

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Tetracyclin-regulierte  
Transgenexpression durch  
Herpesvirus-saimiri-Vektoren in  
primären humanen Fibroblasten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Hanna Langenberger**  
aus Wedel in Holstein

Kiel 2015



Referent: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Benedikt Gahn

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juni 2016  
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. sc. hum. Rainer Podschun  
Prüfungsbeisitzender: Dr. rer. nat. Gregor Maschkowitz

**Donde una puerta se cierra, otra se abre.**

Miguel de Cervantes Saavedra

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary.....	2
3. Einleitung.....	3
3.1. Herpesvirus saimiri.....	3
3.2. Mutagenese von Herpesvirus saimiri.....	7
3.3. Das Tetracyclin-Schalter-System.....	8
3.4. Die Komponenten der Tetracyclin-regulierten Transgenkassette.....	10
4. Ziele der Arbeit.....	14
5. Material und Methoden.....	15
5.1. Medien und Puffer.....	15
5.2. Biologische Materialien.....	16
5.3. Oligonukleotide und Restriktionsenzyme.....	17
5.4. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software.....	18
5.5. Methoden der Virologie und Zellbiologie.....	19
5.6. Methoden der Molekularbiologie.....	22
6. Ergebnisse.....	27
6.1. Herstellung rekombinanter Virusmutanten.....	27
6.2. Transgenexpression in primären Fibroblasten.....	29
6.3. Längerfristiger Expressionsverlust.....	39
6.4. Strategien zur Verbesserung der Transgenexpression.....	44
6.5. Zellveränderungen unter Transgenexpression.....	53
7. Diskussion.....	54
7.1. Entwicklung der Gentherapie.....	54
7.2. Herpesvirus saimiri-basierte Vektoren für den Gentransfer.....	56
7.3. Transduktion und Transgenexpression in Fibroblasten.....	60
7.4. Chemische Reinduktion der Transgenexpression in Fibroblasten.....	62
8. Abkürzungsverzeichnis.....	65
9. Literaturverzeichnis.....	67
10. Lebenslauf.....	74
11. Danksagung.....	75
12. Erklärung.....	76

## 1. Zusammenfassung

Herpesvirus saimiri hat als episomaler, nicht integrierender Vektor interessante Eigenschaften für den Gentransfer in viele unterschiedliche Zelltypen von Säugern und Menschen. Durch Red-vermittelte homologe Rekombination in Bakterien wurden Doxycyclin-regulierbare Transgenkassetten in das virale Genom in bakteriellen artifiziellen Chromosomen inseriert und rekombinante Virusvektoren nach Transfektion in permissive Nierenzellen rekonstituiert. Nach Transduktion primärer menschlicher Fibroblasten wurde die Expression des Zielgens für verstärkt grün fluoreszierendes Protein (eGFP) unter Doxycyclin innerhalb weniger Stunden angeschaltet und nach der Entfernung des Induktors wieder abgeschaltet. Für die Expressionsraten zeigten sich der zur Expression der Doxycyclin-abhängigen Transregulatoren verwendete Minimalpromotor als auch die Orientierung der Transgenkassette im viralen Genom wesentlich. Mit dem vom humanen Cytomegalovirus abgeleiteten Minimalpromotor wurde eine deutlich stärkere eGFP-Expression besonders in direkter Orientierung erreicht. Bei dem vom Murinen Mammatumorvirus abgeleiteten Minimalpromotor führte die reverse Orientierung des Transgens zu besseren Ergebnissen. Durch die sekundäre Deletion des Kanamycin-Selektionsmarkers über das Cre-Lox-System konnten die Expressionsraten weiter gesteigert werden. Bei Infektionsmultiplizitäten von 0,01 bis 1,0 wurden nach Doxycyclin-Induktion gute Expressionsraten bei geringer basaler Hintergrundexpression beobachtet. Während die rekombinanten Konstrukte eindeutig die erwartete genomische Konfiguration aufwiesen, deuteten weitere Befunde darauf hin, dass im Rahmen der Replikation der Virusvektoren auch unerwartete Mutationen im Vektorgenom auftreten können. Über mehrere Wochen der Kultur wurde außerdem ein sekundärer Expressionsverlust des Transgens eGFP in den transduzierten Fibroblasten beobachtet. Nach etwa acht Wochen war die eGFP-Expression weitestgehend verloren gegangen. Inhibitoren der DNA-Methylierung und der Histon-Deacetylierung wurden hinsichtlich der Reinduktion der eGFP-Expression untersucht. Bei der Hemmung der Histon-Deacetylase konnte durch Trichostatin A zwar keine verbesserte Expression, wohl aber ein relevanter Zellverlust induziert werden. Dagegen führte Natriumbutyrat zu einer deutlich verbesserten eGFP-Expression. Die Hemmung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-2'-Desoxycytidin konnte die eGFP-Expression noch stärker verbessern, besonders bei frühzeitiger Applikation. Das Protein eGFP selbst schien besonders bei sehr hohen Expressionsraten toxische Effekte aufzuweisen. Insgesamt konnte diese Arbeit zeigen, dass Vektoren auf der Basis von Herpesvirus saimiri die effiziente Transduktion primärer menschlicher Fibroblasten und die Doxycyclin-abhängige Transgenexpression erlauben, aber hinsichtlich der langfristigen Transgenexpression der epigenetischen Inaktivierung unterliegen.

## 2. Summary

As an episomal, non-integrating vector, Herpesvirus saimiri has interesting properties for the gene transfer into many different cell types of mammals and humans. By Red-mediated homologous recombination in bacteria, doxycycline-regulated transgene cassettes were inserted into the viral genome in bacterial artificial chromosomes and recombinant virus vectors were reconstituted after transfection into permissive kidney cells. After the transduction of primary human fibroblasts, the expression of the target gene eGFP was switched on by doxycycline within a few hours and switched off again after the removal of the inducer. Concerning the expression rates, the minimal promoter used for the expression of doxycycline-dependent transregulators as well as the orientation of the transgene within the viral genome were shown relevant. Markedly higher eGFP expression rates were achieved by using the human cytomegalovirus-derived minimal promoter, particularly in the direct orientation. The murine mammary tumor virus-derived minimal promoter showed better results in reverse orientation of the transgene. By secondary deletion of the kanamycin-selection marker using the Cre-Lox system, the expression levels could be further increased. At multiplicities of infection from 0,01 to 1,0 after doxycycline induction, good expression rates with low basal expression levels were observed. While the recombinant constructs clearly showed the expected genomic configuration, further findings indicated that also unexpected mutations can occur within the virus genome upon replication of the virus vectors. Over several weeks in culture, a secondary loss of expression of the eGFP transgene was observed in transduced fibroblasts. After approximately eight weeks the eGFP expression was lost to a great extent. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation were evaluated concerning the reinduction of eGFP expression. Upon inhibition of the histone deacetylase by trichostatin A, a better expression could not be achieved, but a relevant loss of cell numbers was induced. In contrast, sodium butyrate led to a significantly improved eGFP expression. The DNA methyltransferase inhibition by 5-aza-2'-deoxycytidine was able to improve the eGFP expression even more, especially upon early application. The protein eGFP itself seemed to exhibit toxic effects, particularly at very high expression levels. In summary, this work showed that herpesvirus saimiri-based vectors enable the efficient transduction of primary human fibroblasts and the doxycycline-dependent transgene expression, but are subject to epigenetic inactivation with respect of long-term transgene expression.

### 3. Einleitung

Die Molekulare Therapie und Gentherapie gewinnt besonders bei der Krebsbehandlung und der Therapie monogener Erbkrankheiten an Bedeutung. Dabei ist die Keimbahntherapie von der somatischen Gentherapie zu unterscheiden. Die genetische Manipulation der Keimzellen wird für die Anwendung am Menschen aus ethischen Gesichtspunkten weltweit abgelehnt. Die somatische Gentherapie zielt dagegen darauf ab, funktionelle Defekte in Körperzellen auszugleichen, indem Gensequenzen über geeignete Vektoren in die „kranke“ Zelle eingeschleust werden und somit z.B. ein Gen ersetzt oder korrigiert wird. Für die Anwendung der somatischen Gentherapie ist die Erforschung sicherer und effizienter Vektoren unabdingbar. Vektoren für die somatische Gentherapie ebenso wie für experimentelle Fragestellungen werden durch folgende Eigenschaften beschrieben:

- Spektrum der Zelltypen, die für den Vektor zugänglich sind
- Genetische Persistenzform (episomal oder integriert)
- Immunogenität des Vektors oder seiner Genprodukte
- Wirkdosis und Nebenwirkungs-dosis

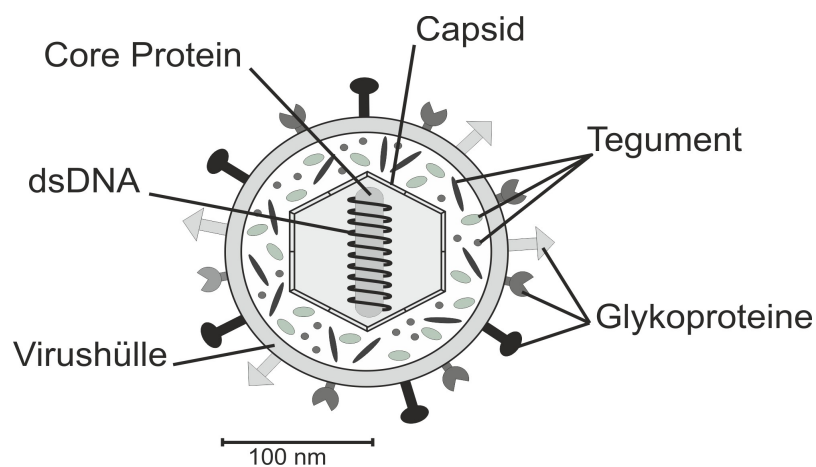
In der Vektorforschung liegt ein besonderer Schwerpunkt auf vorteilhaften Eigenschaften bezüglich des Zielzell-Tropismus, der genetischen Persistenzform und der Zelltyp-spezifischen Kontrolle der Genexpression. Limitationen ergeben sich gegebenenfalls u.a. aus einer nicht erwünschten Replikation der Vektorviren und damit einer Ausbreitung im Organismus sowie bei genomischer Integration aus der Insertionsmutagenese mit einer möglichen Tumorinduktion. Gerade die letztgenannten Probleme der viralen Vektoren machen Herpesvirus saimiri (HVS) zu einem interessanten Werkzeug für experimentelle in-vitro-Fragestellungen und möglicherweise auch für die somatische Gentherapie. Wissenschaftlich überzeugende Berichte über Erkrankungen durch HVS beim Menschen liegen nicht vor. Das Genom von HVS wird in der Zielzelle nicht in die zelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA) integriert, sondern persistiert ohne Virusproduktion z.B. in T-Zellen und Fibroblasten extrachromosomal, also episomal in Form stabiler multipler Kopien des zirkulären Genoms. Somit weist HVS wesentliche Vorteile bezüglich seiner Vektoreigenschaften auf.

