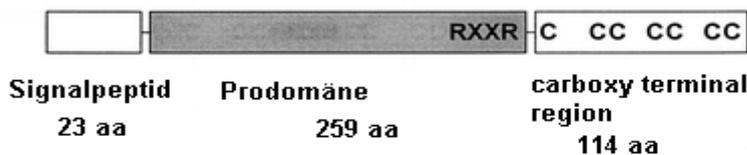


Abbildung 6: Schematische Darstellung des hBMP-2 Vorläuferpeptids mit Angaben der Sequenzlängen
Das reife Protein besteht aus der relativ kurzen *carboxy terminal region* (Länge: 114 aa), diese bildet als Dimer das aktive Molekül. Die proteolytische Spaltung von der Prodomäne findet an der Sequenz RXXR statt. aa: Aminosäuren (Abbildung aus: HOFFMANN et al., 2001).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zielsetzung der Arbeit

Die zur Zeit zur Verfügung stehenden Therapieansätze für die Behandlung chondraler bzw. osteochondraler Verletzungen sind nicht zufriedenstellend. Gentherapeutische Ansätze, welche zunächst im Tiermodell getestet werden, stellen einen Beitrag zur Lösung dieses Problems dar. Die Implantation genetisch veränderter Chondrozyten in die Defekte ist ein möglicher Lösungsansatz. Retroviraler Gentransfer bietet die Gelegenheit, Zellen mit hoher Effizienz *in vitro* genetisch zu verändern. Bisher veröffentlichte Methoden des retroviralen Gentransfers in primäre Chondrozyten des Kaninchens sind dabei nicht zufrieden stellend und müssen für eine therapeutische Verwendung weiter optimiert werden. Die stabile Integration des Vektors in das zelluläre Genom mit der damit verbundenen anhaltenden Transgenexpression ist allerdings für viele gentherapeutische Anwendungen wie die Therapie von Knorpeldefekten nicht notwendig und unter Umständen mit Risiken behaftet. Die Kombination des retroviralen Gentransfers mit regulierbarer Genexpression bietet eine geeignete Lösungsmöglichkeit dieses Problems.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher neben der Optimierung und Evaluierung des retroviralen Gentransfers in primäre Kaninchenchondrozyten die Entwicklung Tetrazyklin-regulierbarer retroviraler Vektoren für den Einsatz in der Behandlung osteochondraler Defekte. Neben der Optimierung des retroviralen Gentransfers mittels konstitutiv exprimierender retroviraler Vektoren unter Verwendung unterschiedlicher Virushüllen und verschiedener Transgene (*nlslacZ* als Reportergen und *hbmp-2* als Beispiel für ein therapeutischen Gen), sollten retrovirale Vektoren entwickelt werden, die zusätzlich zu einem Transgen beide Elemente des Tet-On-Systems enthalten. Durch die Verwendung derartiger Vektoren ist nur eine einzelne Transduktion der Zielzelle für regulierbare Transgenexpression notwendig. Durch die Verwendung des reversen Transaktivators der zweiten Generation rtTA2^S-M2 sollten dabei die in der Literatur beschriebenen Probleme des reversen Transaktivators der ersten Generation (*leakiness*, Toxizität) vermieden werden. Das Expressions- und Regulationspotential der entwickelten regulierbaren retroviralen Vektoren sollte untersucht und die Eignung für die weitere Verwendung *in vivo* bewertet werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind Bestandteil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes in Kooperation mit der Abteilung für Sportorthopädie der Technischen Universität München. Eine Übersicht über den Ablauf des Projektes wird in Abbildung 7 gegeben.

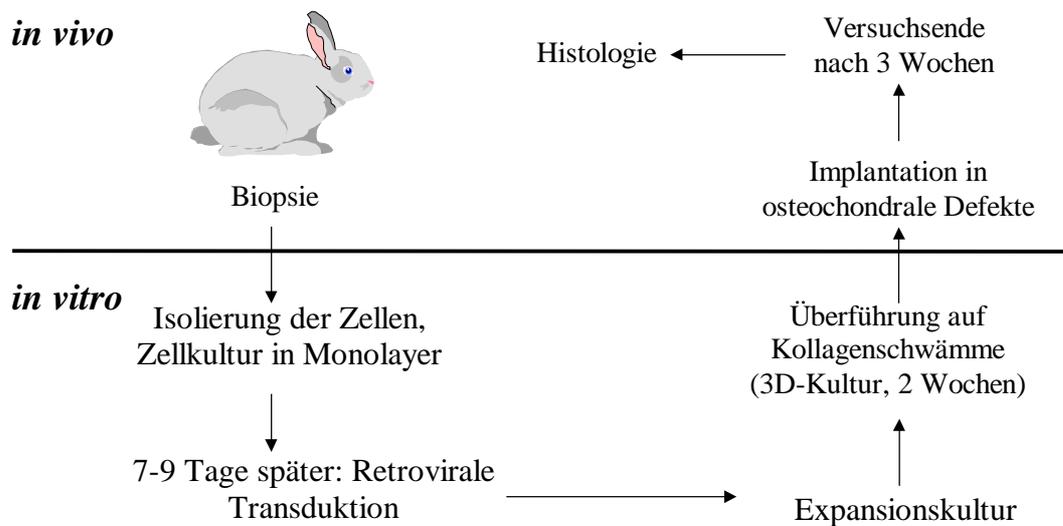


Abbildung 7: Übersicht über das Versuchsvorhaben

Die eigenen Untersuchungen waren in mehrere Schritte gegliedert und beinhalteten:

- 1) Klonierung retroviraler Vektoren.
- 2) Test dieser Vektoren *in vitro* mit Hilfe von Referenzzelllinien. Für amphotrope Viren wurden NIH 3T3 Zellen (murine Fibroblasten) verwendet. VSV.G-pseudotypisierte Viren wurden mittels Transduktion von HT-1080 Zellen (humane Fibrosarkomzellen) getestet.
- 3) Optimierung der Transduktion primärer Chondrozyten des Kaninchens.
- 4) Monitoring der Transgenexpression *in vitro*.
- 5) Monitoring der Transgenexpression *nlslacZ*-transduzierter Chondrozyten *in vivo*.
- 6) Entwicklung und Evaluierung Tetrazyklin-induzierbarer Vektoren.

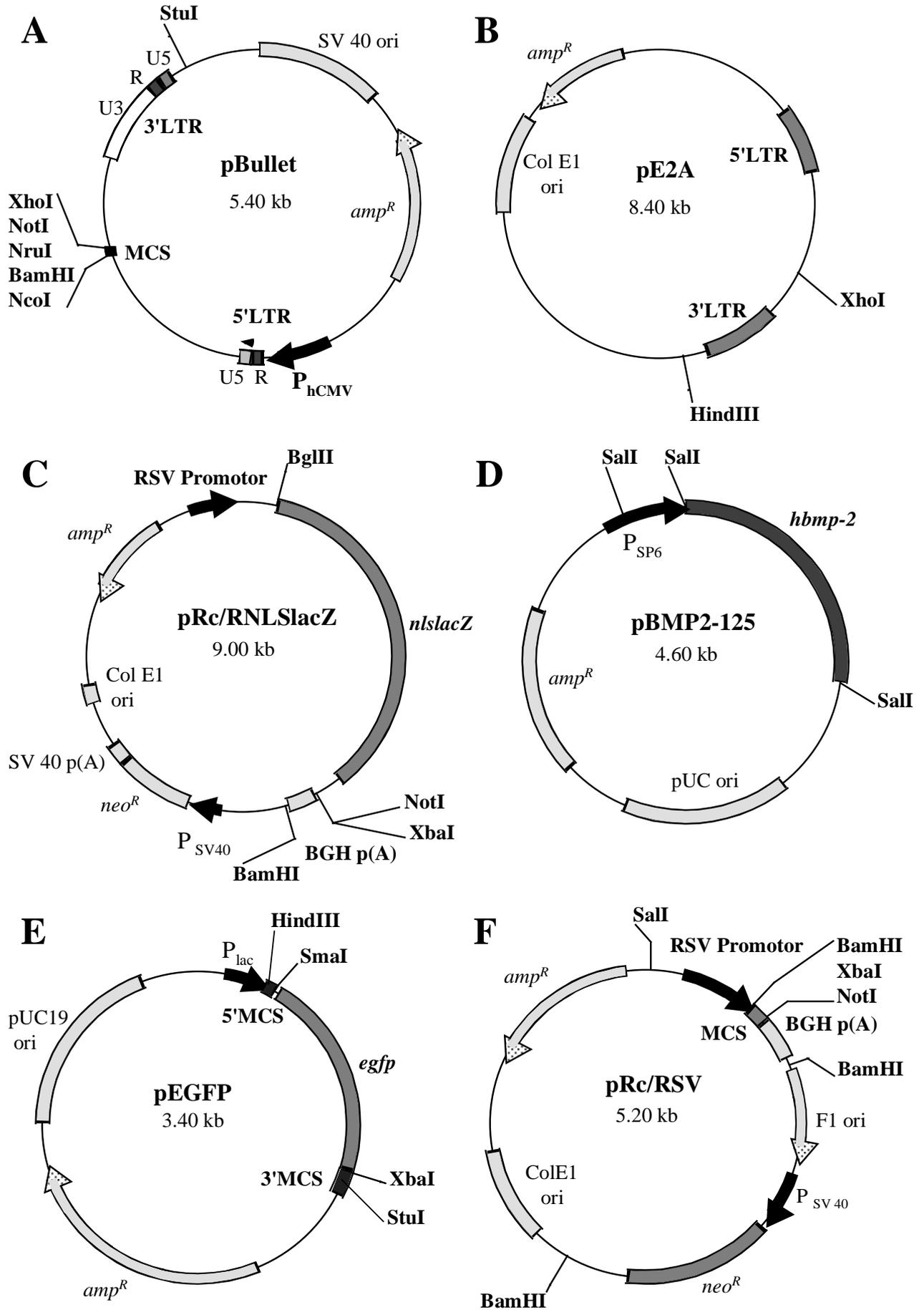
3.2 Molekularbiologische Materialien und Methoden

3.2.1 Für Klonierungen verwendete Plasmide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 4 mit einer kurzen Angabe des Verwendungszweckes und der Bezugsquelle (Herkunft) aufgelistet. Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau dieser Plasmide mit Angabe der für Klonierungen verwendeten Restriktionsenzym-Schnittstellen.

Tabelle 4: Für Klonierungen verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pBullet	Mo-MLV-retroviraler Vektor	Erhalten von R. Willemsen, Rotterdam, Niederlande, (WILLEMSEN et al., 2003)
pE2A	Mo-MLV-retroviraler Vektor	Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität, München
pRc/RNLSlacZ	Isolierung der <i>nslacZ</i> cDNA	Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität, München
pBMP2-125	Isolierung der <i>hbmp-2</i> cDNA	Erhalten von L. Tamayo, Cambridge, USA
pEGFP	Isolierung der <i>egfp</i> cDNA	Fa. BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
pRc/RSV	Vektor für Zwischenklonierungen	Fa. Invitrogen, La Jolla, USA
pTRE2	Tet-On-System, Isolierung des Tet-responsive Promotors	Fa. BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
pUhrT 61-1	Tet-On-System, Isolierung des reversen Transaktivators (<i>rtTA2^s-M2</i>)	Erhalten von H. Bujard, Heidelberg (URLINGER et al., 2000)



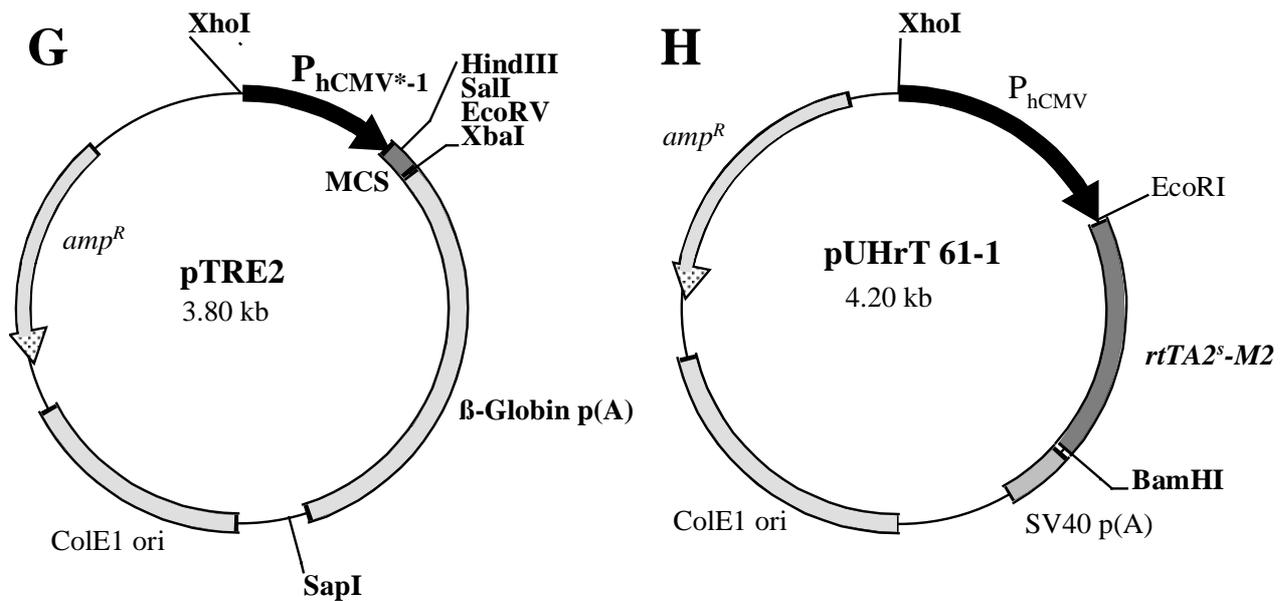


Abbildung 8: Schematische Darstellung der für Klonierungen verwendeten Plasmide (A-H)

LTR: long terminal repeat; U3, R, U5: Regionen der LTR; MCS: multiple cloning site; SV 40 ori: origin of replication des Simian Virus 40; *amp^R*: Ampicillin-Resistenz Gen; P_{hCMV}: Promotor des humanen Cytomegalievirus; ColE1 ori: ColE1 origin of replication; RSV Promotor: Promotor des Rous Sarkom Virus; *nlslacZ*: β-Galaktosidase Gen mit nuclear leading signal; BGH p(A): Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; P_{SV 40}: Promotor des Simian Virus 40; *neo^R*: Neomycin-Resistenz Gen; SV 40 p(A): Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40; P_{SP6}: SP6 Promotor; *hbmp-2*: humanes bone morphogenic protein-2 Gen; pUCori: pUC origin of replication des pUC; P_{lac}: Sequenz des lac Promotors; *egfp*: enhanced green fluorescent protein; F1 ori: F1 origin of replication; P_{hCMV*-1}: Tet-responsive Promotor; β-Globin p(A): Polyadenylierungssignal des β-globin Gens; *rtTA2^s-M2*: Sequenz des reversen Transaktivators *rtTA2^s-M2*; XhoI, NotI, NruI, BamHI, NcoI, StuI, HindIII, BglII, Sall, SmaI, EcoRV, XbaI, SapI, EcoRI: Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme; kb: Kilobasen.

3.2.2 Bakterienkultur

3.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Amplifikation von Plasmid-DNA fand in *Escherichia coli* (*E. coli*), Stamm DH10B (Fa. Invitrogen, La Jolla, USA), statt. Die Bakterien wurden als Flüssigkultur in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) bzw. auf LB-Agarplatten kultiviert. Alle verwendeten Plasmide enthalten das Gen für *Ampicillin-Resistenz* (*amp^R*) und ermöglichen so eine Selektion plasmidtragender Bakterien in Anwesenheit von β-Lactam Antibiotika. Für eine solche Selektion wurde Ampicillin G (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in einer Endkonzentration von 100 mg/ml zugesetzt.

Luria-Bertani-Medium:

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

Agarplatten:

- 15 g Agar (Bacto™ Agar, Fa. BD Diagnostic Systems, Sparks, USA)
- 1 l LB-Medium
- Sterilisation bei 120 °C und 1 bar für 20 Minuten
- Zugabe von 0,1 g/ml Ampicillin G nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C
- Die Lagerung der Platten erfolgt bei + 4 °C.

3.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Spontan nehmen *E. coli* Bakterien keine Fremd-DNA auf. Es existieren jedoch verschiedene Methoden, um *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Verwendete Bakterien wurden wie von SAMBROOK und Mitarbeitern, 1989a veröffentlicht, mit Hilfe von Calcium Chlorid chemisch kompetent gemacht.

3.2.2.3 Transformation

Transformation von Bakterien bezeichnet das Einbringen genetischen Materials in Form bakterieller Plasmide und damit die Veränderung der genetischen Eigenschaften.

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

Fa. wtb Binder, Tuttlingen). Bis zum folgenden Morgen bilden sich klonale Bakterienkolonien. Eine Lagerung dieser Platten bei +4 °C ist bis zu vier Wochen möglich.

3.2.3 Plasmidpräparation

Den im Folgenden beschriebenen Methoden liegt dasselbe Prinzip zugrunde. Nach Anzucht im geeigneten Selektionsmedium erfolgt die Lyse der Bakterien in NaOH/SDS haltigem Puffer. Dadurch werden die Zellen zerstört und Proteine und DNA freigesetzt und denaturiert. Das Lysat wird durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen neutralisiert, wobei chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer als Präzipitat ausfallen und die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Am Ende wird die Plasmid-DNA durch Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) entsalzt und gefällt.

3.2.3.1 Analytische Plasmidpräparation

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

3.2.3.2 Maxipräparation zur Präparation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmiden für weitere Klonierungen erfolgte mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit* der Fa. Qiagen GmbH, Hilden, nach Angaben des Herstellers.

3.2.3.3 Cäsium-Chlorid-Präparation von Plasmiden

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

Zunächst erfolgte die Zentrifugation der Bakterien-Übernachtskultur (500 ml Volumen) bei 4 000 U/min (Zentrifuge J-21 B Centrifuge, Fa. Beckmann, Palo Alto, USA). Nach Resuspension des Pellets in 40 ml Lysozym-Puffer folgte eine Inkubation von 20 min bei r. t. Durch Zugabe von 80 ml alkalinem Natriumdodecylsulfat (SDS) schloss sich die alkalische Lyse an. Nach Inkubation auf Eis (5-10 min) und anschließender Zugabe von 60 ml 5 M K-Acetat-Lösung folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15-30 min. Danach erfolgte die Zugabe von 10 ml ddH₂O, an die sich ein Zentrifugationsschritt von 30 min,

MATERIAL UND METHODEN

10 000 U/min (J-21 B Centrifuge, Fa. Beckmann, Palo Alto, USA) anschloss. Der Zentrifugationsüberstand wurde durch ein Stück Verbandsgaze filtriert und in ein neues 500 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 ml Isopropanol folgte eine Inkubation von 30 min bei r. t. Der Ansatz wurde danach 30 min bei 10 000 U/min (r. t.) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets an der Luft, erfolgte dessen Auflösung in 8 ml 0,1x saline-sodium citrate (SSC). Je Ansatz wurden 8 g Caesium-Chlorid (CsCl, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in ein 50 ml Falcon Tube (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz) eingewogen und das gelöste Pellet zugegeben. Nach dem Lösen des CsCl und anschließender 30 minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3 800 U/min für 15 min (Varifuge 3.0R, Fa. Heraeus, Hanau).

Der Überstand wurde abgenommen und mit 200 µl Ethidium-Bromid (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 8,9 ml Optisealtubes (Beckmann, Palo Alto, USA) gegeben. Nach Auffüllung mit 0,1x SSC folgte über Nacht eine 14- bis 16-stündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Optima Le 80K Ultracentrifuge, Rotor Ti80, Fa. Beckmann, Palo Alto USA) mit 55 000 U/min bei 14 °C.

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

Zu der gereinigten unteren Phase wurden 3 Volumen Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer) pH 7,4 und 8 Volumen Ethanol (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) zugegeben. Es schloss sich eine 30 minütige Zentrifugation bei 4 000 U/min an. Das entstandene DNA-Pellet wurde einmal mit 100%igem Ethanol und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Dann folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4 000 U. Nach Trocknung des Pellets bei r. t. wurde dieses je nach Größe in 200-500 µl 0,1x SSC gelöst.

MATERIAL UND METHODEN

Lysozym-Puffer:

- 5 mg Lysozym (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) pro 1 ml Stammlösung

Stammlösung:

- 10 mM EDTA (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 50 mM Glucose
- 25 mM Tris, pH 8,0 (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- in ddH₂O gelöst

alkalines SDS:

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

5 M K-Acetat-Lösung:

- 147 g K-Acetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 300 ml ddH₂O lösen und autoklavieren (20 min., 120 °C, 1 bar)
- 57,5 ml Eisessig (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 142,5 ml ddH₂O

0,1x saline-sodium citrate (SSC):

- 0,5 % (v/v) 20x SSC in ddH₂O

20x SSC:

- 175,3 g Natriumchlorid
- 88,2 g Natriumcitrat
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
- mit ddH₂O auf 1000 ml Volumen auffüllen

TE-Puffer:

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

3.2.4 Konzentrationsbestimmung gelöster DNA

3.2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

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

3.2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

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

3.2.5 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese durch Agarosegele ist eine Standardmethode für die Separation, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Das Prinzip der Elektrophorese ist folgendes: An ein in salzhaltigem Puffer liegendes Agarosegel wird ein elektrisches Feld angelegt, woraufhin DNA, welche bei neutralen pH-Wert negativ geladen ist, zur Anode wandert. Die Geschwindigkeit dieser Wanderung hängt unter anderem von der Größe der entstandenen Fragmente ab. Grundsätzlich gilt, dass kleine Fragmente schneller wandern als große. Für die Analyse und Präparation von DNA wurden Agarosegele je nach Größe der DNA-Fragmente mit einem Gehalt von 0,8 bis 2 % (w/v) Agarose (peqGold Universal Agarose, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in Tris-Acetat-Puffer (TAE-Puffer) mit

2 µl Ethidium-Bromid (Konzentration 10 mg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Elektrophorese fand in einer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit Elektrophoresekammer (Fa. Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) in TAE-Puffer bei 45-80 V statt. Die Dauer betrug je nach Versuchsbedingungen 1-3 h. Die DNA-Proben wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker dienten der 1 kb DNA Marker, der 100 bp Marker und der λ -HindIII Marker der Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA. Die Dokumentation der Elektrophoresegele erfolgte mittels Fotografie des Gels in einer Dunkelkammer mit UV-Leuchttisch (Gerät Bio-Print®, Fa. Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich) und nachfolgender Auswertung durch die zugehörige Software Bio-Capt® (Fa. Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich). Durch den Zusatz von Ethidium-Bromid, einem DNA intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff, stellen sich DNA-Fragmente einer Größe als eine in UV-Licht fluoreszierende Bande dar.

TAE-Puffer:

- 4,84 g Tris-Acetat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 1,1 ml 100%ige Essigsäure (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- mit ddH₂O auf 1000 ml Volumen auffüllen

6x Ladepuffer:

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

3.2.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

3.2.6.1 Analytischer Restriktionsverdau

Zur Analyse von Plasmiden aus Minipräparationen nach Ligation oder zur Kontrolle eines bereits etablierten Plasmids wurde eine analytische Spaltung der Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) durchgeführt. Diese Enzyme schneiden

DNA an für sie spezifischen Restriktionsstellen und führen so zu einer Linearisierung oder Fragmentierung der DNA. 0,2-1 µg Plasmid-DNA wurden hierfür mit 5-10 IU Restriktionsenzym (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim oder Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA) und dem dazugehörigen Puffer für ein bis zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Heatblock (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 10 µl. Danach folgte die gelelektrophoretische Analyse (siehe Kapitel 3.2.5).

3.2.6.2 Präparativer Restriktionsverdau

Zur Präparation von DNA-Fragmenten für die weitere Klonierung wurden 4 bis 10 µg DNA mit 10-20 IU des benötigten Restriktionsenzym wie in Kapitel 3.2.6.1 beschrieben, verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente bei 45 V wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

3.2.7 DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen

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

3.2.8 Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen je nach verwendetem Enzym glatte Enden (*blunt-ends*), Enden mit 5'-Überhang oder Enden mit 3'-Überhang (*sticky-ends*). In den beiden letzten Fällen ergibt sich im Rahmen von Klonierungen bzw. Subklonierungen unter Umständen das Problem, dass DNA-Fragmente mit inkompatiblen Enden miteinander verknüpft werden müssen. Hierbei besteht die Möglichkeit, solche Enden zu glätten und die DNA-Fragmente mittels *blunt-end*-Ligation zu verknüpfen. Das Auffüllen 5'-überhängender Enden wurde mittels Klenow Enzym durchgeführt. Klenow Enzym besitzt 5'→3'-Polymerase- und 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Erstere kann in Anwesenheit von desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTP) und Magnesiumionen zum Auffüllen 5'-überhängender Enden genutzt werden, so dass man glatte DNA-Enden (*blunt-ends*) erhält. Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität werden 3'-überhängende Enden geglättet. Da Klenow Enzym in praktisch allen Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist, kann DNA aus Restriktionsverdauansätzen direkt für die Auffüllreaktion eingesetzt werden. Verwendet wurden Klenow Enzym und eine dNTP-Stammlösung (mit je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP

und dTTP) der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Für die Reaktion betrug die Endkonzentration der dNTPs 0,05 mM. Das Reaktionsvolumen betrug je nach Konzentration der DNA 20-40 µl, wobei darauf geachtet wurde, dass der Ansatz die entsprechende Menge Restriktionspuffer enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 bis 3 IU Klenow Enzym gestartet und nach einstündiger Inkubation bei 37 °C durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min gestoppt.

3.2.9 Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Um eine Religation linearer DNA mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde die 5'-Phosphatgruppe durch den Einsatz alkalischer Phosphatase (AP) entfernt. Da die AP auch in Restriktionsansätzen aktiv ist, wurde diese am Ende der Inkubation der zu dephosphorylierenden Restriktion ohne vorhergehende Aufreinigung zugegeben. Nach Zusatz von 1 IU AP der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C. Durch Erhitzung auf 65 °C für 15 min folgte anschließend die Inaktivierung des Enzyms.

3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

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

3.3 Zellbiologische Materialien und Methoden

3.3.1 Verwendete Zelllinien

- 293T: Es handelt sich hierbei um eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch stabile Transfektion der adenoviralen E1A-Region immortalisiert wurde.

Zusätzlich enthält sie das *SV 40 large T Antigen* (DUBRIDGE et al., 1987). Die Zellen wurden freundlicherweise von R. Willemsen, Niederlande zur Verfügung gestellt.

- Phoenix-Ampho: Es handelt sich um eine von 293T Zellen abstammende MLV Verpackungszelllinie mit stabil integrierten Expressionsvektoren für die amphotropen Hüllproteine und die *gag-pol*-Proteine (www.stanford.edu/group/nolan). Die Zellen wurden freundlicherweise von R. Willemsen, Niederlande zur Verfügung gestellt.
- HT-1080: Menschliche Fibrosarkomzelllinie der Fa. ATCC (Manassas, USA), Nummer: CCL-121 (RASHEED et al., 1974).
- NIH 3T3: Embryonale Maus-Fibroblastenzelllinie der Fa. ATCC (Manassas, USA), Nummer: CCL-1658 (JAINCHILL et al., 1969).
- primäre Chondrozyten des Kaninchens: Kulturen primärer Chondrozyten stammten aus etwa 6 Wochen alten weiblichen Tieren der Rasse Weiße Neuseeländer der Fa. Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Intraoperativ wurde aus dem Oberschenkelrollkamm eines Knies Knorpel entnommen, aus dem dann die Chondrozyten als primäre Kultur etabliert wurden. Die Chondrozytenkulturen der verschiedenen Tiere bekamen dabei Bezeichnungen, die von der Tiernummer des Spendertieres abgeleitet waren: Die Zellen des Tieres mit der Nummer „1“ würden nach der gewählten Nomenklatur die Bezeichnung „CZ 1“ bekommen.

3.3.2 Methoden der Zellkultur

3.3.2.1 Medien und Zusätze

- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM): Mit 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine der Fa. Biochrom, Berlin
- foetales Kälberserum (FKS): Sera Plus der Fa. Pan Biotech GmbH, Aidenbach
- *Phosphate buffered saline* (PBS)-Dulbecco (1 x): Ohne Ca²⁺, Mg²⁺ (Fa. Biochrom, Berlin)

- Trypsin/EDTA: 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS (Fa. Biochrom, Berlin)
- Glutamin: 200 mM Glutaminlösung der Fa. Biochrom, Berlin
- HEPES-Puffer: Solution 1 M (Fa. Invitrogen, La Jolla, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Doxycyclin: Für die Verwendung in der Zellkultur wurde Doxycyclin der Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen in ddH₂O mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in 100 µl Aliquots bei –20 °C.

3.3.2.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 1 % Glutamin und 1 % HEPES-Puffer (komplementiertes Medium) in einem Inkubator (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Fa. Thermo Life Sciences, Staufien) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Primäre Chondrozyten wurden zusätzlich mit Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 µg/ml, Fa. Biochrom, Berlin) kultiviert. Verwendet wurden Kulturschalen der Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz. Das Kulturvolumen einer 6 cm Schale betrug 5 ml, das einer 10 cm Schale 10 ml. Als schwammartige Trägermatrix für Chondrozyten in 3D-Kultur wurde Kollagen-resorb der Fa. Resorba Clinicare, Nürnberg verwendet. Für die Kultivierung in 3D-Kultur wurden 6×10^5 Chondrozyten durch Injektion mit einer Nadel auf ein 4 x 4 x 4 mm großes Stück Schwamm aufgebracht.

3.3.2.3 Zellpassage

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

3.3.2.4 Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer

Die Zellen wurden trypsiniert und in komplementiertem Medium aufgenommen. 100 µl Trypanblau (Fa. Biochrom, Berlin) wurden mit 100 µl Zellsuspension gemischt und 5 bis 10 min inkubiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann und diese dann unter dem Mikroskop blau gefärbt erscheinen. Eine Kammer eines Hämocytometers wurde mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Zwei der jeweils gegenüberliegenden Eckquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) ausgezählt, wobei nur nicht angefärbte Zellen berücksichtigt wurden.

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

$$\text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml Zellsuspension.}$$

3.3.2.5 Das Tet-On-System

Es wurden auch Retroviren verwendet, bei denen die Expression des Transgens durch das Tet-On-System kontrolliert wird. Für die Induktion der Transgenexpression wurde Doxycyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml dem Medium zugesetzt. Für die Kontrolle der Transgenexpression wurden die jeweiligen Zellen im Doppelansatz ausgesät wovon ein Ansatz wie zuvor beschrieben induziert wurde. Die Analyse beider Ansätze (induziert und nicht-induziert) erfolgte 24 h nach Induktion.

3.4 Retrovirale Methoden

3.4.1 Der retrovirale Vektor pBullet

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete retrovirale Vektor pBullet (WILLEMSEN et al., 2003) ist eine Weiterentwicklung des Vektors pSTITCH (WEIJTENS et al., 1998), welcher von dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) abgeleitet ist. In pBullet wurde die U3 Region der 5'LTR durch den humanen *intermediate early* Cytomegalievirus Promotor (CMV IE Promotor) ersetzt. Die 3'LTR ist unverändert und entspricht der wildtyp Mo-MLV LTR (siehe auch Abbildung 8 A). Dieser Aufbau hat zur Folge, dass die Genexpression nach Transfektion in eukaryotischen Zellen vom CMV IE Promotor betrieben wird. Bei viraler Transduktion wird in Folge der reversen Transkription und Integration dieser Promotor durch

die retrovirale U3 Region ersetzt, welche Promotor- und Enhancersequenzen enthält. Die so gebildete vollständige LTR steuert dann die Genexpression. Für die Verpackung der viralen mRNA ist das erweiterte Verpackungssignal Ψ^+ enthalten, welche den 5'-nicht-translatierten Anteil des *gag* Gens enthält und eine bessere Verpackung ermöglicht (BENDER et al., 1987). Der Vektor enthält einen Spleißdonor und -akzeptor, die denen des wildtyp Mo-MLV entsprechen und hier für die Synthese der *env*-mRNA notwendig sind. Es entstehen sowohl eine genomische mRNA, die die gesamte Länge des viralen Genoms umfasst, als auch eine kürzere subgenomische mRNA. Diese durch Spleißen produzierte mRNA ist 0,8 kb kürzer als die genomische mRNA und verläuft analog der Bildung der Mo-MLV *env*-RNA. Als Weiterentwicklung des Vektors pSTITCH enthält pBullet zusätzliche Schnittstellen im Anschluss an die NcoI Schnittstelle in Form einer *multiple cloning site*. Für die Insertion eines Transgens muss jedoch immer auch die NcoI Schnittstelle verwendet werden, um einen ordnungsgemäßen Spleißvorgang zu gewährleisten.

pSTITCH, bzw. pBullet, wurde für die Kombination mit den Verpackungsplasmiden pHIT 60 (SONEOKA et al., 1995, vgl. Abbildung 9 B) und pCOLT-GALV (WEIJTENS et al., 1998, vgl. Abbildung 9 D) entwickelt, um mittels transienter Transfektion in 293T Zellen innerhalb von nur einer Woche retrovirale Zellüberstände mit hohem viralem Titer zu generieren. Die beiden Verpackungsplasmide sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Der in allen Plasmiden enthaltene humane CMV IE Promotor und das im bakteriellen Plasmidanteil enthaltene *SV 40 ori* bewirken eine stärkere Plasmidexpression und damit höhere virale Titer. Bei der Verwendung der Zelllinie 293T bewirken die Proteine der adenoviralen E1A Region eine Aktivierung des CMV IE Promotors. Das in den Zellen enthaltene *SV 40 large T Antigen* ermöglicht durch Wirkung auf das *SV 40 ori* der Plasmide eine Amplifikation der kompletten Plasmide und erhöht die Plasmidkopienzahl pro Zelle. Das ursprünglich publizierte System wurde in der vorliegenden Arbeit dahingehend verändert, dass Anstelle des *envelope*-Plasmids pCOLT-GALV, welches für die Hüllproteine das Gibbonaffen Leukämievirus kodiert, das Plasmid pHCMV-G (YEE et al., 1994, vgl. Abbildung 9 C) verwendet wurde. Das Plasmid pHCMV-G kodiert für die Hüllproteine des Vesikulären Stomatitis-Virus und enthält ebenfalls den CMV IE Promotor für die Genexpression und das *SV 40 ori*.

3.4.2 Die Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen mittels Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen mit nicht-viralen Methoden. Eine Transfektion ist zunächst einmal nur transient, d. h. die DNA wird nicht in

MATERIAL UND METHODEN

das Genom integriert, sondern verbleibt extrachromosomal. Ohne eine weitere Selektion geht solche DNA mit der Zeit verloren und die Transgenexpression kommt zum Erliegen.

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, die in der Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion* angewendet (WIGLER et al., 1977).