#### 3.1. Herpesvirus saimiri

HVS gehört zu den  $\gamma_2$ -Herpesviren oder Rhadinoviren. Diese Bezeichnung leitet sich von dem altgriechischen Wort ραδινος für fragil oder zerbrechlich ab, weil die virale DNA in Fragmente stark unterschiedlicher Dichte zerfällt (Bornkamm et al.; 1976; Roizmann et al., 1992). Rhadinoviren sind als tierpathogene Erreger bekannt, die besonders lymphoproliferative Er-



krankungen z.B. bei Rindern und Affen verursachen. HVS kann aus dem Blut seines natürlichen Wirts, dem Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*), isoliert werden, das im tropischen Regenwald in Süd- und Zentralamerika lebt (Fickenscher & Fleckenstein, 2001; Fleckenstein & Desrosiers, 1982; Fleckenstein & Ensser, 2007). Die Infektion erfolgt meist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre über den Speichel. Das Virus persistiert dann lebenslang in T-Lymphozyten, verursacht aber keine Erkrankungen oder Tumoren (Melendez et al., 1968). Die experimentelle Infektion anderer Neuweltaffen-Spezies wie z.B. Tamarine (*Saguinus spp.*), Marmosetten (*Callithrix jacchus*) und Nachtaffen (owl monkey, *Aotus trivirgatus*) verursacht dagegen akute T-Zell-Lymphome und führt in weniger als zwei Monaten zum Tod des Affen (Melendez et al., 1969; Wright et al., 1976). Die T-Zellen dieser Spezies sind permissiv für die HVS-Replikation. Zu den Rhadinoviren gehört, neben HVS, auch das Humane Herpesvirus Typ 8 oder Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV). Dieses Virus verursacht beim Menschen das Kaposi-Sarkom, die multizentrische Castleman-Erkrankung und das Körperhöhlen- oder Ergusslymphom. Aufgrund unterschiedlicher Genomstruktur und pathogenen Eigenschaften werden HVS-Stämme in drei Subgruppen (A-C) unterteilt, wobei Stämme der Gruppe C (Hauptvertreter C488 und C484) die größte onkogene Potenz aufweisen (Desrosiers & Falk, 1982; Fickenscher & Fleckenstein, 2001; Medveczky et al., 1984, 1989).

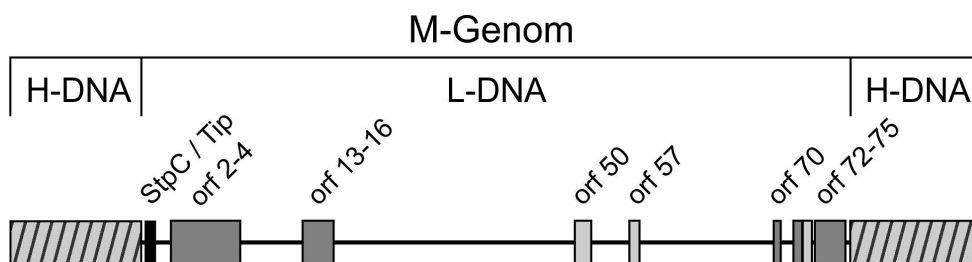


**Abb. 1: Schematische Darstellung von Herpesvirus saimiri.**

Wie alle anderen Herpesviren enthält HVS ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit linearer, doppelsträngiger DNA (dsDNA; Abb. 1). Die Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit viralen Glykoproteinen, die mit zellulären Rezeptoren interagieren und somit die Adhäsion an und die Penetration in die Wirtszelle ermöglichen. Das Nukleokapsid besteht aus 162 Kapsomeren und wird von der viralen Proteinmatrix, dem Tegument, umgeben. Das Tegument wird bei der Infektion einer Wirtszelle mit eingeschleust, unterstützt die virale Replikation und stört die Erkennung des Virus durch das wirtseigene Immunsystem (Chiu & Rixon, 2002; Gibson, 1996; Roizmann & Pellet, 2001; Steven & Spear, 1997).

Aufgrund unterschiedlicher Genomstruktur, Pathogenität und Transformationseigenschaften kann HVS in drei Untergruppen A, B und C unterteilt werden (Desrosiers & Falk, 1982; Ensser & Fleckenstein, 2005; Medveczky et al., 1984). Viren der Subgruppe C mit ihrem Hauptvertreter C488 weisen das höchste onkogene Potenzial auf. So führt eine Infektion mit HVS-Stämmen der Subgruppe C nicht nur bei Neuweltaffen sondern auch bei bestimmten Altweltaffen (Rhesusaffe, *Macaca mulatta*) und bei Kaninchen (*New Zealand white rabbit*) zu akuten T-Zell-Lymphomen und lymphoproliferativen Erkrankungen (Ablashi et al., 1980; Duboise et al., 1998a, 1998b; Knappe et al., 2000; Rosenwirth et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit C488 transformierte humane T-Zellen in vitro Antigenunabhängig zu einem stabilen Wachstum gebracht werden können (Biesinger et al., 1992). Die Wirtszelle enthält dabei eine hohe Anzahl episomaler, nicht-integrierender Kopien des viralen Genoms, ohne dabei die Antigen-Spezifität und die essentiellen Funktionen der T-Zelle zu stören. Die meisten viralen Gene werden unter der latenten Persistenz nicht exprimiert und infektiöse Viruspartikel werden nicht produziert. Gerade diese Eigenschaft macht HVS C488 zu einem vielversprechenden Werkzeug für den Gentransfer und gegebenenfalls auch für die Molekulare Therapie.

Der Name Rhadinovirus leitet sich von dem Dichteverhalten der viralen DNA bei der Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten ab. Die DNA teilt sich in zwei Fraktionen auf: eine Fraktion mit geringem GC-Gehalt und niedriger Dichte (L-DNA), die alle Gene enthält, die für die Pathogenität, Replikation und Persistenz des Virus eine Rolle spielen. Die zweite Fraktion weist einen hohen GC-Gehalt und eine hohe Dichte auf (H-DNA). Sie besteht aus nicht-kodierenden repetitiven Sequenzen und flankiert beiderseits die L-DNA. Das gesamte Genom wird als M-DNA bezeichnet und nimmt auf die Dichte bezogen eine Zwischenstellung ein (Bornkamm et al., 1976; Abb. 2).



**Abb. 2: Das Genom von Herpesvirus saimiri C488.** Die kodierende L-DNA umfasst ca. 113 kb und wird beiderseits von der repetitiven H-DNA flankiert. Das gesamte Genom (M-Genom) umfasst ca. 165 kb.

Die kodierende L-DNA von HVS C488 enthält mindestens 77 offene Leserahmen (orf), von denen ca. 60 näher beschrieben sind (Albrecht et al., 1992; Ensser & Fleckenstein, 2005; Ensser et al., 2003). Einige der exprimierten viralen Proteine weisen eine ausgeprägte Homologie zu zellulären Proteinen auf. Diese Proteine greifen in die Wachstumsregulation

und den Zellzyklus ein, wirken antiapoptotisch, hemmen das Komplementsystem oder wirken als Zytokine oder Rezeptoren. Diese Proteine scheinen aber keine relevante Rolle für die Virusreplikation, T-Zell-Transformation oder Pathogenität zu spielen, wohl aber für die Persistenz und für die Immunevasion. Für die Replikation sind besonders das sehr früh exprimierte Gen (*immediate early*) *orf57* und die früh exprimierten Gene (*delayed early*) *orf50* und *orf70* wesentlich. Für die Latenz kommt *orf73* mit seinem Genprodukt Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen (LANA) die größte Bedeutung zu. Ähnlich wie das LANA des KSHV wandert dieses HVS-Protein in den Zellkern, bindet dort an die virale DNA und hemmt Promotoren für die viralen ORF50-Aktivatorproteine. Dies trägt zur Hemmung der Virusreplikation und Blockade der Reaktivierung bei (Giles et al., 2003; Schäfer et al., 2003; Zielke et al., 2012). Somit scheint *orf73* für die Entscheidung wesentlich zu sein, ob HVS lytisch repliziert oder latent persistiert.

ORF	Genprodukt	Abkürzung	Zielmoleküle	Bedeutung
1a	Tyrosinkinase-interagierendes Protein	Tip	Tyrosinkinase Lck	T-Zell-Transformation
1b	Saimiri-Transformations-assoziiertes Protein	StpC	Ras, NF- $\kappa$ B, TRAF	Transformation
2	Dihydrofolat-Reduktase	vDHFR	Dihydrofolat	Nukleotid-Synthese
3	Formylglycinamidribotid-Amidotransferase-Homolog	vFGARAT		vermutlich Nukleotid-Metabolismus
4	Komplement-Kontroll-Protein-Homolog	CCPH	C3	Komplement-Inhibition
13	Interleukin-17	vIL-17	IL-17R	Cytokin-Wirkung
14	Superantigen-Homolog	vSsag, IE14	vermutlich MHC II	vermutlich T-Zell-Proliferation
15	CD59-Homolog	vCD59	membrane attack complex (C8, C9)	Komplement-Inhibition
16	Bcl2-Homolog	vBcl2		Apoptose-Inhibition
50	R-Transaktivator	R, Rta, ORF50	virale Promotoren	Genregulation, Virusreplikation
57	IE57	IE57, ORF57	virale RNA	Genregulation, Virusreplikation, RNA-Transport, Spleißen
70	Thymidylatsynthetase	TS		Nukleotid-Metabolismus
71	FLICE-inhibierendes Protein	vFLIP	Caspase 8, FADD	Apoptose-Inhibition
72	Cyclin-D-Homolog	vCyclin D	CDK6	Zellzyklus-Regulation
73	Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen	LANA		episomale Persistenz, episodale Replikation
74	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, IL-8-Rezeptor-Homolog	vGPCR, vIL-8R		Leukozytenmigration, Proliferation
75	Formylglycinamidribotid-Amidotransferase-Homolog	vFGARAT		vermutlich Nukleotid-Metabolismus

**Tab. 1: Ausgewählte Gene von Herpesvirus saimiri C488 und deren Bedeutung.** Zusammengefasst nach Jung et al. (1999), Ensser et al. (2003) und Ensser & Fleckenstein (2005).

Für die Pathogenität und als Merkmal zur Unterscheidung der drei HVS-Untergruppen hat die linksterminale L-DNA die entscheidende Bedeutung. Bei HVS C488 sind dort die beiden Gene *stpC* und *tip* lokalisiert, die für die Transformation von T-Zellen und für die Tumorinduktion essentiell sind (Duboise et al., 1996; Knappe et al., 1997; Medveczky et al., 1993). Das Saimiri-Transformations-assoziierte Protein der Subgruppe C (StpC) erfüllt die Kriterien eines Onkoproteins, interagiert mit Ras und mit dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierten Faktoren und aktiviert Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen und NFκB. Das Tyrosinkinase-interagierende Protein Tip aktiviert die Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren durch seine Interaktion mit der T-zellulären Tyrosin-Kinase Lck, die Tip infolge der Interaktion phosphoryliert. Einen Überblick über ausgewählte Gene von HVS und deren Funktion gibt Tab. 1.

### 3.2. Mutagenese von Herpesvirus saimiri

Das Genom von HVS umfasst ca. 165 Kilobasen (kb). Die größten Genome der Primatenviren finden sich bei den Herpesviren (bis 235 kb) und Pockenviren (bis 375 kb). Im Vergleich hierzu umfassen z.B. die Genome der Circoviren oder der Hepadnaviren 1,7 bis 3,3 kb. Die Genome der übrigen Virusfamilien weisen ca. 5 bis 38 kb auf (Modrow et al., 2010). Die umfangreiche Größe des HVS-Genoms bereitet Schwierigkeiten bei der genetischen Manipulation mit Hilfe einfacher Plasmide oder Cosmide. Dieses Problem konnte mit der Etablierung künstlicher Chromosomen gelöst werden. Das zuerst angewendete System basierte auf künstlichen Hefe-Chromosomen, den *yeast artificial chromosomes*, die sich allerdings für herpesvirale Genome als wenig geeignet erwiesen. Im weiteren Verlauf suchte man nach prokaryonten Vektoren, da Bakterien wesentliche Vorteile hinsichtlich ihrer schnellen Proliferationskinetik, ihrer einfachen Anzuchtbedingungen und ihrer gezielt zur Manipulation nutzbaren Genetik aufweisen. Bei *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde ein derartiges System basierend auf der mini-F-Sequenz der Fertilitätsplasmide etabliert. Derartige bakterielle artifizielle Chromosomen (BAC) können große Genomsequenzen aufnehmen und diese in der Bakterienzelle in ein bis zwei Kopien lagern. Ein weiterer Vorteil dieses Systems im Vergleich zu den Hefe-Vektoren und Plasmid- und Cosmid-basierten Systemen ist die hohe Stabilität der BAC-DNA, da es hierbei kaum zu ungewollten Rekombinationen der DNA kommt. Somit weisen BAC-basierte Systeme die Möglichkeit der stabilen Lagerung integrierter Sequenzen (z.B. für Genbanken) auf, ermöglichen die einfache und schnelle Manipulation von Genen und dienen zudem der einfachen Gewinnung manipulierter DNA (Shizuya & Kouros-Mehr, 2001; Wagner et al., 2002).

Für die Manipulation von BAC-DNA stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Herkömmliche Klonierungsverfahren mit Restriktionsenzymen und anschließender Ligation

sind wegen der Genomgröße von HVS nicht praktikabel. Die gängigen Rekombinationstechniken beruhen daher auf der homologen Rekombination, bei der von kurzen homologen Regionen flankierte Sequenzen gezielt in die BAC-DNA integriert werden können. Dieses kann mit zirkulären Plasmiden sowie linearen DNA-Fragmenten oder mit Produkten der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Red-vermittelte Rekombinationstechnik verwendet, die im Folgenden genauer beschrieben wird.

Für die Red-vermittelte homologe Rekombination von BAC-DNA und linearer dsDNA werden die BAC-DNA tragenden *E. coli* durch Elektroporation transformiert, d.h. das Rekombinationskonstrukt wird mit Hilfe eines elektrischen Feldes in die Vektor-tragenden Bakterien eingebracht. Für die homologe Rekombination in den transformierten Bakterien werden Stämme von *E. coli* benötigt, die das Rekombinationssystem Red des Bakteriophagen  $\lambda$  enthalten. Dieses System umfasst einen thermosensiblen Promotor, der die Expression der Gene *exo*, *beta* und *gam* vermittelt. Das Genprodukt von *exo* ist eine Exonuklease (Exo), die Nukleotide am 5'-Ende der dsDNA abbaut und damit am 3'-Ende kurze Strecken einzelsträngiger DNA (ssDNA) generiert. Diese ssDNA wird von Beta gebunden und damit vor Degradierung durch Nukleasen geschützt. Des Weiteren fördert Beta die Anlagerung homologer Sequenzen an diese Region. Gam hemmt das in *E. coli* vorkommende RecBCD System, das lineare DNA abbaut. Für die Selektion erfolgreich rekombinierter BAC-DNA werden Antibiotika-Resistenz-Gene benötigt, einerseits in der ursprünglichen BAC-DNA und andererseits in dem Rekombinationskonstrukt. Nur wenn beide Antibiotika-Resistenzen vorhanden sind, gelingt die Anzucht auf entsprechenden Selektionsnährböden. Zur weiteren Kontrolle wird daraufhin eine Kolonie-PCR der so erhaltenen Bakterienstämme durchgeführt, die mittels entsprechender Primer die Integration des Rekombinationskonstrukts in die gewünschte Position des Vektors bestätigt (Lee et al., 2001; Wagner et al., 2002). Nach Vermehrung der so ausgewählten Bakterien wird die mutierte BAC-DNA extrahiert und durch Transfektion permissiver Zellkulturen die mutierten Virusstämme gewonnen. Das komplette Genom von HVS C488 liegt auf Grund vorangegangener Arbeiten in ein BAC kloniert vor (Toptan, 2010; Toptan et al., 2010).

### 3.3. Das Tetracyclin-Schalter-System

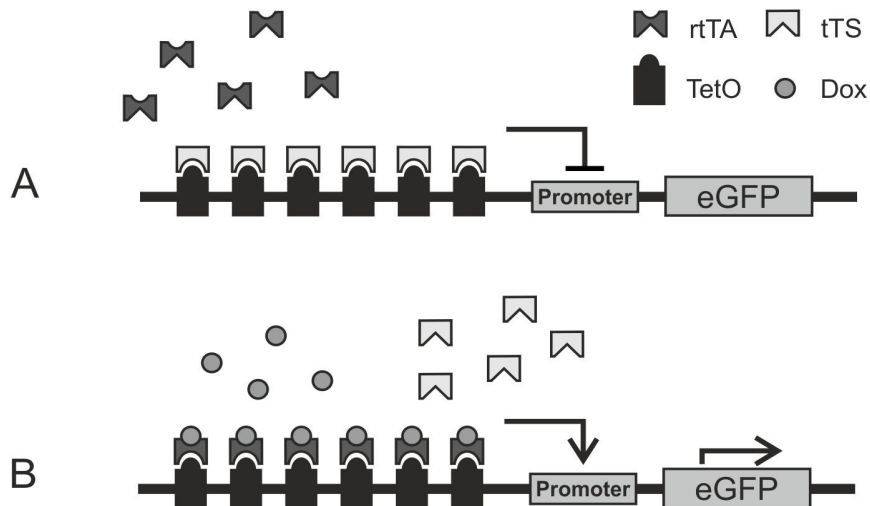
Ein Regulationssystem ist für die gezielte experimentelle Untersuchung einzelner Genprodukte und deren Wirkungsweise in Zellen oder einem Organismus nützlich. Derartige Systeme sollen die endogene Genexpression nicht beeinflussen, aber die strikte Regulation des Gens von Interesse ermöglichen. Ein solches eukaryontes Regulationssystem ist aus dem prokaryonten Resistenz-Mechanismus gegenüber Tetracyclin (Tet) abgeleitet. Bei diesem enterobakteriellen System wird durch den zellwandgängigen Induktor Tet oder Doxycyclin (Dox) die Expression eines Resistenz-Proteins (TetA) aktiviert (Sigler et al.,

2000), das in die Zellmembran integriert wird und die aktive Ausschleusung des Antibiotikums ermöglicht. Eine konstitutive Expression dieses Proteins würde zu einem gravierenden Wachstumsnachteil für die Bakterien führen. Darum steht dieser Mechanismus unter der Kontrolle des Tet-Repressors (TetR), der die basale Expression von TetA verhindert. Der TetR mit 46 kDa besteht aus 207 Aminosäuren und bindet als Dimer an die Tet-Operatoren (TetO) auf der bakteriellen DNA. TetO sind kurze 19-Basenpaar-(bp)-Sequenzen, an die der TetR bindet und damit die Genexpression blockiert. Gelangt nun Dox über passive Diffusion in die Zelle, bildet es mit Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ) einen Chelatkomplex, der die antibiotisch wirksame Form darstellt. Dieser Komplex bindet an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und ist zugleich Induktor für TetR und Substrat für TetA. Die Bindung des  $Mg^{2+}$ -Dox-Komplexes an TetR führt zu einer Konformationsänderung seiner DNA-Bindedomäne und TetR fällt vom TetO ab. Damit wird die Expression von TetA ermöglicht und das Resistenz-Protein in Form eines Proton-Tet-Antiporters in die Zellmembran integriert. Gelangt nun weiteres Dox in die Zelle wird dieses im Austausch mit einem Proton aus der Zelle ausgeschleust (Berens & Hillen, 2003; Chopra & Roberts, 2001; Hillen & Berens, 2002).

Bei Prokaryonten und Eukaryonten wurde dieses bakterielle Regulationssystem erfolgreich angewendet. Durch Tet-kontrollierte Fremdgene wurde in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien die Produktion therapeutisch wichtiger Proteine gesteigert und die Identifizierung essentieller Proteine pathogener Bakterien ermöglicht (Geissendörfer & Hillen, 1990; Ji et al., 2001; Lutz & Bujard, 1997). Auch bei Pflanzen kam dieses bakterielle Genregulationssystem zur Anwendung. Durch einen konstitutiv exprimierten TetR wurde die Expression des TetO-Promotors gehemmt und durch Dox-Gabe die Repression wieder aufgehoben (Gatz & Quail, 1988). Bei Säugern und davon abgeleiteten Zelllinien kam es aber meistens nur zur unvollständigen TetR-abhängigen Repression (Kim et al., 1995). Deshalb wurde das System weiter entwickelt und der TetR wurde mit viralen oder humanen Regulationsdomänen fusioniert. Durch die Fusion von TetR mit Aktivierungsdomänen entstanden Tet-abhängige Transaktivatoren (tTA) und durch die Fusion mit hemmenden Domänen die Tet-abhängigen Transsuppressoren (tTS). Der ursprüngliche TetR fungiert als Dox-bindende DNA-Bindeeinheit, die bei Abwesenheit von Dox an TetO gebunden ist und bei Anwesenheit von Dox durch Konformationsänderung diese Bindung verlässt. Die fusionierten Regulatoromänen entfalten ihre Wirkung demnach nur bei Abwesenheit von Dox: durch tTA wird die Genexpression aktiviert und durch tTS aktiv gehemmt.

Problematisch bleibt bei diesem System die Tatsache, dass Dox vollständig aus der Zelle entfernt werden muss. Besonders bei der Anwendung an Versuchstieren kann dies lange dauern, was dann zu einer verzögert ansteigenden Expression führt. Deshalb wurden TetR-

Varianten aus *E. coli* entwickelt, die Dox zum Binden an die DNA benötigen und nach Dox-Gabe die Bindung nicht verlassen. Durch die Fusion dieser TetR-Mutanten mit unterschiedlichen Regulationsdomänen entstanden reverse Tet-abhängige Transaktivatoren (rtTA) und damit die Grundlage für das verwendete Zwei-Schalter-System (Abb. 3).



**Abb. 3: Doxycyclin-abhängige Regulation der Transgenexpression durch ein Zwei-Schalter-System.** In Abwesenheit von Dox ist der Repressor tTS (hellgrau) an die Tet-Operatoren (TetO, schwarz) gebunden und hemmt den Promotor und damit die eGFP-Expression (A). Ist Dox (graue Kreise) vorhanden, wird es von dem Transaktivator rtTA (dunkelgrau) gebunden und es kommt zu einer Konformationsänderung in der DNA-Bindedomäne. tTS wird dadurch aus seiner Bindung an TetO verdrängt, rtTA kann binden und damit die eGFP-Expression aktivieren (B).

### 3.4. Die Komponenten der Tetracyclin-regulierten Transgenkassette

Für die Anwendung in HVS-Vektoren sollte ein Tet-reguliertes Transgenkonstrukt eingesetzt werden, das aus einer Regulations- und einer Expressionskassette besteht, die durch eine isolierende Sequenz (Insulator) voneinander getrennt sind, sowie ein Kanamycin-Resistenzgen als Selektionsmarker trägt. Der cHS4-Insulator aus dem 5'-Bereich des  $\beta$ -Globin-Gen des Huhns dient als genregulatorische Barriere zwischen der Regulations- und Expressionskassette und ermöglicht damit die strikte Trennung der jeweiligen genregulatorischen Funktionen, so dass Enhancer oder Silencer ihre Funktion über den Insulator hinaus nicht ausüben können (Chung et al., 1993, 1996). Die isolierende Eigenschaft ist auf eine 5'-gelegene Sequenz zurückzuführen, die eine DNase-I-Hypersensitivität aufweist.