Um virale Partikel zu generieren wurden 293T Zellen verwendet, welche transient mit drei Plasmiden kotransfiziert wurden: 1) Ein auf pBullet basierender retroviraler Vektor, 2) das für *gag* und *pol* kodierende Hilfsplasmid pHIT 60 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von RA Willemsen, Rotterdam, Niederlande) und 3) ein für die viralen Hüllproteine kodierendes *env*-Plasmid (pCOLT-GALV, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von RA Willemsen, Rotterdam, Niederlande oder pHCMV-G, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J-K Yee, La Jolla, USA). Der schematische Aufbau der für eine Kotransfektion verwendeten Plasmide mit pBulletEGFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von RA Willemsen, Rotterdam, Niederlande, vgl. Abbildung 9 A) als Beispiel für einen retroviralen Vektor sind in der Abbildung 9 wiedergegeben. Wenn alle drei Plasmide in ein und dieselbe 293T Zelle transfiziert werden, werden hier alle viralen Proteine exprimiert, durch welche die ungespleißte mRNA des retroviralen Vektors als virale mRNA verpackt wird. Auf diese Weise werden infektiöse virale Partikel gebildet, die in den Zellüberstand abgegeben werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll für eine transiente Transfektion für die Retrovirusproduktion ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Transfektionsschema

Tag 1		2 x 10 ⁶ 293T Zellen auf eine 10 cm Schale ausplattieren
Tag 2	24 h später: Transfektion	Transfektion der 293T Zellen mit dem <i>Calcium Phosphate Transfection Kit</i> ® der Fa. Invitrogen, La Jolla, USA, nach Angaben des Herstellers Verwendeter DNA-Mix: 10 µg pBullet Vektor mit Transgen 10 µg <i>gag-pol</i> -Plasmid 10 µg <i>env</i> -Plasmid, pCOLT-GALV oder pHCMV-G
Tag 3	16-18 h nach Transfektion	Mediumwechsel mit 5 ml komplementiertem Medium
Tag 4	40-42 h nach Transfektion	Abnahme des virushaltigen Zellüberstandes

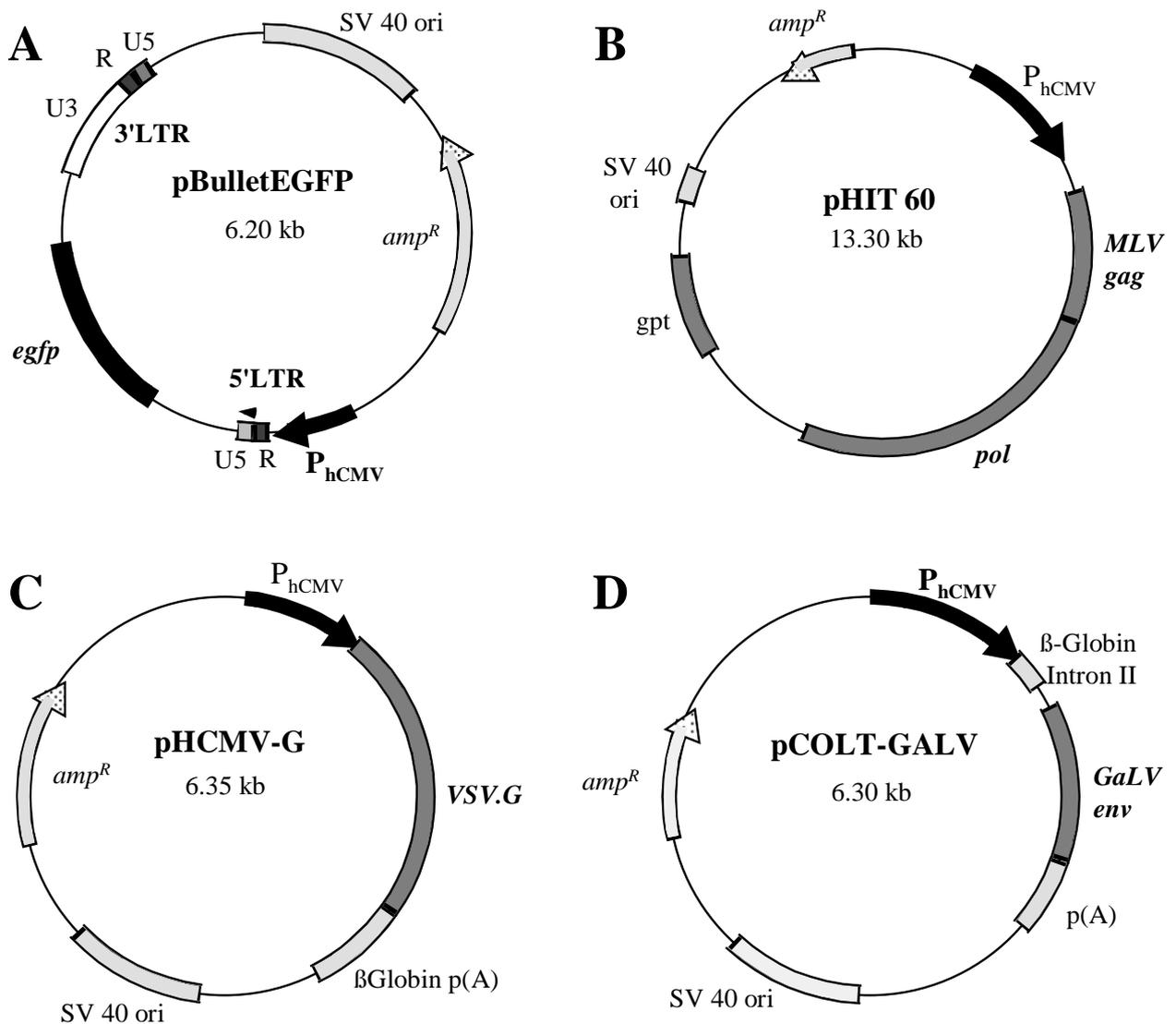


Abbildung 9: Schematische Darstellung der für Transfektionen verwendeten Plasmide (A-D)

A: Retroviraler Vektor pBulletEGFP; B: *Gag-pol*-Plasmid pHIT 60; C: *Env*-Plasmid pHCMV-G; D: *Env*-Plasmid pCOLT-GALV. LTR: long terminal repeat; U3, R, U5: Regionen der LTR; SV 40 ori: origin of replication des Simian Virus 40; amp^R : Ampicillin-Resistenz Gen; P_{hCMV} : Promotor des humanen Cytomegalievirus; *egfp*: enhanced green fluorescent protein; MLV: Maus-Leukämie-Virus; *gag*: Sequenz des *gag* Gens; *pol*: Sequenz des *pol* Gens; *gpt*: Xhantin Guanin Phosphoribosyl Transferase; VSV.G: Sequenz des G-Proteins des Vesikulären-Stomatitis-Virus; β -Globin p(A): Sequenz des Polyadenylierungssignals des β -globin Gens; β -Globin Intron II: Sequenz des zweiten Introns des β -globin Gens; *GalV env*: Sequenz des *env* Gens des Gibbonaffen-Leukämie-Virus; kb: Kilobasen.

3.4.3 Die Gewinnung retroviraler Überstände

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

3.4.4 Kryokonservierung viraler Überstände

Für die Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt wurden retrovirale Überstände bei -80 °C kryokonserviert. Die filtrierten Überstände wurden in bedarfsgerechten Volumina (0,6 ml, 1,2 ml, 1,8 ml) in Cryotubes (Fa. Nalge Nunc Int., Rochester, USA) aliquotiert und dann sofort bei -80 °C gelagert. Für eine spätere Transduktion wurde der benötigte Überstand in einem 22 °C Wasserbad aufgetaut und sofort verwendet.

3.4.5 Retrovirale Transduktion

Das Protokoll für retrovirale Transduktionen ist in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Protokoll für retrovirale Transduktionen

Tag 1		Zielzellen auf 6 cm Platten oder T25 Flaschen ausplattieren <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-left: 40px;"> HT-1080 $2,5 \times 10^5$ Zellen </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-left: 40px;"> NIH3T3 2×10^5 Zellen </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-left: 40px;"> 293T 1×10^6 Zellen </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-left: 40px;"> primäre Chondrozyten 3×10^5 Zellen </div>
Tag 2	16-18 h später: Transduktion	Transduktion der Zielzellen: Zellen 1 x mit PBS waschen Zugabe von 0,5 ml unverdünntem Virusüberstand dem zuvor $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aus einer Polybrene-Stammlösung von $800\text{ }\mu\text{g/ml}$ (gelöst in ddH ₂ O) zugesetzt wurden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 2 h, alle 20 min schwenken Zugabe von 4 ml komplementiertem Medium
Tag 3		Weitere Kultur der Zellen
Tag 4	~ 48 h nach Transduktion	Passage der Zellen für weitere Kultur oder Analyse der Genexpression der transduzierten Zellen

3.4.6 Phoenix-Ampho: Verpackungszelllinie der dritten Generation

Phoenix-Ampho Zellen sind eine Retrovirus-Verpackungszelllinie der dritten Generation für die Generierung amphotroper, MLV-abstammender Retroviren. Diese Zelllinie basiert auf 293T Zellen, welche mit zwei Hilfskonstrukten stabil transfiziert wurden. Die retroviralen Gene befinden sich auf zwei voneinander unabhängigen Konstrukten, was die Bildung rekombinanter replikationskompetenter Viren durch homologe Rekombination erschwert

(„split packaging function“, eingeführt durch MARKOWITZ et al., 1988). Bei diesen Konstrukten wurden außerdem die 5'LTR vollständig durch einen RSV-Promotor (*gag-pol*-Konstrukt) bzw. CMV-Promotor (*env*-Konstrukt) ersetzt um homologe Regionen zwischen den verwendeten Konstrukten bzw. dem retroviralen Vektor zu verringern.

Damit diese Zellen virale Partikel bilden können, muss noch die genetische Information für die virale mRNA in die Zellen eingebracht werden, die dann durch die Genprodukte der vorhandenen Hilfskonstrukte zu einem infektiösen Retrovirus verpackt wird. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dieser Schritt durch retrovirale Transduktion.

3.4.7 Die Generierung stabiler Retrovirus-Produzentenzellen mittels retroviraler Transduktion

Im Gegensatz zur Transfektion werden bei einer Transduktion Zellen durch eine virale Infektion genetisch verändert. Hierbei wird die Eigenschaft von Retroviren genutzt, nach einer Infektion direkt stabil in das zelluläre Genom zu integrieren. Die nachfolgend beschriebene Methode bietet den Vorteil unter Verzicht auf jegliche Selektion innerhalb von 6 Tagen eine stabile Retrovirus-Zelllinie zu generieren (Tabelle 7).

Tabelle 7: Herstellung einer stabilen Phoenix-Ampho Viruszelllinie

Tag 1		2 x 10 ⁶ 293T Zellen auf eine 10 cm Schale ausplattieren
Tag 2	24 h später: Transfektion	Transfektion der 293T Zellen mit dem <i>Calcium Phosphate Transfection Kit</i> ® der Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, nach Angaben des Herstellers Verwendeter DNA-Mix: 10 µg pBullet Vektor mit Transgen 10 µg <i>gag-pol</i> -Plasmid 10 µg <i>env</i> -Plasmid, pCOLT-GALV oder pHCMV-G
Tag 3	14-16 h nach Transfektion am späten Nachmittag	Mediumwechsel mit 5 ml komplementierten Medium 1 x 10 ⁶ Phoenix-Ampho Zellen auf eine 6 cm Schale ausplattieren
Tag 4	38-40 h nach Transfektion	Abnahme und Filtration des virushaltigen Zellüberstandes der 293T Zellen, Zugabe von 5 ml Medium auf die 293T Zellen Überstand mit 4 µg Polybrene pro ml versetzen, den Überstand der Phoenix-Ampho Zellen durch diesen ersetzen
Tag 5	62-64 h nach Transfektion	Protokoll von Tag 4 wiederholen
Tag 6		Passage der transduzierten Phoenix-Ampho Zellen

3.4.8 Gewinnung retroviraler Überstände von Phoenix-Ampho Viruszelllinien

Retrovirale Überstände von Phoenix-Ampho Viruszelllinien wurden nach dem Protokoll der Tabelle 8 gewonnen.

Tabelle 8: Gewinnung retroviraler Überstände von Phoenix-Ampho Viruszelllinien

Tag 1		9,3 x 10 ⁶ Phoenix-Ampho Zellen in eine T150 Flasche ausplattieren
Tag 2		Mediumwechsel mit 25ml komplementiertem Medium
Tag 3	24 h nach Mediumwechsel	Abnahme und Filtration des virushaltigen Zellüberstandes

3.4.9 Titerbestimmung *nslacZ*-exprimierender Retroviren

Der retrovirale Titer wurde anhand des Markergens *nslacZ* bestimmt. Zur Quantifizierung der gebildeten infektiösen rekombinanten Retroviren wurden Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des jeweiligen Zellüberstandes nach oben beschriebener Methode transduziert (siehe Kapitel 3.4.5). Die Titration amphotroper Virusüberstände erfolgte mit NIH 3T3 Zellen, der Titer VSV.G-pseudotypisierte Virusüberstände wurde mittels HT-1080 Zellen bestimmt. Der zu titrierende Überstand wurde in Zehnerschritten mit komplementiertem Medium verdünnt und nach Zugabe von Polybrene für die Transduktion verwendet. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils zwei Schalen der jeweiligen Zelllinie transduziert (Titration im Doppelansatz). Zellen, die erfolgreich transduziert wurden, integrieren das Genom des Virus und exprimieren das Markergen. Diese Eigenschaft wird bei Teilung der transduzierten Zelle an die Tochterzellen weitergegeben. Die Auswertung der Titration erfolgte 48 h nach der Transduktion nach X-Gal-Färbung (siehe Kapitel 3.5.1) der infizierten Schalen. Ein Infektionsereignis wird durch eine Kolonie von 2 bis 4 blau gefärbten Zellen inmitten des nicht angefärbten Zellrasens repräsentiert. Durch systematisches Durchmustern der Platte bei 100facher Vergrößerung (Axiovert 135, Fa. Zeiss, Jena) wurden alle Kolonien im Endbereich der Titration (d. h. die beiden Verdünnungsstufen bevor es zu keiner Infektion mehr kommt) einer Platte gezählt. Aus dem Ergebnis der ausgezählten Platten wurde dann der Mittelwert gebildet.

Der Titer des Virusüberstandes, angegeben als Anzahl infektiöser Partikel pro Milliliter Überstand (IP/ml), ergibt sich aus folgender Formel:

Titer mit IP/ml = Anzahl der Kolonien/Volumen Virusüberstand in ml

wobei sich das Volumen des eingesetzten Virusüberstandes aus der Verdünnungsstufe und dem verwendeten Infektionsvolumen ergibt.

3.5 Analyse der Transgenexpression

3.5.1 Histochemischer LacZ Nachweis mittels X-Gal Färbung

β -D-Galaktosidase, kodiert durch das *lacZ* Gen von *E. coli*, katalysiert die hydrolytische Spaltung von 5-Bromo-4 Chloro-3 Indoyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) und führt so zur Entstehung einer intensiv blauen Verbindung. Durch die Verwendung von *nslacZ*, bei dem das Reportergen mit der Kernlokalisationssequenz des *SV 40 large T Antigen* verknüpft ist, bleibt dieser Farbstoff im Kern der genexprimierenden Zelle (d. h. am Ort des Genproduktes) lokalisiert. Anhand der Bildung des blauen Farbstoffes ist eine genaue Identifikation von Zellen möglich, die durch *nslacZ* kodierende Retroviren transduziert worden sind.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS mit Kalziumionen und Magnesiumionen (PBS²⁺) gewaschen und dann für 5 min mittels Fixierlösung fixiert. Nach Beseitigung der Fixierlösung durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS²⁺ folgte die Inkubation mit X-Gal-Färbelösung für 3 bis 12 h bei 37 °C. Nach Ende der Inkubation wurden die fixierten und gefärbten Zellen mit PBS überschichtet. Diese sind so lichtgeschützt bei +4 °C mehrere Monate haltbar.

PBS²⁺:

- 1 % (v/v) 68 mM CaCl₂ Stammlösung,
- 1 % (v/v) 49 mM MgCl₂ Stammlösung in PBS

68 mM CaCl₂ Stammlösung:

- Calcium Chloride Dihydrate (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in ddH₂O, sterilfiltriert

49 mM MgCl₂ Stammlösung:

- Magnesiumchlorid Hexahydrat (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) in ddH₂O, sterilfiltriert

Fixierlösung:

- 2 % (v/v) Formaldehyd (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt), beides in PBS

X-Gal-Färbelösung:

- unmittelbar vor Gebrauch wird X-Gal-Stammlösung 1:40 in X-Gal-Ausgangslösung verdünnt.

X-Gal-Stammlösung:

- 5-Bromo-4 Chloro-3 Indoyl- β -D-Galaktopyranosid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wird mit einer Konzentration von 40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (Fa. Merck, Darmstadt) gelöst.
- Die X-Gal-Stammlösung wird lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

X-Gal-Ausgangslösung:

- in PBS werden gelöst:
- 5 mM Kaliumferricyanat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 5 mM Kaliumferrocyanat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 2 mM Magnesiumchlorid (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
- 0,01 % (w/v) Natrium-Desoxcholat (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 0,02 % (w/v) Nonidet P 40 (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Die Lösung wird lichtgeschützt bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.5.2 Fotodokumentation

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

3.5.3 Durchflusszytometrie

Zytometrie ist die Messung physikalischer oder chemischer Charakteristika von Zellen. Durchflusszytometrie bezeichnet den Prozess, bei welchem diese Messungen an Zellen durchgeführt werden, die sich in Suspension befinden. Die Analyse findet an einzelnen Zellen

in einem Flüssigkeitsstrom innerhalb eines so genannten Durchflusszytometers oder *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) statt. Mittels Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse können Zellcharakteristika wie Zellgröße (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) und die relative Fluoreszenzstärke einer Zelle (Messung in den Kanälen FL1, FL2 oder FL3) gemessen werden. Hierfür werden die Einzelzellen einem Argon-Laserstrahl ausgesetzt. Dieser wird zum einen durch die Zellen gestreut und liefert so die Werte für die Zellgröße und Granularität. Zum anderen werden in den Zellen vorhandene Fluorochrome (wie z. B. Fluoreszein und EGFP) angeregt und führen zur Emission von Fluoreszenz charakteristischer Wellenlänge. Diese Fluoreszenz wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und dokumentiert. Bei jeder Messung wurden die jeweiligen Ausgangszelllinien (nicht-transfiziert oder -transduziert) als Negativkontrolle mitgemessen. Eine Messung umfasste 20 000 im FACS detektierte Ereignisse.

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

3.5.3.1 Nachweis der *lacZ* Genexpression mittels Fluoreszein- β -D-Galaktopyranosid

Für die Durchflusszytometrie wurde das Substrat der β -Galaktosidase Fluoreszein- β -D-Galaktopyranosid (FDG) verwendet und stellt einen sensitiven, auf Fluoreszenz basierenden Assay für den Nachweis der Aktivität der β -Galaktosidase dar (NOLAN et al. 1988). Nichtfluoreszierendes FDG wird in mehreren Schritten durch β -Galaktosidase gespalten: Zuerst zu Fluoreszein-monogalactosid und dann zu dem stark fluoreszierenden Fluoreszein. Durch die Einsatzmöglichkeit in der Durchflusszytometrie lassen sich so auch geringe β -Galaktosidase Aktivitäten auf Einzelzellbasis analysieren, wobei die Zellen ihre Vitalität nicht einbüßen und nach einem Sortiervorgang wieder in Kultur genommen werden können. Verwendet wurde das *FluoReporter® lacZ Flow Cytometry Kit* der Fa. Molecular Probes, Eugene, USA.

Für die Analyse einer Zellpopulation wurden die Zellen trypsiniert (siehe Kapitel 3.3.2.3) und abzentrifugiert (900 rpm, 5 min, r. t., Varifuge 3.0R, Fa. Heraeus, Hanau). Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert, 100 μ l dieser Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und zum Abkühlen auf Eis gestellt. 100 μ l 2 mM *FDG working Solution*, hergestellt nach Angaben des Herstellers, und das FACS-Röhrchen wurden dann lichtgeschützt für 10 min in ein 37 °C Wasserbad gestellt. Danach wurden 100 μ l 2 mM *FDG working Solution* zu den Zellen gegeben, die das FDG infolge hypotonen Schocks aufnehmen. Nach exakt einer Minute wurden 1,8 ml FACS-Puffer, welcher eine Temperatur von 4 °C hat, zugegeben und

die Probe lichtgeschützt auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1,5 μM Propidiumiodid für die Markierung toter Zellen wurde die Probe im Durchflusszytometer analysiert. FDG-positive Zellen wurden dabei im Kanal FL1 (530 ± 30 nm), Propidiumiodid-positive Zellen in Kanal FL3 (630 ± 22 nm) dargestellt.

FACS-Puffer:

- 4 % FKS in PBS

3.5.3.2 Nachweis der *egfp* Genexpression mittels FACS-Analyse

EGFP lässt sich mittels Durchflusszytometrie ohne zusätzliche Probenbehandlung darstellen. Hierfür wurde eine etwa 80 % konfluente 6 oder 10 cm Schale wie beschrieben trypsiniert, zentrifugiert (900 rpm, 5 min, r. t, Varifuge 3.0R, Fa. Heraeus, Hanau) und das Pellet in 1,5-2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde dann auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1,5 μM Propidiumiodid gemessen.

Da EGFP nach Anregung durch einen Argon Laser (488 nm Wellenlänge) Fluoreszenz einer Wellenlänge von etwa 510 nm emittiert, erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Kanal FL1. Die Auswertung erfolgte nach der von KANDEL und Mitarbeitern 1997 publizierten Methode: Dabei wird der Wert der so genannten „relativen Fluoreszenz“ (RF) gebildet. Dieser Wert ist definiert als die Ratio zwischen dem Medianwert der Fluoreszenz der GFP-positiven Zellen und dem Medianwert der Fluoreszenz der negativen Zellen (Eigenfluoreszenz der Zellen). Mit dieser Methode ist es möglich, die Messergebnisse verschiedener Tage miteinander zu vergleichen.

3.5.4 Nachweis der *bone morphogenic protein-2* Genexpression

Die Messung der *bone morphogenic protein-2* (*bmp-2*) Expression erfolgte mittels ELISA-Nachweis des sezernierten Proteins im Zellüberstand. Verwendet wurde der *Quantakine BMP-2 Immunoassay* der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers, jede Probe wurde im Doppelansatz gemessen.

Für die Gewinnung von Zellüberständen für die Bestimmung der BMP-2 Konzentration wurden $2,5 \times 10^5$ HT-1080 Zellen, beziehungsweise 3×10^5 Chondrozyten auf eine Zellkulturschale von 6 cm Durchmesser ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit 5 ml Medium. Vierundzwanzig Stunden später wurden diese Überstände abgenommen und 10 min bei 2 000 U/min und 4 °C abzentrifugiert (Varifuge 3.0R, Fa.

Heraeus, Hanau). Die Überstände wurden aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wird das virale Provirus im Genom transduzierter Zellen nachgewiesen. Dafür wurde zunächst genomische DNA aus kultivierten Zellen extrahiert: Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin Tissue Kit* der Fa. BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der genomischen DNA wurde wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben photometrisch bestimmt. Die isolierte DNA dient in der PCR als Probe. Mittels spezifisch für das retrovirale Provirus ausgewählten Primern wird ein DNA-Abschnitt bekannter Länge amplifiziert. Dieses DNA-Produkt der PCR kann dann mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.5) nachgewiesen werden. Während der PCR katalysiert eine thermostabile Polymerase nach einem Denaturierungsschritt (Trennung von DNA-Doppelsträngen durch Erhitzen auf $94\text{ }^{\circ}\text{C}$) und dem Hybridisieren der Primer an die DNA-Probe (*Annealing*) die Verlängerung der Primersequenz (*Extension*). Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, *Annealing* und *Extension* gelingt die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes. Für den Nachweis des retroviralen Provirus eines auf pBullet basierenden Retrovirus wurden folgende Primer verwendet:

Forward Primer: 5'- ATCGCAGCTTGGATACACGC -3'

Dieser Primer bindet in pBullet von den Basen 4039 bis 4058, diese Sequenz liegt 5', d. h. aufwärts, der MCS des Vektors.

Backward Primer: 5'- TCAAAACTAGAGCCTGGACCACTG -3'

Dieser Primer bindet in pBullet in gegenläufiger Richtung von den Basen 4206 bis 4183, diese Sequenz liegt 3', d. h. abwärts, der MCS des Vektors.

Die Primersequenzen wurden anhand der Plasmidsequenz ausgewählt und von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

Ein PCR Ansatz enthielt 40 ng DNA Probe, 200 μM dNTP-Mix (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 5 % DMSO, 0,2 μM Forward Primer und 0,2 μM Backward Primer. Dieser Ansatz wurde mit magnesiumionenhaltigem 10x PCR Puffer (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gepuffert und mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 μl gebracht. Die PCR wurde als „hot start PCR“ durchgeführt, d. h. vor Zugabe von 1 IU Taq-Polymerase (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde der PCR-Ansatz im PCR Gerät (Gene-Amp 9600, Fa. Perkin Elmer Inc., Shelton, USA) für 4 min auf $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die Schritte des für

die Reaktion verwendeten PCR-Programmes sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Ablauf des verwendeten PCR-Programms

Programmschritt	Dauer	Temperatur	
Denaturieren der DNA-Probe zu Beginn	6 min	94 °C	
3-Schritt PCR (30 Zyklen)	Denaturieren	4 min	94 °C
	<i>Annealing</i>	1 min	57 °C
	<i>Extension</i>	2 min	72 °C
Verlängerung des entstandenen PCR-Produktes am Ende	8 min	72 °C	

3.7 Northern Blot-Analyse

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

3.7.1 Aufbereitung der Proben

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die Isolation erfolgte mittels Trizol Reagens (Fa. Invitrogen, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde mit 50 µl Diethylpyrocarbonat-haltigem Wasser (DEPC-H₂O) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte im Photometer (Beckmann DU 600 Spektrophotometer, Fa. Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Absorption -1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. 10 µg RNA wurden in einer Speedvac Zentrifuge (SVC 100, Fa. Eppendorf, Hamburg) eingetrocknet und anschließend in 20 µl Denaturierungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C für 15 Minuten. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit 5 µl „Blue Loading Dye“ versetzt.

DEPC-H₂O:

- 20 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 100 ml ddH₂O

Denaturierungspuffer:

- 500 µl Formamid
- 50 µl 10x Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
- 175 µl Formaldehyd 37 %
- 275 µl DEPC-H₂O

10x Morpholinopropansulfonsäure (MOPS):

- 83,72 g MOPS
- 8,2 g Natriumacetat
- 20 ml 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung pH 8,0
- DEPC-H₂O ad 1 l
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

„Blue Loading Dye“:

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

3.7.2 Isolierung der Sonden

Als Sonden werden radioaktiv markierte, zur mRNA komplementäre DNA-Fragmente eingesetzt. Die Sonden werden mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus Plasmiden ausgeschnitten (s. Kapitel 3.2.6.2) und isoliert (s. Kapitel 3.2.7).

3.7.3 Auftrennung der Proben und „Blotting“

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

Die Proben wurden in einem 1%igen Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelherstellung erfolgte durch Erhitzen von 1 g Agarose (peq GOLD Universal Agarose, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 72,2 g DEPC-H₂O bis zum Siedepunkt und anschließendes Abkühlen auf ca. 65 °C. Es wurden 10 ml 10x MOPS und 17,8 ml 37%iges Formaldehyd mit der Agaroselösung vermischt und zu einem Gel gegossen. Nach Auftragen der Proben auf das Agarosegel erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer (Biorad Powerpac 30; Fa. Bio-Rad

Laboratories GmbH, München) für zwei bis drei Stunden bei 60 Volt. Anschließend wurde das Gel aus der Gelelektrophoresekammer genommen und fünf Minuten mit Leitungswasser gespült. Nachfolgend wurde das Gel 15 min in 10x SSC geschwenkt. Das „Blotting“, d. h. der Transfer der aufgetrennten Proben von dem Gel auf eine Membran, wurde über Nacht mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Fa. Schleicher und Schuell BioScience GmbH, Dassel) durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran zehn Minuten in 2x SSC geschwenkt und durch einstündiges Erhitzen (Kelvitron®, Fa. Heraeus, Hanau) bei 80 °C fixiert. Es folgte eine UV-Vernetzung (Stratalink 1800, Fa. Stratagene, La Jolla, USA).

20x SSC:

- 175,3 g Natriumchlorid
- 88,2 g Natriumcitrat
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
- in ddH₂O lösen und auf ein Volumen von 1 000 ml auffüllen.

10x SSC und 2x SSC werden durch Verdünnen von 20x SSC mit ddH₂O hergestellt.

Laufpuffer:

- 60 ml 10x MOPS
- 107 ml Formaldehyd 37 %
- 433 ml DEPC-H₂O

3.7.4 Hybridisierung

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

Die DNA-Sonde wurde durch Austausch nicht-radioaktiver Nukleotide gegen ³²P-markierte Nukleotide radioaktiv markiert. Hierfür wurde der *Prime-It® II Random Primer Labeling Kit* (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Mindestens 50 ng Sonde (in einem Gesamtvolumen von 24 µl) wurden mit 10 µl Random 9-mer Primer versetzt und fünf Minuten gekocht. Zu der zwei Minuten auf Eis gekühlten Probe wurden 10 µl 5x dCTP Primer Buffer, 4 µl Nukleotid (α-³²P-dCTP, spezifische Aktivität: 3 000 Ci/mmol, Fa ICN Biomedicals

MATERIAL UND METHODEN

GmbH, Eschwege,) und 1 µl Exo-Klenow (5 U/µl) gegeben und zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die nicht in die Sonde eingebauten Nukleotide wurden anschließend durch Aufreinigung in einer *MicroSpin™ G25 Column* (Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg) entfernt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Sonde erfolgte durch Messung in einem Betacounter (Liquid Scintillation Counter 1219 Rackbeta LKB, Fa. Wallac, Turku, Finnland). Für die Hybridisierung wurde eine Aktivitätsmenge von ca. 2×10^6 „Counts Per Minute“ (cpm)/ml eingesetzt. Die DNA-Sonde wurde mit 2 M NaOH (30 % des einzusetzenden Probenvolumens) neun Minuten bei r. t. denaturiert, zu der prähybridisierten Membran gegeben und über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungsöfen hybridisiert.

Um die nicht gebundene radioaktive Sonde von der Membran zu entfernen wurde die Membran am folgenden Tag dreimal mit Waschlösung bei 65 °C für je 13 Minuten gewaschen.

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

Church-Puffer:

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

Waschlösung:

- 1%ige SDS-Lösung
- 0,04 M diNatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)-Lösung

„Stripping“-Lösung:

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

3.7.5 Entwicklung des Blots

Die Visualisierung der hybridisierten Proben erfolgte mittels Autoradiographie im Phosphor-Imager (Fluorescent Image Analyser FLA-2000, Fa. Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Verwendet wurde das Programm AIDA, Version 2.0, derselben Firma.

3.8 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer stammten von Charles River, Sulzfeld. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von sechs Wochen und ein durchschnittliches Körpergewicht von 1,8 kg. Die Haltung der Tiere erfolgte in Drahtkäfigen mit einer Belegung von zwei Tieren pro Käfig. Wasser- und Futterangebot (Alleinfutter-Pellets für Kaninchen, Altromin 2123, Altromin GmbH, Lage) erfolgte *ad libitum*. Die Raumtemperatur bewegte sich zwischen 15 und 21 °C mit gleichbleibendem Luftwechsel (relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %). Über eine automatische Beleuchtungseinheit wurde der Tag-Nacht-Rhythmus (jeweils 12 Stunden dauernde Hell-Dunkel-Phase) simuliert.

Die Nutzung der Tiere für die beschriebenen Versuche wurde der Regierung von Oberbayern innerhalb eines genehmigungspflichtigen Tierversuchsvorhaben angezeigt.

3.9 Gewinnung der Knorpelbioptate und Implantation der besiedelten Schwämme

Die nachfolgenden Tätigkeiten wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Sportorthopädie der Technischen Universität München durchgeführt.

Nachfolgend wird eine kurze Beschreibung der Operations-Technik gegeben: Nach intramuskulärer Anästhesie der Tiere (0,25 mg/kg Medetomidin und 17 mg/kg S-Ketanest) wurde das Kniegelenk unter sterilen Bedingungen parapatellar eröffnet und die Kniescheibe zur Seite verlagert. Für die Isolation der primären Chondrozyten wurde in einer ersten Operation eine Biopsie von 1 x 1 x 1 mm Größe aus dem Knorpel des Oberschenkelrollkammes entnommen. In einer zweiten Operation wurde mit einem Stahlbohrer (3,6 mm im Durchmesser) ein 3 mm tiefer Defekt in die Vertiefung des Oberschenkelrollkammes des

kontralateralen Knies gesetzt. Die mit autologen Chondrozyten besiedelten Schwämme wurden manuell in die Defekte eingesetzt und nach Reposition der Kniescheibe durch diese an Ort und Stelle gehalten. Die Euthanasie der Tiere erfolgte drei Wochen nach Implantation unter Propofol-Anästhesie durch intravenöse Injektion von Pentobarbital.

3.10 Präparation des Oberschenkelrollkamms und histologische Aufbereitung

Der Oberschenkelrollkamm des transplantierten Kniegelenks wurde nach Euthanasie des Tieres entnommen. Das Präparat wurde dann für 2 h bei r. t fixiert (4,6 % Formaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt), zweimal in PBS gewaschen und X-Gal gefärbt. Die Zusammensetzung der X-Gal-Färbelösung wurde bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben. Nach ausreichender Farbentwicklung wurden die Präparate in 10 % EDTA für drei Wochen entkalkt und anschließend in Paraffin eingebettet. Histologische Schnitte wurde in einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf Objektträger (Fa. Menzel Gläser, Braunschweig) gebracht . Für die Hämatoxilin-Eosin Färbung (H.-E. Färbung) wurden die Schnitte nacheinander 5 min in Mayers Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und anschließend 5-10 min in Leitungswasser gewaschen. Danach wurde mit 0,1%iger wässriger Eosinlösung (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt, erneut mit Leitungswasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 % und 100 %) entwässert und in Xylol eingestellt.

3.11 Vektorprogramme

Die Vektorsequenzen der verwendeten und im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu klonierten Plasmide wurden mit Hilfe des Programms MacVector 5.9.2 (Oxford Molecular Group, Oxford, Großbritannien) erstellt und verwaltet. Die Plasmidkarten der Vektoren wurden mit dem Programm Mac Plasmap v. 1.83 (Jingdong Liu, Salt Lake City, USA) erstellt. Für die schematischen Zeichnungen der retroviralen Vektoren wurde das Programm Visio 4.0 für Microsoft Windows (Visio Corporation, Seattle, USA) verwendet.

3.12 Statistische Auswertung

Eine explorative Bewertung wurde für Datensätze zur Charakterisierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Datensätze, welche den Einfluss der Induktion auf den Prozentsatz transgenexprimierender Zellen und die Änderung der Transgenexpressionsstärke beschreiben.

MATERIAL UND METHODEN

Für die Unterschiede der zwei Vektoren pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP wurde die Signifikanz mittels 2-faktorieller Varianzanalyse bestimmt, als Post-Hoc-Test wurde der T-Test für unabhängige Stichproben gewählt. Die Unterschiede zwischen den Datensätzen der verschiedenen Zelllinien wurden ebenfalls mittels 2-faktorieller Varianzanalyse bestimmt, als Post-Hoc-Test wurde der Bonferroni Test gewählt. Bei diesen durchgeführten Tests gilt $p < 0,05$ als signifikant. Die beschriebenen Auswertungen, ebenso Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS Version 11.0 für Windows (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt. Bei allen weiteren Ergebnissen erfolgte die Auswertung rein deskriptiv, da weitere statistische Analysen nicht notwendig sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klonierung konstitutiv exprimierender retroviraler Vektoren

Konstitutive Expression bedeutet, dass die Transgenexpression ohne Regulation stattfindet. Bei allen verwendeten retroviralen Vektoren war im Plasmid der CMV Promotor für die Transgenexpression enthalten. Dieser Promotor ist an der Stelle der U3 Region der 5'LTR lokalisiert. Nach erfolgreicher Zellinfektion bzw. Transduktion durch Viren dieser Plasmide tritt an die Stelle des CMV Promotors der Promotor der U3 Region. Dieser wird im Verlauf der reversen Transkription an diese Stelle kopiert.

4.1.1 Klonierung des Vektors pBulletLZ

Für die Markierung der Zellen *in vitro* wurde das Reportergen *nlslacZ* (β -galaktosidase mit einem Kernlokalisierungssignal) verwendet. Diese Markierung ermöglicht das Monitoring der Transgenexpression einzelner Zellen *in vitro* und *in vivo* und wurde in der vorliegenden Arbeit für die Etablierung des retroviralen Gentransfers verwendet.

Isolierung des *nlslacZ* Inserts: Das Plasmid pRc/RNLSlacZ (Abbildung 8 C) wurde mit dem Restriktionsenzym BglII geschnitten und die überhängenden Enden durch Klenow Enzym aufgefüllt. Es wurde dann nochmals mit NotI verdaut und das *nlslacZ* Gen enthaltende Insert von 3472 bp isoliert. Dieses Insert besitzt am 5' Ende glatte und am 3' Ende überhängende NotI Enden.

Präparation des retroviralen Vektors pBullet: Der Vektor pBullet (Abbildung 8 A) wurde zunächst mit NcoI in der MCS an der Stelle 4108 bp linearisiert und die Enden durch Klenow Enzym aufgefüllt. Dann folgte ein NotI Verdau, wobei NotI ebenfalls in der MCS an Stelle 4127, also abwärts der NcoI Schnittstelle, schneidet.

Das *nlslacZ* Insert wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor ligiert. Der resultierende Vektor pBulletLZ hat eine Größe von 8857 bp. Eine schematische Darstellung von pBulletLZ zeigt Abbildung 10 als Plasmid und als Provirus nach retroviraler Integration.

4.1.2 Klonierung des Vektors pBulletBMP2

Als therapeutisches Transgen wurde das Gen des Wachstumsfaktors *bmp-2* eingesetzt. Verwendet wurde die komplementäre DNA (cDNA) des Menschen (*hbmp-2*). Dies ist im Kaninchenmodell möglich, da die synthetisierten aktiven Proteine von Mensch und

ERGEBNISSE

Kaninchen homolog sind (SWISS-PROT Datenbank, P12642 und SWISS-PROT Datenbank, O46564).