Die verwendete Zwei-Schalter-Regulationseinheit (Abb. 3) besteht aus dem reversen Tet-abhängigen Aktivator rtTA und dem Transsilencer tTS. rtTA führt in Gegenwart von Dox zur Aktivierung des entsprechenden TetO-Promotors und damit zur effizienten Genexpression. Dagegen hemmt tTS aktiv die Expression vom TetO-Promotor in Abwesenheit von Dox (Abb. 3). Die Entwicklung des rtTA war für die Anwendung der Dox-regulierten Genexpression ein wissenschaftlicher Durchbruch. Allerdings zeigten sich einige Nachteile bei der Anwendung

des initial generierten rtTA-Fusionsproteins, das die Aktivierungsdomäne VP16 aus dem Herpes-Simplex-Virus trägt (HSV; Gossen & Bujard, 1992). Einerseits kann dieses virale Regulatorprotein die zelluläre und humorale Immunantwort induzieren (Ashley et al., 1994; Mikloska et al., 1998). Andererseits besitzt dieses Fusionsprotein auch in Abwesenheit von Dox eine geringgradige TetO-Bindeaffinität und führt somit zur unvollständigen Repression des TetO-Promotors und zu einer unerwünschten Hintergrundexpression. Außerdem sind relativ hohe intrazelluläre Konzentrationen des Induktors Dox notwendig, d.h. die Dox-Sensitivität ist relativ gering. Die eben genannten Probleme führten zu einer Weiterentwicklung des rtTA: Die VP16-Aktivierungsdomäne wurde auf die minimalen, essentiellen regulatorischen Elemente reduziert (Baron et al., 1997). Diese minimale Aktivierungsdomäne wurde mit dem ursprünglichen rtTA fusioniert, potentielle Spleißstellen und Schnittstellen für Endonukleasen entfernt und der Leserahmen der optimalen humanen Codon-Verwendung angepasst. Durch so entwickelte, auf VP16 basierende Aktivierungsdomänen, entstand rtTAS<sup>2</sup>-M2. Dieses Fusionsprotein weist *in vivo* eine deutlich erhöhte Stabilität auf, eine bis 10-fach erhöhte Dox-Sensitivität und eine reduzierte Hintergrundexpression (Urlinger et al., 2000).

Für die erste tTS-Generation wurde der TetR mit der Repressor-Domäne der Krüppel-assoziierten Box des humanen Zink-Finger-Proteins Kox1 fusioniert (Deuschle et al., 1995; Margolin et al., 1994). Allerdings zeigte sich eine unerwünschte Affinität zu dem Heterochromatin-Protein HP1, die zur Hemmung der gewünschten Repression der Genexpression führte (Ryan et al., 1999). Das aus dem adenoviralen E1A-Protein stammende Repressionsmotiv PLDLS zeigte diese Eigenschaft dagegen nicht. E1A wird zusammen mit seinem Ko-Repressor C-terminales Binde-Protein in der frühen Infektionsphase gebildet, greift in die Genregulation und in die Zellteilung ein und unterstützt damit die Virusreplikation (Chinnadurai, 2007; Russell, 2000). Die Histon-Modifikation spielt dabei eine wesentliche Rolle (Zhao et al., 2007). Mit der Einführung dieser viralen Repressordomäne konnte die reprimierende Wirkung von tTS deutlich verbessert werden.

Die Transkription von rtTA wird durch den ubiquitär aktiven Promotor (pgkP) des zellulären Gens Phosphoglyceratkinase 1 (*pgk-1*) initiiert, das ein wichtiges Enzym der Glykolyse kodiert (Papadakis et al., 2004). Die Transkription von rtTA erfolgt bicistronisch zusammen mit tTS. Zwischen beiden Leserahmen liegt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die die direkte Bindung von Ribosomen und damit die Translation unabhängig des *capping* der Boten-RNA (mRNA) erlaubt (Jang et al., 1988; Pelletier & Sonnenberg, 1988). Die Termination der Transkription erfolgt über den am Ende der Regulationskassette befindlichen Terminator des Gens *pgk1* (pgkT).



Minimale Promotoren sind verkürzte Varianten, die nur noch für die Transkriptionsregulation essenzielle Elemente enthalten. Sie besitzen eine TATA-Box und eine Transkriptions-Initiationsstelle, sind aber in Abwesenheit weiterer Enhancer-Elemente transkriptionell inaktiv. Durch die Verwendung minimaler Promotoren kann die basale Aktivität reduziert und die Regulierbarkeit der Expression durch die Aktivierung (rtTA) oder Repression (tTS) über heterologe repetitive TetO-Elemente verbessert werden. Für die Expressionskassette wurden als Tet-regulierbare Elemente bezeichnete minimale Promotoren eingesetzt, die vom humanen Cytomegalovirus (hCMV) und dem Maus-Mammatumovirus (MMTV) abgeleitet sind. Für den minimalen hCMV-Promotor wurde bereits im Jahr 1992 die effiziente Tet-Regulierbarkeit beschrieben (Gossen & Bujard, 1992). Verbesserte Tet-regulierbare Elemente zeichneten sich ohne Aktivierung durch eine reduzierte basale Expression aus (Agha-Mohammadi et al., 2004). Der MMTV-Minimalpromotor zeigte in diesem Zusammenhang zwar eine reduzierte Basalexpression; allerdings war unter Dox-Induktion die maximale Expressionsrate derjenigen der hCMV-Variante unterlegen (Hoffmann et al., 1997).

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* ist ein vielfach eingesetztes Werkzeug der Zell- und Molekularbiologie (Shimomura et al., 1962; 2005). Aus dem Photoprotein Aequorin mit einer Größe von 26,9 kDa wird das Fluorophor in seinem Ursprungsorganismus autokatalytisch freigesetzt und ist somit nicht auf zellspezifische Prozessierung angewiesen. In der Anwendung muss GFP über eines seiner beiden Anregungsmaxima (395 nm und 475 nm) aktiviert werden, die Emission erfolgt bei 509 nm (Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992). GFP weist in nahezu allen eukaryonten Zelltypen keine toxischen Wirkungen auf, wobei aber auch widersprüchliche Berichte zu finden sind (Liu et al., 1999). Durch Mutagenese konnte ein Derivat mit gesteigerter Fluoreszenzintensität generiert werden (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP). In der Transgenkassette wird die eGFP-mRNA durch das PolyA-Signal aus dem Simianen Virus 40 (SV40) terminiert (Gossen & Bujard, 1992).

Als Marker für die Selektion rekombinanter BACs mit dem gesamten HVS-Genom nach der Aufnahme des Expressionskonstruktes durch homologe Rekombination in *E. coli* dient eine Kanamycin-Resistenzkassette am rechten Ende des Transgenkonstrukts. Dieses Markergen wird beiderseits von einer LoxP-Sequenz (*locus of crossing over*) flankiert und kann mit Hilfe der Cre-Rekombinase unter Zurückbleiben einer einzelnen LoxP-Sequenz wieder entfernt werden. Das Cre-LoxP-System stammt aus dem Bakteriophagen P1. Die LoxP-Stellen bestehen aus 34 bp mit einem Kern von 8 bp, der beiderseits durch palindromische 13-bp-Sequenzen begrenzt wird (Hoess et al., 1982; Sternberg & Hamilton, 1981). Bei dieser Konfiguration ist es wesentlich, in welcher Richtung die beiden LoxP-Sequenzen angeordnet

sind: Bei gleichgerichteter Orientierung kommt es zu einer Deletion des dazwischen befindlichen Abschnitts, bei invertierter Orientierung dagegen zu einer Inversion der Region.

Somit steht also mit HVS ein viraler Vektor zur Verfügung, der durch seine günstigen Eigenschaften in der Lage ist, viele verschiedene Zelltypen sicher und effizient zu transduzieren. Zur gezielten Manipulation von Transgenen eignet sich die Red-vermittelte Rekombination in *E. coli*-basierten BACs, die mit geringem zeitlichen Aufwand die genetische Veränderung auch großer Gensequenzen erlauben. Für eine mögliche Anwendung mutierter Gensequenzen in der Molekularen Therapie am Menschen ist eine sichere Kontrolle der Genexpression unabdingbar. Hierbei eignet sich das Tet-Regulations-System dafür, die Genexpression gezielt zu induzieren und, wenn nötig, auch wieder abschalten zu können.

## 4. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die effiziente Tet-abhängige Regulation zur Transgenexpression in Vektoren auf der Basis von HVS C488 zu etablieren. Komplexe Regulationskassetten sollten durch homologe Red-vermittelte Rekombination in *E. coli* in das rekombinante BAC von HVS eingefügt werden. Diese Genkassetten sollten eine strikt regulierte Expression des eGFP nach Dox-Gabe vermitteln. In Anwesenheit von Dox sollte es zu einer starken Genexpression kommen und bei Abwesenheit von Dox die Genexpression reprimiert sein.

Die eGFP-Expression transduzierter Zellen sollte unter dem Fluoreszenzmikroskop und durch Mikrofluorimetrie erfasst werden. Für die Transduktionsexperimente sollten humane primäre Fibroblasten eingesetzt werden. Die Rekonstitution der Virusvektoren sollte durch Transfektion der aus *E. coli* gewonnenen BAC-DNA in HVS-permissiven Nierenzellen aus Nachtaffen erfolgen.

Die Experimente zielten darauf ab, die optimale Konfiguration der viralen Vektoren, die geeigneten Transduktionsdosen für die Transduktion und die Parameter der Expressionskinetik zu bestimmen. Schließlich sollten chemische Substanzen getestet werden, die einer epigenetischen Inaktivierung der Transgene funktionell entgegenwirken und somit die induzierbare eGFP-Expression verbessern könnten.

Fernziel dieser Arbeit ist die Entwicklung neuartiger episomaler Expressionsvektoren für den Gentransfer in vitro und gegebenenfalls auch für die Molekulare Therapie. Diese Vektoren sollen Transgene auf effizientem und sicherem Wege in menschliche Zellen einbringen und zu einer gezielten Modifikation zellulärer Funktionen führen. Die gezielte Expression eines Fremdgens soll durch ein striktes An- und Abschalten der Genexpression mit Hilfe eines anderweitig inerten Liganden ermöglicht werden.

## 5. Material und Methoden

Hier nicht aufgeführte Reagenzien und Materialien werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

### 5.1. Medien und Puffer

Als Lösungsmittel wurde in der Regel bidestilliertes Wasser verwendet. Die pH-Einstellung erfolgte mit Salzsäure oder Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt).

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
LB-Medium ( <i>Luria-Bertani</i> ), pH7	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10 g/l NaCl	Invitrogen (Carlsbad, USA) Invitrogen J.T. Baker (New Jersey, USA)
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agar	Invitrogen
DMEM high glucose ( <i>Dulbecco's Modified Essential Medium</i> )	4,5 g/l Glukose	Invitrogen
D10	DMEM high glucose 10% FKS (fetales Kälberserum) 0,5% Penicillin (10 U/ $\mu$ l) 0,5% Streptomycin (10 mg/ml) 1% L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen PAA (Coelbe) PAA PAA PAA
D10 C	D10 mit Ciprofloxacin (10 $\mu$ g/ml)	Bayer (Leverkusen)
OptiMEM® ( <i>Minimal Essential Medium</i> )	50% reduzierte Serumkonzentration	Invitrogen
Einfrriermedium ( <i>Bakterien</i> )	50% Glycerin	Gerbu (Wieblingen)
Einfrriermedium ( <i>Zellkultur</i> )	90% FKS 10% DMSO	PAA Invitrogen
PBS ( <i>phosphat buffered saline</i> ), pH 7,2-7,4	136 mM NaCl 1,5 mM KCl 64 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T. Baker J.T. Baker Merck Merck
10% SDS, pH 7 (Na-Dodecylsulfat)	100 g/l SDS	Merck
0,5 M EDTA, pH 8,0	186,1 g/l EDTA	Roth (Karlsruhe)
1 M TRIS/HCl, pH 8,0 (Tris-hydroxymethyl-aminoethan)	121,1g/l TRIS-Base	Roth
10x TBE ( <i>TRIS-Borat-EDTA</i> ), pH 8,0	0,89 mM TRIS/HCl 0,89 mM Borsäure 25 mM EDTA	Merck Roth
6x DNA-Ladepuffer	50% Glycerin 10 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau	Roth Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PCR-Lysepuffer	10x PCR-Puffer (100 $\mu$ l/ml) 10% Tween 20 (50 $\mu$ l/ml) Proteinase K (6 $\mu$ l/ml)	Invitrogen Sigma-Aldrich Invitrogen

## 5.2. Biologische Materialien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> XL-1 blue	recA-defizienter Wirtstamm (Stratagene) transformiert mit Rekombinationsvektor, Resistenz: Kanamycin	Danke, 2010
<i>E. coli</i> GS1783	DH10B [ $\lambda$ cl857 (cro-bioA)<>tet] mit Arabinose-induzierbarer I-SceI, Resistenz: Chloramphenicol	Tischer et al., 2006, 2010
<i>E. coli</i> EL350	DH10B [ $\lambda$ cl857 (cro-bioA)<>araC-P <sub>BAD</sub> Cre] mit Arabinose-induzierbarer Cre-Rekombinase, Resistenz: Chloramphenicol	Lee et al., 2001
HFF ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )	primäre humane Vorhautfibroblasten gewonnen aus den Präputien von bis zu zwei Jahre alten Kindern	
OMK ( <i>owl monkey kidney cells</i> )	epitheliale Nieren-Zelllinie aus dem Nachtaffen <i>Aotus trivirgatus</i> (ATCC, Manassas, VA)	Daniel et al., 1976
HVS WT C488	Herpesvirus saimiri Stamm C488, Wildtyp-Isolat aus dem Totenkopffäffchen ( <i>Saimiri sciureus</i> )	Desrosiers & Falk, 1982
HVS BAC C488	vollständiges Genom von HVS WT C488 mit einer mini-F-Sequenz aus pBeloBAC11 inseriert in ORF14, Resistenz: Chloramphenicol	Toptan, 2010

**Rekombinationsvektoren:** Die Rekombinationsvektoren bestehen aus einer Regulations- und einer Expressionskassette, die durch den *chs4-Insulator* aus dem  $\beta$ -Globingen des Huhns voneinander getrennt sind, sowie einem am rechten Ende gelegenen Kanamycin-Resistenz-Gen, beiderseits flankiert von einer *LoxP*-Sequenz (*lox-neo-lox*). Die Tet-regulierbare Regulationskassette, bestehend aus dem Transaktivator (*rtTA*) und dem Transsilencer (*tTS*), getrennt durch eine IRES-Sequenz, steht unter der Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase-1-Promotors ( $P_{PGK}$ ) und des PGK-1-Terminators ( $T_{PGK}$ ). Die eGFP-Expressionskassette steht unter der Kontrolle der minimalen Promotor-Varianten aus *hCMV* oder *MMTV*, die mit repetitiven Tet-Operatoren (*tetO*) gekoppelt sind und dadurch die eGFP-Expression (*eGFP*) initiieren. Die Termination durch Polyadenylierung wird durch die poly-A-Sequenz aus SV40 (*sv40*) erreicht. Die Rekombinationsvektoren wurden von Christina Danke (Erlangen) in das HVS-Integrationsplasmid (*C-term orf75; lox-neo-lox; N-term orf75*) inseriert (Danke, 2010).

Bezeichnung	Kurzbeschreibung
phCMVgfp	C-Terminus von ORF75; sv40; eGFP; hCMV-Promotor; tetO; chs4-Insulator; $T_{PGK}$ ; tTS; IRES; rtTA; $P_{PGK}$ ; lox-neo-lox; N-Terminus von ORF75
phCMVgfpR	C-Terminus von ORF75; $P_{PGK}$ ; rtTA; IRES; tTS; $T_{PGK}$ ; chs4-Insulator; tetO; hCMV-Promotor; eGFP; sv40; lox-neo-lox; N-Terminus von ORF75
pMMTVgfp	C-Terminus von ORF75; sv40; eGFP; MMTV-Promotor; tetO; chs4-Insulator; $T_{PGK}$ ; tTS; IRES; rtTA; $P_{PGK}$ ; lox-neo-lox; N-Terminus von ORF75
pMMTVgfpR	C-Terminus von ORF75; $P_{PGK}$ ; rtTA; IRES; tTS; $T_{PGK}$ ; chs4-Insulator; tetO; MMTV-Promotor; eGFP; sv40; lox-neo-lox; N-Terminus von ORF75

### 5.3. Oligonukleotide und Restriktionsenzyme

**Oligonukleotid-Primer:** Angegeben ist jeweils zuerst die Bezeichnung, dann die Sequenz (5' → 3') und die Beschreibung und Orientierung (*sense*: s, *antisense*: a; Biomers, Ulm).

Rekombination (Kapitel 6.1., Abb. 6)		
<b>R1</b>	CAG CGC ATG GCT GCA TGG TGT AA GAC CAC GCT ATC TGT GCA AG	orf74, flankiert HR (s) direkt, flankiert HR (a)
<b>R2</b>	CAG CGC ATG GCT GCA TGG TGT AA AGA TGA GGA AGA GGA GAA C	orf74, flankiert HR (s) revers, flankiert HR (a)
Arabinose-Induktion (Kapitel 6.2.D, Abb. 12 und 13)		
<b>Ar1</b>	CTG CTC CCA TTC ATC AGT TC CGA TCA GGA TGA TCT GGA C	kana (s) kana (a)
<b>Ar2</b>	AGA TGA GGA AGA GGA GAA C TGG CTG CTA ACA GGC ATG G	direkt, flankiert loxP (s) orf75, flankiert loxP (a)
<b>Ar3</b>	GAC CAC GCT ATC TGT GCA AG TGG CTG CTA ACA GGC ATG G	revers, flankiert loxP (s) orf75, flankiert loxP (a)
Virusrekonstitution in OMK-Zellen (Kapitel 6.3.A, Abb. 17)		
<b>V1</b>	ACT GCC ACT ACT GCT TGA C TCA GAC AAG AAG TGG GCA ATG	stpC/tip (s) stpC/tip (a)
<b>V2</b>	CAG CGC ATG GCT GCA TGG TGT AA AGG CAC AGT TGA CAA TGT	orf75 (s) orf75 (a)
<b>V3</b>	AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC CTC CCC CTG AAC CTG AAA C	eGFP (s) eGFP (a)
<b>V4</b>	CTG TTC TCC TCT TCC TC CAA AGT ATG ACA GGA AAA AC	tet (a) tet (s)
Transgennachweis aus viraler DNA und BAC-DNA (Kapitel 6.3.A, Abb. 18-20)		
<b>A</b>	ATG CTT TTA GTA GTT TGA GG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC	orf75 (s) eGFP (a)
<b>B</b>	TCA CGA ACT CCA GCA GGA CC AAG AAG GGT GAG AAC AGA G	eGFP (s) pgkT (a)
<b>C</b>	TAT CTA ATC CCA CCC CAC CC CGG CGC TCT GGA ATT ACT CA	pgkT (s) rtTA (a)
<b>D</b>	GCC GGT CGA ACA GCT CAA TT CGA TCA GGA TGA TCT GGA C	rtTA (s) kana (a)
<b>E</b>	CTG CTC CCA TTC ATC AGT TC TGG CTG CTA ACA GGC ATG G	kana (s) orf75 (a)
<b>F</b>	ATG CTT TTA GTA GTT TGA GG GAG CTG CTT AAT GAG GTC GGA A	orf75 (s) tTS (a)
<b>G</b>	GAG CTG CTT AAT GAG GTC GGA A TAT CTA ATC CCA CCC CAC CC	tTS (s) pgkT (a)
<b>H</b>	AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC CGA TCA GGA TGA TCT GGA C	eGFP (s) kana (a)
<b>I</b>	ATG CTT TTA GTA GTT TGA GG GCC GGT CGA ACA GCT CAA TT	orf 75 (s) rtTA (a)

**Sequenzierung und RT-PCR (Kapitel 6.3.B, Abb. 21)**

<b>S1</b>	GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG	GAPDH (s) GAPDH (a)
<b>S2</b>	CGG CGC TCT GGA ATT ACT CA GCC GGT CGA ACA GCT CAA TT	rtTA2s-M2 (s) rtTA2s-M2 (a)
<b>S3</b>	GAG CTG CTT AAT GAG GTC GGA A GCT CTC CAG GCC ATG CAG AA	tTS-PLDLS (s) tTS-PLDLS (a)
<b>S4</b>	AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC CTC CCC CTG AAC CTG AAA C	eGFP (s) eGFP (a)
<b>S5</b>	ACA CAA ACA GTC TTG AAA AAA ATG GC ACT AAT AAA AAG TTC CAC ACA ACT AAC	StpC/Tip (s) StpC/Tip (a)

**Restriktionsenzyme**

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
<b>NotI</b>	GCG GCC GC	Linearisierung des Rekombinationsplasmids, aus <i>Nocardia otitidis caviarum</i>
<b>PstI</b>	CTG CAG	Kontrolle der rekombinanten BACs, aus <i>Providencia stuartii</i>
<b>NcoI</b>	CCA TGG	Kontrolle der rekombinanten BACs, aus <i>Nocardia coralline</i>

**5.4. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software****Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Glasflaschen mit Schraubverschluss (250, 500, 1000 ml)	Schott (Wertheim)
Aqua dest. steril	Delta Select (AlleMan Pharma, Rimbach)
Küvetten (Uvette®)	Eppendorf (Hamburg)
Messpipetten (10 ml, 5 ml, 2 ml)	Greiner (Frickenhäuser)
Messpipetten (25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikropipetten (Research®)	Eppendorf
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
Petrischale (10 cm)	Greiner
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (Biosphere®, 1000, 200, 100, 10 µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Reagenzgefäße (15 ml)	Sarstedt
Reagenzgefäße (50 ml)	Greiner
Sterilfilter Minisart® (0,20 µm)	Sartorius (Göttingen)

**Geräte, wenn nicht im Text beschrieben**

Gerät	Hersteller
PipetBoy acu	IBS (Integra Bioscience, Fernwald)
FireBoy plus	IBS
pH-Meter (Microprocessor pH211)	Hanna (Kehl am Rhein)
Vortexer Genius 3	IKA (Staufen)

**Software**

Programm	Hersteller
Vector NTI	Invitrogen
FCS Express 4 Flow Research Edition	DeNovo (Los Angeles, USA)
BD FACSDiva Software	Becton-Dickinson (Heidelberg)
LAS-3000 Image Reader	Fuji (Tokio, Japan)
OpenOffice.org 4.1.0	Oracle (Redwood Shores, USA)
Corel Draw X5	Corel (Ottawa, Kanada)

**5.5. Methoden der Virologie und Zellbiologie**

**Zellkultur:** Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder in Gewebekultur-Platten (Greiner) bei 37°C oder 32°C in einem Inkubator (HeraCell®, Heraeus, Hanau) bei 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angezüchtet. Das Passagieren der Zellen erfolgte einmal wöchentlich. Dafür wurde die Kultur unter der sterilen Werkbank (HeraSafe®, Heraeus) mit PBS (PAA) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Darmstadt) behandelt, bis sich die adhärennten Zellen vom Boden vollständig ablösten. Daraufhin wurde die Zellsuspension in einer kleinen Menge D10-Medium resuspendiert, auf die Oberfläche der Kulturen im Verhältnis von 1:2 bis 1:3 verteilt und frisches Medium zu den neuen Kulturen gegeben.