Isolierung des *hbmp-2* Inserts: Das Plasmid pBMP2-125 (Abbildung 8 D) wurde mit Sall geschnitten und die überhängenden Schnittenden mittels Klenow Enzym aufgefüllt. Das *hbmp-2* enthaltende Insert von 1242 bp wurde isoliert.

Präparation des retroviralen Vektors pBullet: Der Vektor pBullet wird mit NcoI in der MCS an der Stelle 4108 linearisiert und die Enden durch Klenow Enzym aufgefüllt.

Das *hbmp2* Insert wurde mittels *blunt-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor ligiert. Der resultierenden Vektor pBulletBMP2 ist 6650 bp groß (vgl. Abbildung 10 B).

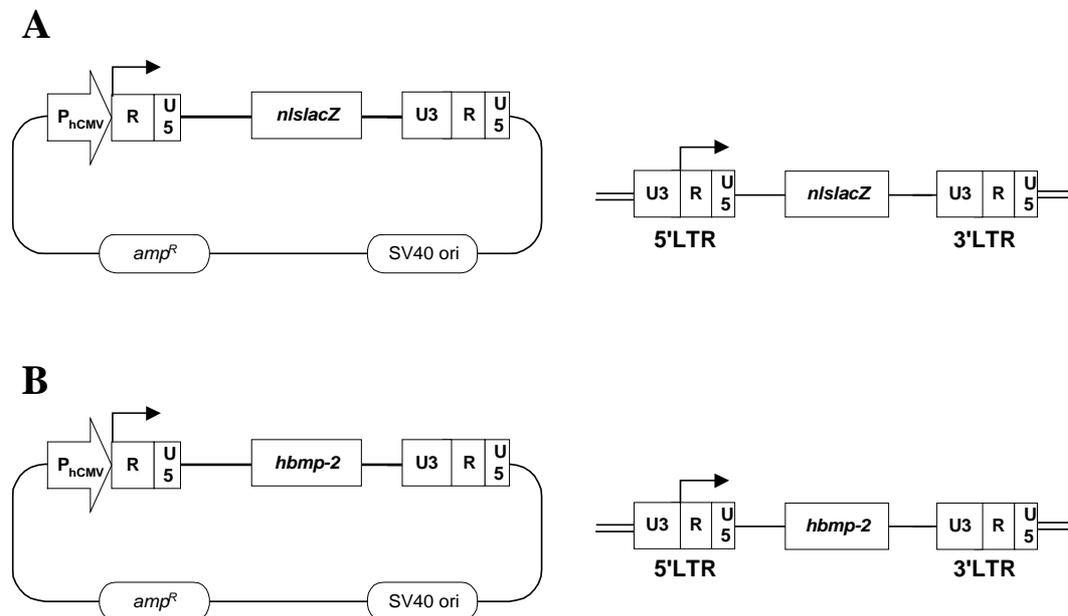


Abbildung 10: Darstellung der Plasmide pBulletLZ (A) und pBulletBMP2 (B)

Links ist der schematische Aufbau der Plasmide dargestellt. Die Transgenexpression wird von dem Promotor P_{hCMV} gesteuert, Start und Richtung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der rechte Teil zeigt eine Darstellung der Plasmide nach retroviraler Integration in das Zellgenom (Provirus). Die Transgenexpression wird von dem retroviralen Promotor der U3 Region der 5'LTR gesteuert, Start und Richtung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. LTR: *long terminal repeat* des Moloney-Maus-Leukämie-Virus; P_{hCMV}: *intermediate early* Promotor des humanen Cytomegalievirus, R, U5, U3: Abschnitte der Mo-MLV LTR; *nlslacZ*: Gen der β -galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal; *hbmp-2*: Gen des *humanen bone morphogenic protein-2*; SV40 ori: *origin of replication* des Simian Virus 40; *amp^R*: Gen für die Ampicillin-Resistenz.

4.2 Generierung stabiler Phoenix-Ampho Zelllinien

Das Infektionsspektrum amphotroper Retroviren erstreckt sich auch auf Kaninchenzellen. Es war deshalb anzunehmen, dass derartig umhüllte Viren geeignet sind, Chondrozyten zu transduzieren. Für die Produktion derartiger Viren wurden unter Verwendung der auf 293T Zellen basierenden Verpackungszelllinie Phoenix-Ampho stabile Zelllinien für die Produktion von Retroviren mit amphotropem Infektionsspektrum generiert. Um später Transduktionseffizienz und Transgenexpression von Chondrozyten leichter beurteilen zu können, wurde zunächst das für das Reportergen *nslacZ* kodierende Plasmid pBulletLZ (s. Kapitel 4.1.1) verwendet. Wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, wurden zwei nicht-selektionierte stabile Phoenix-Ampho Viruszelllinien hergestellt. Als *env*-Plasmid wurde pCOLT-GALV eingesetzt, was zu der Bildung GALV-pseudotypisierter Retroviren führt. Die nach Transduktion resultierenden Zelllinien wurden PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) genannt.

4.2.1 Analyse der PhoeLZ Zelllinien

Um infektiöse virale Partikel produzieren zu können, muss die jeweilige Verpackungszelle zusätzlich die Information für die virale mRNA erhalten. Bei dem durchgeführten Protokoll wurde dies durch eine Infektion mit transient generierten GALV-pseudotypisierten Viren erreicht, wobei die Infektion an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt wurde. Transduzierte Zellen exprimieren die im rekombinanten Virus enthaltenen Transgene und konnten dadurch identifiziert werden.

Die Expression des Reportergens *nslacZ* in den Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) wurde mittels X-Gal-Färbung überprüft. Der Anteil positiver Zellen wurde zusätzlich durch FACS-Analyse nach FDG-Färbung bestimmt. Die Analyse zeigte, dass PhoeLZ (2602) mit 76,9 % über einen höheren Anteil *lacZ*-positiver Zellen verfügte als PhoeLZ (0503) mit 57,6 % (s. Abbildung 11).

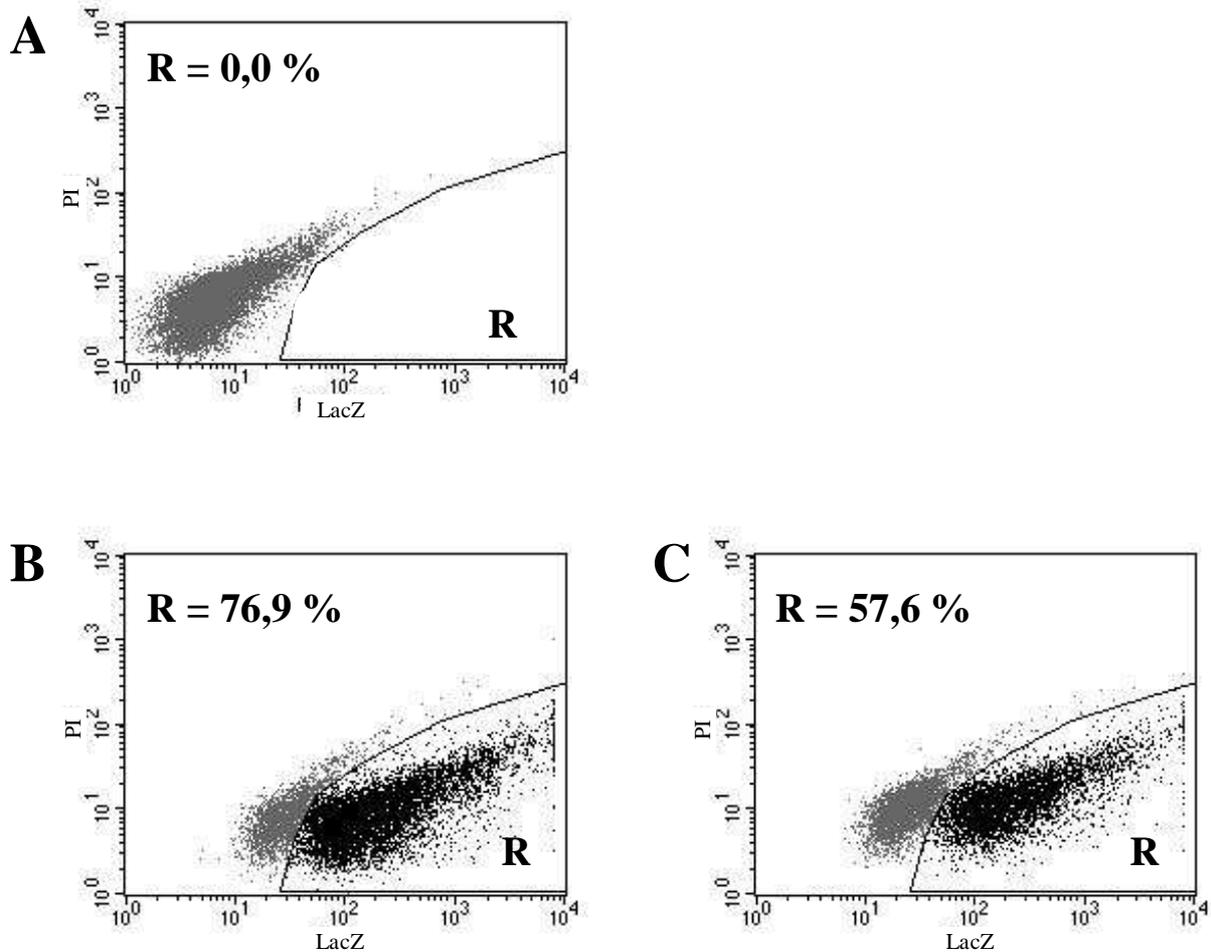


Abbildung 11: Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503)
 A: Nicht-transduzierte Phoenix-Ampho Zellen (Negativkontrolle). B: PhoeLZ (2602); C: PhoeLZ (0503).
 Gezeigt wird das Ergebnis der FACS-Analyse nach FDG- und Propidiumiodid-Färbung. Der Prozentsatz *lacZ*-positiver Zellen (R) ist angegeben. Die x-Achse (LacZ) bezeichnet die Intensität FDG-positiver Zellen als Maß für die *lacZ*-Expression; Die y-Achse (PI) zeigt die Fluoreszenzstärke Propidiumiodid-positiver Zellen.

4.2.2 Titerbestimmung der PhoeLZ Zelllinien

Von den beiden Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) wurden retrovirale Überstände gewonnen, welche dann frisch, d. h. ohne vorheriges Einfrieren, für eine Infektion verwendet wurden. Der Virustiter der Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) wurde mittels Titration auf NIH 3T3 Zellen ermittelt. Es zeigte sich, dass PhoeLZ (2602) mit 8×10^5 IP/ml mehr infektiöse virale Partikel produzierte als PhoeLZ (0503) mit 4×10^5 IP/ml (s. Tabelle 10).

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Virustiter der Phoenix-Ampho Viruszelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) nach Titration auf NIH 3T3 Zellen

IP/ml: infektiöse Partikel pro Milliliter Virusüberstand

Zelllinie	Titer [IP/ml]
PhoeLZ (2602)	8×10^5
PhoeLZ (0503)	4×10^5

4.2.3 Transduktion primärer Chondrozyten mit PhoeLZ Überständen

Zur selben Zeit wurden primäre Chondrozyten von zwei verschiedenen Tieren (CZ 273 und CZ 277) transduziert. In einem Parallelansatz wurden frische Überstände der Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) verwendet. Als Infektionskontrolle wurden im gleichen Ansatz NIH 3T3 Zellen transduziert. Die Transduktionseffizienz (Infektionsrate) wurde mittels FACS-Analyse und X-Gal-Färbung kontrolliert. Obwohl NIH 3T3 Zellen mit 81 bzw. 82 % zu einem hohen Prozentsatz transduziert wurden, lag die Rate bei beiden Chondrozytenlinien mit 2 bis 11 % in einem eher niedrigen Bereich (Abbildung 12).

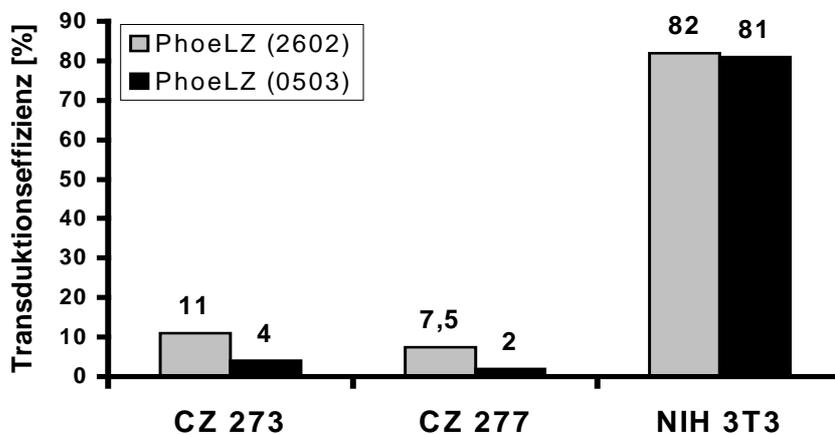


Abbildung 12: Transduktionseffizienz bei Transduktion mit amphotropen Virusüberständen

Die Säulen bezeichnen den prozentualen Anteil *lacZ*-positiver Zellen nach Transduktion mit Virusüberständen der Zelllinien PhoeLZ (2602) (grau) und PhoeLZ (0503) (schwarz) (n=1). Transduziert werden die Chondrozyten CZ 273 und CZ 277 und als Infektionskontrolle NIH 3T3 Zellen. Die Transduktionseffizienz wurde mittels FACS-Analyse nach FDG- und Propidiumiodid-Färbung ermittelt.

4.3 Transduktionen mit VSV.G-pseudotypisierten Retroviren

Die im vorhergehenden Versuch erzielte Infektionsrate primärer Chondrozyten erwies sich als zu gering für eine weitere Verwendung dieser Zellen ohne zusätzliche Selektionsverfahren. Um die Transduktionseffizienz zu verbessern, wurden VSV.G-pseudotypisierte retrovirale

Partikel generiert. Während die Infektion von Retroviren mit amphotropen Wirtsspektrum durch die Bindung an einen spezifischen zellulären Rezeptor (Ram 1) eingeleitet wird, interagiert VSV.G mit weit verbreiteten Phospholipid-Komponenten der Zellmembran. VSV.G-pseudotypisierte Viren zeigen daher ein breites Spektrum infizierbarer Zelltypen (ARAI et al., 1999; LEE et al., 2001), darunter auch solche, die sich mit den herkömmlichen retroviralen Vektoren nicht oder nur schwer transduzieren lassen (EMI et al., 1991). Es ist daher anzunehmen, dass derart umhüllte Viren auch in der Lage sind, Chondrozyten des Kaninchen zu transduzieren, obwohl eine derartige Anwendung bisher nicht beschrieben wurde. Da die langanhaltende Expression des VSV.G Proteins toxisch für Zellen ist, wurden diese Viren mittels transienter Transfektion von 293T Zellen produziert. Verwendet wurde das retrovirale Plasmid pBulletLZ. Aufgrund guter Transduktionseigenschaften wurden als Infektionskontrolle HT-1080 Zellen verwendet.

4.3.1 Titerbestimmung der VSV.G-pseudotypisierten Überstände

Nach transienter Transfektion wurden mehrfach Überstände gewonnen, die frisch oder nach einmaligem Einfrieren für Infektionen verwendet wurden. Da bei solchen Überständen nur ein geringes Volumen für die weitere Verwendung zur Verfügung steht, wurde in einigen Fällen auf eine Titerbestimmung verzichtet. Für die Titration wurden HT-1080 Zellen verwendet. Die Ergebnisse der Titration verschiedener VSV.G-pseudotypisierter Virusüberstände sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Titerbestimmung verwendeter pBulletLZ/VSV.G Überstände durch Titration auf HT-1080 Zellen

IP/ml: infektiöse Partikel pro Milliliter Virusüberstand; VSV.G: Hüllprotein G des Vesikulären-Stomatitis-Virus

Virusüberstand*	Titer [IP/ml]	Bemerkung
pBulletLZ/VSV.G (1605)	5×10^5	eingefrorener Überstand
pBulletLZ/VSV.G (2803)	1×10^6	eingefrorener Überstand
pBulletLZ/VSV.G (2507)	$2,4 \times 10^6$	frischer Überstand
pBulletLZ/VSV.G (2507)	$1,1 \times 10^6$	eingefrorener Überstand
pBulletLZ/VSV.G (0703)	$3,1 \times 10^6$	frischer Überstand

*Plasmid/Hülle (Kennziffer)

4.3.2 Transduktion primärer Chondrozyten mittels VSV.G-pseudotypisierter Retroviren

Es wurden Chondrozyten von insgesamt dreizehn verschiedenen Kaninchen transduziert. Hierfür wurden zuvor eingefrorene virale Überstände von zwei verschiedenen Transfektionen verwendet (Virusüberstand pBulletLZ/VSV.G (2803) und pBulletLZ/VSV.G (2507)). Transduzierte Zelllinien wurden im Folgenden durch den Namenszusatz „LZ“ gekennzeichnet. Die Infektion der Zellen fand an zwei verschiedenen Terminen statt, als Kontrolle diente jeweils die gleichzeitige Infektion von HT-1080 Zellen. Die Effizienz der Transduktion wurde mittels X-Gal-Färbung und teilweise mittels FACS-Analyse bestimmt (Tabelle 12 und Tabelle 13). Beispiele für *nlslacZ*-transduzierte Zellen nach X-Gal-Färbung werden in Abbildung 13 gezeigt. Der Mittelwert der Transduktionseffizienz betrug $86,8 \pm 12,4$ % transduzierte Zellen. Der Virusüberstand pBulletLZ/VSV.G (2803) lieferte insgesamt höhere Transduktionsraten (87-99 %) als der Virusüberstand pBulletLZ/VSV.G (2507) mit 63 bis 82 %.

Tabelle 12: Transduktionseffizienz bei Verwendung des eingefrorenen Virusüberstandes pBulletLZ/VSV.G (2803)

Die Daten für die Zelllinien CZ 81LZ, CZ 133LZ, CZ 134LZ, CZ 135LZ und HT-1080LZ-1 wurden mittels FACS-Analyse ermittelt, die für alle weiteren Zelllinien mittels X-Gal-Färbung. Gezeigt werden die Ergebnisse einer Analyse bis zu sieben Tage nach Transduktion.

Zelllinie	Transduktionseffizienz [%]
CZ 80LZ	95
CZ 81LZ	98
CZ 82LZ	95
CZ 83LZ	95
CZ 84LZ	95
CZ 85LZ	95
CZ 133LZ	99
CZ 134LZ	91
CZ 135LZ	87
HT-1080LZ-1	94

Tabelle 13: Transduktionseffizienz bei Verwendung des eingefrorenen Virusüberstandes pBulletLZ/VSV.G (2507)

Alle Werte wurden mittels FACS-Analyse sieben Tage nach Transduktion ermittelt.

Zelllinie	Transduktionseffizienz [%]
CZ 158LZ	63
CZ 159LZ	70
CZ 160LZ	80
CZ 161LZ	82
HT-1080LZ-2	87

4.3.3 Verlauf der Transgenexpression *in vitro*

Um zu prüfen, ob die retroviral mit dem *nslacZ* Gen transduzierten Zellen die zu Beginn gemessene Transgenexpression beibehalten, wurde über einen Zeitraum von 12 Wochen nach der Transduktion wiederholt der prozentuale Anteil transgenexprimierender Zellen bestimmt. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil es sich um nicht-selektionierte, also nicht-klonale Zellpopulationen handelt. Einzelne Zellen verfügen hier unter Umständen über einen Wachstumsvorteil und dominieren mit der Zeit die Kultur. Wiederholte FACS-Messungen der transduzierten Zelllinien CZ 133LZ, CZ 134LZ, CZ 135LZ zeigten, dass der Anteil *nslacZ*-positiver Zellen in Langzeitkultur geringgradig abnahm: Während der Anteil *lacZ*-positiver Zellen in der ersten Woche nach Transduktion $92,3 \pm 6,1$ % (MW \pm SD) betrug, sank dieser im weiteren Verlauf auf $76 \pm 13,9$ % ab. Der Verlauf ist in der Abbildung 14 grafisch dargestellt, die Werte der einzelnen Messungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

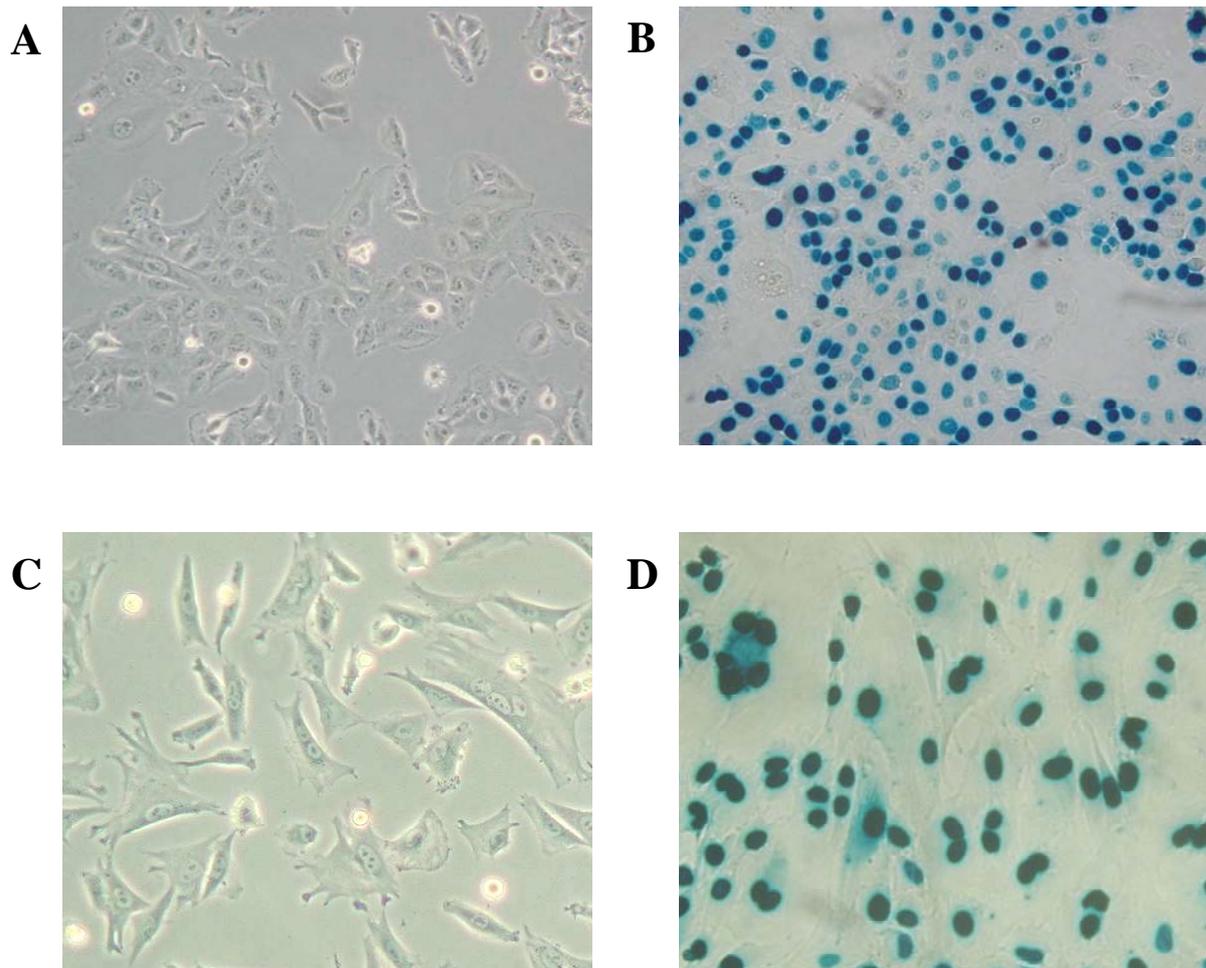


Abbildung 13: *nlslacZ* Expression nach Transduktion mit Retroviren des Plasmids pBulletLZ
A und B zeigen HT-1080 Zellen: A: Nicht transduziert und B: transduziert mit dem Virusüberstand pBulletLZ/VSV.G (2507) nach X-Gal-Färbung (100fache Vergrößerung). C und D zeigen Chondrozyten des Kaninchens: C stellt die nicht-transduzierte Zelllinie CZ 163 dar, D die retroviral transduzierte Zelllinie CZ 81LZ nach X-Gal-Färbung (100fache Vergrößerung). Transduzierte Zellen zeigen eine unterschiedlich starke Blaufärbung des Zellkerns.

Nach der erfolgreichen Transduktion wurden die Zellen weiter expandiert und schließlich durch Aufbringen auf Kollagenschwämme in 3-D Kultur gebracht. Um zu überprüfen, ob in derartiger Kultur das Markergen weiterhin exprimiert, wurden einzelne Schwämme zur Kontrolle X-Gal- und nach der Anfertigung von histologischen Schnitten H.-E.-gefärbt. Die anhaltende Transgenexpression der Zellen CZ 81LZ wird in der Abbildung 15 A und B belegt.

ERGEBNISSE

Tabelle 14: Analyse der Transgenexpression in Langzeitkultur

Die retroviral *nlslacZ*-transduzierten Zelllinien CZ 133LZ, CZ 134LZ und CZ 135LZ wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen nach Transduktion im 3-Wochenabstand mittels FACS-Analyse nach FDG- und Propidiumiodid-Färbung analysiert. Die Messwerte bezeichnen den Anteil *lacZ*-positiver Zellen in % zum jeweils angegebenen Messzeitpunkt.

Zelllinie	Messzeitpunkt (Wochen nach Transduktion)				
	0	3	6	9	12
CZ 133LZ	99 %	95 %	92 %	92 %	92 %
CZ 134LZ	91 %	86 %	75 %	68 %	68 %
CZ 135LZ	87 %	80 %	72 %	69 %	68 %

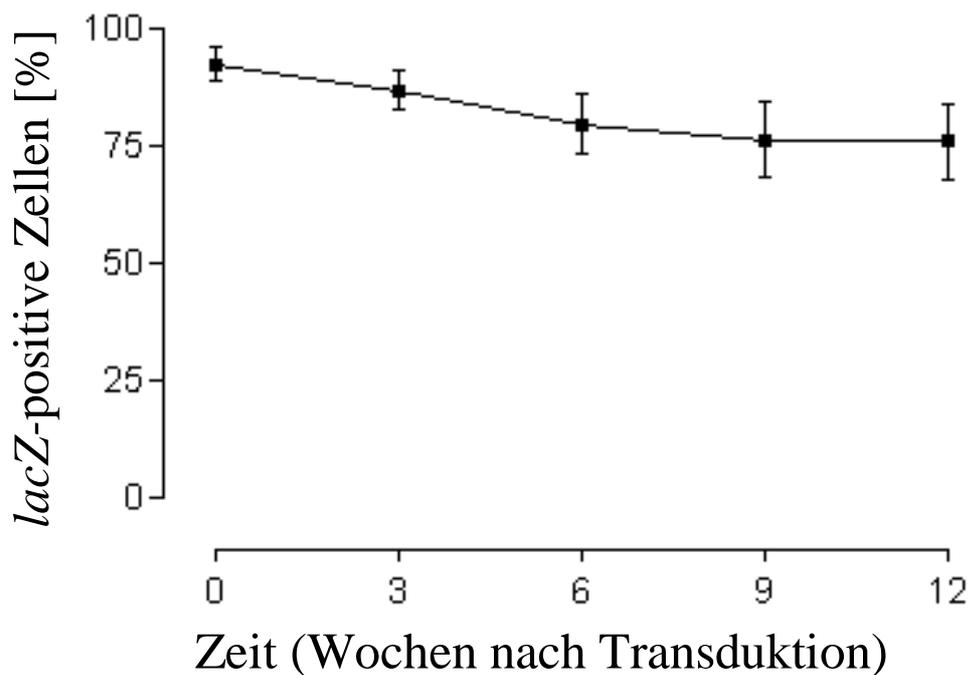


Abbildung 14: Langzeitverlauf der Transgenexpression nach retroviraler Transduktion der Kaninchenchondrozyten CZ 133LZ, CZ 134LZ und CZ 135LZ

Grafisch dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der *lacZ*-positiven Zellen zu verschiedenen Messzeitpunkten (x-Achse). Zu Beginn betrug der Anteil *lacZ*-positiver Zellen $92,3 \pm 6,1$ %, nach drei Wochen $87,0 \pm 7,5$ %, nach 6 Wochen $79,7 \pm 10,8$ %, nach 9 Wochen $76,3 \pm 13,6$ % und nach 12 Wochen $76,0 \pm 13,9$ %.

4.3.4 Transgenexpression *in vivo*

Neben der Transgenexpression *in vitro* wurde auch die Expression *in vivo* untersucht. Hierfür wurden mit dem *nlslacZ* Gen transduzierte Chondrozyten nach Besiedelung von Kollagenschwämmen autolog in einen osteochondralen Defekt im Kniegelenk des Kaninchens implantiert. Die Implantation fand 6 bis 8 Wochen nach Kulturbeginn der Chondrozyten und etwa zwei Wochen nach Aufbringen auf die Schwämme statt. Drei Wochen nach Implantation wurden die Tiere euthanasiert und die Femurkondylen nach Fixierung, X-Gal-Färbung und nachfolgender Entkalkung histologisch aufbereitet. Es wurden insgesamt sechs verschiedenen Tieren *nlslacZ* markierte Zellen auf Schwämmen implantiert. Dabei handelte es sich um die Tiere mit der Nummer 80 (korrespondierende Zelllinie CZ 80LZ), Nummer 84 (CZ 84LZ), Nummer 85 (CZ 85LZ), Nummer 158 (CZ 158LZ), Nummer 159 (CZ 159LZ) und Nummer 160 (CZ 160LZ). Bei fünf von sechs Tieren zeigten sich in H.-E.-gefärbten Schnitten X-Gal-positive Zellen, ein Hinweis auf anhaltende Transgenexpression. Als Beispiel werden in Abbildung 15 C und D Bilder histologischer Schnitte des Tieres mit der Nummer 160 gezeigt. X-Gal-positive Zellen zeigten sich vor allem in den oberen Schichten der Randbereiche der Knorpeldefekte.

4.4 Retroviraler Gentransfer des Wachstumsfaktors *hbmp-2*

Nach der Etablierung der retroviralen Infektion durch Verwendung des Markergens *nlslacZ* wurde im Folgenden das Transgen *hbmp-2* transferiert. Unter Verwendung des Plasmids pBulletBMP2 (s. Abbildung 10 B) wurden mittels transienter Transfektion VSV.G-pseudotypisierte Retroviren generiert. Im Anschluss wurden verschiedene Zellen mit frischen oder zuvor eingefrorenen Überständen infiziert. In einem ersten Versuch wurde der hBMP-2 Gehalt im viralen Überstand nach einer transienten Transfektion von 293T Zellen für die Virusproduktion gemessen. Analysiert wurde der als pBulletBMP2/VSV.G (0905) bezeichnete Virusüberstand. Durch diese Messung wurde die Funktion des Vektors auf Plasmidebene kontrolliert. Die *hbmp-2* Genexpression wird hier von dem hCMV Promotor und nicht wie nach einer Transduktion vom viralen LTR Promotor betrieben (vgl. Abbildung 10 B). In diesem Überstand wurde ein BMP-2 Proteingehalt von 92 ng/ml gemessen, wobei im Zellüberstand der Negativkontrolle (nicht-transduzierte 293T Zellen) kein hBMP-2 nachgewiesen werden konnte.

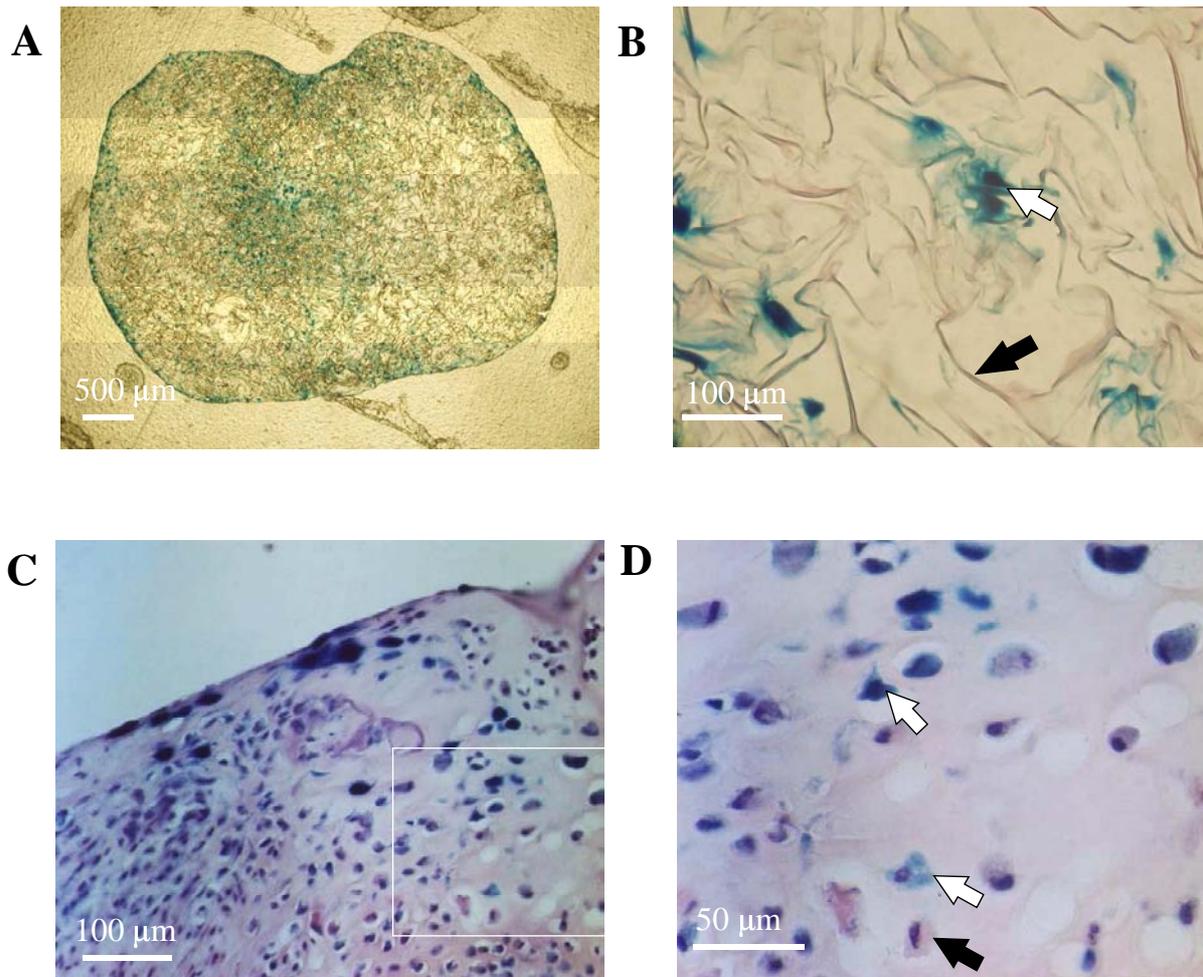


Abbildung 15: Transgenexpression *nlslacZ*-transduzierter Chondrozyten *in vitro* und *in vivo*

A und B zeigen die Transgenexpression der Zelllinie CZ 81LZ nach Besiedelung eines Kollagenschwammes in 3D-Kultur *in vitro*. Dargestellt sind histologische Schnitte nach X-Gal- und H.-E.-Färbung in 40facher (A) bzw. 100facher Vergrößerung (B). C und D zeigen histologische Präparate des Tieres mit der Nummer 161, 3 Wochen nach Implantation *nlslacZ*-transduzierter Zellen (X-Gal-Färbung des Gelenkpräparates und H.-E.-Färbung der Schnitte). C zeigt eine Aufnahme des äußeren Randbereiches des Defektes (80fache Vergrößerung), D zeigt den in C markierten Bereich in 200facher Vergrößerung. Weiße Pfeile (B und D) kennzeichnen beispielhaft X-Gal-positive Zellen, der Schwarze Pfeil in B bezeichnet eine Kollagenfaser des Kollagenschwammes, der schwarze Pfeil in D eine X-Gal-negative Zelle. Die Expression von *nlslacZ* äußert sich nach X-Gal-Färbung in einer Blaufärbung der Zelle.

Unter Verwendung verschiedener Virusüberstände wurden Chondrozyten von sechs verschiedenen Kaninchen transduziert. Die transduzierten Zellpopulationen wurden CZ X-BMP2, CZ 188-BMP2, CZ 160-BMP2, CZ 161-BMP2, CZ 163-BMP2 und CZ 288I-BMP2 genannt. Im Rahmen von Kontrollinfektionen wurden außerdem HT-1080 Zellen mit drei verschiedenen Überständen infiziert (HT-BMP2-1, HT-BMP2-2 und HT-BMP2-3). Die für die Transduktionen verwendeten Überstände sind in der nachfolgenden Tabelle 15 aufgeführt.