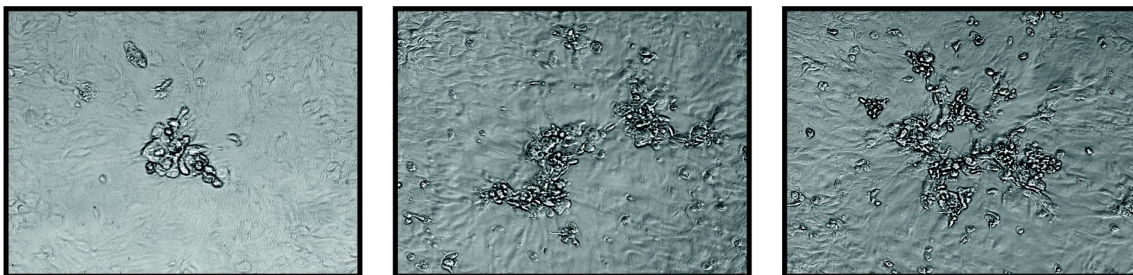
**Einfrieren und Auftauen:** Die Lagerung von Zellkulturen erfolgte bei -80°C. Dazu wurden adhärennte Zellen, wie oben beschrieben, mit Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und in einer kleinen Menge Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation (650x g) für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen, das Sediment in eiskaltem FKS resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte unter Mischen die Zugabe von 10% Volumen DMSO (Biomol, Hamburg), das Portionieren in Kryoröhrchen (Greiner) und die Lagerung bei -80°C (HeraFreeze®, Heraeus). Das schonende Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Die aufgetaute Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:20 mit Medium gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (600x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in frischem Medium resuspendiert.

**Bestimmung der Zellzahl:** Die Zellzahlen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer (Assistent®, Hecht, Altnau, Schweiz) bestimmt. Dafür wurden die Zellsuspensionen mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau (Biochrom) in einem definierten Verhältnis gemischt und auf die mit einem Deckgläschen (Hartenstein, Würzburg) abgedeckte Zählkammer gegeben. Die Zellen in den vier großen Eckquadraten mit je 0,1 µl (1 mm<sup>2</sup>x 0,1 mm) wurden ausgezählt, der Mittelwert gebildet und dieser, unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung, mit dem Faktor 10 multipliziert und somit die Zellzahl pro µl bestimmt.



**Viruskultivierung:** Durch Transfektion permissiver OMK-Zellen mit BAC-DNA wurden rekombinante Viren rekonstituiert. Größere Mengen von Virusüberständen wurden durch Infektion weiterer OMK-Zellkulturen hergestellt. Dazu wurden OMK-Zellen in 175 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen zu einer Konfluenz von 60-80% in D10-Medium am Vortag ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einer geringen Menge Medium und einer Infektionsmultiplizität (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,1 bedeckt, für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit frischem Medium überzogen. Nach kompletter Lyse der Zellen wurde die Suspension bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert (650x g, Multifuge 4KR, Heraeus), der Überstand in Kryoröhrchen portioniert und bei -80°C gelagert.

**Virustitration:** Die Virustitration durch Plaque-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Infektiosität und wird in *plaque forming units* (pfu/ml) angegeben. Dazu wurde eine serielle Verdünnung des Virusüberstands angefertigt und auf permissive OMK-Zellen gegeben. Hierfür wurden je  $4 \times 10^4$  OMK-Zellen in 500 µl D10-Medium in Gewebekulturplatten mit je 24 Kulturgefäßen (24-Well-Platte) am Vortag ausgesät, über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag mit je 100 µl der verdünnten Virussuspension ( $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$ ) infiziert. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurde das Medium vollständig entfernt und durch 1 ml frisches D10-Medium ersetzt. Nach etwa 3 d bildeten sich die ersten cytopathischen Effekte (Plaques) in Form von Gruppen abgekugelter und geschwollener Zellen, die sich im weiteren Verlauf vergrößerten und vom Boden ablösten (Abb. 4). Anhand der letzten Verdünnungsstufe, in der sich Plaques zeigten, wurde der Titer als Mittelwert aus dem Triplikat angegeben. Die Auswertung erfolgte eine Woche nach der Infektion. Die in dieser Arbeit erreichten Virustiter lagen für den HVS-Wildtyp bei  $1 \times 10^5$  pfu/ml, in den unterschiedlichen Konstrukten ergeben sich Titer zwischen  $1 \times 10^3$  bis  $7 \times 10^4$  pfu/ml. Die Bestimmung der Infektiosität einer Virussuspension hat hohe praktische Bedeutung für Transduktionsexperimente: Für vergleichbare Versuchsbedingungen muss die Transduktionsdosis, also die Anzahl infektiöser Partikel verschiedener Viren, auf die Anzahl der zu transduzierenden Zellen angepasst werden. Als Maß dient hier die MOI und wird als Quotient aus den eingesetzten pfu im Verhältnis zu der Anzahl infizierter Zellen angegeben.



**Abb. 4: Infizierte OMK-Zellen mit cytopathischem Effekt.** Drei Tage nach der Infektion (3 dpi) zeigten sich die Zellen abgekugelt (links). Zum Zeitpunkt 5 dpi waren die Plaques in der Kultur deutlich fortgeschritten (Mitte). Nach einer Woche (7 dpi) lösten sich die infizierten Zellen im Plaque-Zentrum vom Boden ab (rechts).

**Transfektion:** Die Transfektion von OMK-Zellen mit Lipofectamin (Invitrogen) diente der Rekonstitution von Herpesviren aus gereinigter BAC-DNA. Zu diesem Zweck wurden ca. 3 µg BAC-DNA (entspricht etwa 1/10 einer Maxi-Präparation, Kap.5.6) in 200 µl OptiMEM und 10-15 µl Lipofectamin mit 200 µl OptiMEM gemischt, für 35-45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend weitere 1,1 ml OptiMEM hinzugefügt. Am Vortag in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesäte OMK-Zellen mit einer Konfluenz von 60-70% (etwa 2,5-5,0x 10<sup>5</sup> Zellen) wurden zweimal mit OptiMEM gewaschen, das Medium anschließend entfernt und die Zellen mit 1,5 ml der Transfektionslösung überzogen. Eine vierstündige Inkubation folgte bei 37°C mit anschließender Zugabe von 1,5 ml D10-Medium, einer erneuten Inkubation über Nacht und Gabe von frischem D10-Medium am nächsten Tag. Nach 4-10 d im Brutschrank bei 37°C wurden die ersten cytopathischen Effekte sichtbar, nach weiteren 7-14 d waren alle Zellen lysiert und die Viren konnten geerntet werden.

**Fluorimetrie:** Die direkte Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der eGFP-exprimierenden primären Fibroblasten erfolgte mit Hilfe eines Fluorimeters (Safire II®, Tecan, Crailsheim). Der Vorteil ist dabei, dass die Zellen ähnlich der Fluoreszenzmikroskopie keiner Vorbehandlung bedürfen und somit eine Verlaufsbeobachtung der vitalen Zellen einfach möglich ist. Die Anregung von eGFP erfolgte bei 483 nm, die Emission wurde bei 525 nm gemessen.

**Durchflusszytometrie:** Mit der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften nach der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen oder wegen zelleigener Expression von Fluorochromen (eGFP) differenziert werden. Dazu passieren die Zellen im Durchflusszytometer (FACSCanto™, Becton-Dickinson, BD, Heidelberg) in einer dünnen Kapillare einen Laser, dessen Licht abhängig von den Zelleigenschaften gestreut wird. Geeignete Detektoren messen die Unterbrechung des Lichtstrahls, die spezifische Streuung sowie die Fluoreszenz und können so Einzelzellen und deren Eigenschaften mit Hilfe geeigneter Software (FACSDiva™) darstellen. Zur Vorbereitung wurden die zu analysierenden Fibroblasten mit PBS gewaschen und mit 500 µl Accutase (PAA) vom Boden der Kulturplatte gelöst. Nach Zugabe von 500 µl D10 und Überführung in ein Reaktionsröhrchen folgte eine Zentrifugation bei 3.000 U/min und 4°C für 5 min (Biofuge fresco®, Hereaus). Anschließend wurde das Sediment in 1 ml kaltem FACS-PBS (5% FKS, 1% Natriumazid (Merck) in PBS) resuspendiert und erneut zentrifugiert (3.000 U/min, 4°C, 5 min). Die Zellen wurden nun in 500 µl FACS-PBS resuspendiert, in Polystyrolröhrchen (Falcon™, BD) überführt und auf Eis zur zeitnahen Messung gelagert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software FCS Express 4 Flow Research Edition (DeNovo, Los Angeles).

## 5.6. Methoden der Molekularbiologie

**Isolation und Reinigung von DNA:** Für die Isolation größerer Mengen BAC-DNA für die Transfektion permissiver OMK Zellen wurde das Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die Gewinnung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA wurde nach der alkalischen Plasmid-Extraktions-Methode durchgeführt (Birnboim & Doly, 1979), bei der hochmolekulare chromosomale DNA denaturiert und ausgefällt wird, während zirkuläre Plasmide in Lösung bleiben und aus dem Überstand gewonnen werden. Dazu wurden Bakterienkulturen in 5 ml Medium (ggf. mit Antibiotikazusatz) bei 32°C, 220 U/min über Nacht inkubiert (Schüttelinkubator Multitron, Infors, Basel, Schweiz) und bei 6.000x g für 10 min zentrifugiert (Multifuge 4KR, Heraeus). Das Sediment wurde in 300 µl Lösung 1 (25 mM TRIS-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A (Fermentas)) resuspendiert. Hierbei wird durch RNase die RNA im Ansatz degradiert und störende Ionen werden über EDTA-Chelatkomplexbildung eliminiert. TRIS-HCl dient als Puffer für die genannte Reaktion. Anschließend wurden 300 µl der Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) hinzugefügt. Dabei alkalisiert NaOH das saure Milieu aus dem vorherigen Schritt und Natriumdodecylsulfat (SDS) dient der denaturierenden Fällung von Proteinen aus dem Ansatz. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µl der Lösung 3 (3 M K-Acetat (Sigma-Aldrich), pH 5,5) zugesetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wird das Präparat erneut angesäuert, so dass Proteine, Zellwandbestandteile und chromosomale DNA unlöslich werden. Nach 10 min Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus) bei 17.000x g und Raumtemperatur wurden 800 µl des Überstands mit 600 µl Isopropanol (Roth) gemischt und erneut für 15 min zentrifugiert. Das so erhaltene DNA-Präzipitat wurde mit 1.000 µl 70% Ethanol (Merck) gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde nach Lufttrocknung in Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

**Agarosegel-Elektrophorese:** Die Agarosegel-Elektrophorese dient dem Auftrennen von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die Fragmente bei angelegtem Gleichstrom von der Kathode zur Anode. Das Laufverhalten der DNA-Moleküle wird dabei abhängig von ihrer Größe und der Konzentration des Agarosegels in spezifischer Weise beeinträchtigt. Durch Ethidiumbromid (Roth) im Gel können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Agarose (Invitrogen) wurde in einem Erlenmeyerkolben (Duran, Schott, Mainz) abgewogen (z.B. 1% Gel für eine mittelgroße Gelkammer: 1,2 g für 120 ml 1x TBE) und durch Erwärmung in dem Puffer gelöst. Nach Zugabe von 4 µl 1% Ethidiumbromid und Abkühlen unter dem Abzug wurde die Kammer (DNA SubCell™, Bio-Rad, München) mit eingestecktem Kamm luftblasenfrei gefüllt und nach vollständigem Erkalten mit 1x TBE-Puffer übergossen. Die mit Ladebuffer versetzte Probe und ein DNA-Größenmarker (150 µl/ml Gene Ruler DNA Ladder (Invitrogen), 50 µl/ml 6x

DNA-Ladepuffer) wurden in die Taschen pipettiert und für ca. 60 min bei 120 V (Spannungsgeber EPS 301, General Electrics) und 400 mA aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (LAS-3000 Image Reader, Fuji). Die Bilder wurden anschließend digital gespeichert oder mit einem Fotodrucker (Fuji) ausgedruckt.