ERGEBNISSE

Tabelle 15: Für die Transduktion verwendete virale Überstände

Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich um einmal eingefrorene Überstände. VSV.G: Hüllprotein G des Vesikulären-Stomatitis-Virus.

Zelllinie	Virusüberstand
CZ X-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (0905)*
CZ 188-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (1807), frisch
CZ 160-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (1807)
CZ 161-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (1807)
CZ163-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (1807)
CZ 288I-BMP2	pBulletBMP2/VSV.G (1807)
HT-BMP2-1	pBulletBMP2/VSV.G (1807)
HT-BMP2-2	pBulletBMP2/VSV.G (2507), frisch
HT-BMP2-3	pBulletBMP2/VSV.G (1710)

*Plasmid/Hülle (Kennziffer)

Nachfolgend wurde überprüft, ob nach der transienten Transfektion von 293T Zellen für die Virusproduktion infektiöse virale Partikel gebildet wurden, die in Folge der retroviralen Transduktion als Provirus in das Zellgenom der Zelle integrieren können. Hierfür wurde unter Verwendung genomischer DNA retroviral *hbmp-2*-transduzierter Zellen (CZ 288I-BMP2), eine PCR mit für das Provirus von pBulletBMP2 spezifischen Primern durchgeführt (s. Kapitel 3.6). Das für das Provirus positive PCR-Produkt hat eine Größe von 1,4 kb. Als Positivkontrolle der PCR-Reaktion wurde das Plasmid pBulletBMP2 als Probe eingesetzt, als Negativkontrolle diente genomische DNA der nicht-transduzierten Ausgangszelllinie CZ 288I. Das Resultat der Analyse ist in Abbildung 16 dargestellt: Während nach Gelelektrophorese des PCR-Ansatzes der Zelllinie CZ 288I keine 1,4 kb große Bande nachgewiesen werden konnte, war ein derartiges Produkt in den Reaktionsansätzen der Positivkontrolle pBulletBMP2 und in der genomischen DNA der transduzierten Zelllinie CZ 288I-BMP2 nachweisbar. Mit diesem Ergebnis konnte die erfolgreiche Transduktion der Zelllinie CZ 288I-BMP2 durch Viren des Plasmids pBulletBMP2 gezeigt werden.

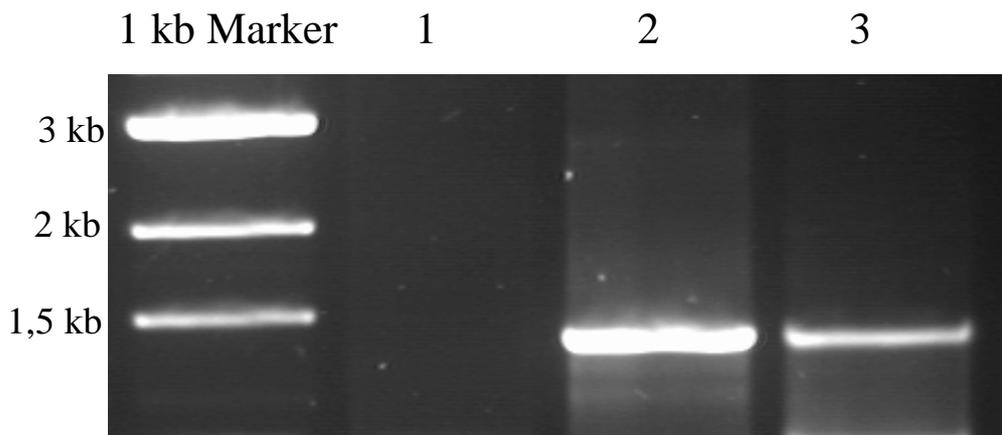


Abbildung 16: PCR-Nachweis des Provirus des Plasmids pBulletBMP2 im Genom der transduzierten Zelllinie CZ 288I-BMP2

Dargestellt ist das Resultat einer PCR mit für den Vektor pBulletBMP2 spezifischen Primern nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsansatzes. Das spezifische Produkt hat eine Größe von 1,4 kb. Bahn 1: Genomische DNA aus CZ 288I (Negativkontrolle, aufgetragen sind 30 μ l des Reaktionsansatzes); Bahn 2: Plasmid-DNA von pBulletBMP2 (Positivkontrolle, aufgetragen sind 2 μ l des Reaktionsansatzes); Bahn 3: Genomische DNA aus CZ 288I-BMP2 (aufgetragen sind 30 μ l des Reaktionsansatzes). Auf der linken Bahn ist ein Abschnitt des 1 kb Markers der Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA zu sehen, die Fragmentgrößen der Banden sind angegeben.

Der Infektionserfolg wurde in allen Fällen indirekt mittels Messung der Transgenexpression durch Bestimmung des BMP-2 Proteingehaltes im Zellüberstand kontrolliert. Zellüberstände der gleichen Zelllinie, die nicht transduziert wurden, dienten als Negativkontrolle. Auch in diesem Versuch wurden nicht-selektionierte Zellpopulationen verwendet. Sowohl von den transduzierten Zelllinien als auch von den Negativkontrollen wurden Überstände gewonnen und im BMP-2 ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 aufgeführt. In keinem Fall konnte BMP-2 in den Überständen der Negativkontrollen gemessen werden. Infolgedessen ist die gemessene Konzentration dieses Zytokins bei *hbmp-2*-transduzierten Zellen auf den retroviralen Gentransfer zurückzuführen. Die gemessenen Konzentrationen der verschiedenen transduzierten Chondrozyten erstreckten sich dabei über einen Bereich von 45,0 ng/ml Zellüberstand (CZ 188-BMP2) bis 0,5 ng/ml (CZ 288I-BMP2), was einer 90fach höheren Konzentration entsprach. Transduzierte HT-1080 Zellen zeigten ebenfalls Messwerte über einen weiten Bereich von 0,5 ng/ml (HT-BMP2-1) bis 19,8 ng/ml (HT-BMP2-2). Bei beiden Zelltypen lieferte die Infektion mit frischem Überstand das höchste Ergebnis (CZ 188-BMP2 bzw. HT-BMP2-1).

Von einem mit CZ 188-BMP2 Zellen besiedelten Schwamm wurde der BMP-2 Gehalt im Zellüberstand gemessen. Diese Probe mit der Bezeichnung CZ 188-BMP2 Resorb wurde fünf

ERGEBNISSE

Wochen nach Transduktion entnommen und enthält 7,5 ng hBMP-2 pro Milliliter. Dadurch wurde die anhaltende BMP-2 Produktion nach längerer Kultivierung auch nach Änderung der Kulturbedingung durch Überführung der Zellen von Monolayer- in 3D-Kultur belegt.

Ebenso wie nach der Transduktion mit *nlslacZ* kodierenden Retroviren besteht bei den *hbmp-2*-transduzierten nicht-selektionierten Zellpopulationen die Möglichkeit, dass sich die Stärke der Transgenexpression in dieser Population mit der Zeit ändert. Aus diesem Grund wurde der Verlauf der Transgenexpression der Zellen CZ 288I-BMP2 und HT-BMP2-3 durch mehrfache Messung der BMP-2 Konzentration im Zellüberstand verfolgt (s. Abbildung 18 A und B). Beide Zelllinien zeigten nach neun (CZ 288I-BMP2) bzw. acht Wochen (HT-BMP23) eine messbare *hbmp-2* Expression von 2,7 ng/ml (CZ 288I-BMP2) bzw. 5,3 ng/ml (HT-BMP2-3). Als Negativkontrolle wurde zu jedem Messzeitpunkt der BMP-2 Gehalt in Zellüberständen der nicht-transduzierten Ausgangszelllinien (CZ 288 bzw. HT-1080 Zellen) gemessen. In diesen Kontrollen war zu keinem Zeitpunkt hBMP-2 nachweisbar.

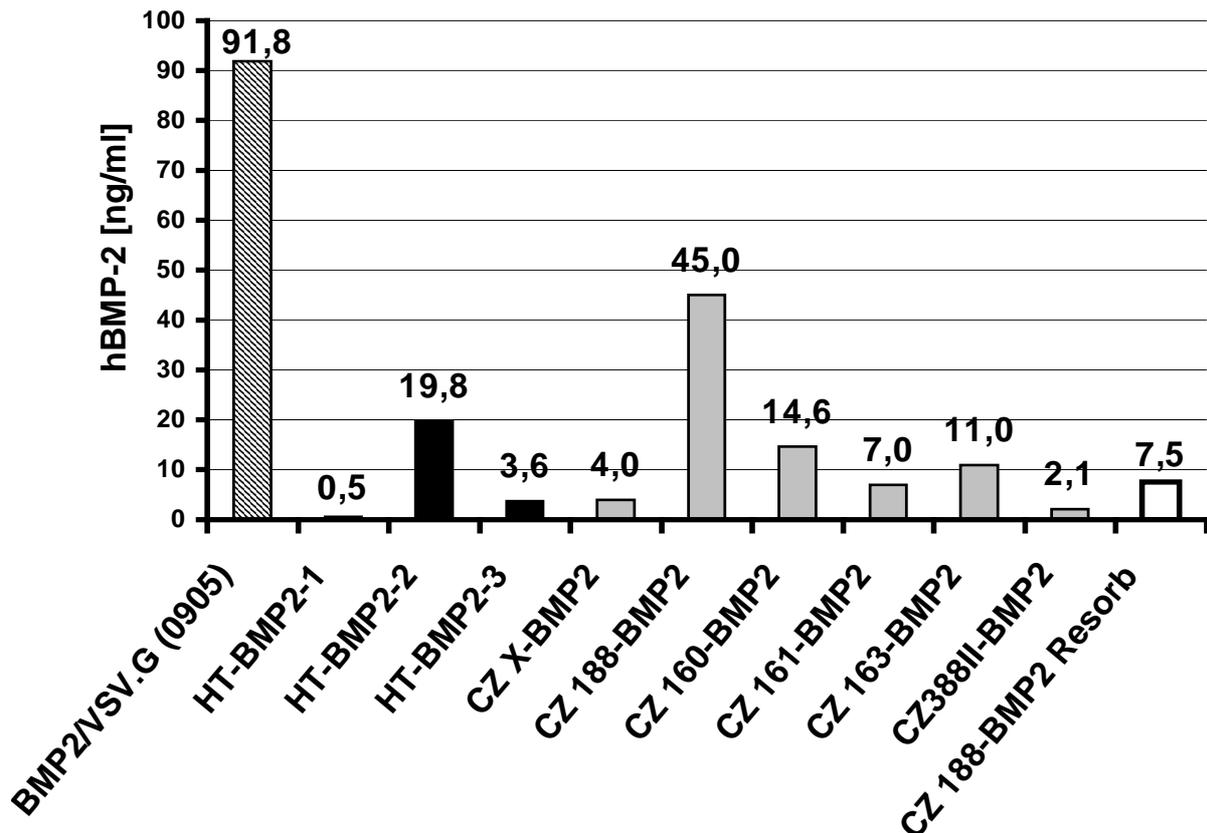
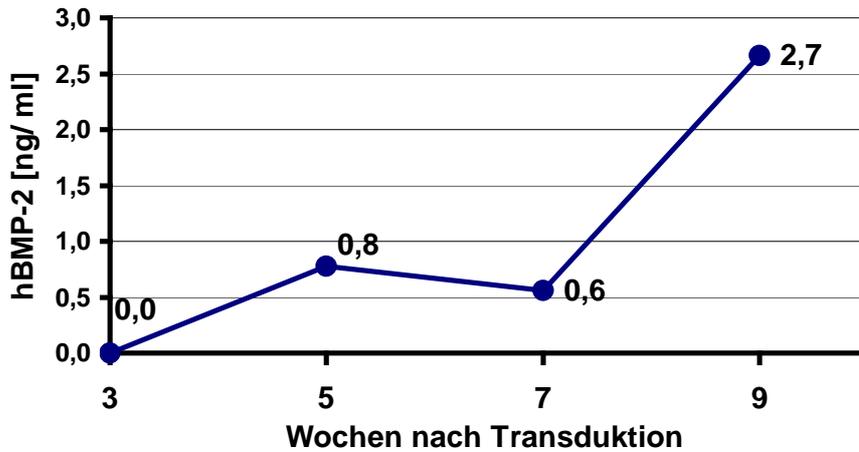


Abbildung 17: BMP-2 Gehalt verschiedener Zellüberstände

Dargestellt ist der mittels ELISA bestimmte Gehalt an hBMP-2 Protein in verschiedenen Zellüberständen. Gestreifte Säule: viraler Überstand pBulletBMP2/VSV.G (0905) von 293T Zellen, die mit den Plasmiden pBulletBMP2, pHIT 60 und pHCMV-G transfiziert wurden; schwarze Säulen: hBMP-2 Gehalt in Überständen retroviral *hbmp-2*-transduzierter HT-1080 Zellen; graue Säulen: hBMP-2 Gehalt in Überständen retroviral *hbmp-2*-transduzierter Chondrozyten; weiße Säule: hBMP-2 Gehalt des Kulturmediums eines mit CZ 188-BMP2 Zellen besiedelten Kollagenschwammes.

A



B

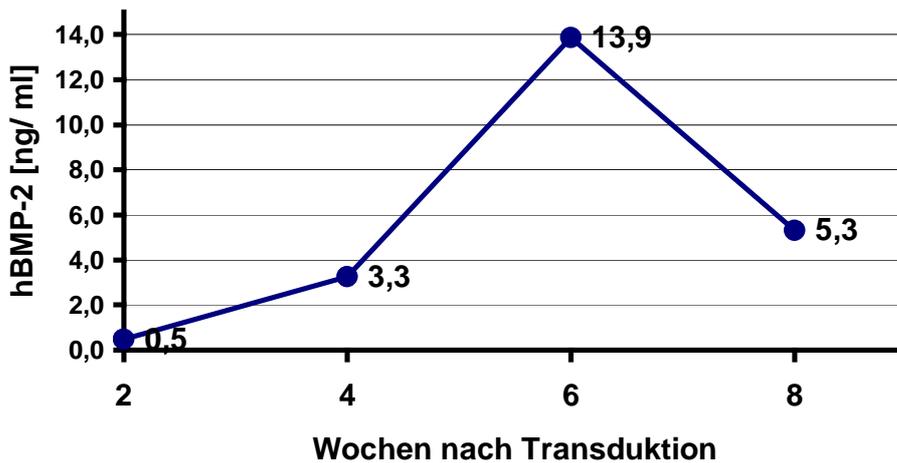


Abbildung 18: Verlaufskontrolle der *hbm2* Expression der Zelllinien CZ 288I-BMP2 (A) und HT-BMP2-3 (B) *in vitro*

Dargestellt ist der mittels ELISA gemessene Verlauf der BMP-2 Konzentration im Zellüberstand der jeweiligen Zelllinie, der Zeitpunkt der Messung, bezeichnet als Woche nach der Transduktion, ist durch einen Punkt gekennzeichnet.

4.5 Tetrazyklin-induzierbare Vektoren

4.5.1 Die Klonierung des retroviralen Vektors pBulletA

Das Ziel war es, einen retroviralen Vektor zu generieren, welcher zusätzlich zu einer möglichen Klonierungsstelle im so genannten Virusbackbone (der Bereich zwischen den LTRs) über singuläre Schnittstellen in der U3-Region der 3'LTR verfügt. Diese sollten 5' (d. h. aufwärts) der viralen Promotor- und Enhancersequenzen liegen.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die Sequenz der 3'LTR des Vektors pBullet durch die Sequenz der 3'LTR des Vektors pE2A ausgetauscht (vgl. Abbildung 8 B). Der Vektor pE2A, eine Weiterentwicklung von pN2A (HANTZOPOULOS et al., 1989), verfügt über eine zusätzliche MCS in der U3 Region der 3'LTR. An diese Stelle platzierte Transgene liegen 5' des retroviralen U3 Promotors. Infolgedessen findet durch diesen Promotor keine Transkription dieser Transgene statt, sie müssen daher über einen eigenen Promotor verfügen. Nach Austausch der 3'LTR verfügt der neue retrovirale Vektor pBulletA neben der bisherigen MCS (singuläre Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI, BamHI, NruI, NotI und XhoI) über eine zusätzliche Klonierungsstelle (MluI) in der 3'LTR für die Insertion eines Transgens (s. Abbildung 19).

Aus pE2A wurde nach HindIII- und XhoI-Verdau das Fragment isoliert, das die Sequenz der viralen 3'LTR enthält. Die Enden der HindIII-Schnittstelle wurden zuvor mittels Klenow Enzym aufgefüllt. Das Plasmidfragment hat eine Länge von 1297 bp.

pBullet wurde mit XhoI und StuI geschnitten und der Restvektor von einer Größe von 4561 bp ohne die 3'LTR isoliert.

Das die pE2A-3'LTR enthaltende Fragment wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pBullet ligiert. Der resultierende Vektor pBulletA hat eine Größe von 5857 bp.

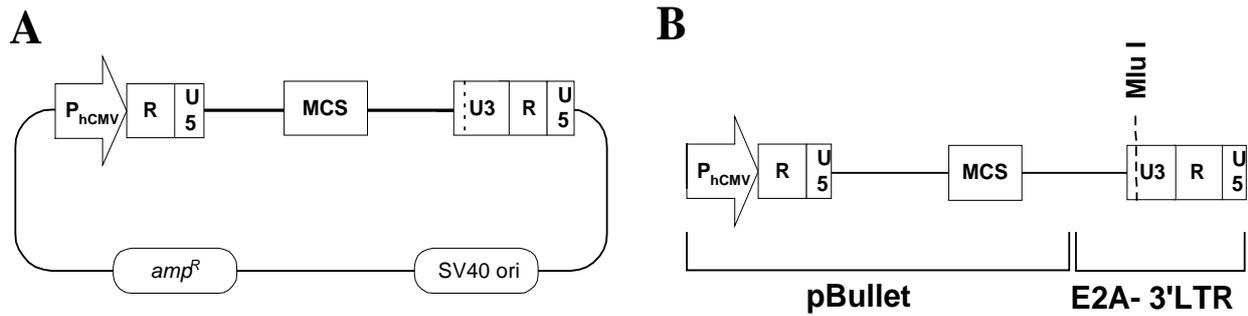


Abbildung 19: pBulletA

A zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids; B stellt die Herkunft der retroviralen Sequenzen dar. U3, R, U5: Regionen der LTR; MCS: *multiple cloning site*; SV40 ori: *origin of replication* des Simian Virus 40; amp^R: *Ampicillin-Resistenz Gen*; P_{hCMV}: Promotorsequenz des humanen Cytomegalievirus; LTR: *long terminal repeat*; MluI: Restriktionsschnittstelle.

4.5.2 Klonierung Tetrazyklin-induzierbarer Vektoren

Ziel war es, retrovirale Vektoren zu entwickeln, die beide regulatorischen Elemente des Tet-On-Systems enthalten. Dabei handelt es sich um das Gen des reversen Transaktivators der zweiten Generation, *rtTA2^S-M2*, und die Sequenz Tet-responsive Promotors, P_{hCMV*-1}, mit nachfolgender MCS für die Insertion von Transgenen. Es wurde die Konstruktion von Double-copy-Vektoren gewählt, wobei der Tet-responsive Promotor mit der MCS für das Transgen in die U3 Region der 3'LTR kloniert wurde.

4.5.2.1 pBulletAR

Als virales Plasmid wurde der neu klonierte Vektor pBulletA (s. Kapitel 4.5.1) verwendet. In einem ersten Klonierungsschritt wurde der reverse Transaktivator aus dem Plasmid pUhrT 61-1 in die MCS zwischen die LTRs kloniert.

Präparation des retroviralen Vektors pBulletA: Der Vektor pBulletA wurde zunächst mit NcoI in der MCS an der Stelle 4108 linearisiert und die Enden durch Klenow Enzym aufgefüllt. Dann folgte ein BamHI Verdau, wobei BamHI ebenfalls in der MCS an Stelle 4120, also abwärts der NcoI Schnittstelle, schneidet. Aus dem Plasmid pUhrT 61-1 wurde mittels EcoRI Verdau, Auffüllen der überhängenden Enden und nachfolgendem BamHI Verdau das den reversen Transaktivator *rtTA2^S-M2* enthaltende Fragment von einer Größe von 760 bp isoliert. Dieses Fragment wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pBulletA ligiert. Das resultierende Plasmid, pBulletAR, ist 6614 bp groß (s. Abbildung 20 A).

4.5.2.2 pBulletARTS

Im zweiten Schritt wurde der Tet-responsive Promotor in *sense* Orientierung, d. h. in 5'→3' Richtung in die MluI Schnittstelle des Vektors pBulletAR kloniert.

Präparation des retroviralen Vektors pBulletAR: Das neu klonierte Plasmid pBulletAR wurde in der MluI Schnittstelle in der U3 Region der 3'LTR linearisiert und die Enden mittels Klenow Enzym aufgefüllt.

Isolation des Tet-responsive Promotors: Das Plasmid pTRE2 wurde mit XhoI und XbaI geschnitten, die überstehenden Enden wurden durch Klenow Enzym aufgefüllt. Das 532 bp große Fragment, das die Sequenz des Tet-responsive Promotors P_{hCMV*-1} mit einer MCS enthält, wurde isoliert.

Dieses Fragment wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pBulletAR ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pBulletARTS genannt und hat eine Größe von 7152 bp (s. Abbildung 20 B).

Die MCS des Tet-responsive Promotors, in welche das gewählte Transgen kloniert werden sollte, enthält in diesem Plasmid die beiden singulären Schnittstellen HindIII (bp 5884) und Sall (bp 5890).

4.5.2.2.1 Klonierung des Transgens *nslacZ* in pBulletARTS

Um die Funktion des Vektors kontrollieren zu können, wurde das Reporter-gen *nslacZ* als Transgen verwendet.

Präparation des retroviralen Backbones pBulletARTS: Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert und die Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt.

Isolierung des *nslacZ* Inserts: pRc/RNLSlacZ (vgl. Abbildung 8 C) wurde mit den Restriktionsenzymen BglII und XbaI geschnitten und die überhängenden Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Das 3490 bp große Fragment, das das *nslacZ* Gen enthält, wurde isoliert.

NslacZ wurde in 5'→3' Orientierung mittels *blunt-end* Ligation in den vorbereiteten Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid hat eine Größe von 10632 bp und wurde pBulletARTSLZ genannt.

4.5.2.2.2 Klonierung des Transgens *egfp* in pBulletARTS

Als alternatives Reporter-gen wurde *egfp* verwendet.

Präparation des retroviralen Vektors pBulletARTS: Der Vektor wurde mit Sall linearisiert und die Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Danach wurde der Vektor mit HindIII geschnitten.

Isolierung des *egfp* Inserts: pEGFP (vgl. Abbildung 8 E) wurde mit den Enzymen HindIII und StuI geschnitten und das das Reportergen enthaltende Fragment von 851 bp Größe isoliert.

Egfp wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pBulletARTS ligiert. Das resultierende Plasmid, pBulletARTSEGFP, ist 8003 bp groß.

4.5.2.3 pBulletARTAS-2

Das Plasmid pBulletARTAS-2 unterscheidet sich von pBulletARTS dadurch, dass die den Tet-responsive Promotor enthaltende Kasette in 3'→5' Orientierung in die MluI Schnittstelle der 3'LTR des oben beschriebenen Vektors pBulletAR kloniert wurde (vgl. Abbildung 20 C). Das resultierende Plasmid pBulletARTAS-2 hat ebenfalls eine Größe von 7152 bp. Die MCS des Tet-responsive Promotors, in welche später das Transgen kloniert werden soll, enthält die beiden singulären Schnittstellen HindIII (bp 5389) und SalI (bp 5383). Die Transgene müssen ebenfalls in 3'→5' Orientierung in die MCS des Tet-responsive Promotors kloniert werden und müssen, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, über ein Polyadenylierungssignal (p(A)-Signal) verfügen, um die Transkription zu beenden.

4.5.2.3.1 Klonierung des Transgens *nslacZ* in pBulletARTAS-2

Um die Funktion des Vektors kontrollieren zu können, wird auch in diesem Konstrukt *nslacZ* als Transgen verwendet. Das eingeführte Reportergen verfügt über das Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons (BGH p(A)-Signal).

Präparation des retroviralen Vektors pBulletARTAS-2: Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert und die Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt.

Isolierung des *nslacZ-BGH p(A)* Inserts: pRc/RNLSlacZ wurde mit den Restriktionsenzymen BglII und BamHI geschnitten und die überhängenden Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Das 3781 bp große Fragment, welches das *nslacZ* Gen mit dem BGH p(A)-Signal enthält, wurde isoliert.

NslacZ-BGH p(A) wurde mittels *blunt-end* Ligation in 3'→5' Orientierung in den vorbereiteten Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid hat eine Größe von 10632 bp und wurde pBulletARTAS-2LZ genannt.

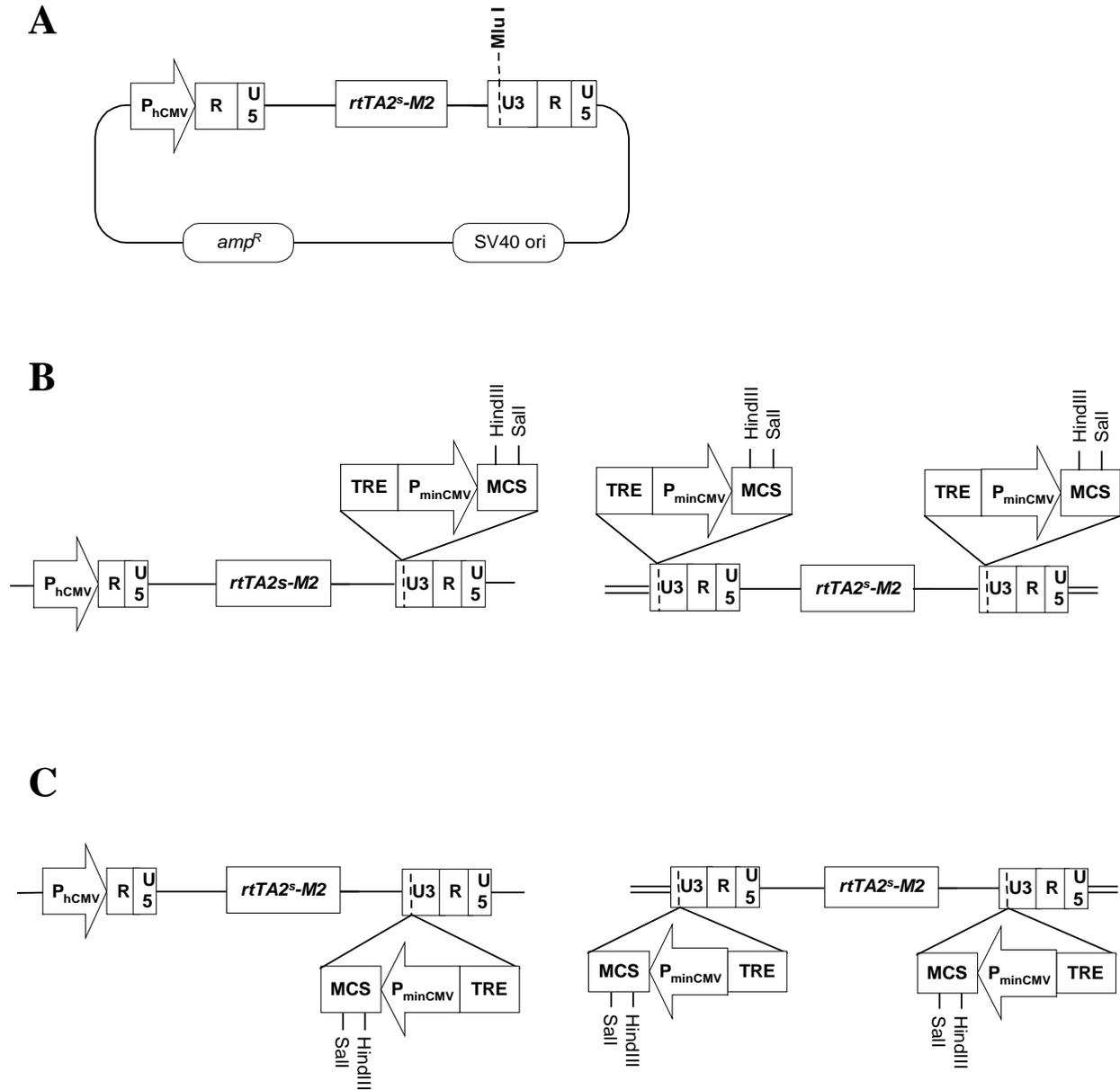


Abbildung 20: Schematische Darstellung retroviraler Double-copy-Vektoren

A: Das Plasmid pBulletAR. B: Darstellung des für retrovirale Sequenzen kodierenden Anteils von pBulletARTS (links), die rechte Darstellung zeigt diesen Anteil als Provirus nach Integration in das Zellgenom. Zu beachten ist die Verdoppelung der U3 Region mit den darin enthaltenen Elementen. C: Das Plasmid pBulletARTAS-2 in gleicher Darstellung wie B. Die singulären Restriktionsschnittstellen (MluI, HindIII und SalI) für die Insertion von weiteren DNA Sequenzen sind eingezeichnet. MCS: *multiple cloning site* für die Insertion von Transgenen; U3, R, U5: Regionen der LTR; P_{hCMV}: Promotor des humanen Cytomegalievirus; *rtTA2^s-M2*: Sequenz des reversen Transaktivators *rtTA2^s-M2*; TRE: Sequenz des Tet-responsive Elements des Tet-responsive Promotors; P_{minCMV}: minimaler *intermediate early* Promotor des humanen Cytomegalievirus, Teil des Tet-responsive Promotors; SV40 ori: *origin of replication* des Simian Virus 40; *amp^R*: *Ampicillin-Resistenz Gen*.

4.5.2.3.2 Klonierung des Transgens *egfp* in pBulletARTAS-2

Als alternatives Reporter gen wurde ebenfalls *egfp* verwendet. Das eingeführte Transgen verfügt über ein BGH p(A)-Signal.

Präparation des retroviralen Vektors pBulletARTAS-2: Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert und die Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt.

Isolierung des *egfp*-BGH p(A) Inserts: Der Vektor pRc/REGFP (s. Kapitel 4.5.3 und Abbildung 21) wurde mit BamHI geschnitten und die Enden mittels Klenow Enzym aufgefüllt. Das 1113 bp große, *egfp*-BGH p(A) enthaltende Fragment wurde isoliert.

Egfp-BGH p(A) wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 3'→5' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pBulletARTAS-2 ligiert. Das resultierende Plasmid, pBulletARTAS-2EGFP, ist 8265 bp groß.

4.5.3 Zwischenklonierung: pRc/REGFP

Diese Klonierung wurde durchgeführt, um das Reporter gen *egfp* mit einem poly(A)-Signal auszustatten. Der Vektor pRc/RSV verfügt über eine geeignete MCS, im Anschluss daran ist das Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons, BGH p(A), lokalisiert (vgl. Abbildung 8 F). Dieses p(A)-Signal ist vor allem deshalb gut für die Verwendung in retroviralen Vektoren geeignet, weil es mit einer Größe von 225 bp verhältnismäßig klein ist.

Präparation des Vektors pRc/RSV: Das Plasmid wurde mit NotI linearisiert, die Enden wurden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Es folgte ein XbaI Verdau. Das den Vektor enthaltende Fragment von 5228 bp Länge wurde isoliert.

Isolation des *egfp*-Inserts: pEGFP wurde mit den Enzymen SmaI und XbaI geschnitten und das 750 bp große, *egfp* enthaltende Fragment isoliert.

Egfp wurde mittels *blunt-end-sticky-end* Ligation in 5'→3' Orientierung in den vorbereiteten Vektor pRc/RSV ligiert. Das resultierende Plasmid, pRc/REGFP, ist 5978 bp groß. *egfp*-BGH p(A) kann aus diesem Vektor mittels BamHI Verdau als 1,1 kb große Kasette isoliert werden (vgl. Abbildung 21).

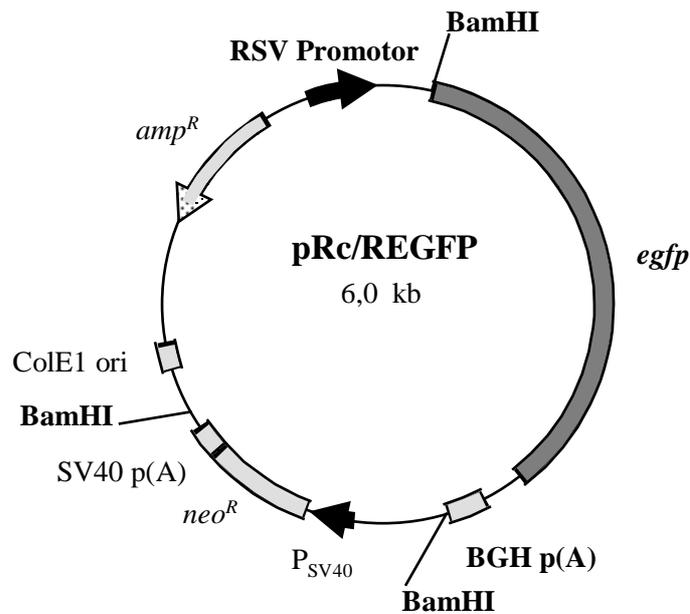


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Plasmids pRc/REGFP

egfp: enhanced green fluorescent protein; BGH p(A): Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; P_{SV40}: Promotorsequenz des Simian Virus 40 (SV 40); *neo^R*: Neomycin-Resistenz Gen; SV40 p(A): Polyadenylierungssignal von SV 40; ColE1 ori: ColE1 origin of replication; *amp^R*: Ampicillin-Resistenz Gen; RSV Promotor: Promotorsequenz des Rous Sarkom Virus; BamHI: Restriktionsschnittstellen für das Enzym BamHI.

4.6 Generierung stabiler Tetrazyklin-induzierbarer Phoenix-Ampho Zelllinien, Markergen *nslacZ*

4.6.1 Verwendung des GALV-envelopes

Unter Verwendung der für *nslacZ* kodierenden Plasmide pBulletARTAS-2LZ und pBulletARTSLZ (s. Kapitel 4.5.2.2.1 und 4.5.2.3.1) wurden zwei nicht-selektionierte stabile Phoenix-Ampho Viruszelllinien hergestellt. Für die Infektion der Verpackungszellen wurden GALV-pseudotypisierte Retroviren verwendet (Verwendung des *env*-Plasmids pCOLT-GALV). Die resultierenden amphotropen Zelllinien wurden PhoeARTSLZ und PhoeARTAS-2LZ genannt. Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil *nslacZ*-exprimierender Zellen nach Induktion mit Doxyzyklin ermittelt. Die Induzierbarkeit der Transgenexpression wurde durch parallele Messung induzierter und nicht-induzierter Zellen überprüft. Der Anteil *lacZ*-exprimierender Zellen lag bei beiden Zelllinien bei etwa 2 %. Grundlage für die Bewertung der Transgenexpression ist dabei der mittels FACS-Analyse gemessene Mittelwert der Fluoreszenzstärke (MFI, Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz aller positiven Zellen) der *egfp*-positiven Zellen (s. Abbildung 22).

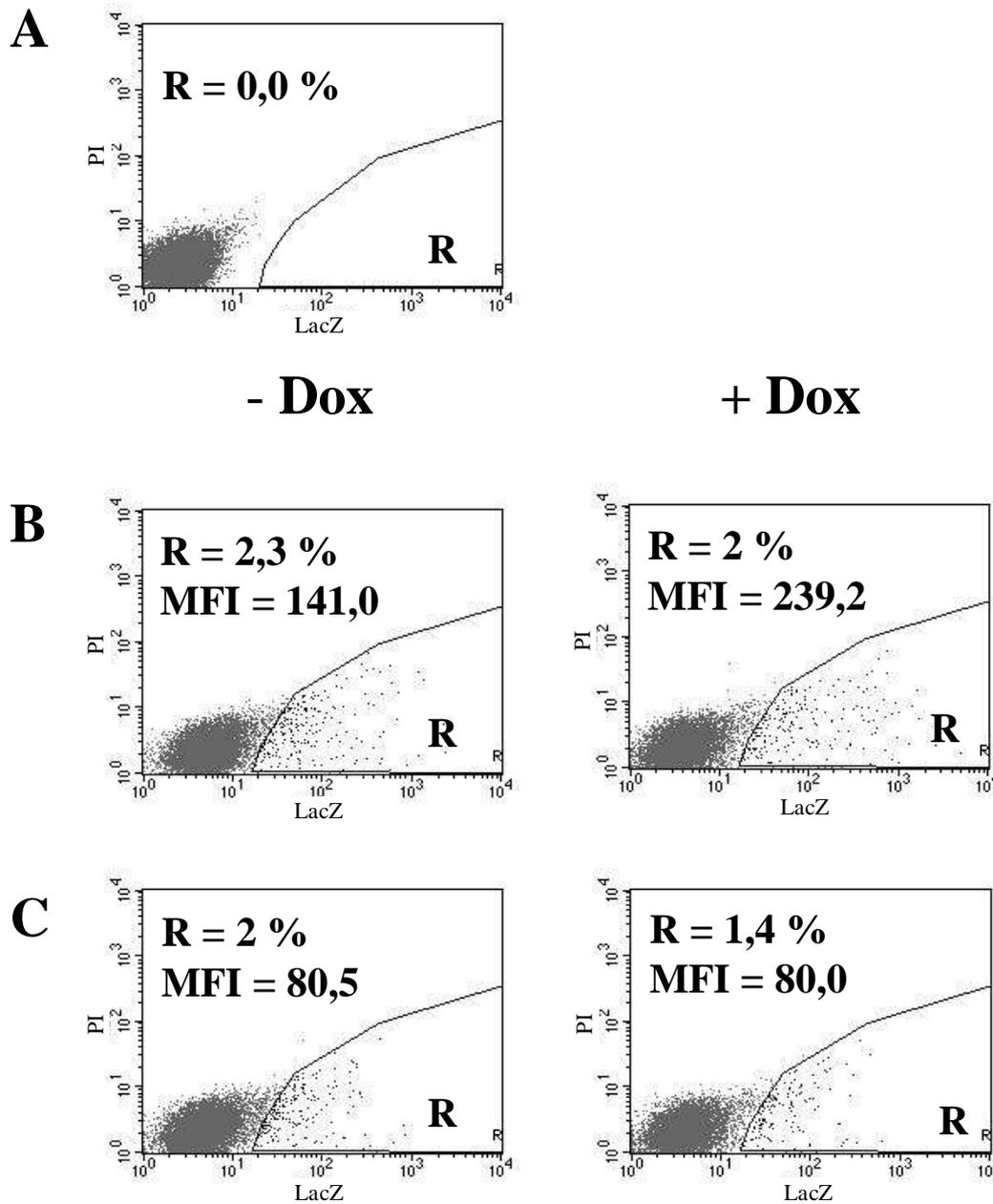


Abbildung 22: Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeARTSLZ und PhoeARTAS-2LZ
 A: Nicht-transduzierte Phoenix-Ampho Zellen (Negativkontrolle). B: PhoeARTSLZ ohne Induktion (links) und nach Induktion mit 1 µg Doxyzyklin pro ml Medium für 24 h (rechts). C: PhoeARTAS-2LZ ohne (links) und nach (rechts) Induktion. Gezeigt wird das Ergebnis der FACS-Analyse nach FDG- und Propidiumiodid-Färbung. Der Prozentsatz (R) und die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der *lacZ*-positiven Zellen sind angegeben. Die x-Achse (LacZ) bezeichnet die Intensität FDG-positiver Zellen als Maß für die *lacZ*-Expression; Die y-Achse (PI) zeigt die Fluoreszenzstärke Propidiumiodid-positiver Zellen; - Dox: Messung ohne Doxyzyklin; + Dox: Messung nach Zugabe von Doxyzyklin.

Von PhoeARTSLZ und PhoeARTAS-2LZ wurden virale Zellüberstände gewonnen und NIH 3T3 Zellen infiziert. Der durch X-Gal Färbung ermittelte Anteil *lacZ*-positiver Zellen nach Induktion lag bei beiden Viruszelllinien unter 1 %.

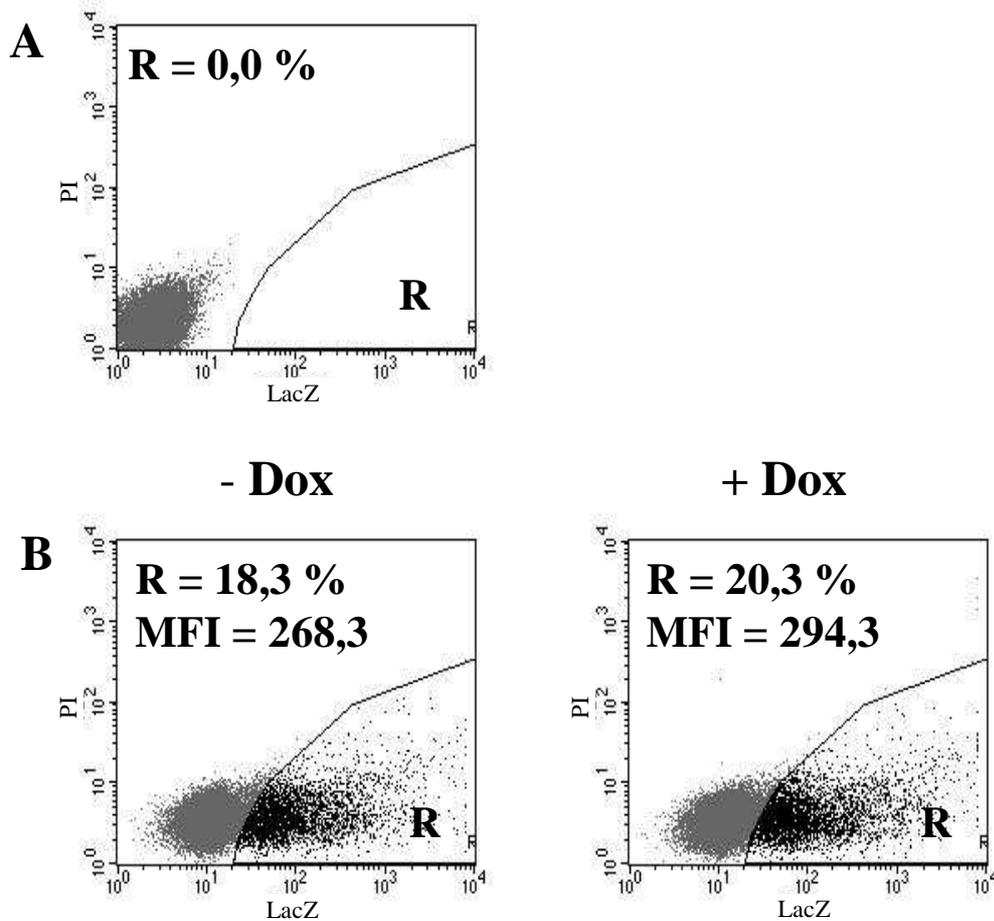


Abbildung 23: Analyse der Transgenexpression der Zelllinie PhoeARTSLZ-V

A: Nicht-transduzierte Phoenix-Ampho Zellen (Negativkontrolle). B: PhoeARTSLZ-V ohne Induktion (links) und nach Induktion mit 1 µg Doxyzyklin pro ml Medium für 24 h (rechts). Gezeigt wird das Ergebnis der FACS-Analyse nach FDG- und Propidiumiodid-Färbung. Der Prozentsatz (R) und die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der *lacZ*-positiven Zellen sind angegeben. Die x-Achse (LacZ) bezeichnet die Intensität FDG-positiver Zellen als Maß für die *lacZ*-Expression; Die y-Achse (PI) zeigt die Fluoreszenzstärke Propidiumiodid-positiver Zellen; - Dox: Messung ohne Doxyzyklin; + Dox: Messung nach Zugabe von Doxyzyklin.

4.6.2 Verwendung des VSV.G-envelopes

In einem weiteren Versuch wurde für die Generierung einer stabilen Phoenix-Ampho Zelllinie anstelle des GALV-Hüllproteins (pCOLT-GALV, Abbildung 9 D) das VSV.G-Hüllprotein für die Infektionen der Verpackungszellen verwendet (*env*-Plasmid pHCMV-G, Abbildung 9 C). Ziel war es, durch die Verwendung einer anderen Virushülle die Transduktionsrate und damit indirekt den viralen Titer zu verbessern. Als retrovirales Vektorplasmid wurde pBulletARTSLZ verwendet. Die resultierende Zelllinie, PhoeARTSLZ-V, wurde mittels FACS-Messung analysiert (Abbildung 23). Es wurden im Parallelansatz induzierte und nicht-induzierte Zellen gemessen.

Die auf diese Weise generierte Viruszelllinie zeigte im induzierten Zustand über 20 % *lacZ*-

ERGEBNISSE

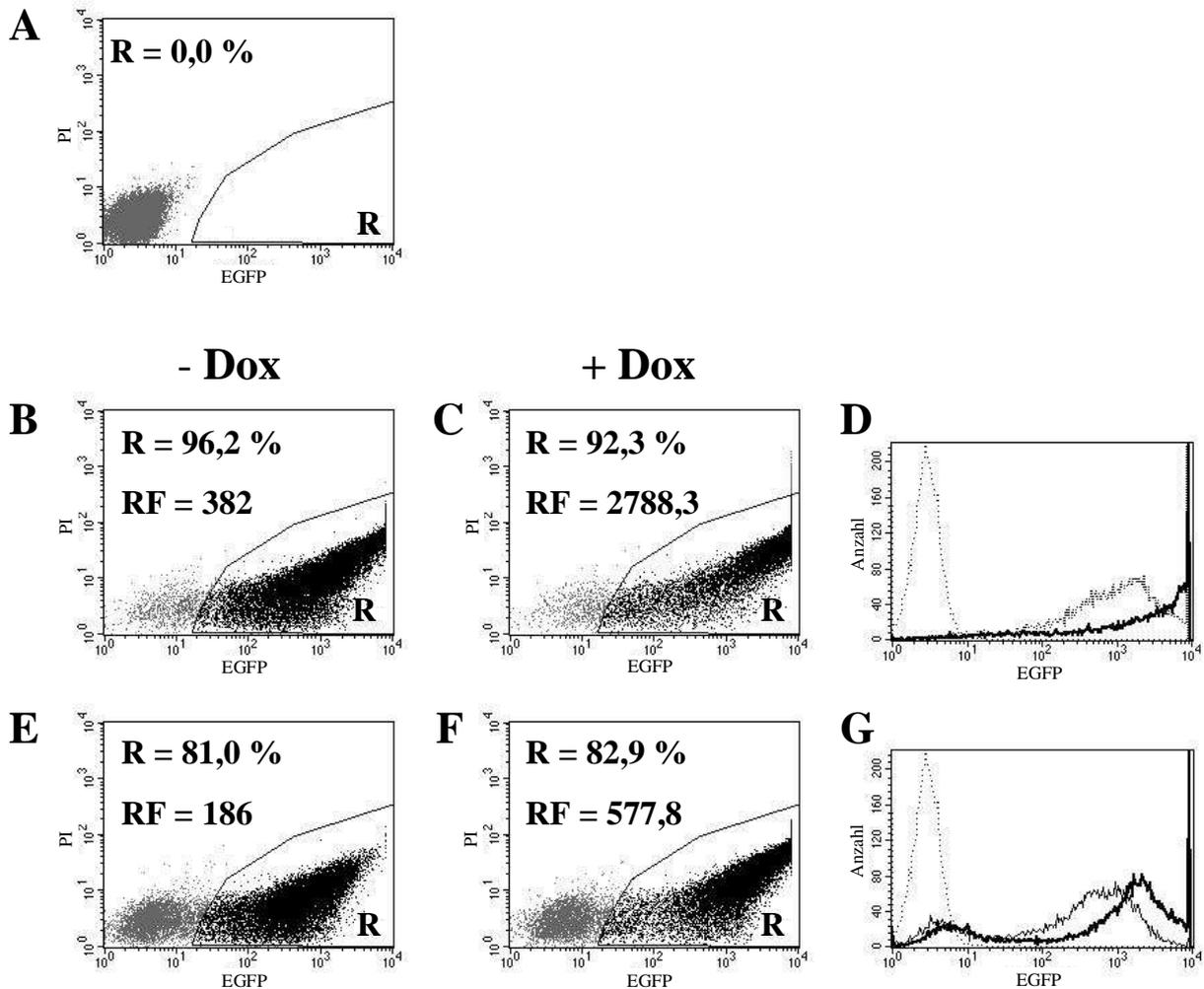


Abbildung 24: FACS-Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeARTSEGFP und PhoeARTAS-2EGFP

A: Nicht-transduzierte Phoenix-Ampho Zellen (Negativkontrolle). B: PhoeARTSEGFP ohne Induktion und C: nach Induktion mit Doxyzyklin. D: Überlagernde Darstellung von A, B und C im Histogramm. E: PhoeARTAS-2EGFP ohne und F: nach Induktion. G: Überlagernde Darstellung von A, E und F im Histogramm. Der Prozentsatz (R) und die relative Fluoreszenz (RF) der positiven Zellen sind angegeben. Die x-Achse (EGFP) bezeichnet als Maß für die *egfp*-Expression die Intensität *egfp*-positiver Zellen. Die y-Achse (PI) zeigt die Fluoreszenzstärke Propidiumiodid-positiver Zellen. Gepunktete Linie im Histogramm: Negativkontrolle (A); hellgraue Linie: Zellen ohne Induktion (- Dox); schwarze Linie: Zellen nach Induktion (+ Dox). - Dox: Messung ohne Doxyzyklin; + Dox: Messung nach Zugabe von Doxyzyklin (1 µg/ml Medium für 24 h).

positive Zellen. Nach Induktion war der Anteil positiver Zellen im Vergleich zum nicht-induzierten Zustand nahezu unverändert, es wurde ein Anstieg von 18,5 % auf 20,3 % positiver Zellen gemessen. Die Expressionsstärke der *nlslacZ*-exprimierenden Zellen, angegeben als mittlere Fluoreszenz-Intensität, MFI, zeigte einen Anstieg von 268,3 auf 294,3. Dies entsprach einer Steigerung der Expressionsstärke von 9,7 % nach Induktion. Nach Infektion von NIH 3T3 Zellen mit retroviralen Überständen der Zelllinie PhoeARTSLZ-V betrug der Anteil X-Gal-positiver Zellen nach Induktion weniger als 5 %.

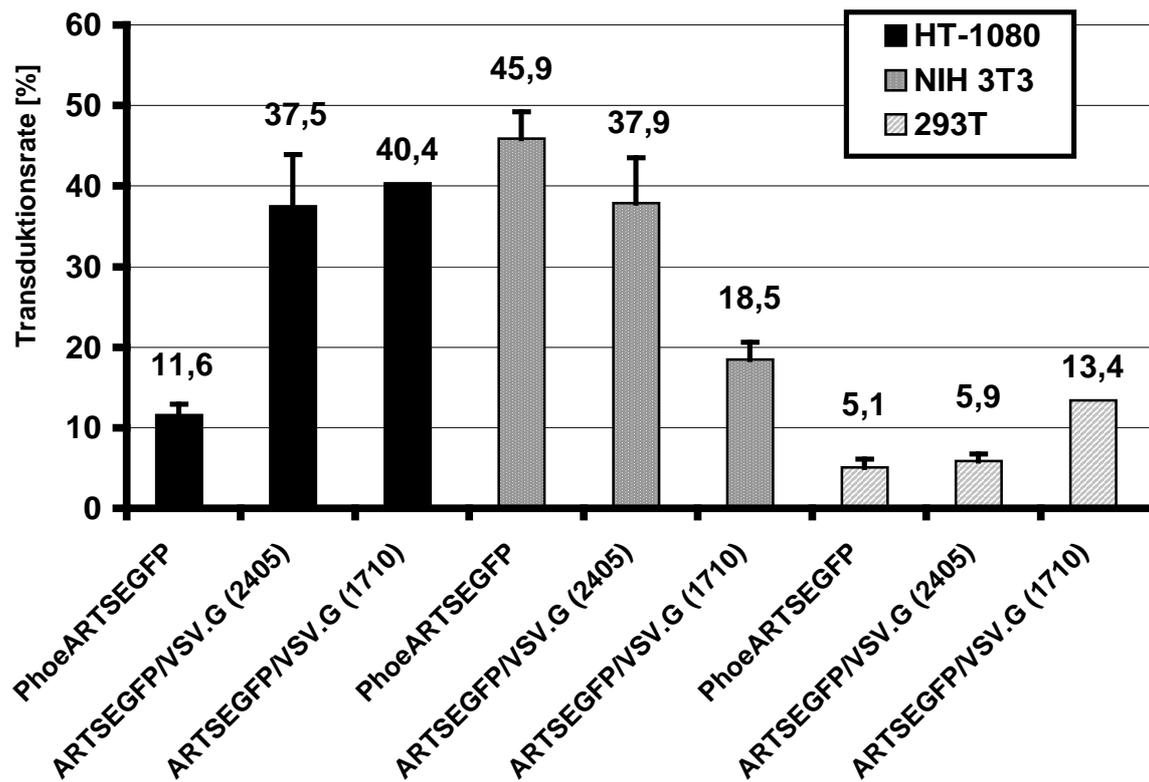


Abbildung 25: Transduktionsraten nach Transduktion mit pBulletARTSEGFP-Retroviren

Dargestellt ist die Transduktionsrate nach Infektion der Zelllinien HT-1080, NIH 3T3 und 293T mit verschiedenen retroviralen Überständen des Vektors pBulletARTSEGFP. Der verwendete Virusüberstand stellt die Beschriftung der x-Achse dar. Der prozentuale Anteil *egfp*-positiver Zellen wird mittels FACS-Analyse der transduzierten Zellen nach Induktion gemessen. Der jeweilige Wert bzw. der Mittelwert bei Doppel- oder Dreifachansätzen ist angegeben. Der Balken gibt bei Experimenten, die im Mehrfachansatz durchgeführt werden, die Größe der Standardabweichung an.

4.7 Generierung stabiler Tetrazyklin-induzierbarer Phoenix-Ampho Zelllinien, Markergen *egfp*

Nachdem mit dem Plasmid pBulletARTSLZ unter Verwendung des *env*-Plasmids pHCMV-G eine höhere Transduktionsrate als mit pCOLT-GALV erzielt wurde, wurde auch in diesem Versuch das *env*-Plasmid pHCMV-G verwendet. Unter Verwendung der beiden retroviralen Plasmide pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP wurde je eine virusproduzierende Phoenix-Ampho Zelllinie hergestellt (vgl. Kapitel 3.4.7). Die Zelllinien wurden PhoenixARTSEGFP und PhoenixARTAS-2EGFP genannt. Die Transgenexpression wurde mittels FACS-Analyse überprüft (Abbildung 24).

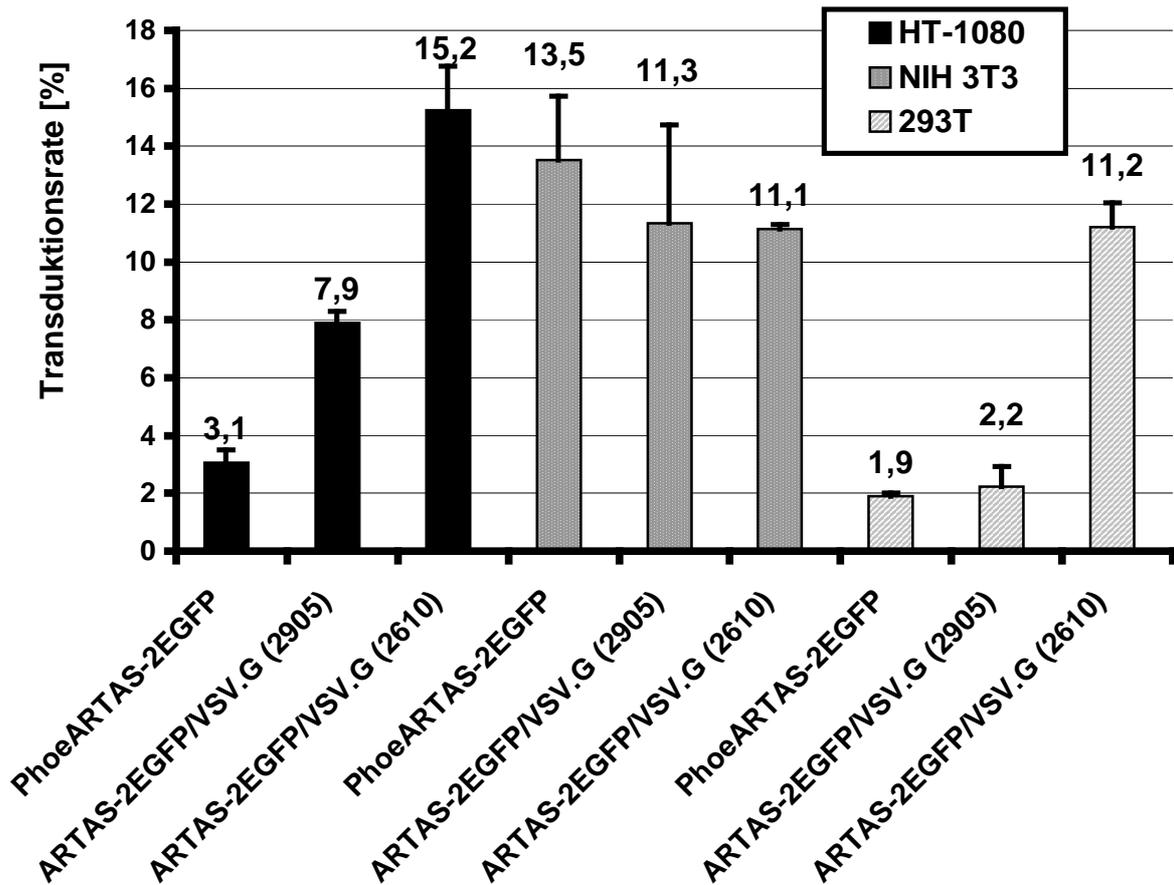


Abbildung 26: Transduktionsraten nach Transduktion mit pBulletARTAS-2EGFP-Retroviren
 Dargestellt ist die Transduktionsrate nach Infektion der Zelllinien HT-1080, NIH 3T3 und 293T mit verschiedenen retroviralen Überständen des Vektors pBulletARTAS-2EGFP. Der verwendete Virusüberstand stellt die Beschriftung der x-Achse dar. Der prozentuale Anteil *egfp*-positiver Zellen wird mittels FACS-Analyse der transduzierten Zellen nach Induktion gemessen. Alle Experimente werden im Doppel- oder Dreifachansatz durchgeführt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert, der Balken gibt die Größe der Standardabweichung an.

4.8 Transduktion mit Tetrazyklin-induzierbaren Retroviren

Für die weitere Charakterisierung der induzierbaren retroviralen Vektoren pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP wurden im Folgenden verschiedene konventionelle Zelllinien *in vitro* durch Retroviren dieser Plasmide transduziert. Mit amphotropen Virusüberständen der in Kapitel 4.7 beschriebenen Phoenix-Ampho Zelllinien wurden neben NIH 3T3 Zellen auch HT-1080 und 293T Zellen infiziert. Es wurden jeweils zwei (293T Zellen) bzw. drei (NIH 3T3 und HT-1080 Zellen) voneinander unabhängige Transduktionen durchgeführt. Verschiedene VSV.G-pseudotypisierte Überstände beider Plasmide wurden ebenfalls dazu verwendet, in mehreren voneinander unabhängigen Ansätzen NIH 3T3, HT-1080 und 293T Zellen zu transduzieren. Die in den Experimenten verwendeten

viralen Überstände wurden alle zuvor kryokonserviert. In nicht-selektionierten Zellpopulationen wurden Transduktionseffizienz und Induktion der Transgenexpression nach Zugabe von Doxyzyklin mittels FACS-Analyse beurteilt.

Die Virushülle (amphotrop oder VSV.G) hatte nur Einfluss auf die Transduktionseffizienz, die Funktion der Vektoren blieben davon unbeeinträchtigt. Deshalb wurden im Folgenden die Ergebnisse der Tetrazyklin-abhängigen Regulation für die verschiedenen Zelllinien zusammengefasst.

4.8.1 Transduktionseffizienzen Tetrazyklin-induzierbarer Vektoren

Wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, wurden drei verschiedene Zelllinien (HT-1080, NIH 3T3 und 293T) mit Viren der *egfp* kodierenden Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren transduziert. Die Transduktionseffizienz, definiert als der Prozentsatz positiver Zellen nach Induktion, wird für das Plasmid pBulletARTSEGFP in Abbildung 25 und für pBulletARTAS-2EGFP in der Abbildung 26 wiedergegeben.

Die Transduktionen mit Überständen der amphotropen Viruszelllinien PhoeARTSEGFP und PhoeARTAS-2EGFP führten dabei in allen Fällen bei der Zelllinie NIH 3T3 zu deutlich höheren Transduktionsraten als bei HT-1080 Zellen, 293T Zellen wurden zu einem noch geringeren Prozentsatz transduziert. Die erzielten Werte betragen bei NIH 3T3 Zellen für PhoeARTSEGFP $45,9 \pm 3,4$ % ($n = 3$) und $13,5 \pm 2,2$ % ($n = 3$) für PhoeARTAS-2EGFP, bei HT-1080 Zellen $11,6 \pm 1,3$ % ($n = 4$) für PhoeARTSEGFP und $3,1 \pm 0,5$ % ($n = 3$) für PhoeARTAS-2EGFP und bei 293T Zellen $5,1 \pm 1,0$ % ($n = 2$) für PhoeARTSEGFP und $1,9 \pm 0,1$ % ($n = 3$) für PhoeARTAS-2EGFP.

VSV.G-pseudotypisierte virale Überstände des Plasmids pBulletARTSEGFP erzielten bei HT-1080 Zellen nur $37,5 \pm 6,4$ % ($n = 4$) bzw. $40,4$ % ($n = 1$) transduzierte Zellen (vgl. Abbildung 25). NIH 3T3 Zellen wurden durch VSV.G-pseudotypisierte Viren dieses Plasmids zu $37,9 \pm 5,6$ % ($n = 2$), bzw. $18,5 \pm 2,1$ % ($n = 3$) transduziert, 293T Zellen nur bis zu $13,4 \pm 0,9$ % ($n = 1$) (Überstand ARTSEGFP/VSV.G (0810), Abbildung 25).

Virale Überstände des Plasmids pBulletARTAS-2EGFP erzielten insgesamt niedrigere Transduktionsraten. Die Transduktion von HT-1080 Zellen mit dem Überstand ARTAS-2EGFP/VSV.G (2610) erzielte mit $15,2 \pm 1,5$ % ($n = 2$) das höchste Ergebnis. Die Transduktionsraten von NIH 3T3 Zellen ($13,5 \pm 2,2$ % ($n = 3$)) mit dem Überstand von PhoeARTAS-2EGFP) und 293T Zellen mit $11,2 \pm 0,8$ % ($n = 2$) (Überstand ARTAS-2EGFP/VSV.G (2610)) lagen noch darunter (vgl. Abbildung 26).

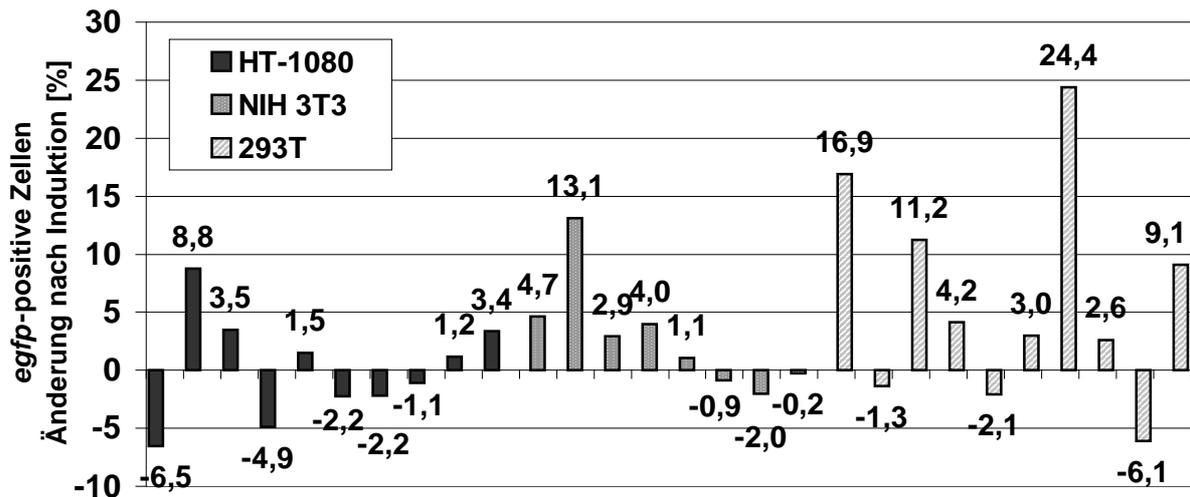


Abbildung 27: pBulletARTSEGFP: Einfluss der Induktion auf den Anteil *egfp*-positiver Zellen

Dargestellt ist die prozentuale Änderung des Anteils positiver Zellen nach Induktion mit Doxyzyklin. Die Werte bezeichnen die Differenz zwischen nicht-induziertem und induziertem Zustand, angegeben als Prozent des nicht-induzierten Anteils. Gezeigt sind die Ergebnisse von verschiedenen Transduktionen der Zelllinien HT-1080 (n = 10), NIH 3T3 (n = 8) und 293T (n = 10) mit Viren des Plasmids pBulletARTSEGFP. Die Daten werden mittels FACS-Analyse ermittelt, wobei parallel zwei Ansätze transduzierter Zellpopulationen gemessen werden, ein Ansatz ohne vorherige Induktion und ein Ansatz nach 24 stündiger Induktion mit 1 µg/ml Doxyzyklin. Als Negativkontrolle dient die Messung nicht-transduzierter Zellen.

4.8.2 Einfluss der Induktion auf den Prozentsatz transgenexprimierender Zellen

Ein weiterer Parameter in der Beurteilung von Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren ist die Änderung des Anteils transgenexprimierender Zellen in Abhängigkeit von der Induktion durch Doxyzyklin. In Abbildung 27 und Abbildung 28 wurde ausgehend von dem Anteil *egfp*-positiver Zellen im nicht-induzierten Zustand die prozentuale Änderung dieses Anteils nach Induktion dargestellt. Dafür wurde die Differenz zwischen nicht-induziertem und induziertem Zustand als prozentualer Anteil des nicht-induzierten Zustandes ausgedrückt. Negative Werte bedeuten dabei, dass im induzierten Zustand weniger positive Zellen gemessen wurden als im nicht-induzierten Zustand des Parallelansatzes. Solche negativen Werte, wie sie vor allem nach der Transduktion von HT-1080 Zellen mit Viren des Plasmids pBulletARTAS-2EGFP gemessen wurden, sind *per definitionem* in einem funktionsfähigen Tet-On-System nicht möglich, da hier der Tet-responsive Promotor erst durch die Zugabe von Doxyzyklin aktiviert werden müsste und die Transgenexpression infolgedessen ansteigt. Derartige Messergebnisse wurden daher als Messfehler gewertet. Es war davon auszugehen, dass dieser Messfehler auch bei den positiven Werten existent ist. Bei den Messungen nach Transduktionen mit Viren des Plasmids pBulletARTSEGFP wurde deshalb ein Fehlerbereich von ± 6,5 % angenommen. Dieser Wert entspricht der größten gemessenen negativen

ERGEBNISSE

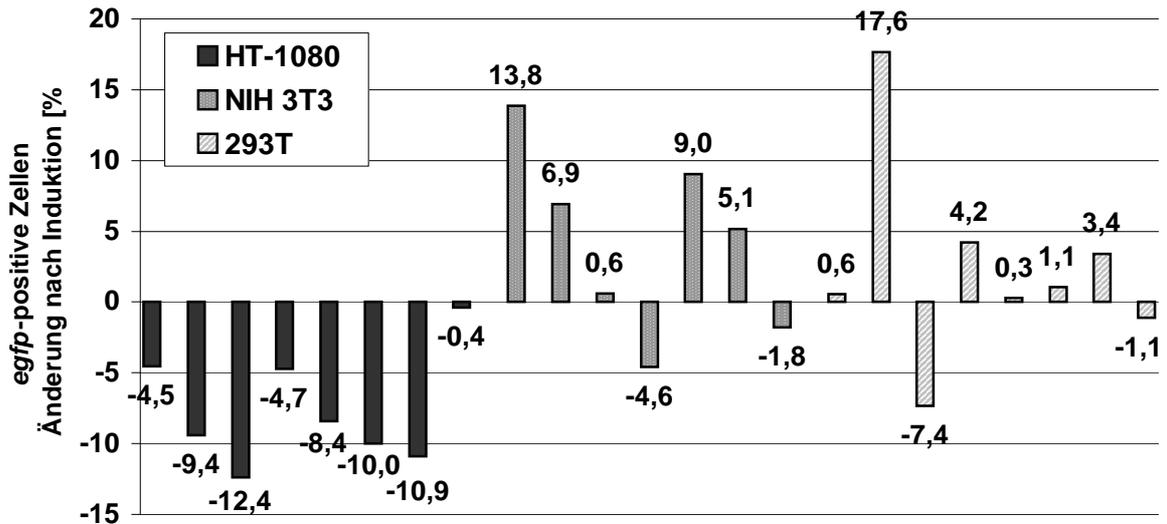


Abbildung 28: pBulletARTAS-2EGFP: Einfluss der Induktion auf den Anteil *egfp*-positiver Zellen

Dargestellt ist die prozentuale Änderung des Anteils positiver Zellen nach Induktion mit Doxyzyklin. Die Werte bezeichnen die Differenz zwischen nicht-induziertem und induziertem Zustand, angegeben als Prozent des nicht-induzierten Anteils. Gezeigt sind die Ergebnisse von verschiedenen Transduktionen der Zelllinien HT-1080 (n = 8), NIH 3T3 (n = 7) und 293T (n = 8) mit Viren des Plasmids pBulletARTAS-2EGFP. Die Daten werden mittels FACS-Analyse ermittelt, wobei parallel zwei Ansätze transduzierter Zellpopulationen gemessen werden, ein Ansatz ohne vorherige Induktion und ein Ansatz nach 24 stündiger Induktion mit 1 µg/ml Doxyzyklin. Als Negativkontrolle dient die Messung nicht-transduzierter Zellen.

Abweichung. Wurden alle in diesem Bereich liegenden Werte nicht berücksichtigt, zeigte sich, dass von den ursprünglich 28 Messungen nur sechs einen erhöhten Anteil *egfp*-positiver Zellen ergeben (vgl. Abbildung 27).

Der Fehlerbereich bei der Messung pBulletARTAS-2EGFP transduzierter Zellen erstreckte sich über $\pm 12,4$ %. Von den 23 Messwerten der Abbildung 28 lagen nur zwei Werte über dieser Grenze. Aufgrund dieser Daten zeigte sich bei beiden Plasmiden keine signifikante Änderung im Anteil transgenexprimierender Zellen nach Induktion.