**Polymerasekettenreaktion:** Die PCR dient dem Amplifizieren von DNA-Abschnitten mit Hilfe spezifischer Primer-Oligonukleotide und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die Primer sind kurze DNA-Oligonukleotide (10-25 Nukleotide), die flankierend an die zu amplifizierende DNA-Sequenz binden (*sense* und *antisense* Primer) und so den Start- und Endpunkt für die Synthese des komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase bilden. Für die PCR wurde die DNA initial in dem PCR-Cycler (T3000, Biometra, Göttingen) denaturiert (4 min bei 95°C), darauf folgten 25-30 Zyklen mit aufeinander folgender Denaturierung (30 s, 95°C), Hybridisierung (30 s, 55-60°C, Primer-abhängig) und Synthese (10 min, 72°C). Ein 50 µl PCR-Ansatz für ca. 50-300 ng DNA bestand aus 0,2 mM dNTP Mix (Invitrogen), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1x PCR Puffer (NH<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), 1 Einheit (U) Taq-Polymerase (Fermentas) und je 0,5 µM *sense*- und *antisense*-Primern (Biomers, Ulm). Die Amplifikate wurden anschließend mit der Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht.

**Elution und Quantifizierung von DNA:** Die DNA aus PCR-Produkten wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers gereinigt und bei 4°C gelagert. Zur Quantifizierung der DNA-Menge in dem Eluat wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. An Hand der Bandenstärke im Vergleich zu dem mitgeführten Marker wurde die DNA Menge abgeschätzt.

**Sequenzierung:** Die Sequenzierung von Genabschnitten wurde mit dem Big Dye v1.1 Kit durchgeführt (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt). Für die Sequenzierung eines PCR-Produkts wurden 20-50 ng DNA benötigt, die in einem 10 µl-Ansatz zusammen mit 1 µl BigDye, 1 µl 5x BigDye-Puffer und je 0,5 µM Primern gemischt wurden. Die Sequenzierung erfolgte in einer linearen PCR mit initialer Denaturierung (1 min, 96°C) und dann 24 Zyklen einer Denaturierung (10 s, 95°C), Hybridisierung (5 s, 50°C) und Synthese (4 min, 60°C). Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt, die DNA extrahiert und im Institut für Klinische Molekularbiologie auf Geräten von Applied Biosystems sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Vector NTI Advance 10 Contig express (Invitrogen).

**RNA-Präparation:** Für die Gewinnung der RNA wurden die zu untersuchenden Zellen gewaschen, mit 1 ml Trizol (Invitrogen) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dann folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) und nach kräftigem Mischen eine Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus) bei 13.000 U/min, 4°C für 15 min. Die wässrige Phase wurde anschließend 1:1 mit Isopropanol (Roth) gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die ausgefällte RNA bei 13.000 U/min und 4°C für 15 min

sedimentiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit Zugabe von 1 ml 75% Ethanol (Merck) und erneuter Zentrifugation (12.000 U/min, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt, die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser (1 ml Diethylpyrocarbonat (Merck) in 1 l H<sub>2</sub>O) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

**Entfernung genomischer DNA aus RNA:** Für die Entfernung genomischer DNA aus der präparierten Ribonukleinsäure (RNA) wurde zunächst die RNA-Konzentration photometrisch anhand der optischen Dichte (OD) bei spezifischer Wellenlänge bestimmt (1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml RNA). Dazu wurde die Probe 1:50 mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser verdünnt und anschließend bei 260 nm (RNA und DNA) und 280 nm (Protein) gemessen (Bio-Photometer, Eppendorf). Mit dem OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Quotienten, der zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte, wurde die Reinheit abgeschätzt. Im folgenden Schritt wurden 12-16 µg RNA mit 5 µl 10x Puffer (Roche, Grenzach-Wyhlen), 0,5 µl RNase-freie DNase I (Roche) und 0,5 µl RNase-Inhibitor (Ribo Lock RNase Inhibitor, Fermentas) gemischt, mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte für 10 min bei 75°C. Die gereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

**cDNA-Synthese durch reverse Transkription:** Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden 25 µl der gewonnenen RNA mit 2 µl Primer (Oligo(dT)<sub>18</sub>, Fermentas) und 2 µl 10 mM dNTP-Mix (Fermentas) gemischt, im Thermoblock (Eppendorf) für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Sedimentation wurden 8 µl 5x Transkriptionspuffer (Invitrogen) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen) zugegeben, für 2 min bei 42°C erwärmt, anschließend 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript II RT, 200 U/µl, Invitrogen) hinzugefügt und der Ansatz nach gründlichem Mischen für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min beendet. Der Ansatz wurde bei -20°C gelagert oder für eine PCR weiterverwendet.

**DNA-Präparation aus Virusüberständen:** Zur DNA-Präparation aus Virusüberständen wurde Proteinase K (Roche) verwendet. Dazu wurden 1-2 ml des Virusüberstands für 3 h bei 4°C zentrifugiert (16.000x g, Biofuge fresco, Hareaus). Das Sediment wurde anschließend in 100 µl PCR-Lysepuffer resuspendiert und für 60 min bei 56°C im Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte für 15 min bei 95°C. Die virale DNA wurde bei -20°C gelagert.

**Präparation von DNA-Fragmenten:** Plasmid-tragende Bakterien (XL-1 blue, Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurden am Vortag in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (30 µg/ml, Sigma-Aldrich) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 U/min (Schüttelinkubator Multitron, Infors) inkubiert. Die Extraktion der Plasmide erfolgte mit der alkalischen Plasmid-Extraktions-Methode und wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Dazu wurden 2 µl des Produkts mit jeweils 1 µl NotI und Puffer O (Fermentas) und 6 µl H<sub>2</sub>O

gemischt, für 1-2 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl Ladepuffer auf einem 1% Agarosegel (60 min, 120 V, 400 mA) aufgetrennt. Nach dieser Kontrolle wurden 45 µl des Produkts mit 3 µl NotI, 6 µl Puffer O und 6 µl H<sub>2</sub>O für 4 h bei 37°C inkubiert und die DNA in einem 0,7% Agarosegel (60 min, 120 V, 400 mA) aufgetrennt. Die Bande mit dem enthaltenen Rekombinationsfragment wurde aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eluiert. Die Quantifizierung der DNA-Menge in dem Eluat erfolgte über erneute elektrophoretische Auftrennung einer Teilprobe und dem Vergleich der Bandenstärke mit dem mitgeführten DNA-Größenmarker.

**Herstellung elektrokompetenter Bakterien:** Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* der Stämme GS1783 und EL350 mit dem jeweils vollständigen Genom von HVS als BAC wurden die Bakterien 1:20 in LB-Medium mit Chloramphenicol (30 µg/ml, Sigma-Aldrich) bei 32°C und 220 U/min (Schüttelinkubator Multitron, Infors) inkubiert, bis eine optische Dichte bei 660 nm von 0,5-0,7 erreicht war (Bio-Photometer, Eppendorf). Eine Inkubation für 15 min bei 42°C und 220 U/min folgte im Wasserbad (GLS 400, Grant, Cambridgeshire, UK) mit nachfolgendem Transfer auf Eis und einer Inkubation für 20 min auf dem Laborschüttler. Durch dreimalige Zentrifugation für 5 min bei 0°C und 4.500x g (Biofuge fresco, Hareaus) mit jeweiliger Entfernung des Überstands und Aufnahme der Bakterien in eiskaltem 10% Glycerin (Gerbu) wurden die Bakterien gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in kaltem 10% Glycerin (1:100 des initialen Kulturvolumens) resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden in Kryoröhrchen zu je 50 µl portioniert, in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Transformation durch Elektroporation:** Die Elektroporation wurde zum Einbringen linearisierter DNA in elektrokompetente Bakterienzellen verwendet (Transformation). Dazu wurden zu 50 µl elektrokompetenten *E. coli* 100 ng DNA in eine eiskalte Elektroporationsküvette (BioRad) gegeben und in dem Elektroporator (BioRad) bei 5 kV/cm (entspricht 1,5 kV bei 0,1 cm Wanddicke der Küvette), 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Die transformierten Bakterien wurden danach sofort in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikazusatz gegeben und für 2 h bei 32°C und 220 U/min inkubiert. Anschließend wurden 100-150 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin (jeweils 30 µg/ml) mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und für 2 d bei 32°C inkubiert. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte unter Verschluss mit Parafilm® (Brand, Wertheim) bei 4°C.

**Selektion transformierter Bakterien:** Für die Selektion erfolgreich elektroporierter *E. coli* wurde nach großen und runden Kolonien gesucht. Kleine Kolonien könnten aufgrund lokalem Antibiotikaverbrauchs gewachsen, ohne transformiert worden zu sein. Bei nicht runden Kolonien könnte es sich um Mischkulturen handeln. Die ausgewählten Klone wurden

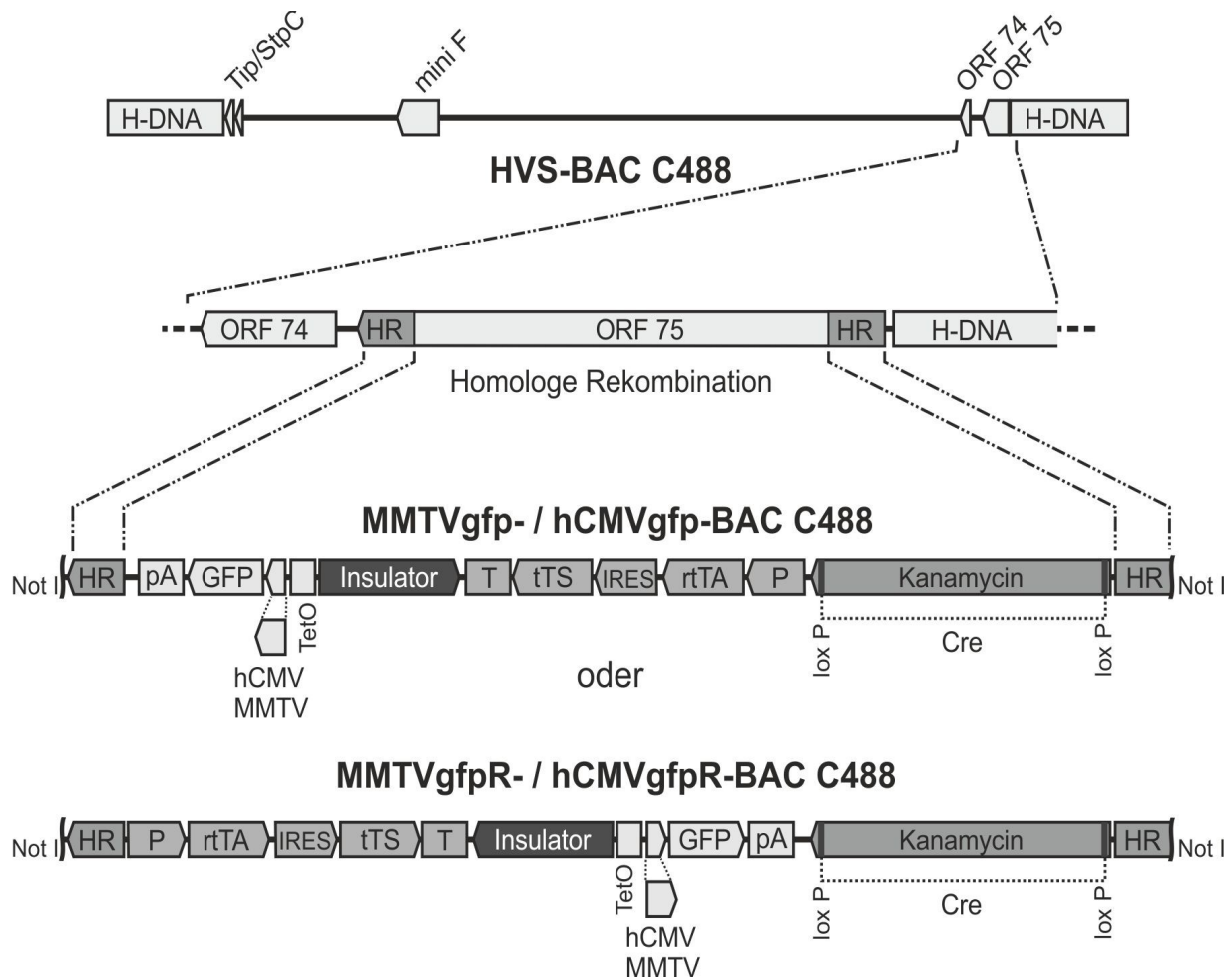
strichförmig auf einer neuen Agarplatte mit geeignetem Antibiotikazusatz ausgestrichen. Gleichzeitig wurde eine PCR mit Primern angesetzt, welche die für die homologe Rekombination benötigte Homologieregion (HR) flankieren und dabei einerseits das inserierte Transgen und andererseits das Virusgenom (Bereich *orf75*) binden.