4.8.3 Einfluss der Induktion auf die Änderung der Transgenexpressionsstärke

Ein weiterer wichtiger Parameter im Tet-On-System ist neben dem Anteil transgenexprimierender Zellen die Änderung der Stärke der Transgenexpression in Abhängigkeit vom Induktionszustand. Es ist zu erwarten, dass Zellen, die im nicht-induzierten Zustand Transgenexpression zeigen (sogenannte *leakiness*), nach Induktion eine stärkere Transgenexpression aufweisen. Grund dafür ist, dass nach Induktion mit Doxyzyklin und Bindung des reversen Transaktivators, der Tet-responsive Promotor seine volle Aktivität entfalten kann. Um eine Änderung der Expressionsstärke beurteilen zu können, wurde mit Hilfe von FACS-Analysen der Wert der relativen Fluoreszenz (RF) der *egfp*-exprimierenden Zellen im

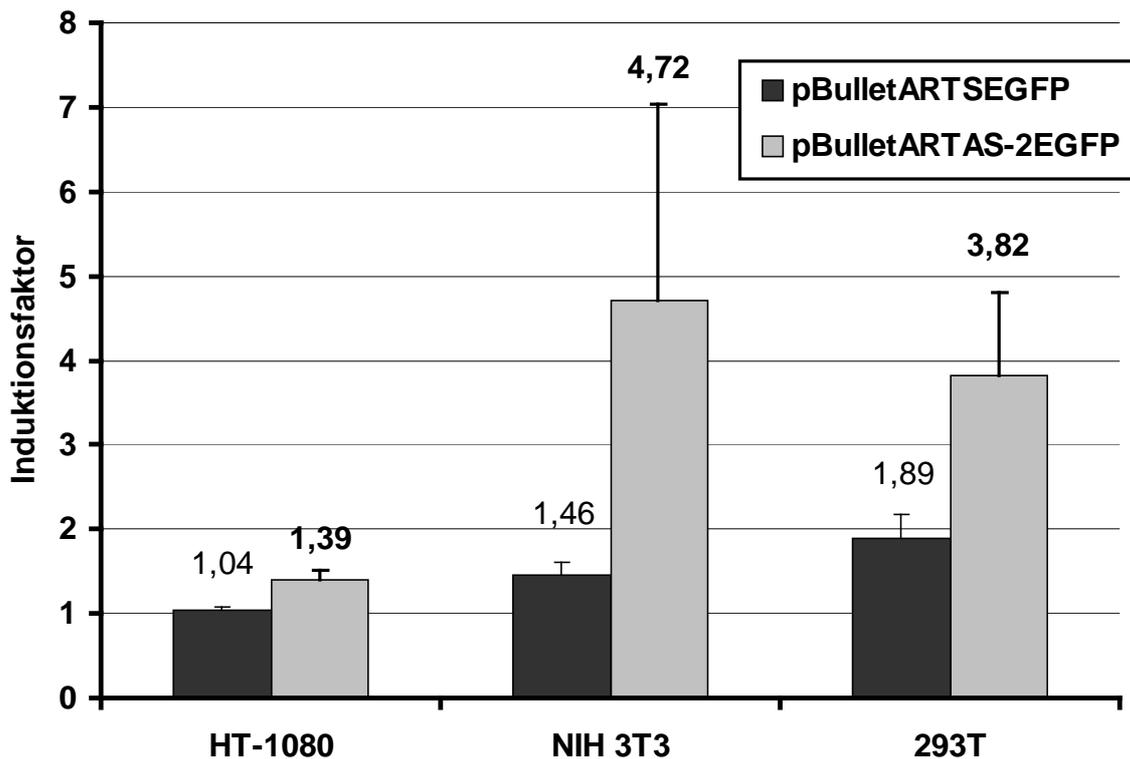


Abbildung 29: Einfluss der Induktion auf die Expressionsstärke

Darstellung der nach FACS-Analyse ermittelten Induktionsfaktoren für Viren der Plasmide pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP nach Transduktionen der Zelllinien HT-1080, NIH 3T3 und 293T. Die y-Achse bezeichnet den Induktionsfaktor, d. h. die Steigerung der Transgenexpression nach Zugabe von Doxzyklin zu dem Zellkulturmedium (1 µg/ml) für 24 h. Die x-Achse zeigt für die transduzierten Zelllinien die Mittelwerte aus mehreren Transduktionen, der Balken bezeichnet die Größe der Standardabweichung. Transduktionen mit pBulletARTSEGFP: HT-1080: n = 10; NIH 3T3: n = 8; 293T: n = 10. Transduktionen mit pBulletARTAS-2EGFP: HT-1080: n = 8; NIH 3T3: n = 7; 293T: n = 8.

induzierten und nicht-induzierten Zustand ermittelt (s. Kapitel 3.5.3.2). Die Induktion der Expression wurde durch den Quotienten aus RF induziert/RF nicht-induziert beschrieben. Daraus ergab sich ein Faktor, der die Zunahme der Expressionsstärke der gesamten positiven Zellen nach Induktion beschreibt. Der Wert „1“ entsprach dabei der Fluoreszenzstärke im nicht-induzierten Zustand. Dieser Faktor wurde im Folgenden als „Induktionsfaktor“ bezeichnet. Aus den Induktionsfaktoren der einzelnen Transduktionen wurden für die verschiedenen Zelllinien die Mittelwerte für die Viren der beiden induzierbaren Plasmide pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP gebildet (Abbildung 29).

Es zeigte sich, dass pBulletARTAS-2EGFP in den drei verwendeten Zelllinien einen signifikant höheren Induktionsfaktor hat als pBulletARTSEGFP ($p < 0,001$). Die Stärke dieser Induktion war zudem zelltypabhängig. pBulletARTAS-2EGFP zeigte in NIH 3T3 Zellen einen Induktionsfaktor von $4,72 \pm 2,32$ Standardabweichung (SD), während er in 293T Zellen

3,82 ± 0,97 SD und in HT-1080 Zellen nur 1,39 ± 0,12 SD betrug. pBulletARTSEGFP zeigte in 293T Zellen mit 1,89 ± 0,28 SD den höchsten Induktionsfaktor, in NIH 3T3 Zellen betrug er 1,46 ± 0,15 SD und in HT-1080 Zellen 1,04 ± 0,03 SD. Dabei war bei beiden Plasmiden die Induktion der Transgenexpression mit $p < 0,001$ in den Zelllinien NIH 3T3 und 293T signifikant höher als in der Zelllinie HT-1080. Die Unterschiede der Induktion waren zwischen den Zelllinie NIH 3T3 und 293T nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.8.4 Northern Blot-Analyse der transkriptionellen Aktivität der Tet-On-Vektoren

Nach Integration des Provirus in das zelluläre Genom entstehen unterschiedliche mRNA Transkripte. Länge und Anzahl sind dabei abhängig von den enthaltenden Promotoren und vom Vorhandensein funktioneller Spleißdonor und –akzeptorstellen (vgl. Kapitel 2.3.3). Das Provirus von pBulletARTSEGFP und von pBulletARTAS-2EGFP verfügt über zwei unterschiedliche Promotoren: Zum einen über den viralen Promoter der U3 Region (aktiv in der 5'LTR) und zum anderen über den Tet-responsive Promotor. Letzterer sollte dabei eine Tetrazyklin-abhängige Aktivität zeigen. Dadurch, dass die beiden Vektoren nach dem Prinzip von Double-copy-Vektoren konstruiert wurden, wird der im Plasmid nur in der U3 Region der 3'LTR lokalisierte Tet-responsive Promotor im Zuge der reversen Transkription dupliziert. Im Provirus ist er infolgedessen sowohl in der U3 Region der 5'LTR als auch in der U3 Region der 3'LTR vorhanden. Außerdem ist ein Spleißdonor und –akzeptor im viralen Backbone zwischen den LTRs vorhanden (vgl. Kapitel 3.4.1). Die verschiedenen theoretisch möglichen Transkripte des Provirus des konstitutiven Vektors pBulletEGFP und der induzierbaren Vektoren pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP sind in Abbildung 31 dargestellt. Es ist zu beachten, dass die für pBulletARTSEGFP dargestellten Transkripte vom Tet-responsive Promotor der 5'LTR bis zum Ende der R Region der 3'LTR (in voller Länge und als Spleißform) bei korrekter Vektorfunktion nicht vorkommen sollten. Die Transkripte dieses Promotors sollten erwartungsgemäß am p(A)-Signal der R Region der 5'LTR enden. Um die transkriptionelle Aktivität der Tet-On-Vektoren nach Integration als Provirus zu überprüfen, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die gesamte RNA von Zellen isoliert, die zuvor retroviral transduziert wurden. Dabei handelte es sich um HT-1080 Zellen, welche mit VSV.G-pseudotypisierten viralen Überständen des Plasmids pBulletARTSEGFP (Überstand ATRSEGFP/VSV.G (1710)) oder pBulletARTAS-2EGFP (Überstand ARTAS-2EGFP/VSV.G (2610)) transduziert wurden. Es wurde dabei RNA von Zellen ohne Induktion und nach 24 stündiger Induktion mit Doxyzyklin gewonnen.

ERGEBNISSE

Tabelle 16: *egfp* Expression [%] der für die Northern Blot-Analyse verwendeten HT-1080 Zellen

Der Anteil *egfp*-positiver Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt, als Negativkontrolle wurden nicht-transduzierte HT-1080 Zellen gemessen. - Dox: Zellen ohne Induktion; + Dox: induzierte Zellen.

Virusüberstand	% <i>egfp</i> -positive Zellen	
EGFP/VSV.G (1710)		94,2
ARTSEGFP/VSV.G (1710)	- Dox	41,4
	+ Dox	40,4
ARTAS-2EGFP/VSV.G (2610)	- Dox	18,1
	+ Dox	16,3

Außerdem wurde RNA von HT-1080 Zellen, die mit Virus des Plasmids pBulletEGFP (vgl. Abbildung 9 A) transduziert wurden, gewonnen und analysiert. Dadurch wurde die Funktion eines konstitutiv *egfp*-exprimierenden Vektors überprüft. Als Negativkontrolle diente RNA nicht-transduzierter HT-1080 Zellen. Der Anteil *egfp*-exprimierender Zellen zum Zeitpunkt der RNA Isolation wurde mittels FACS-Analyse ermittelt, die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Für die Hybridisierung des Northern Blots wurde zunächst eine DNA Sonde verwendet, die die gesamte Länge des *egfp* Gens umfasste. Durch diese Hybridisierung wurden die mRNA Transkripte, die das *egfp* Gen in der gleichen Orientierung wie der transkribierende Promotor enthalten, detektiert. Alle acht möglichen Transkripte sind in Abbildung 31 dargestellt. In pBulletARTAS-2EGFP (Abbildung 20 C) ist das *egfp* Gen in *antisense* Orientierung in den Vektor kloniert worden. Transkripte des ebenfalls in *antisense* Orientierung enthaltenden Tet-responsive Promotors können mit dieser Sonde detektiert werden, da die entstehende mRNA die Sequenz des Gens in der richtigen Orientierung enthält. Die Transkripte des U3 Promotors der 5'LTR hybridisierten dagegen nicht. Wie erwartet wurde bei Zellen, die das Provirus von pBulletARTAS-2EGFP enthalten nur ein Transkript detektiert, welches dem Transkript des Tet-responsive Promotors mit einer Größe von 1,1 kb entspricht (Abbildung 30 A, Bahn 5 und 6). Bei HT-1080 Zellen, die das Provirus von pBulletARTSEGFP enthalten, konnten durch die Hybridisierung mit der *egfp*-spezifischen Sonde zwei Transkripte unterschieden werden (Abbildung 30 A, Bahn 3 und 4). Das stärkere Signal entsprach dabei dem Transkript des Tet-responsive Promotors (Länge 1,4 kb). Die obere Bande ließ sich nicht genau einem Transkript zuordnen. Da sie aber deutlich oberhalb der 28 S ribosomalen RNA (rRNA) Bande (Größe 5 kb) lag, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um das nicht-gespleißte Transkript des Tet-responsive Promotors handelte, welches trotz p(A)-Signal der 5'LTR bis zum Ende

ERGEBNISSE

der R Region der 3'LTR läuft und eine Länge von 5,8 kb hat. Das Provirus des konstitutiv exprimierenden Vektors pBulletEGFP (Abbildung 30 A, Bahn 2) zeigte zwei Transkripte, wobei die obere Bande der nicht-gespleißten mRNA (Länge 3,0 kb) und die untere Bande der gespleißten Form (2,1 kb) entsprach. Nicht-transduzierte HT-1080 Zellen zeigten kein Signal (Bahn 1).

Die gleiche Membran wurde danach mit einer für die U3 Region-spezifischen Sonde rehybridisiert. Das verwendete Plasmidfragment für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde umfasste die ersten 361 bp der U3 Region und zusätzlich ~190 bp des retroviralen Backbones aufwärts der 3'LTR. Das Provirus von pBulletARTAS-2EGFP zeigte ein mRNA Transkript, welches als schwache Bande zu erkennen ist (Abbildung 30 B, Bahn 5 und 6). Bei dieser Bande handelte es sich entweder um die gespleißte, oder die nicht-gespleißte mRNA des U3 Promotors der 5'LTR. Wie erwartet, wurde kein Transkript des Tet-responsive Promotors detektiert (vgl. Abbildung 31 C). Das Provirus von pBulletARTSEGFP zeigte nach Hybridisierung mit der U3-spezifischen Sonde drei Transkripte (Abbildung 30 B, Bahn 3 und 4). Das oberste und das unterste waren dabei nach der Lage mit den nach Hybridisierung mit der *egfp*-spezifischen Sonde detektierten Transkripten identisch. Wie zuvor war das kurze Signal des Tet-responsive Promotors wesentlich stärker. Die dritte Bande lag auf einer vergleichbaren Höhe wie eine Bande des Provirus von pBulletARTAS-2EGFP (Bahn 5 und 6). Es ist davon auszugehen, dass diese Banden die nicht-gespleißten mRNA des U3 Promotors der 5'LTR darstellten. Die Größe dieses Transkriptes für das Provirus von pBulletARTAS-2EGFP betrug 4,8 kb und hatte damit eine vergleichbare Größe wie das des Provirus von pBulletARTSEGFP mit 4,6 kb. RNA von HT-1080 Zellen, die die provirale Form des Vektors pBulletEGFP (Abbildung 30 B, Bahn 2) enthalten, zeigten wieder zwei Transkripte. Wie bei der *egfp*-spezifischen Hybridisierung, entsprach die obere Bande der nicht-gespleißten mRNA (Länge 2,8 kb) und die untere Bande der gespleißten Form (1,9 kb). Nicht-transduzierte HT-1080 Zellen zeigten kein Signal (Bahn 1).

Nach Entfernung der U3 Sonde von der Membran erfolgte die Hybridisierung mit einer für 18 S rRNA-spezifischen radioaktiv markierten Probe. Dieser Schritt diente dazu, den Auftrag vergleichbarer RNA Mengen auf den verschiedenen Bahnen zu überprüfen (Abbildung 30 C).

ERGEBNISSE

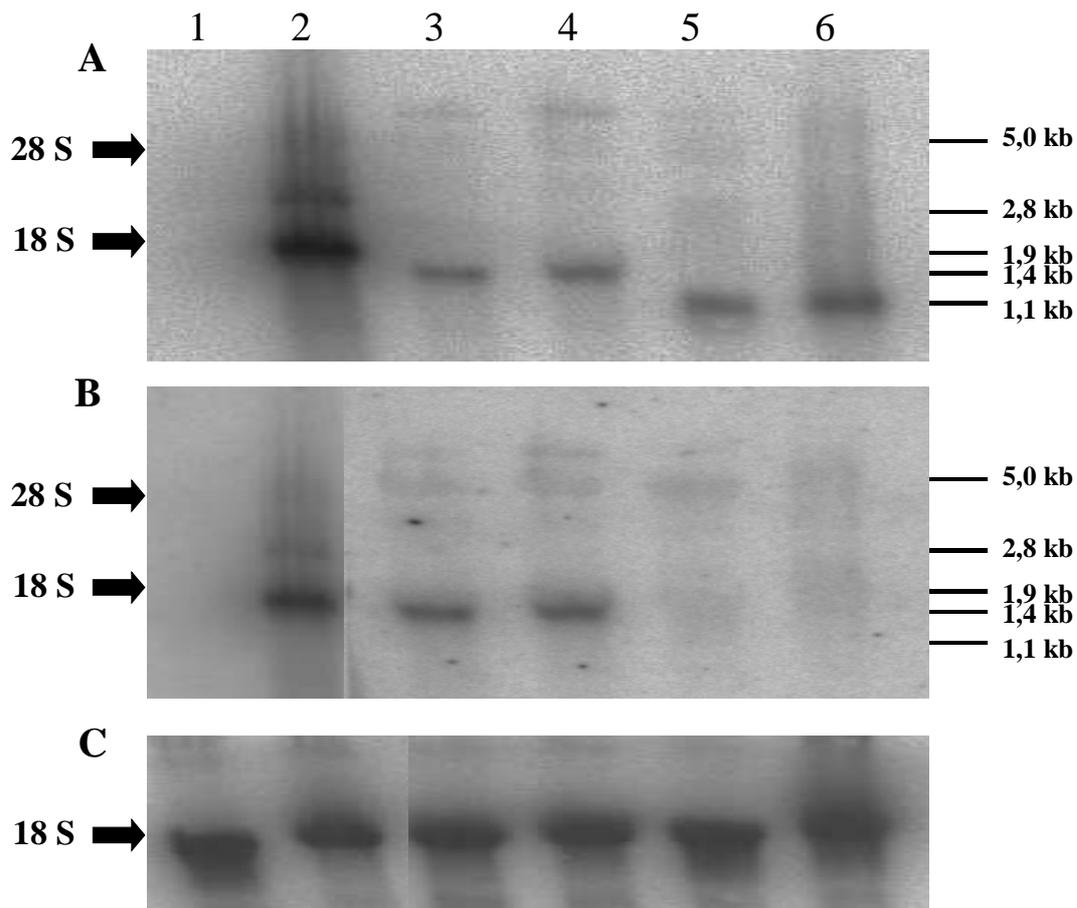


Abbildung 30: Northern Blot-Analyse der gesamt RNA von HT-1080 Zellen, nach Transduktion mit viralen Überständen des Plasmids pBulletEGFP (Bahn 2), pBulletARTSEGFP (Bahn 3 nicht-induziert und 4 induziert) und pBulletARTAS-2EGFP (Bahn 5 nicht-induziert und 6 induziert)

Als Negativkontrolle wurde auf Bahn 1 gesamt RNA nicht-transduzierter HT-1080 Zellen aufgetragen.

A: Hybridisierung mit einer Sonde für die gesamte Länge des *egfp* Gens; B: Rehybridisierung derselben Membran mit einer U3 Region-spezifischen Probe; C: Rehybridisierung derselben Membran mit einer 18 S rRNA-spezifischen Sonde für die Quantifizierung der aufgetragenen RNA Menge. Die Höhe der 18 S und 28 S rRNA Banden des RNA Gels ist gekennzeichnet (1,9 bzw. 5 kb, links). Die Größen der eindeutig bestimmbar mRNA Transkripte und der 18 S und 23 S rRNA sind angegeben (rechts).

ERGEBNISSE

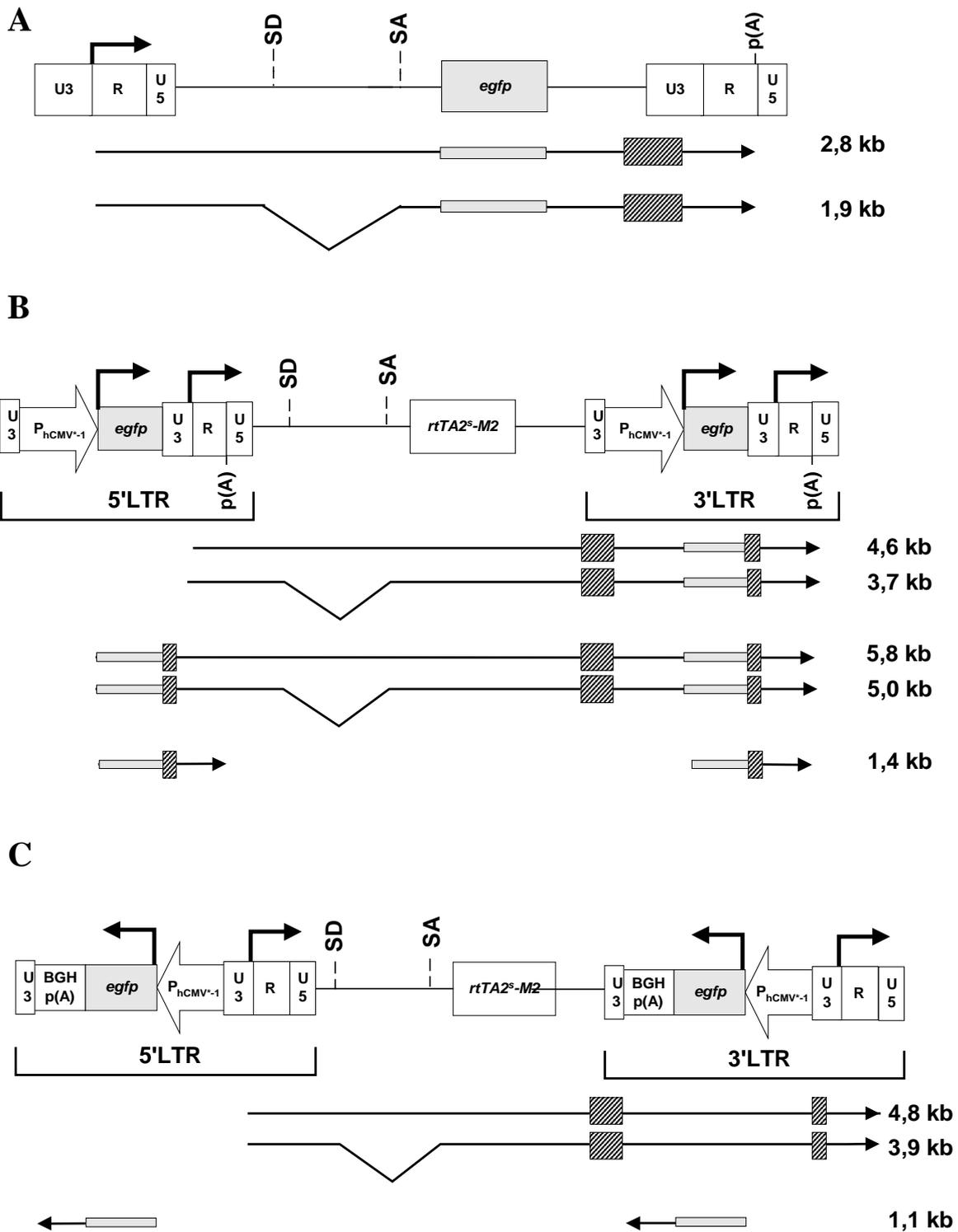


Abbildung 31: Schematische Darstellung retroviraler Vektoren als Provirus und deren mögliche mRNA Transkripte

A: Das Plasmid pBulletEGFP; B: Das Plasmid pBulletARTSEGFP; C: Das Plasmid pBulletARTAS-2EGFP. Der Transkriptionsstart der Promotoren im Provirus und die Transkriptionsrichtung der mRNA sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Größe der Transkripte in Kilobasen (kb) ist eingezeichnet. Graue Felder auf den Transkripten kennzeichnen die Homologie zu der verwendeten *egfp*-spezifischen Sonde in der Northern Blot-Analyse, schraffierte Felder die Homologie zu der verwendeten U3-spezifischen Sonde. LTR: *long terminal repeat*; U3, R, U5: Regionen der LTR; SD und SA: Spleißdonor bzw. -akzeptor; p(A): Polyadenylierungssignal; *egfp*: *enhanced green fluorescent protein*; *rtTA2^S-M2*: Sequenz des reversen Transaktivators *rtTA2^S-M2*; P_{hCMV⁺-1}: Tet-responsiver Promotor; BGH p(A): Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons.

5 DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen anhand des Reportergens *nlslacZ* den effizienten Gentransfer in primäre Chondrozyten des Kaninchens mittels konstitutiv exprimierender retroviraler Vektoren. Dabei wurde ohne den Einsatz zusätzlicher Selektionsverfahren durch Verwendung VSV.G-pseudotypisierter Retroviren eine Transduktionseffizienz von bis zu 99 % erreicht. Die Stabilität des Gentransfers bzw. der Genexpression wurde in Langzeitkultur *in vitro* und im Kaninchenmodell nach autologer Zelltransplantation belegt. Erfolgreicher retroviraler Gentransfer wurde zudem durch Transfer der cDNA des Wachstumsfaktors *hbmp-2* *in vitro* bestätigt.

Des Weiteren wurde ein neuer retroviraler Vektor entwickelt, welcher für die Konstruktion von Double-copy-Vektoren geeignet ist. Auf diesem Vektor basierende retrovirale Vektoren für Tetrazyklin-induzierbare Genexpression zeigten *in vitro* eine unzulängliche Regulierbarkeit im Sinne von starker *leakiness* und schwacher Induzierbarkeit der Transgenexpression. Eine Verwendung dieser Vektoren *in vivo* erschien deshalb nicht gerechtfertigt.

5.1 Diskussion des Gentransfers in primäre Kaninchenchondrozyten

In der Vergangenheit entwickelte sich ein gesteigertes Interesse an gentherapeutischen Ansätzen für die Unterstützung der Heilung von Knorpeldefekten (HANNALLAH et al., 2002; LIEBERMAN et al., 2002b). Die Kombination von Chondrozytentransplantation mit stabilem Gentransfer durch retrovirale Vektoren stellt in diesem Zusammenhang eine mögliche Strategie dar. Im Rahmen von therapeutischen Ansätzen könnten Zytokine transferiert werden, um die Bildung von Knorpelgewebe zu untersuchen und zu fördern. Durch den stabilen Transfer von Markergenen ist es möglich, Verbleib und Vitalität der Zelltransplantate *in vivo* zu verfolgen. Bisherige Arbeiten von anderen Arbeitsgruppen sind entweder von der Durchführung (Einsatz zusätzlicher Selektion transduzierter Chondrozyten) oder der erreichten Transduktionseffizienz unzureichend. In anderen Arbeiten werden die verwendeten Viren nur ungenau beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb unterschiedliche Methoden des retroviralen Gentransfers untersucht. Es wurden stabile Viruszelllinien hergestellt, die Retroviren mit amphotropem Wirtsspektrum bilden und VSV.G-pseudotypisierte Retroviren durch transiente Transfektion. Es konnte gezeigt werden, dass durch VSV.G-pseudotypisierte Retroviren im Vergleich zu Viren mit amphotropem Wirtsspektrum eine weit effizientere Transduktion primärer Kaninchenchondrozyten erreicht wird. Die Effizienz dieses Gentransfers erlaubte die

DISKUSSION

weitere Verwendung der transduzierten Zellen für eine Zelltransplantation in osteochondrale Defekte ohne weitere Selektion. Die retrovirale Transduktion primärer Kaninchenchondrozyten wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (KANG et al., 1997; ADACHI et al., 2002; HIRSCHMANN et al., 2002). Sowohl KANG und Mitarbeiter (1997) als auch HIRSCHMANN und Mitarbeiter (2002) verwenden zusätzliche Selektionsverfahren im Anschluss an die retrovirale Transduktion. KANG und Mitarbeiter verwenden ein auf dem BAG Vektor (PRICE et al., 1987) basierendes Retrovirus, welches das *lacZ* Gen und das Gen der Neomycin-Resistenz (*neo^R*) trägt. Virushülle bzw. Wirtsspektrum des Virus werden nicht näher definiert, die verwendeten Virusüberstände haben einen Titer von 1×10^6 cfu/ml. Die Selektion mit G418 (Selektion *neo^R*-exprimierender Zellen) führt dabei zu einer Chondrozytenpopulation, welche lediglich zu 80 % das *lacZ* Gen exprimiert. Dieses Ergebnis zeigt einen wichtigen Nachteil eines solchen Verfahrens: Die Selektion von Zellen in denen nur das Resistenzgen exprimiert wird, das Reportergen oder therapeutische Gen dagegen nicht (EMERMAN und TEMIN, 1984). Hinzu kommt, dass eine derartige Selektion zusätzliche Zeit braucht (etwa 7 bis 10 Tage), was für primäre Zellen, die zudem noch *in vivo* verwendet werden sollen, von Nachteil ist. Die zusätzliche Transduktion mit dem *neo^R* Gen birgt zudem den Nachteil, dass dieser Selektionsmarker als Xenogen zu einer Immunreaktion *in vivo* führen kann. HIRSCHMANN und Mitarbeiter (2002) demonstrieren die Markierung primärer Chondrozyten verschiedener Spezies mit dem Reportergen *egfp*. Dabei werden Viren mit drei verschiedenen Infektionsspektren getestet: Amphotrop, GALV und 10A1. GALV-pseudotypisierte Viren erzielen dabei die besten Ergebnisse (Transduktion von Kaninchenchondrozyten zu 56 %). Chondrozyten dieser Spezies werden durch amphotrope Viren nur zu maximal 19 % transduziert, eine Effizienz, die mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist. Populationen mit > 98 % markierten Zellen werden nach anfänglicher Transduktionseffizienz von maximal 56 % (Retrovirus mit GALV-Infektionsspektrum) durch FACS-Sortierung *egfp*-exprimierender Zellen erreicht. Diese Methode hat die wichtige Einschränkung, dass sie nur für mittels FACS-Analyse detektierbare Transgene verwendbar ist. Ein weiterer Nachteil ist der mit einer FACS-Sortierung verbundene Verlust von Zellen. ADACHI und Mitarbeiter (2002) untersuchen in ihrer Arbeit die Möglichkeit des retroviralen Gentransfers in primäre Muskelzellen des Kaninchens. Primäre Chondrozyten dienen in dieser Studie lediglich als Vergleichskontrolle. Diese Arbeitsgruppe erreicht eine mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbare Transduktionseffizienz primärer Kaninchenchondrozyten von $93,4 \pm 3,4$ %. Da das verwendete Zellsystem für die Virusherstellung nicht beschrieben wird ist eine Aussage über

DISKUSSION

die verwendete Virushülle und das damit verbundene Infektionsspektrum nicht möglich.

Die Verwendung transienter Transfektionssysteme bietet den Vorteil, innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeit (eine Woche) virale Überstände mit für Retroviren hohen Titern zu generieren. Transiente retrovirale Expressionssysteme sind so konstruiert, dass die Bildung rekombinanter replikationskompetenter Viren praktisch unmöglich ist und bisher nicht nachgewiesen werden konnte (YEE et al., 1994; SONEOKA et al., 1995; ROMANO et al., 2000). Das von WEJTENS und Mitarbeitern (1998) beschriebene Vektorsystem für die transiente Transfektion von 293T Zellen für die Herstellung retroviraler Überstände wurde dahingehend modifiziert, dass anstelle des GALV-Hüllproteins VSV.G als Virushülle eingesetzt wurde. In der Literatur sind transient hergestellte VSV.G-pseudotypisierte Überstände mit Titern von $4,6 \times 10^6$ IP/ml (PEAR et al., 1993) bis zu $\sim 10^7$ IP/ml (SONEOKA et al., 1995; YANG et al., 1999) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Virustiter waren teilweise deutlich niedriger, wobei frische Überstände den höchsten Titer zeigten. Die Abnahme des Virustiters durch Kryokonservierung um etwa 50 % ist dagegen bekannt (PEAR, 2001). Da die Transduktionseffizienz unter anderem von dem Virustiter abhängig ist, was auch durch die gezeigten Daten belegt wird, sollten für eine optimale Transduktionseffizienz daher in erster Linie frische Überstände verwendet werden.

HIRSCHMANN und Mitarbeiter (2002) beobachteten zudem einen Einfluss der Passagenzahl auf die Transduktionseffizienz primärer Chondrozyten. Durch die Transduktion zu ähnlichem Zeitpunkt nach der Zellisolation wurde dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit weitgehend ausgeschlossen. Trotzdem beobachtete Unterschiede der Transduktionseffizienz bei der Verwendung der gleichen viralen Überstände sind daher auf andere Ursachen zurückzuführen. So könnten trotz der Verwendung von Inzucht-Spendertieren individuelle Unterschiede im Proliferationsverhalten der Chondrozyten bestehen. Da für den erfolgreichen retroviralen Gentransfer Zellteilung unbedingte Voraussetzung ist (MILLER et al., 1990), lassen sich gut proliferierende Zellpopulationen besser infizieren.

Vor allem *in vivo* wird nach retroviralem Gentransfer die Transgenexpression häufig mit der Zeit abgeschaltet (sogenanntes *silencing*), wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist (PANNELL und ELLIS, 2001). Vor allem nicht-klonale Zellpopulationen mit heterologer Transgenexpression sind davon betroffen. Es konnte gezeigt werden, dass das Markergen *nlslacZ* auch 12 Wochen nach Transduktion zu einem hohen Prozentsatz exprimiert wird, obwohl ein chronologischer Abfall des Anteils *lacZ*-positiver Zellen zu verzeichnen war. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen von ADACHI und Mitarbeitern (2002), die über einen Beobachtungszeitraum von vier Wochen einen ähnlichen Verlauf verzeichnen.

DISKUSSION

Die nach FACS-Sortierung homolog *egfp*-positiven Chondrozyten der Arbeitsgruppe von HIRSCHMANN (2002) bleiben dagegen auch über einen Zeitraum von acht Monaten stabil, ein Hinweis auf das Vorhandensein stabiler Zellpopulationen nach retroviraler Transduktion. Das Phänomen des *silencing* wird auch *in vivo* von KANG und Mitarbeitern (1997) bei retroviral transduzierten Chondrozyten beobachtet, der beobachtete Zeitraum erstreckt sich dabei über vier Wochen. HIRSCHMANN und Mitarbeiter (2002) weisen nur eine anhaltende Transgenexpression über ebenfalls vier Wochen nach, ohne eine Aussage über eine Änderung im Anteil exprimierender Zellen zu treffen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Markergen *nslacZ* bietet die Möglichkeit, die *In-vivo*-Expression des Markergens durch X-Gal-Färbung des fixierten Gewebes nachzuweisen. Nach Anfertigung histologischer Präparate ist die Transgenexpression als blauer Farbniederschlag in den Zellen nachweisbar. Die Stabilität dieses Niederschlages erlaubt es, diesen Nachweis auch für histologische Präparate von Gelenken zu verwenden, die zuvor über einen Zeitraum von drei Wochen entkalkt worden sind. Nach Anfertigung von histologischen Schnitten konnte in den Präparaten von 5 von 6 Tieren, die drei Wochen zuvor *nslacZ*-markierte Zellen implantiert bekommen hatten, X-Gal-positive Zellen detektiert werden (vgl. Abbildung 15 C und D). Dadurch wurde im Sinne eines „*proof of principle*“ nachgewiesen, dass zumindest bis zu diesem Zeitpunkt das Transgen exprimiert wurde. X-Gal-positive Zellen waren nur in den äußeren Schichten des Defektes zu erkennen. Diese Beobachtung kann verschiedene Ursachen haben: 1) Verlust der Transgenexpression in tieferen Zellschichten, 2) Verdrängung der transduzierten Chondrozyten durch einwandernde mesenchymale Zellen, 3) Tod der transduzierten Zellen aufgrund einer zytotoxischen Immunantwort ausgelöst durch das Reporterprotein, 4) Transplantationsbedingter Tod dieser Zellen, 5) programmierter Zelltod oder 6) technische Probleme (unzureichende Inkubation der tieferen Gelenkschichten mit X-Gal-Färbelösung). Die gezeigten Daten lassen keine Bestimmung der Ursache zu. Es ist jedoch anzunehmen, dass die unter Punkt 6) genannten technischen Probleme zumindest partiell beteiligt sind. Aufgrund der morphologischen Struktur des Gelenkes kann die wässrige X-Gal-Färbelösung bei der Färbung des Gewebeblockes nur in die oberen Schichten des Gelenkpräparates eindringen. Dadurch ist der Nachweis der *lacZ*-Expression nicht im gesamten Bereich des implantierten Kollagenschwammes möglich. Aus den gleichen Gründen konnte keine Aussage über den prozentualen Anteil X-Gal-positiver Zellen im Defektbereich getroffen werden. Der Umstand, dass in den X-Gal-positiven Zellen der blaue Farbniederschlag nicht auf die Zellkerne beschränkt war (dies wäre bei der Verwendung der cDNA von *nslacZ* zu erwarten), ist wahrscheinlich ebenfalls ein technisches Problem. Bei

der Fixierung der Präparate wurde eine Formalinlösung ohne Zusatz von Glutaraldehyd verwendet. Dies kann unter Umständen zu einer nicht ausreichenden Fixation des Gewebes führen, was einen Austritt des Enzyms β -Galaktosidase aus dem Kern und der Zelle bewirken kann (MA et al., 2002).

Der retrovirale Gentransfer eines therapeutischen Transgens wurde beispielhaft mit der cDNA des *hbmp-2* durchgeführt und *in vitro* überprüft. Eine Transduktion von HT-1080 Zellen und von verschiedenen Chondrozyten führte in allen Fällen zu messbaren BMP-2 Konzentrationen im Zellüberstand, während im Überstand nicht-transduzierter Zellen in keinem Fall BMP-2 nachgewiesen werden konnte. Dadurch wird belegt, dass retroviraler Gentransfer geeignet ist, diesen Wachstumsfaktor in Chondrozyten des Kaninchens zu exprimieren. Ein Vergleich der BMP-2 Konzentration im Zellüberstand mit den Daten nach Gentransfer von anderen Gruppen ist nicht möglich, da in der Regel andere Protokolle für die Gewinnung derartiger Überstände verwendet werden. Die in der vorliegenden Arbeit erreichten BMP-2 Konzentrationen lagen in einem Bereich, der mit den Konzentrationen an rekombinantem Protein vergleichbar ist, die von MARTIN et al., 2001 und GOOCH et al., 2002 in der Zellkultur verwendet werden. Diese beiden Arbeitsgruppen können einen biologischen Effekt des Wachstumsfaktors belegen. Es ist daher anzunehmen, dass die durch retroviralen Gentransfer erzielten Konzentrationen ebenfalls ausreichend sind. Der retrovirale Gentransfer des Wachstumsfaktors konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit belegt werden. In nachfolgenden Untersuchungen müssen die biologischen Funktionalität des Proteins und dessen therapeutische Wirkung untersucht werden.

5.2 Diskussion der Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren

Für die Entwicklung eines Ein-Vektor-Systems für regulierbare Genexpression wurde das Tet-On-System gewählt, da in dem vorliegenden Versuchsmodell die Expression des therapeutischen Transgens nur für einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum (die Zeit bis zur Heilung des osteochondralen Defektes) benötigt wird und in diesem Fall dieses System besser praktikabel ist als das Tet-Off-System.

Das Tet-On-System besteht aus zwei regulatorischen Einheiten: Zum einen aus dem reversen Transaktivator und zum anderen aus dem Tet-responsive Promotor (P_{hCMV*1}) durch welchen das Transgen exprimiert wird. Die Regulation der Transgenexpression ist dabei von einem Antibiotikum der Tetrazyklin-Familie abhängig. Für eine regulierbare Genexpression müssen beide Komponenten in einer Zelle vorhanden sein. Das ursprünglich von GOSSSEN und BUJARD entwickelte System basiert auf der nicht-viralen Transfektion dieser Komponenten

auf zwei getrennten Plasmiden. Obwohl mit dieser Methode gute Erfolge erzielt werden, ist es für verschiedene Anwendungen von Vorteil, dieses System in virale Vektoren (v. a. Adenovirus und Retrovirus, darunter MLV und lentivirale Vektoren) zu integrieren, um den effizienten Transfer zu vereinfachen. Adenovirale Vektoren sind zum Beispiel ein geeignetes Mittel für die effiziente transiente Expression von Transgenen und sind sowohl für den *In-vitro*- als auch den *In-vivo*-Gentransfer geeignet. Die Verwendung retroviraler Vektoren bietet dagegen den Vorteil, das System stabil in Zellen zu transferieren. Retroviren sind zudem in der Lage, ein breites Spektrum primärer Zellen zu infizieren, die mit nicht-viralen Methoden nur schwer transfizierbar sind.

Die Entwicklung von Ein-Vektor-Systemen soll die Verwendung des Systems zusätzlich vereinfachen. Auf MLV-basierende Ein-Vektor-Systeme für das Tet-Off-System werden bisher nur von HOFFMANN und Mitarbeitern (1996) und PAULUS und Mitarbeitern (1996) beschrieben. Die Entwicklung eines Ein-Vektor-Systems für den Transfer des Tet-On-Systems wird nur von PAULUS und Mitarbeitern (2000) beschrieben. HOFFMANN und Mitarbeiter (1996) und HWANG und Mitarbeiter (1996) verwenden für Tetrazyklin-regulierbare Vektoren auf MLV-basierende SIN-Vektoren, um einen störenden Einfluss der viralen Promotor- und Enhancersequenzen auf die Regulation des Systems zu vermeiden. PAULUS und Mitarbeiter (1996 und 2000) verwenden retrovirale Vektoren mit vollständiger U3 Region und erzielen unter Verwendung des Tet-Off-Systems (Transaktivator tTA) eine zuverlässige Regulation, während das Tet-On-System (reverser Transaktivator der ersten Generation, rtTA) eine schlechtere Regulation zeigt. Der von URLINGER und Mitarbeitern (2000) entwickelte reverse Transaktivator der zweiten Generation, rtTA2^S-M2, zeigt eine insgesamt bessere Regulation als rtTA und ist damit vielversprechend für die Verwendung in retroviralen Vektorsystemen. In der vorliegenden Arbeit wurden wie bei PAULUS und Mitarbeitern (2000) Vektoren mit intakter U3 Region für die Konstruktion eines Tetrazyklin-regulierbaren Vektors verwendet. SIN-Vektoren sind bekannt dafür, verhältnismäßig niedrige virale Titer zu bilden. Aus diesem Grund wurde von diesem Ansatz Abstand genommen, da die Nachteile des niedrigen Titers (niedrige Transduktionsraten) den Einsatz regulierbarer Vektoren einschränken würden. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass VSV.G pseudotypisierte Retroviren die Möglichkeit bieten, den viralen Titer mittels Ultrazentrifugation zu verbessern, wodurch dieser Nachteil gemindert wird (YEE et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedlich aufgebaute retrovirale Vektoren entwickelt, die beide regulatorischen Einheiten des Tet-On-Systems (GOSSEN und BUJARD,

DISKUSSION

1992; URLINGER et al., 2000) enthalten. Beide Vektoren basierten auf dem Prinzip eines Double-copy-Vektors, eine Strategie die auch von PAULUS und Mitarbeitern (1996 und 2000) und HWANG und Mitarbeitern (1996) gewählt wird. Dafür wurde zunächst der Vektor pBullet derart modifiziert, dass zusätzlich zu der MCS zwischen den LTRs eine zusätzliche Schnittstelle in der U3 Region der 3'LTR existiert (Vektor pBulletA, Abbildung 19). Die neue Schnittstelle liegt aufwärts, d. h. in 5'-Richtung der viralen Promotor- und Enhancersequenzen der U3 Region. An dieser Stelle platzierte Inserts werden daher nicht durch den viralen Promotor exprimiert. Deshalb war es notwendig, hier einen zusätzlichen Promotor zu verwenden um eine eigene Transkription zu erzielen. Im Verlauf der reversen Transkription während der Infektion einer Zelle dient die U3 Region der 3'LTR als Vorlage für die Bildung der U3 Region der proviralen 5'LTR. Auf diese Weise werden in diesem Bereich platzierte DNA Sequenzen im Verlauf der retroviralen Infektion verdoppelt und in zweifacher Kopie mit dem viralen Provirus in das zelluläre Genom integriert. Wie bei HANTZOPOULOS und Mitarbeitern (1989) beschrieben, wird hierdurch eine erhöhte Transgenexpression erzielt. Um diesen Effekt zu nutzen, wurde der Tet-responsive Promotor mit dem Transgen (hier *nlslacZ* oder *egfp*) an diese Position kloniert. Basierend auf pBulletA wurden die beiden Vektoren pBulletARTS und pBulletARTAS-2 kloniert (Abbildung 20 B und C). Während im Vektor pBulletARTS der Tet-responsive Promotor für die Tetrazyklin-regulierbare Expression eines Transgens in *sense*-Orientierung (also 5'→3' Richtung) eingefügt wurde, ist dieser in pBulletARTAS-2 in *antisense*-Orientierung im Vektor enthalten. Der Vektor pBulletARTAS-2 nutzt damit den Effekt der sogenannten *antisense inhibition*. Die mRNA Transkripte des viralen Promotors der 5'LTR sollten in einer solchen Anordnung nicht nur der Expression des reversen Transaktivators dienen, sondern auch durch Bindung der *antisense* Transkripte des P_{hcmv*-1} infolge homologer Rekombination zu einer verringerten Expression des Transgens führen. Dadurch sollte vor allem die Höhe der Transgenexpression im nicht-induzierten Zustand, d. h. die *leakiness* des integrierten Vektors reduziert werden. *Antisense inhibition* kann unter Umständen auch einen störenden Einfluss auf den erzielten Virustiter haben, da durch diese nicht nur die Transgenexpression verringert wird, sondern auch weniger virale mRNA entsteht, die als virales Genom verpackt werden kann. Dieses Problem stellt sich bei dem Vektor pBulletARTS nicht, wobei die Anordnung in *sense*-Orientierung zu einer stärkeren *leakiness* führen kann. Unter Verwendung des Reportergens *egfp* und z. T. *nlslacZ* wurden diese Vektoren in verschiedenen Zellen getestet.

Es zeigte sich, dass keiner der beiden Vektoren eine zuverlässige Kontrolle der Transgenexpression zulassen. Dabei ist insbesondere hervorzuheben, dass beide Vektortypen

DISKUSSION

eine starke *leakiness*, aufwiesen. *Leakiness*, die Transgenexpression im nicht-induzierten Zustand, ist ein bekanntes Problem des Tetrazyklin-regulierbaren Systems für das verschieden Ursachen möglich sind (SAEZ et al., 1997; BARON und BUJARD, 2000; CORBEL und ROSSI, 2002). Da in allen Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht-klonale Zellpopulationen analysiert wurden, sind die von PAULUS und Mitarbeitern (2000) diskutierten klonalen Effekte nicht als Ursache anzusehen. Klonale Effekte bezeichnen in diesem Fall die unterschiedlichen Expressionsmuster in verschiedenen Zellklonen aufgrund unterschiedlicher Integrationsstellen des Vektors im Chromatin. Es scheint sich vielmehr um ein generelles Problem der konstruierten Vektoren zu handeln. Als denkbare Ursachen kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht: Zum einen ist in der Literatur eine gewisse Autoaktivität des Tet-responsive Promotors beschrieben, d. h. eine vom Transaktivator oder reversen Transaktivator unabhängige Expression (GOSSEN und BUJARD, 2002). Zum anderen ist die Aktivierung des Tet-responsive Promotors durch die starken Promotor- und Enhancersequenzen der U3 Region auch in Abwesenheit von Doxyzyklin denkbar. Eine Aktivierung des Tet-responsive Promotors durch die Bindung des reversen Transaktivators rtTA2^S-M2 in Abwesenheit von Dox ist eher unwahrscheinlich, da die Zuverlässigkeit dieses reversen Transaktivators in verschiedene Studien belegt wird und als Ursachenquelle daher auszuschließen ist (URLINGER et al., 2000; LAMARTINA et al., 2002; KOPONEN et al., 2003, LAMARTINA et al., 2003).

Zusätzlich zu der *leakiness* wurde bei beiden Vektorkonstruktionen eine nur geringe Induktion der Transgenexpression nach Zugabe von Doxyzyklin beobachtet. Die Induktionsfähigkeit zeigte aber gewisse Unterschiede: In allen drei getesteten Zelllinien (HT-1080, NIH 3T3 und 293T) zeigten Viren des Vektors pBulletARTAS-2EGFP einen höheren Induktionsfaktor als Viren des Plasmids pBulletARTSEGFP. Damit bestätigte sich die zuvor geäußerte Annahme, dass die Anordnung des Tet-responsive Promotors in *antisense*-Orientierung zu einer besseren Regulation führt. Außerdem wurde die Induzierbarkeit von der verwendeten Zelllinie beeinflusst. Beide Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren zeigten in HT-1080 Zellen im Vergleich zu NIH 3T3 und 293T Zellen die schlechteste Induktion. Viren des Plasmids pBulletARTSEGFP zeigten in dieser Zelllinie mit einem Induktionsfaktor von $1,04 \pm 0,03$ so gut wie keine Induktion der Transgenexpression. Es wird von verschiedenen Seiten beschrieben, dass der Zelltyp Einfluss auf die Regulierbarkeit Tetrazyklin-regulierbarer Systeme (sowohl Tet-On als auch Tet-Off) haben kann (ACKLAND-BERGLUND und LEIB, 1995; HOWE et al., 1995; PAULUS et al., 1996; BARON und BUJARD, 2000). Eine gute Regulation des Tet-Off-Systems in einem retroviralen Vektor in NIH 3T3 Zellen wird schon

in der Arbeit von PAULUS et al., 1996 gezeigt. Über die Regulierbarkeit des Tet-On-Systems in HT-1080 und 293T Zellen konnte dagegen in der Literatur keine Informationen gewonnen werden.

Die Bewertung von *leakiness* und Induktion wurde durch die Verwendung des Reportergens *egfp* zusätzlich erschwert. Dieses Reporter gen ist für die Analyse der Transgenexpression in regulierbaren Systemen nicht optimal. *egfp* hat zwar den Vorteil der einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit in einzelnen Zellen, die verhältnismäßig lange Halbwertszeit von 24 h führt aber dazu, dass das gebildete Protein in der Zelle akkumuliert. Infolgedessen führt schon geringe *leakiness* des Tet-responsive Promotors zu einem deutlichen Signal. Änderungen in der Expressionskinetik lassen sich ebenfalls nur schwer nachweisen. Eine mögliche Alternative ist die Verwendung der destabilisierten EGFP Variante dEGFP mit einer Halbwertszeit von nur 2 h (LI et al., 1998). Für die Evaluierung induzierbarer Systeme eignet sich auch das Reporter gen Luziferase. Dieses verfügt über eine kurze Halbwertszeit und ist darum gut geeignet die Expressionsänderungen in solchen Systemen zu verfolgen. Ein Nachteil dabei ist allerdings, dass die Analyse der Transgenexpression nicht in einzelnen Zellen verfolgt werden kann, da immer Zellpopulationen als Ganzes gemessen werden (FONTES et al., 1997).

Eine weitere Limitation der im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren lag in der vergleichsweise geringen Transduktionseffizienz der verwendeten retroviralen Überstände, was wahrscheinlich auf eine Reduktion des viralen Titers zurückzuführen war. Dies wurde durch die Verwendung „großer“ Transgene, wie z. B. *nls lacZ* noch verstärkt, wodurch der Einsatz dieser Vektoren noch weiter beschränkt ist. Anscheinend wurde bei der Verwendung des Reporter gens *nslacZ* (mit einer Länge von 3,5 kb) eine Größe der viralen mRNA erreicht, welche für die Verpackung in Viruspartikel kritisch ist. Retroviren verfügen über ein begrenztes Verpackungsvolumen für virale mRNA, welches im Bereich der Genomgröße des wildtyp Virus (etwa 8,3 kb) liegt. Bei lentiviralen Vektoren ist eine logarithmische Abnahme des Virustiters mit steigender Vektorlänge beschrieben (KUMAR et al., 2001). *egfp* führt mit einer Größe von etwa 750 bp zu der Bildung kleinerer viraler mRNAs, deren Größe die Verpackung nicht behindern sollte. Die Transduktionsraten der Vektoren pBulletARTSEGFP und pBulletARTAS-2EGFP waren dementsprechend deutlich verbessert. Die im Vergleich zu den zuvor beschriebenen konstitutiven Vektoren erreichten Effizienzen waren aber immer noch deutlich geringer. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von PAULUS und Mitarbeitern (1996), die über einen 10fach niedrigeren viralen Titer mit Double-copy-Vektoren im Vergleich zu Single-copy-

Vektoren berichten. HANTZOPOULOS und Mitarbeiter (1989) beobachteten ebenfalls einen leicht niedrigeren viralen Titer mit Double-copy-Vektoren im Vergleich zu Single-copy-Vektoren.

Eine Bestätigung der Theorie, dass die Vektorkonstruktion durch die Insertion des Tet-responsive Promotors in *sense*- oder *antisense*-Orientierung auf den Virustiter Einfluss haben könnte, scheint sich zu bestätigen: Die gezeigten Transduktionseffizienzen mit Viren des Plasmids pBulletARTAS-2EGFP waren in der Regel geringer als mit Viren des Plasmids pBulletARTSEGFP. Beide Vektorkonstrukte verfügten über kein eukaryotisches Resistenzgen. Dies hat den Vorteil, dass die Vektoren dadurch einfacher aufgebaut sind, da eine Gensequenz gespart wird. Außerdem wird vermieden, dass durch die Expression der Resistenzproteine *in vivo* eine verstärkte Antigenität der transduzierten Zellen entsteht. Ein Nachteil einer Strategie ohne Resistenzgen ist allerdings, dass die Titration von Virusüberständen erschwert oder unmöglich wird, wenn für die Bestimmung der Transduktionseffizienz kein in einzelnen Zellen detektierbares Transgen (z. B. *lacZ*) im Vektor enthalten ist. Eine Selektion transduzierter Zellen wird außerdem erschwert.

Nach Integration des Provirus in das zelluläre Genom entstehen unterschiedliche mRNA Transkripte. Länge und Anzahl sind dabei abhängig von den enthaltenden Promotoren und vom Vorhandensein funktioneller Spleißdonor und -akzeptorstellen (vgl. Kapitel 2.3.3). Das Provirus von pBulletARTSEGFP und von pBulletARTAS-2EGFP verfügt über zwei unterschiedliche Promotoren: Zum einen über den viralen Promoter der U3 Region (aktiv in der 5'LTR) und zum anderen über den Tet-responsive Promotor. Letzterer sollte dabei eine Tetrazyklin-abhängige Aktivität zeigen. Dadurch, dass die beiden Vektoren nach dem Prinzip von Double-copy-Vektoren konstruiert wurden, wird der im Plasmid nur in der U3 Region der 3'LTR lokalisierte Tet-responsive Promotor im Zuge der reversen Transkription dupliziert. Im Provirus ist er infolgedessen sowohl in der U3 Region der 5'LTR, als auch in der U3 Region der 3'LTR vorhanden. Außerdem ist ein Spleißdonor- und -akzeptor im viralen Backbone zwischen den LTRs vorhanden (vgl. Abbildung 31 B und C). Es konnte gezeigt werden, dass der virale LTR Promotor nur schwach aktiv ist, während der Tet-responsive Promotor eine starke Aktivität aufweist.

Dieses Ergebnis zeigt, dass wie schon bei HANTZOPOULOS et al., 1989 beschrieben, die Expression durch den viralen Promotor der U3 Region durch den unmittelbar benachbarten starken Tet-responsive Promotor reduziert wird. Die generelle Funktionalität der Spleißdonor- und -akzeptorstelle wurde dabei Anhand des Plasmids pBulletEGFP überprüft. Das beobachtete stärkere Signal für die gespleißte mRNA steht in Einklang mit den

Beobachtungen von KRALL und KOHN, 1996 für den Vektor pMFG. Die nur schwachen gespleißten mRNA Transkripte sind ebenfalls durch dieses Phänomen zu erklären. Transkripte, die das virale p(A)-Signal der 5'LTR durchlaufen, wie bei dem Provirus von pBulletARTSEGFP beobachtet, sind ebenfalls von HANTZOPOULOS et al., beschrieben worden und sind dadurch zu erklären, dass das Mo-MLV p(A)-Signal vergleichsweise schwach ist (FURGER et al., 2001; ZAISS et al., 2002).

5.3 Ausblick

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch das vorgestellte Vektorsystem ein effizienter Gentransfer in primäre Kaninchenchondrozyten möglich ist, sollte für weitere Anwendungen nachgeprüft werden, ob auch mit den Chondrozyten anderer Tierspezies und mit humanen Chondrozyten ähnliche Ergebnisse erzielt werden können. Da VSV.G für eine Zellinfektion mit weit verbreiteten Phospholipid-Komponenten der Zellmembran interagiert, zeigen VSV.G-pseudotypisierte Viren ein breites Spektrum infizierbarer Zelltypen (ARAI et al., 1999; LEE et al., 2001), darunter auch solche, die sich mit den herkömmlichen retroviralen Vektoren nicht oder nur schwer transduzieren lassen (EMI et al., 1991). Nachdem der retrovirale Gentransfer in Kaninchenchondrozyten mit hoher Effizienz durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass derart umhüllte Viren auch Chondrozyten anderer Spezies transduzieren können.

Vor dem Hintergrund der schweren Nebenwirkungen der retroviralen Gentherapie zur Behandlung der SCID steht die Weiterentwicklung des retroviralem Gentransfers in Bezug auf die Sicherheit im Vordergrund. Um eine Aktivierung benachbarter Gene zu vermeiden, können verschiedene Strategien verfolgt werden. Einige Beispiele sollen im Folgenden genannt werden: 1) Die Weiterentwicklung retroviraler SIN-Vektoren, die die negativen Einflüsse der viralen Enhancer- und Promotorsequenzen auf umliegendes zelluläres Chromatin vermeiden, 2) die Verwendung so genannter Insulator-Sequenzen (PANNELL und ELLIS, 2001), 3) die Modifikation des viralen poly(A)-Signals, um fortlaufende Transkription zellulärer Gene durch die Vektorpromotoren zu verhindern und 4) die Verwendung starker Spleißakzeptorsequenzen im Vektor, um die Interaktion des viralen Spleißdonors mit abwärtsgelegenen zellulären Sequenzen zu vermeiden.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Vektoren mit konstitutiver Genexpression bieten dennoch die Möglichkeit, im Rahmen von Voruntersuchungen therapeutische Transgene *in vitro* und *in vivo* zu testen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Wachstumsfaktor *hbmp-2* steht dabei nur stellvertretend für andere. Für einen therapeutischen Einsatz

DISKUSSION

retroviraler Vektoren ist regulierbare Genexpression für viele Applikationen Voraussetzung. Die Entwicklung induzierbarer retroviraler Vektoren stellt daher nach wie vor eine Aufgabe für die Zukunft dar. Neben dem Einsatz von MLV-retroviralen Vektoren bieten sich dabei auch lentivirale Vektoren an, die den Vorteil haben, auch sich nicht teilende Zellen zu transduzieren. Regulierbare lentivirale Vektoren, die den reversen Transaktivator der zweiten Generation enthalten, sind schon beschrieben (KOPONEN et al., 2003). Bei der Entwicklung neuer Vektorsysteme, egal ob es sich dabei um Ein- oder Zwei-Vektor-Systeme handelt, sollte der Tet-responsive Promotor in einem SIN-Vektor verwendet werden, um den aktivierenden Einfluss der viralen Enhancer- und Promotorsequenzen auf die Regulation zu vermeiden. Es ist weiterhin zu prüfen, ob das seit kurzer Zeit auf dem Markt erhältliche TRE-Element der neuen Generation, TRE-Tight (Fa. BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) zu einer besseren Regulation führt. Bei ungenügender Regulation des Tet-On-Systems im Sinne einer starken *leakiness* ist zudem zu überprüfen, ob der zusätzliche Einsatz des Tetrazyklin-abhängigen *transcriptional silencer* eine Verbesserung bringt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Knorpeldefekte lassen sich nicht zufriedenstellend therapieren, da bis heute ein kontrollierter regenerativer Gewebeaufbau unmöglich war. Eine neue Strategie wäre eine Kombination von Chondrozytentransplantation mit gentherapeutischen Methoden, z. B. die stabile *Ex-vivo*-Transduktion von primären Chondrozyten mit retroviralen Vektoren, die gewebeaufbauende Zytokine exprimieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb Etablierung und Optimierung des retroviralen Gentransfers in primäre Kaninchenchondrozyten und die Beobachtung von Verbleib, Vitalität und Genexpression der Zelltransplantate *in vivo*. Transduzierte Zellen sollten ohne weitere Selektionsverfahren für eine spätere Transplantation verwendet werden können. Da regulierbare Genexpression in einem solchen Modell von Vorteil ist, war ein weiteres Ziel die Entwicklung retroviraler Tet-On-Vektoren.

Es wurden konstitutiv exprimierende retrovirale Vektoren und Tet-On-Vektoren kloniert und Retroviren mit unterschiedlichen Infektionsspektren generiert. Effizienz und Stabilität des Gentransfers wurden ohne weitere Selektionsverfahren mit Hilfe konstitutiv *nlslacZ*-exprimierender retroviraler Vektoren *in vitro* und *in vivo* beurteilt. Zusätzlich wurde stellvertretend für ein therapeutisches Gen der Wachstumsfaktor *hbmp-2* transferiert. Retrovirale Ein-Vektor-Systeme, die den reversen Transaktivator $rtTA2^s$ -M2 und den Tet-responsive Promotor enthielten, wurden *in vitro* durch die Expression der Reportergene *nlslacZ* oder *egfp* in verschiedenen Zelllinien getestet. Mit VSV.G-pseudotypisierten Retroviren konnte eine Transduktionseffizienz von bis zu 99 % erzielt werden, amphotrope Viren waren deutlich weniger effizient. Transduzierte Chondrozyten zeigten *in vitro* über mindestens 12 Wochen eine stabile Transgenexpression, die auch in 3D-Kultur auf Kollagenschwämmen fortbestand. *In vivo* war für mindestens drei Wochen Transgenexpression nachweisbar. *hbmp-2* transduzierte Zellen exprimierten zudem dieses Transgen *in vitro*. Die neu entwickelten Tetrazyklin-induzierbaren Retroviren zeigten eine starke Basalexpression bei nur geringer Steigerung nach Induktion mit Doxyzyklin. Die Transduktionseffizienz dieser Retroviren war wesentlich geringer als bei der Verwendung konstitutiv exprimierender Vektoren. VSV.G-pseudotypisierte Retroviren sind eine optimale Methode für den retroviralen Gentransfer in primäre Kaninchenchondrozyten ohne weitere Selektionsverfahren. Neben dem Transfer von Markergenen ist dies die Grundlage für den Transfer von therapeutischen Genen, um deren Effekt *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Zudem wurde ein neuartiger universal einsetzbarer Vektor entwickelt, der die Klonierung in die retroviralen U3 Region und somit die Konstruktion retroviraler Double-copy-Vektoren erlaubt. Die Entwicklung zuverlässiger retroviraler Tet-On-Vektoren bleibt weiterhin eine Herausforderung für die Zukunft.

7 SUMMARY

Experimental investigation of retroviral gene transfer into primary rabbit chondrocytes: development of constitutive and tetracycline-inducible expression systems

Therapy of chondral defects is not satisfying, until today controlled regenerative tissue forming was not possible. A new strategy would be the combination of chondrocyte transplantation with gene therapeutic methods, e. g. by stable ex vivo transduction of primary chondrocytes with retroviral vectors, expressing tissue forming cytokines. Aim of the present study was therefore the establishment and optimisation of retroviral gene transfer into primary rabbit chondrocytes and examination of fate, vitality and gene expression of transplanted cells in vivo. Transduced cells should be used for transplantation without any further selection. Because of advantage of regulatable gene expression in such a model, another aim was the design of retroviral tet-on-vectors.

Constitutively expressing retroviral vectors and tet-on-vectors were cloned and retroviruses with different host ranges were generated. Efficiency and stability of gene transfer without any further selection were tested using constitutively *nlslacZ* expressing retroviral vectors in vitro and in vivo. Additionally the growth factor *hbmp-2*, representing a therapeutical transgene, was transferred. Retroviral single-vector-systems, containing the reverse transactivator rtTA2^s-M2 and the tet-responsive promotor, were tested in vitro by expression of the reporter genes *nlslacZ* and *egfp* in various cell lines. Using VSV.G pseudotyped retroviruses transduction efficiency of up to 99 % could be achieved, amphotropic retroviruses were apparently less efficient. Transduced chondrocytes showed stable transgene expression in vitro for at least 12 weeks, which also persisted in 3D-culture on collagen sponges. In vivo transgene expression continued for at least three weeks. *hbmp-2* transduced cells further expressed this transgene in vitro. The newly developed tetracycline-inducible-retroviral vectors exhibited a strong basal expression with only little enhancement after induction with doxycycline. Transduction efficiency of these retroviruses was much more lower than with constitutively expressing vectors.

VSV.G pseudotyped retroviruses are an optimal method for retroviral gene transfer in primary rabbit chondrocytes without further selection. Besides the transfer of marker genes this serves as a basis for the transfer of therapeutical transgenes to evaluate their effect in vitro and in vivo. Furthermore a new vector was developed that allows cloning into the retroviral U3 region for the generation of double-copy-vectors. Development of reliable retroviral tet-on vectors is still challenging.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT J, HOLTZER H.

The loss of phenotypic traits by differentiated cells. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures.

J Cell Biol 1966;28:473-87

ACKLAND-BERGLUND CE, LEIB DA.

Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type.

Biotechniques 1995;18:196-200

ADACHI N, SATO K, USAS A, FU FH, OCHI M, HAN CW, NIYIBIZI C, HUARD J.

Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects.

J Rheumatol 2002;29:1920-30

ADAM MA, MILLER AD.

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

J Virol 1988;62:3802-6

ADAM MA, OSBORNE WR, MILLER AD.

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

Hum Gene Ther 1995;6:1169-76

ANDERSON WF, BLAESE RM, CULVER K.

The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to consider response with clinical protocol, July 6, 1990.

Hum Gene Ther 1990;1:331-62

ANDERSON WF.

Human gene therapy.

Nature 1998;392 (6679 Suppl):25-30

ARAI T, TAKADA M, UI M, IBA H.

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

Virology 1999;260:109-15

ARAI Y, KUBO T, FUSHIKI S, MAZDA O, NAKAI H, IWAKI Y, IMANISHI J, HIRASAWA Y.

Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector.

J Rheumatol 2000;27:979-82

LITERATURVERZEICHNIS

BALTIMORE D.

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

BALTZER AW, LATTERMANN C, WHALEN JD, WOOLEY P, WEISS K, GRIMM M,
GHIVIZZANI SC, ROBBINS PD, EVANS CH.

Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by
adenoviral transfer of the BMP-2 gene.
Gene Ther 2000;7:734-9

BARAGI VM, RENKIEWICZ RR, QIU L, BRAMMER D, RILEY JM, SIGLER RE,
FRENKEL SR, AMIN A, ABRAMSON SB, ROESSLER BJ.

Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage
defects in vivo.
Osteoarthritis Cartilage 1997;5:275-82

BARON U, BUJARD H.

Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and
advances.
Methods Enzymol 2000;327:401-21

BARON U, GOSSEN M, BUJARD H.

Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded
transactivation potential.
Nucleic Acids Res 1997;25:2723-9

BAUER TR, MILLER AD, HICKSTEIN DD.

Improved transfer of the leukocyte integrin CD18 subunit into hematopoietic cell lines by
using retroviral vectors having a gibbon ape leukemia virus envelope.
Blood 1995;86:2379-87

BAUM C, DULLMANN J, LI Z, FEHSE B, MEYER J, WILLIAMS DA, VON KALLE C.

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

BENDER MA, PALMER TD, GELINAS RE, MILLER AD.

Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag
region.
J Virol 1987;61:1639-46

BENYA PD, PADILLA SR, NIMNI ME.

Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated
function in culture.
Cell 1978;15:1313-21

LITERATURVERZEICHNIS

BERGER SL, PINA B, SILVERMAN N, MARCUS GA, AGAPITE J, REGIER JL, TRIEZENBERG SJ, GUARENTE L.
Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains.
Cell 1992;70:251-65

BIRNBOIM HC, DOLY J.
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl Acids Res 1979;1:1523-31

BODEN SD, ZDEBLICK TA, SANDHU HS, HEIM SE.
The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report.
Spine 2000;25:376-81

BOHL D, SALVETTI A, MOULLIER P, HEARD JM.
Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector.
Blood 1998;92:1512-7

BOLOGNESI DP, MONTEJARO RC, FRANK H, SCHAFFER W.
Assembly of type C oncornaviruses: a model.
Science 1978;199:183-6

BONAVENTURE J, KADHOM N, COHEN-SOLAL L, NG KH, BOURGUIGNON J, LASSELIN C, FREISINGER P.
Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads.
Exp Cell Res 1994;212:97-104

BONNEROT C, ROCAN COURT D, BRIAND P, GRIMBER G, NICOLAS JF.
A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies.
Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:6795-9

BOSTROM M, LANE JM, TOMIN E, BROWNE M, BERBERIAN W, TUREK T, SMITH J, WOZNEY J, SCHILDHAUER T.
Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model.
Clin Orthop 1996;327:272-82

BOWERMAN B, BROWN PO, BISHOP JM, VARMUS HE.
A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA.
Genes Dev 1989;3:469-78

LITERATURVERZEICHNIS

BRAND K, STRAUSS M.

Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie.

In: GANTEN G, RUCKPAUL K. (Hrsg.), Handbuch der molekularen Medizin, Bd. 2; Springer-Verlag; Berlin; 1998;116

BRITTBERG M, LINDAHL A, NILSSON A, OHLSSON C, ISAKSSON O, PETERSON L.

Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.

N Engl J Med 1994;331:889-95

BRITTBERG M, TALLHEDEN T, SJOGREN-JANSSON B, LINDAHL A, PETERSON L.

Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update.

Clin Orthop 2001;391 Suppl:337-48

BROWER-TOLAND BD, SAXER RA, GOODRICH LR, MI Z, ROBBINS PD, EVANS CH, NIXON AJ.

Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function.

Hum Gene Ther 2001;12:117-29

BUCKWALTER JA, MANKIN HJ.

Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.

Instr Course Lect 1998a;47:477-86

BUCKWALTER JA, MANKIN HJ.

Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.

Instr Course Lect 1998b;47:487-504

BUNNELL BA, METZGER M, BYRNE E, MORGAN RA, DONAHUE RE.

Efficient in vivo marking of primary CD4+ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector.

Blood 1997;89:1987-95

BURNS JC, FRIEDMANN T, DRIEVER W, BURRASCANO M, YEE JK.

Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:8033-7

CARLBERG AL, PUCCI B, RALLAPALLI R, TUAN RS, HALL DJ.

Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2.

Differentiation 2001;67:128-38

CASADABAN MJ, MARTINEZ-ARIAS A, SHAPIRA SK, CHOU J.

Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in escherichia coli and yeast.

Methods Enzymol 1983;100:293-308

LITERATURVERZEICHNIS

CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, GROSS F, YVON E, NUSBAUM P, SELZ F, HUE C, CERTAIN S, CASANOVA JL, BOUSSO P, DEIST FL, FISCHER A.

Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.
Science 2000;288:669-72

CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC.

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

CHECK E.

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

CHEN ST, IIDA A, GUO L, FRIEDMANN T, YEE JK.

Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:10057-62

CHONG H, STARKEY W, VILE RG.

A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences.
J Virol 1998;72:2663-70

CHONG H, VILE RG.

Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line.
Gene Ther 1996;3:624-9

COFFIN J.

Genome Structure

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

COHLAN SQ.

Tetracycline staining of teeth.
Teratology 1977;15:127-9

CONE RD, MULLIGAN RC.

High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range.
Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:6349-53

CONVERY FR, AKESON WH, KEOWN GH.

The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses.
Clin Orthop 1972;82:253-62

CORBEL SY, ROSSI FM.

Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes.

Curr Opin Biotechnol 2002;13:448-52

CORMACK BP, VALDIVIA RH, FALKOW S.

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

Gene 1996;173:33-8

CRYSTAL RG.

Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.

Science 1995;270:404-10

DANOS O, MULLIGAN RC.

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

Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:6460-4

DELOUIS C, MILAN D, L'HARIDON R, GIANQUINTO L, BONNEROT C, NICOLAS JF.

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

Biochem Biophys Res Commun 1990;169:8-14

DINSER R, KREPPPEL F, ZAUCKE F, BLANK C, PAULSSON M, KOCHANNEK S, MAURER P.

Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes.

Histochem Cell Biol 2001;116:69-77

DOHERTY PJ, ZHANG H, TREMBLAY L, MANOLOPOULOS V, MARSHALL KW.

Resurfacing of articular cartilage explants with genetically-modified human chondrocytes in vitro.

Osteoarthritis Cartilage 1998;6:153-9

DOUGHERTY JP, TEMIN HM.

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

Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:1197-201

DUBRIDGE RB, TANG P, HSIA HC, LEONG PM, MILLER JH, CALOS MP.

Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system.

Mol Cell Biol 1987;7:379-87

LITERATURVERZEICHNIS

DUGRAY A, GEAY JF, FOUADI A, BONNET ML, VAINCHENKER W, WENDLING F, LOUACHE F, TURHAN AG.

Rapid generation of a tetracycline-inducible BCR-ABL defective retrovirus using a single autoregulatory retroviral cassette.

Leukemia 2001;15:1658-62

EMERMAN M, TEMIN HM.

Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism.

Cell 1984;39:449-67

EMI N, FRIEDMANN T, YEE JK.

Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus.

J Virol 1991;65:1202-7

EVANS CH, ROBBINS PD.

Possible orthopaedic applications of gene therapy.

J Bone Joint Surg Am 1995;77:1103-14

FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M.

Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.

Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:7413-7

FONTES R, DUKHOVICH A, SILLERO A, SILLERO MA.

Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase: effect of dehydroluciferin, coenzyme A and nucleoside triphosphates on the luminescent reaction.

Biochem Biophys Res Commun 1997;237:445-50

FORG P, VON HOEGEN P, DALEMANS W, SCHIRRMACHER V.

Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination.

Gene Ther 1998;5:789-97

FREUNDLIEB S, SCHIRRA-MULLER C, BUJARD H.

A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells.

J Gene Med 1999;1:4-12

FRISBIE DD, GHIVIZZANI SC, ROBBINS PD, EVANS CH, MCILWRAITH CW.

Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene.

Gene Ther 2002;9:12-20

LITERATURVERZEICHNIS

FURGER A, MONKS J, PROUDFOOT NJ.

The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation.

J Virol 2001;75:11735-46

GALILEO DS, GRAY GE, OWENS GC, MAJORS J, SANES JR.

Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies.

Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:458-62

GERHART TN, KIRKER-HEAD CA, KRIZ MJ, HOLTROP ME, HENNIG GE, HIPPI J, SCHELLING SH, WANG E.

Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein.

Clin Orthop 1993;293:317-26

GIESE M, BAHR U, JAKOB NJ, KEHM R, HANDERMANN M, MULLER H, VAHLENKAMP TH, SPIESS C, SCHNEIDER TH, SCHUSSE G, DARAI G.

Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus.

Virus Genes 2002;25:159-67

GLANSBEEK HL, VAN BEUNINGEN HM, VITTEERS EL, MORRIS EA, VAN DER KRAAN PM, VAN DEN BERG WB.

Bone morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin-1alpha effects on proteoglycan synthesis and content.

Arthritis Rheum 1997;40:1020-8

GOOCH KJ, BLUNK T, COURTER DL, SIEMINSKI AL, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED LE.

Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage.

Tissue Eng 2002;8:591-601

GOOMER RS, DEFTOS LJ, TERKELTAUB R, MARIS T, LEE MC, HARWOOD FL, AMIEL D.

High-efficiency non-viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial cells for ex-vivo gene therapy to repair articular cartilage defects.

Osteoarthritis Cartilage 2001;9:248-56

GOSSEN M, BUJARD H.

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.

Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:5547-51

GOSSEN M, BUJARD H.

Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation.

Annu Rev Genet 2002;36:153-73

LITERATURVERZEICHNIS

GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, MULLER G, HILLEN W, BUJARD H.
Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.
Science 1995;268:1766-9

GRISHAM J.
Inquiry into gene therapy widens.
Nat Biotechnol 2000;18:254-5

HACEIN-BEY-ABINA S, LE DEIST F, CARLIER F, BOUNEAUD C, HUE C, DE
VILLARTAY JP, THRASHER AJ, WULFFRAAT N, SORENSEN R, DUPUIS-GIROD S,
FISCHER A, DAVIES EG, KUIS W, LEIVA L, CAVAZZANA-CALVO M.
Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene
therapy.
N Engl J Med 2002;346:1185-93

HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, LE DEIST F, WULFFRAAT N,
MCINTYRE E, RADFORD I, VILLEVAL JL, FRASER CC, CAVAZZANA-CALVO M,
FISCHER A.
A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined
immunodeficiency.
N Engl J Med 2003;348:255-6

HADJANTONAKIS AK, GERTSENSTEIN M, IKAWA M, OKABE M, NAGY A.
Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells.
Mech Dev 1998;76:79-90

HAMMER RE, PALMITER RD, BRINSTER RL.
Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new
gene.
Nature 1984;311:65-7

HANLON L, ARGYLE D, BAIN D, NICOLSON L, DUNHAM S, GOLDER MC,
MCDONALD M, MCGILLIVRAY C, JARRETT O, NEIL JC, ONIONS DE.
Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with
interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors.
J Virol 2001;75:8424-33

HANNALLAH D, PETERSON B, LIEBERMAN JR, FU FH, HUARD J.
Gene therapy in orthopaedic surgery.
J Bone Joint Surg Am 2002;84-A:1046-1061

HANTZOPOULOS PA, SULLENGER BA, UNGERS G, GILBOA E.
Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the
transcriptional unit of a retroviral vector.
Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:3519-23

LITERATURVERZEICHNIS

HEIM R, CUBITT AB, TSIEN RY.

Improved green fluorescence.

Nature 1995;373:663-4

HILLEN W, BERENS C.

Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance.

Annu Rev Microbiol 1994;48:345-69

HIRSCHMANN F, VERHOEYEN E, WIRTH D, BAUWENS S, HAUSER H, RUDERT M.

Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein.

Osteoarthritis Cartilage 2002;10:109-18

HOERR I, OBST R, RAMMENSEE HG, JUNG G.

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

Eur J Immunol 2000;30:1-7

HOFFMANN A, WEICH HA, GROSS G, HILLMANN G.

Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins.

Appl Microbiol Biotechnol 2001;57:294-308

HOFMANN A, NOLAN GP, BLAU HM.

Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:5185-90

HOGAN BL.

Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.

Genes Dev 1996;10:1580-94

HOWE JR, SKRYABIN BV, BELCHER SM, ZERILLO CA, SCHMAUSS C.

The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines.

J Biol Chem 1995;270:14168-74

HU WS, PATHAK VK.

Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy.

Pharmacol Rev 2000;52:493-511

HUNTER E, SWANSTROM R.

Retrovirus envelope glycoproteins.

Curr Top Microbiol Immunol 1990;157:187-253

LITERATURVERZEICHNIS

HWANG JJ, SCURIC Z, ANDERSON WF.

Novel retroviral vector transferring a suicide gene and a selectable marker gene with enhanced gene expression by using a tetracycline-responsive expression system.

J Virol 1996;70:8138-41

INOUE S, TSUJI FI.

Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein.

FEBS Lett 1994;341:277-80

JAENISCH R, JAHNER D, NOBIS P, SIMON I, LOHLER J, HARBERS K, GROTKOPP D.
Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice.

Cell 1981;24:519-29

JAINCHILL JL, AARONSON SA, TODARO GJ.

Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.

J Virol 1969;4:549-53

KAIN SR, GANGULY S.

Overview of genetic reporter systems.

In: AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. (Hrsg.), Current protocols in molecular biology, Volume 2; John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken, USA; 2001;9.6.3-9.6.12

KAIN SR, ADAMS M, KONDEPUDI A, YANG TT, WARD WW, KITTS P.

Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization.

Biotechniques 1995;19:650-5

KALDERON D, ROBERTS BL, RICHARDSON WD, SMITH AE.

A short amino acid sequence able to specify nuclear location.

Cell 1984;39:499-509

KANDEL ES, CHANG BD, SCHOTT B, SHTIL AA, GUDKOV AV, RONINSON IB.

Applications of green fluorescent protein as a marker of retroviral vectors.

Somat Cell Mol Genet 1997;23:325-40

KANG R, MARUI T, GHIVIZZANI SC, NITA IM, GEORGESCU HI, SUH JK, ROBBINS PD, EVANS CH.

Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study.

Osteoarthritis Cartilage 1997;5:139-43

LITERATURVERZEICHNIS

KAVANAUGH MP, MILLER DG, ZHANG W, LAW W, KOZAK SL, KABAT D, MILLER AD.

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

Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:7071-5

KAWABATA M, IMAMURA T, MIYAZONO K.

Signal transduction by bone morphogenetic proteins.

Cytokine Growth Factor Rev 1998;9:49-61

KAY MA, MANNO CS, RAGNI MV, LARSON PJ, COUTO LB, MCCLELLAND A, GLADER B, CHEW AJ, TAI SJ, HERZOG RW, ARRUDA V, JOHNSON F, SCALLAN C, SKARSGARD E, FLAKE AW, HIGH KA.

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

Nat Genet 2000;24:257-61

KELLEHER RJ 3RD, FLANAGAN PM, KORNBERG RD.

A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus.

Cell 1990;61:1209-15

KIM JW, CLOSS EI, ALBRITTON LM, CUNNINGHAM JM.

Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor.

Nature 1991;352:725-8

KINGSLEY DM.

The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.

Genes Dev 1994;8:133-46

KNOTT A, GARKE K, URLINGER S, GUTHMANN J, MÜLLER Y, THELLMANN M, HILLEN W.

Tetracycline-dependent gene regulation: Combinations of Transregulators yield a variety of expression windows.

Biotechniques 2002;32:796-806

KOELLE MR, TALBOT WS, SEGRAVES WA, BENDER MT, CHERBAS P, HOGNESS DS.

The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily.

Cell 1991;67:59-77

LITERATURVERZEICHNIS

KOPONEN JK, KANKKONEN H, KANNASTO J, WIRTH T, HILLEN W, BUJARD H, YLA-HERTTUALA S.

Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo.

Gene Ther 2003;10:459-66

KRALL W, KOHN DB.

Expression levels by retroviral vectors based upon the N2 and the MFG backbones.

Gene Ther 1996;3:365

KRÜGER A, SCHIRRMACHER V, KHOKHA R.

The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies.

Cancer Metastasis Rev 1998-99;17:285-94

KRÜGER A, SCHIRRMACHER V, VON HOEGEN P.

Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells.

Int J Cancer 1994;58:275-84

KUMAR M, KELLER B, MAKALOU N, SUTTON RE.

Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors.

Hum Gene Ther 2001;12:1893-905

KÜNZEL E, KNOSPE C.

Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.

MOSIMANN W, KOHLER T (Hrsg.); Verlag Paul Parey, Berlin; 1990;255-256

LAMARTINA S, ROSCILLI G, RINAUDO CD, SPORENO E, SILVI L, HILLEN W, BUJARD H, CORTESE R, CILIBERTO G, TONIATTI C.

Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators.

Hum Gene Ther 2002;13:199-210

LAMARTINA S, SILVI L, ROSCILLI G, CASIMIRO D, SIMON AJ, DAVIES ME, SHIVER JW, RINAUDO CD, ZAMPAGLIONE I, FATTORI E, COLLOCA S, PAZ OG, LAUFER R, BUJARD H, CORTESE R, CILIBERTO G, TONIATTI C.

Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-Based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and Non-Human primates.

Mol Ther 2003;7:271-80

LEDLEY FD.

Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products.

Hum Gene Ther 1995;6:1129-44

LITERATURVERZEICHNIS

LEE H, SONG JJ, KIM E, YUN CO, CHOI J, LEE B, KIM J, CHANG JW, KIM JH.
Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor.
Gene Ther 2001;8:268-73

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

LI X, ZHAO X, FANG Y, JIANG X, DUONG T, FAN C, HUANG CC, KAIN SR.
Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter.
J Biol Chem 1998;273:34970-5

LI Z, DULLMANN J, SCHIEDLMEIER B, SCHMIDT M, VON KALLE C, MEYER J, FORSTER M, STOCKING C, WAHLERS A, FRANK O, OSTERTAG W, KUHLCKE K, ECKERT HG, FEHSE B, BAUM C.
Murine leukemia induced by retroviral gene marking.
Science 2002;296:497

LIEBERMAN JR, DALUISKI A, EINHORN TA.
The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications.
J Bone Joint Surg Am 2002a;84:1032-44

LIEBERMAN JR, GHIVIZZANI SC, EVANS CH.
Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage.
Mol Ther 2002b;6:141-7

LINIAL ML, MILLER AD.
Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications.
Curr Top Microbiol Immunol 1990;157:125-52

LIU F, VENTURA F, DOODY J, MASSAGUE J.
Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs.
Mol Cell Biol 1995;15:3479-86

LIU H, MCKENNA LA, DEAN MF.
The macromolecular characteristics of cartilage proteoglycans do not change when synthesis is up-regulated by link protein peptide.
Biochim Biophys Acta 1999a;1428:191-200

LIU HS, JAN MS, CHOU CK, CHEN PH, KE NJ.
Is green fluorescent protein toxic to the living cells?
Biochem Biophys Res Commun 1999b;260:712-7

LITERATURVERZEICHNIS

LUYTEN FP, YU YM, YANAGISHITA M, VUKICEVIC S, HAMMONDS RG, REDDI AH.

Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem* 1992;267:3691-5

LYONS KM, PELTON RW, HOGAN BL.

Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 1990;109:833-44

MA W, ROGERS K, ZBAR B, SCHMIDT L.

Effects of different fixatives on beta-galactosidase activity. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1421-4

MADRY H, CUCCHIARINI M, TERWILLIGER EF, TRIPPEL SB.

Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 2003;14:393-402

MADRY H, TRIPPEL SB.

Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 2000;7:286-91

MANKIN HJ.

The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:460-6

MANN R, MULLIGAN RC, BALTIMORE D.

Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983;33:153-9

MARKOWITZ DG, GOFF SP, BANK A.

Safe and efficient ecotropic and amphotropic packaging lines for use in gene transfer experiments. *Trans Assoc Am Physicians* 1988;101:212-8

MARTIN I, SUETTERLIN R, BASCHONG W, HEBERER M, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED LE.

Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* 2001;83:121-8

LITERATURVERZEICHNIS

MASTROMARINO P, CONTI C, GOLDONI P, HAUTTECOEUR B, ORSI N.
Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH.
J Gen Virol 1987;68:2359-69

MATUKONIS M, LI M, MOLINA RP, PASZKIET B, KALEKO M, LUO T.
Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems.
Hum Gene Ther 2002;13:1293-303

MILLER AD.
Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:11407-13

MILLER AD.
Development and applications of retroviral vectors.
In: COFFIN JM, HUGHES SH. und VARMUS HE. (Hrsg.), Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; 1997;440-441

MILLER AD, BUTTIMORE C.
Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production.
Mol Cell Biol 1986;6:2895-902

MILLER AD, JOLLY DJ, FRIEDMANN T, VERMA IM.
A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT.
Proc Natl Acad Sci U S A 1983;80:4709-13

MILLER AD, LAW MF, VERMA IM.
Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene.
Mol Cell Biol 1985;5:431-7

MILLER AD, ROSMAN GJ.
Improved retroviral vectors for gene transfer and expression.
Biotechniques 1989;7:980-2, 984-6, 989-90

MILLER DG, ADAM MA, MILLER AD.
Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection.
Mol Cell Biol 1990;10:4239-42

MISTELI T, SPECTOR DL.
Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology.
Nat Biotechnol 1997;15:961-4

LITERATURVERZEICHNIS

MODROW S, FALKE D.

Molekulare Virologie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998a;291

MODROW S, FALKE D.

Molekulare Virologie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998b;294

MOUNT JD, HERZOG RW, TILLSON DM, GOODMAN SA, ROBINSON N,
MCCLELAND ML, BELLINGER D, NICHOLS TC, ARRUDA VR, LOTHROP CD JR,
HIGH KA.

Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy.

Blood 2002;99:2670-6

NALDINI L, BLOMER U, GALLAY P, ORY D, MULLIGAN R, GAGE FH, VERMA IM,
TRONO D.

In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.

Science 1996;272:263-7

NOLAN GP, FIERING S, NICOLAS JF, HERZENBERG LA.

Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of Escherichia coli lacZ.

Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:2603-7

ORY DS, NEUGEBOREN BA, MULLIGAN RC.

A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:11400-6

PALU G, PAROLIN C, TAKEUCHI Y, PIZZATO M.

Progress with retroviral gene vectors.

Rev Med Virol 2000;10:185-202

PANNELL D, ELLIS J.

Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors.

Rev Med Virol 2001;11:205-17

PASSMAN RS, FISHMAN GI.

Regulated expression of foreign genes in vivo after germline transfer.

J Clin Invest 1994;94:2421-5

PAULUS W, BAUR I, BOYCE FM, BREAKFIELD XO, REEVES SA.

Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells.

J Virol 1996;70:62-7

LITERATURVERZEICHNIS

PAULUS W, BAUR I, KEYVANI K, SENNER V.

Variability of transcriptional regulation after gene transfer with the retroviral tetracycline system.

J Biotechnol 2000;81:159-65

PEAR WS, NOLAN GP, SCOTT ML, BALTIMORE D.

Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:8392-96

PEAR WS.

Transient transfection methods for preparation of high-titer retroviral supernatants.

In: AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. (Hrsg.), Current protocols in molecular biology, Volume 2; John Wiley & Sons, Inc; Hoboken, USA; 2001;9.11

PEARSON B, WOLF PL, VASQUEZ J.

A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize β -galactosidase in tissues.

Lab Investing 1963;12:1249

PEREZ N, PLENCE P, MILLET V, GREUET D, MINOT C, NOEL D, DANOS O, JORGENSEN C, APPARAILLY F.

Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis.

Hum Gene Ther 2002;13:2161-72

PITZER C, SCHINDOWSKI K, POMER S, WIRTH T, ZOLLER M.

In vivo manipulation of interleukin-2 expression by a retroviral tetracycline (tet)-regulated system.

Cancer Gene Ther 1999;6:139-46

POESCHLA EM, WONG-STAAAL F, LOONEY DJ.

Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors.

Nat Med 1998;4:354-7

POLLOCK R, ISSNER R, ZOLLER K, NATESAN S, RIVERA VM, CLACKSON T.

Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:13221-6

PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG, CORMIER MJ.

Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.

Gene 1992;111:229-33

LITERATURVERZEICHNIS

PRATS AC, ROY C, WANG PA, ERARD M, HOUSSET V, GABUS C, PAOLETTI C, DARLIX JL.

Cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA.

J Virol 1990;64:774-83

PRICE J, TURNER D, CEPKO C.

Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer.

Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:156-60

RADIN EL, BURR DB.

Hypothesis: joints can heal.

Semin Arthritis Rheum 1984;13:293-302

RAM Z, CULVER KW, OSHIRO EM, VIOLA JJ, DEVROOM HL, OTTO E, LONG Z, CHIANG Y, MCGARRITY GJ, MUUL LM, KATZ D, BLAESE RM, OLDFIELD EH.

Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells.

Nat Med 1997;3:1354-61

RASHEED S, NELSON-REES WA, TOTH EM, ARNSTEIN P, GARDNER MB.

Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080).

Cancer 1974;33:1027-33

REDDI AH, HUGGINS C.

Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats.

Proc Natl Acad Sci U S A 1972;69:1601-5

REDDI AH.

Cell biology and biochemistry of endochondral bone development.

Coll Relat Res 1981;1:209-26

RIDDELL SR, ELLIOTT M, LEWINSOHN DA, GILBERT MJ, WILSON L, MANLEY SA, LUPTON SD, OVERELL RW, REYNOLDS TC, COREY L, GREENBERG PD.

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

Nat Med 1996;2:216-23

RIOND JL, RIVIERE JE.

Pharmacology and toxicology of doxycycline.

Vet Hum Toxicol 1988;30:431-43

RIZZUTO G, CAPPELLETTI M, MAIONE D, SAVINO R, LAZZARO D, COSTA P, MATHIESEN I, CORTESE R, CILIBERTO G, LAUFER R, LA MONICA N, FATTORI E.

Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation.

Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:6417-22

ROBINSON HL.

New hope for an AIDS vaccine.

Nat Rev Immunol 2002;2:239-50

ROE T, REYNOLDS TC, YU G, BROWN PO.

Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis.

EMBO J 1993;12:2099-108

ROLS MP, DELTEIL C, GOLZIO M, DUMOND P, CROS S, TEISSIE J.

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

Nat Biotechnol 1998;16:168-71

ROMANO G, MICHELL P, PACILIO C, GIORDANO A.

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

Stem Cells 2000;18:19-39

ROSEN V, WOZNEY JM, WANG EA, CORDES P, CELESTE A, MCQUAID D, KURTZBERG L.

Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone.

Connect Tissue Res 1989;20:313-9

ROSSI FM, GUICHERIT OM, SPICHER A, KRINGSTEIN AM, FATYOL K, BLAKELY BT, BLAU HM.

Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16.

Nat Genet 1998;20:389-93

RUBIN GM, SPRADLING AC.

Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors.

Science 1982;218:348-53

RUSSELL DW, MILLER AD.

Foamy virus vectors.

J Virol 1996;70:217-22

SAEZ E, NO D, WEST A, EVANS RM.

Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice.

Curr Opin Biotechnol 1997;8:608-16

SAILOR LZ, HEWICK RM, MORRIS EA.

Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture.

J Orthop Res 1996;14:937-45

SALUCCI V, SCARITO A, AURISICCHIO L, LAMARTINA S, NICOLAUS G, GIAMPAOLI S, GONZALEZ-PAZ O, TONIATTI C, BUJARD H, HILLEN W, CILIBERTO G, PALOMBO F.

Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system.

Gene Ther 2002;9:1415-21

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.

Molecular cloning.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989a;1.82-1.84

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.

Molecular cloning.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; 1989b;1.25, 7.73-7.48, 7.52, A 10

SCHERDIN U, RHODES K, BREINDL M.

Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration.

J Virol 1990;64:907-12

SCHMIDT M, ZICKLER P, HOFFMANN G, HAAS S, WISSLER M, MUESSIG A, TISDALE JF, KURAMOTO K, ANDREWS RG, WU T, KIEM HP, DUNBAR CE, VON KALLE C.

Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model.

Blood 2002;100:2737-43

SCHOTT B, IRAJ ES, RONINSON IB.

Effects of infection rate and selection pressure on gene expression from an internal promoter of a double gene retroviral vector.

Somat Cell Mol Genet 1996;22:291-309

SCHULTZE N, BURKI Y, LANG Y, CERTA U, BLUETHMANN H.

Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice.

Nat Biotechnol 1996;14:499-503

SCHWANTES A, ORTLEPP I, LOCHELT M.

Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors.

Virology 2002;301:53-63

SCIADINI MF, JOHNSON KD.

Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model.

J Orthop Res 2000;18:289-302

LITERATURVERZEICHNIS

SELLERS RS, PELUSO D, MORRIS EA.

The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage.

J Bone Joint Surg Am 1997;79:1452-63

SELLERS RS, ZHANG R, GLASSON SS, KIM HD, PELUSO D, D'AUGUSTA DA, BECKWITH K, MORRIS EA.

Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2).

J Bone Joint Surg Am 2000;82:151-60

SHIMOTOHNO K, TEMIN HM.

Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus.

Cell 1981;26:67-77

SHINNICK TM, LERNER RA, SUTCLIFFE JG.

Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus.

Nature 1981;293:543-8

SHULER FD, GEORGESCU HI, NIYIBIZI C, STUDER RK, MI Z, JOHNSTONE B, ROBBINS RD, EVANS CH.

Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes.

J Orthop Res 2000;18:585-92

SMITH P, SHULER FD, GEORGESCU HI, GHIVIZZANI SC, JOHNSTONE B, NIYIBIZI C, ROBBINS PD, EVANS CH.

Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1.

Arthritis Rheum 2000;43:1156-64

SOMIA N, VERMA IM.

Gene therapy: trials and tribulations.

Nat Rev Genet 2000;1:91-9

SONEOKA Y, CANNON PM, RAMSDALE EE, GRIFFITHS JC, ROMANO G, KINGSMAN SM, KINGSMAN AJ.

A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.

Nucleic Acids Res 1995;23:628-33

SOUTHERN PJ, BERG P.

Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.

J Mol Appl Genet 1982;1:327-41

LITERATURVERZEICHNIS

STOCKING C, BERGHOLZ U, FRIEL J, KLINGLER K, WAGENER T, STARKE C, KITAMURA T, MIYAJIMA A, OSTERTAG W.

Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line.

Growth Factors 1993;8:197-209

SUHR ST, GIL EB, SENUT MC, GAGE FH.

High level transactivation by a modified Bombyx ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:7999-8004

SWISS-PROT DATENBANK, O46564

SWISS-PROT DATENBANK, P12642

TATUM EL.

Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine.

Perspect Biol Med 1966;10:19-32

TEMIN H.

The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis.

Science 1976;192:1075-1080

TEMIN HM.

Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors.

Hum Gene Ther 1990;1:111-23

TOMITA T, HASHIMOTO H, TOMITA N, MORISHITA R, LEE SB, HAYASHIDA K, NAKAMURA N, YONENOBU K, KANEDA Y, OCHI T.

In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes.

Arthritis Rheum 1997;40:901-6

TROBRIDGE GD, RUSSELL DW.

Helper-free foamy virus vectors.

Hum Gene Ther 1998;9:2517-25

URIST MR, IWATA H, CECCOTTI PL, DORFMAN RL, BOYD SD, MCDOWELL RM, CHIEN C.

Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin.

Proc Natl Acad Sci U S A 1973;70:3511-5

URIST MR.

Bone: formation by autoinduction.

Science 1965;150:893-9

LITERATURVERZEICHNIS

URLINGER S, BARON U, THELLMANN M, HASAN MT, BUJARD H, HILLEN W.
Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:7963-8

VAN BEUNINGEN HM, VAN DER KRAAN PM, ARNTZ OJ, VAN DEN BERG WB.
Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint.
Lab Invest 1994;71:279-90

VERMA IM, SOMIA N.
Gene therapy - promises, problems and prospects.
Nature 1997;389:239-42

VIGNA E, CAVALIERI S, AILLES L, GEUNA M, LOEW R, BUJARD H, NALDINI L.
Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors.
Mol Ther 2002;5:252-61

VILE RG, NELSON JA, CASTLEDEN S, CHONG H, HART IR.
Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component.
Cancer Res 1994;54:6228-34

VON DER MARK K, GAUSS V, VON DER MARK H, MULLER P.
Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
Nature 1977;267:531-2

WANG Y, O'MALLEY BW JR, TSAI SY, O'MALLEY BW.
A regulatory system for use in gene transfer.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:8180-4

WEIJTENS ME, WILLEMSSEN RA, HART EH, BOLHUIS RL.
A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes.
Gene Ther 1998;5:1195-203

WEISS RA, BOETTIGER D, MURPHY HM.
Pseudotypes of avian sarcoma viruses with the envelope properties of vesicular stomatitis virus.
Virology 1977;76:808-25

LITERATURVERZEICHNIS

WIGLER M, SILVERSTEIN S, LEE LS, PELLICER A, CHENG Y, AXEL R.
Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells.
Cell 1977;11:223-32

WILLEMSSEN RA, DEBETS R, CHAMES P, BOLHUIS RL.
Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer.
Hum Immunol. 2003;64:56-68

WITHERS-WARD ES, KITAMURA Y, BARNES JP, COFFIN JM.
Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo.
Genes Dev 1994;8:1473-87

WOLFF JA, MALONE RW, WILLIAMS P, CHONG W, ACSADI G, JANI A, FELGNER PL.
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.
Science 1990;247:1465-8

WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RM, WANG EA.
Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.
Science 1988;242:1528-34

WU X, HOLSCHEIN J, KENNEDY SC, PONDER KP.
Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression.
Hum Gene Ther 1996;20:159-71

WWW.STANFORD.EDU/GROUP/NOLAN

WWW.WILEY.CO.UK/GENMED

XU L, YEE JK, WOLFF JA, FRIEDMANN T.
Factors affecting long-term stability of Moloney murine leukemia virus-based vectors.
Virology 1989;171:331-41

YANG NS, BURKHOLDER J, ROBERTS B, MARTINELL B, MCCABE D.
In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.
Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:9568-72

YANG S, DELGADO R, KING SR, WOFFENDIN C, BARKER CS, YANG ZY, XU L, NOLAN GP, NABEL GJ.
Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection.
Hum Gene Ther 1999;10:123-32

LITERATURVERZEICHNIS

- YASKO AW, LANE JM, FELLINGER EJ, ROSEN V, WOZNEY JM, WANG EA.
The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats.
J Bone Joint Surg Am 1992;74:659-70
- YEE JK, MIYANOHARA A, LAPORTE P, BOUIC K, BURNS JC, FRIEDMANN T.
A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:9564-8
- YOUNG DC, KINGSLEY SD, RYAN KA, DUTKO FJ.
Selective inactivation of eukaryotic beta-galactosidase in assays for inhibitors of HIV-1 TAT using bacterial beta-galactosidase as a reporter enzyme.
Anal Biochem 1993;215:24-30
- ZAISS AK, SON S, CHANG LJ.
RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy.
J Virol 2002;76:7209-19
- ZAVADA J.
Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses.
J Gen Virol 1972;15:183-91
- ZHANG G, GURTU V, KAIN SR.
An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells.
Biochem Biophys Res Commun 1996;227:707-11
- ZHANG H, BRADLEY A.
Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development.
Development 1996;122:2977-86
- ZHU Z, MA B, HOMER RJ, ZHENG T, ELIAS JA.
Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice.
J Biol Chem 2001;276:25222-9
- ZIMMER M.
Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior.
Chem Rev 2002;102:759-81
- ZUFFEREY R, NAGY D, MANDEL RJ, NALDINI L, TRONO D.
Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.
Nat Biotechnol 1997;15:871-5

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften viraler Vektorsysteme.....	5
Tabelle 2: Überblick über einige gängige Reportersysteme	8
Tabelle 3: Charakteristische Vertreter der Retroviren	10
Tabelle 4: Für Klonierungen verwendete Plasmide	34
Tabelle 5: Transfektionsschema.....	49
Tabelle 6: Protokoll für retrovirale Transduktionen	51
Tabelle 7: Herstellung einer stabilen Phoenix-Ampho Viruszelllinie.....	52
Tabelle 8: Gewinnung retroviraler Überstände von Phoenix-Ampho Viruszelllinien.....	53
Tabelle 9: Ablauf des verwendeten PCR-Programms.....	59
Tabelle 10: Virustiter der Phoenix-Ampho Viruszelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503) nach Titration auf NIH 3T3 Zellen.....	70
Tabelle 11: Titerbestimmung verwendeter pBulletLZ/VSV.G Überstände durch Titration auf HT-1080 Zellen	71
Tabelle 12: Transduktionseffizienz bei Verwendung des eingefrorenen Virusüberstandes pBulletLZ/VSV.G (2803).....	72
Tabelle 13: Transduktionseffizienz bei Verwendung des eingefrorenen Virusüberstandes pBulletLZ/VSV.G (2507).....	73
Tabelle 14: Analyse der Transgenexpression in Langzeitkultur	75
Tabelle 15: Für die Transduktion verwendete virale Überstände	78
Tabelle 16: <i>egfp</i> Expression [%] der für die Northern Blot-Analyse verwendeten HT-1080 Zellen	99

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau eines Retroviruspartikel (schematisch)	11
Abbildung 2: Genomorganisation der Retroviren	13
Abbildung 3: Schema des retroviralen Replikationszyklus	15
Abbildung 4: Darstellung typischer retroviraler Vektoren nach Integration in das zelluläre Genom (Provirus)	21
Abbildung 5: Regulation der Transgenexpression im Tet-On-System	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung des hBMP-2 Vorläuferpeptids mit Angaben der Sequenzlängen	31
Abbildung 7: Übersicht über das Versuchsvorhaben	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der für Klonierungen verwendeten Plasmide (A-H)	36
Abbildung 9: Schematische Darstellung der für Transfektionen verwendeten Plasmide (A-D)	50
Abbildung 10: Darstellung der Plasmide pBulletLZ (A) und pBulletBMP2 (B)	67
Abbildung 11: Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeLZ (2602) und PhoeLZ (0503).....	69
Abbildung 12: Transduktionseffizienz bei Transduktion mit amphotropen Virusüberständen	70
Abbildung 13: <i>nlslacZ</i> Expression nach Transduktion mit Retroviren des Plasmids pBulletLZ	74
Abbildung 14: Langzeitverlauf der Transgenexpression nach retroviraler Transduktion der Kaninchenchondrozyten CZ 133LZ, CZ 134LZ und CZ 135LZ	75
Abbildung 15: Transgenexpression <i>nlslacZ</i> -transduzierter Chondrozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	77
Abbildung 16: PCR-Nachweis des Provirus des Plasmids pBulletBMP2 im Genom der transduzierten Zelllinie CZ 288I-BMP2.....	79
Abbildung 17: BMP-2 Gehalt verschiedener Zellüberstände	80
Abbildung 18: Verlaufskontrolle der <i>hbmp-2</i> Expression der Zelllinien CZ 288I-BMP2 (A) und HT-BMP2-3 (B) <i>in vitro</i>	81
Abbildung 19: pBulletA	83
Abbildung 20: Schematische Darstellung retroviraler Double-copy-Vektoren.....	86
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Plasmids pRc/REGFP	88
Abbildung 22: Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeARTSLZ und PhoeARTAS-2LZ.....	89
Abbildung 23: Analyse der Transgenexpression der Zelllinie PhoeARTSLZ-V	90
Abbildung 24: FACS-Analyse der Transgenexpression der Zelllinien PhoeARTSEGFP und PhoeARTAS-2EGFP	91
Abbildung 25: Transduktionsraten nach Transduktion mit pBulletARTSEGFP-Retroviren ..	92
Abbildung 26: Transduktionsraten nach Transduktion mit pBulletARTAS-2EGFP-Retroviren	93
Abbildung 27: pBulletARTSEGFP: Einfluss der Induktion auf den Anteil <i>egfp</i> -positiver Zellen	95
Abbildung 28: pBulletARTAS-2EGFP: Einfluss der Induktion auf den Anteil <i>egfp</i> -positiver Zellen	96
Abbildung 29: Einfluss der Induktion auf die Expressionsstärke	97
Abbildung 30: Northern Blot-Analyse der gesamt RNA von HT-1080 Zellen, nach Transduktion mit viralen Überständen des Plasmids pBulletEGFP (Bahn 2), pBulletARTSEGFP (Bahn 3 nicht-induziert und 4 induziert) und pBulletARTAS-2EGFP (Bahn 5 nicht-induziert und 6 induziert)	101
Abbildung 31: Schematische Darstellung retroviraler Vektoren als Provirus und deren mögliche mRNA Transkripte	102

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
aa	Aminosäuren
ADA	Adenosin Desaminase
<i>amp^R</i>	Ampicillin-Resistenz Gen
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BGH p(A)	Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons
BIV	bovines Immundefizienz-Virus
BLV	bovines Leukämie-Virus
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BMP-2	<i>Bone Morphogenic Protein-2</i>
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CA	Viruskapsid
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	<i>colony forming unit</i>
Ci	Curie
cLacZ	zytoplasmatische β -Galaktosidase
CMV	Cytomegalievirus
CMV IE	Cytomegalievirus intermediate early
ColE1 ori	ColE1 <i>origin of replication</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAV	equines Arteritis-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EIAV	Virus der Infektiösen Anämie der Pferde
ELISA	<i>enzyme-linked-immuno sorbent assay</i>
<i>env</i>	<i>envelope</i> , Hüllproteine
EP	externes Glykoprotein
F1 ori	<i>F1 origin of replication</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FDG	Fluoreszein- β -D-Galaktopyranosid
FeLV	felines Leukämie-Virus
FIV	felines Immundefizienz-Virus
FKS	foetales Kälberserum
FL1	Fluoreszenz-Kanal 1
FL2	Fluoreszenz-Kanal 2
FL3	Fluoreszenz-Kanal 3
G	Guanin
gag	guppenspezifische Antigene
GALV	Gibbonaffen-Leukämie-Virus
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H.-E.	Hämatoxilin-Eosin
hBMP	humanes <i>Bone Morphogenic Protein-2</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazin-ethansulfonsäure
HIV I	humanes Immundefizienz-Virus I
HSV-TK	Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IN	Integrase
IP	infektiöse Partikel
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IU	international units (internationale Einheiten)
kb	Kilobasen
LacZ	β -Galaktosidase
LB	Luria-Bertani
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Luc	Luziferase
MA	Matrixproteine
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MLV	Maus-Leukämie-Virus
MMTV	Maus-Mamma-Tumor-Virus
Mo-MLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NC	Nukleokapsid
<i>neo</i> ^R	Neomycin-Resistenz Gen
nlsLacZ	nukleäre β -Galaktosidase
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranosid,
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
p(A)	Polyadenylierungssignal
PB	Primer-Bindungsstelle
PBS	<i>Phosphate buffered saline/primer binding site</i>
PBS ²⁺	<i>Phosphate buffered saline</i> mit Kalziumionen und Magnesiumionen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P _{hCMV}	humaner Cytomegalievirus Promotor
P _{hCMV*-1}	Tet-responsive Promotor
PI	Propidiumiodid
P _{lac}	lac Promotor
P _{minCMV}	minimaler <i>intermediate early</i> Cytomegalievirus Promotor
pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
<i>pro</i>	Gensequenz der viralen Protease
Pro	Promotor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

P _{SP6}	SP6 Promotor
P _{SV 40}	Promotor des Simian Virus 40
pUC	pUC <i>origin of replication</i>
R	<i>redundant</i> RNA-Sequenz
r. t.	Raumtemperatur
RF	relative Fluoreszenz
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
rtTA	reverser Transaktivator
rtTA2 ^s -M2	reverser Transaktivator der zweiten Generation
rtTA2 ^s -S2	reverser Transaktivator der zweiten Generation
SA	Spleißakzeptor
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	<i>simian foamy virus</i>
SIN	selbstinaktivierend
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
SV 40	Simian Virus 40
SV 40 ori	<i>origin of replication</i> des Simian Virus 40
SV 40 p(A)	Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat
Tc	Tetrazyklin
Tcs	Tetrazykline
TE	Tris-EDTA
TetA	Tetrazyklin-Antiporter Protein
<i>tetO</i>	Tet-Operator Sequenz
TetR	Tet-Repressor
TGF-β	Transforming growth factor-β
TM	transmembranes Protein
TRE	Tet-responsive Element

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
tTA	Transaktivator
U/min	Umdrehungen pro Minute
U3	<i>unique</i> 3' Ribonukleinsäure-Sequenz
U5	<i>unique</i> 5' Ribonukleinsäure-Sequenz
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
VSV	Vesikuläre-Stomatitis-Virus
VSV.G	G-Membranprotein des Vesikulären-Stomatitis-Virus
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4 Chloro-3 Indoyl- β -D-Galaktopyranosid
λ	Wellenlänge
Ψ	Verpackungssignal
$\Psi+$	erweitertes Verpackungssignal

12 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, für die engagierte wissenschaftliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Krüger, Gruppenleiter am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, für die kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes und die Anregungen und Betreuung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern der Abteilung für Sportorthopädie der Technischen Universität München. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Peter Ueblacker, Herrn Gian Salzmann und Herrn Stefan Vogts für die Bereitstellung der verwendeten Kaninchenchondrozyten.

Bei Herrn Dr. med. vet. T. Brill bedanke ich mich herzlich für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

Ich danke den Mitarbeitern der „Experimentellen Onkologie“ für die gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei der AG Krüger für ihre Unterstützung, insbesondere Frau Katja Honert für ihre große Hilfe in technischen Fragen und Frau Jutta Nagel für die vielen anregenden Diskussionen. Ebenso möchte ich mich besonders bei Frau Dr. rer. nat. M. Anton für ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Frau Edelburga Hammerschmidt und Herrn Dr. rer. nat. P. Wendt bedanke ich für die Durchführung der FACS-Analysen. Frau Dr. med. vet. M.-L. Schmeller danke ich für ihre Hilfe bei den histologischen Bildern, Herrn Dr. Ing. O. Petrowicz danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meine Familie war mir durch ihre moralische Unterstützung eine unschätzbare Hilfe.

Ralf, danke dass du mich in dieser Zeit ertragen und unterstützt hast.