**Arabinose-vermittelte Expression der Cre-Rekombinase:** Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgte über die Arabinose-vermittelte Induktion in transformierten *E. coli* EL350. Das Enzym erkennt die LoxP-Sequenzen, welche die Kanamycin-Resistenzkassette flankieren und entfernt die Resistenzkassette unter Zurücklassen einer einzigen LoxP-Sequenz an der Schnittstelle (Lee et al., 2001). Zu diesem Zweck wurden 100 µl der BAC-tragenden EL350-Suspension in 2 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (15 µg/ml) bei 32°C und 220 U/min bis zu einer OD von 0,5 inkubiert und nachfolgend 2 ml 1% L(+)-Arabinose (Roth) in LB-Medium ohne Antibiotikum zugesetzt. Nach 60 min Inkubation bei 32°C und 220 U/min im Schüttelwasserbad wurden 200 µl der Bakteriensuspension in 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum und Arabinose inokuliert und für weitere 90-120 min bei 32°C und 220 U/min inkubiert, bis eine Trübung sichtbar wurde. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (15 µg/ml) ausgestrichen, für 2 d bei 32°C inkubiert, danach mit Parafilm® luftdicht verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Eine nachfolgende Kolonie-PCR wurde zur Kontrolle der korrekten Entfernung der Kanamycin-Kassette durchgeführt. Anschließend erfolgte die Virusrekonstitution in permissiven OMK-Zellen nach Plasmid-Extraktion und Transfektion.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Herstellung rekombinanter Virusmutanten

Für die Generierung von HVS-Mutanten mit Tet-regulierter Genexpression wurden komplexe Transgenkassetten aus Rekombinationsvektoren (Kapitel 3.4., 5.2.) durch Red-vermittelte homologe Rekombination in das vollständige Genom von HVS C488 inseriert (Abb. 5), das in klonierter Form als WT BAC C488 in *E. coli* GS1783 zur Verfügung stand.



**Abb. 5: Generierung von Herpesvirus-saimiri-BAC-Mutanten durch Red-vermittelte homologe Rekombination.** Gezeigt ist das vollständige Genom von HVS C488 als BAC (oben), mit mini-F Sequenz aus pBeloBAC11 in der *orf14*-Position (Kap. 3.1., Abb. 2). *orf75* mit seinen flankierenden Homologieregionen (HR) ist als Ausschnitt vergrößert dargestellt. Durch Red-vermittelte homologe Rekombination werden die mit NotI linearisierten Konstrukte über die HR in *orf75* integriert. Die Konstrukte bestehen aus einem Kanamycin-Resistenz-Gen sowie aus einer Regulations- und Expressionskassette, die über einen *chs4*-Insulator des Hühner- $\beta$ -Globin-Gens voneinander getrennt sind. Die Regulationskassette besteht aus dem reversen Tet-regulierbaren Transaktivator (rtTA) und dem Tet-regulierbaren Transsilencer (tTS), getrennt durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), und steht unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (P) und des entsprechenden Terminationssignals (T). Die eGFP-Expressionskassette (GFP) steht unter der Kontrolle des hCMV- oder des MMTV-Minimalpromotors, an den repetitive Tet-Operatoren (TetO) gebunden sind. Die eGFP-Transkription wird durch ein SV40-Terminationssignal beendet (pA). Die Kanamycin-Resistenzkassette wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert, die es der Cre-Rekombinase ermöglichen, die Resistenzkassette unter Zurücklassen einer einzigen LoxP-Sequenz zu entfernen. Durch unterschiedliche Kombination der Minimalpromotoren sowie der Anordnung der Transgenkassette resultierten vier verschiedene HVS-Mutanten: MMTVgfp- bzw. hCMVgfp-BAC C488 mit der Transgenkassette in direkter Orientierung und MMTVgfpR- bzw. hCMVgfpR-BAC C488 in revers orientierter Anordnung.

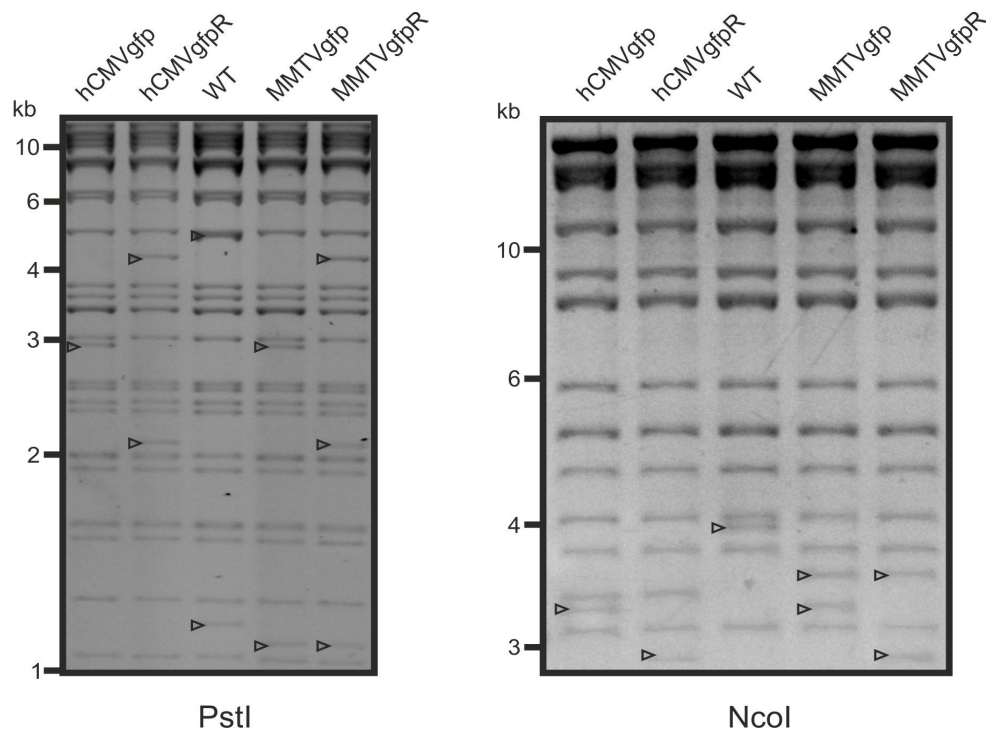


Das Rekombinationsplasmid wurde zuerst über alkalische Extraktion aus *E. coli* XL-1 blue präpariert und nach Kontrolle und DNA-Quantifizierung mit NotI linearisiert, damit das gereinigte lineare Rekombinationsfragment durch Elektroporation in die zuvor elektrokompetent gemachten *E. coli* GS1783 eingebracht werden konnte (Kapitel 5.6.). Die homologe Rekombination wurde in den HVS BAC C488-tragenden GS1783-Bakterien, die das Rekombinationssystem Red des Bakteriophagen  $\lambda$  enthalten, durch Aktivierung des thermosensiblen Promotors bei 42°C induziert, der daraufhin die Expression der Gene *exo*, *beta* und *gam* ermöglicht. Die Exonuklease Exo baut Nukleotide vom 5'-Ende der dsDNA ab und lässt am 3'-Ende einen Einzelstrang stehen. Beta bindet die ssDNA, schützt sie vor dem Abbau durch Nukleasen und unterstützt die Anlagerung homologer Sequenzen. Gam hemmt das RecBCD-System von *E. coli*, das lineare DNA abbaut. Somit ermöglichen diese Proteine gemeinsam die Rekombination von dsDNA über homologe Sequenzen (Yu et al., 2000). Die erhaltenen Bakterien wurden über deren Chloramphenicol- und Kanamycin-Resistenz und durch die Kontrolle über eine Kolonie-PCR mit spezifischen Primerpaaren (R1, R2, Kapitel 5.3.) ausgewählt, welche die für die Rekombination benötigte Homologieregion flankieren und dabei Sequenzen der Transgenkassette und der HVS BAC C488 DNA binden (Abb. 6). Die erfolgreiche Rekombination wurde durch den Verdau mit den Restriktionsendonukleasen PstI und NcoI und deren typisches Bandenmuster bestätigt (Abb. 7).



**Abb. 6: Kolonie-PCR aus rekombinanten BACs.** Die gewählten Primer flankieren die Homologieregion HR und bestätigen die korrekte Insertion der Transgenkassette in HVS BAC C488. Oben: schematische Darstellung, unten: PCR-Produkt. M: Marker, 1-7: Klone rekombinanter BACs, H<sub>2</sub>O: Kontrolle.

Die Rekonstitution der Virusmutanten erfolgte in den für HVS permissiven OMK-Zellen. Für die Transfektion der OMK-Zellen wurde eine relativ große Menge BAC-DNA benötigt, die durch Maxi-Präparation hergestellt wurde (Kap. 5.6.). Die so erhaltene BAC-DNA wurde mit Lipofectamin in die OMK-Zellen eingebracht. Nach 4-10 d bei 37°C wurden die ersten cytopathischen Effekte sichtbar, nach weiteren 7-14 d waren alle Zellen lysiert und die Virusmutanten konnten nach vorsichtiger Zentrifugation aus dem Überstand gewonnen werden (Kapitel 5.5.).



**Abb. 7: BAC-DNA-Verdau der rekombinanten Virusmutanten und des Wildtyps mit Restriktionsendonukleasen.** Das typische Bandenmuster lässt den Wildtyp und die korrekte Insertion der Transgenkassetten erkennen. Spezifische Banden der einzelnen Klone sind mit Pfeilspitzen markiert.

Mit dem Ziel, höhere Virustiter zu erreichen, wurde die Inkubation auch bei 32°C durchgeführt. Die vollständige Lyse verzögerte sich dabei um etwa 1-2 d, führte aber zu keinem relevanten Vorteil bezogen auf die Infektiosität der gewonnenen Viren (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur Bestimmung der Infektiosität der einzelnen Viren wurde eine serielle Verdünnung des Virusüberstands hergestellt. Damit wurden OMK-Zellen infiziert und der Titer als pfu/ml bestimmt (Kapitel 5.5.). Ein Kontroll-Verdau der DNA aus dem Virusüberstand mit Restriktionsendonukleasen nach Behandlung mit Proteinase K bestätigte die erfolgreiche Rekonstitution der Virusmutanten in OMK-Zellen (Kapitel 5.6.). Somit konnte gezeigt werden, dass die Rekombinationssequenz erfolgreich über Red-vermittelte Rekombination in das HVS-Wildtyp-BAC eingebracht werden konnte. Weiterhin gelang nach Präparation der mutierten HVS-BAC-DNA die Transfektion der permissiven OMK-Zellen, die zur Gewinnung rekombinanter HVS-Virusmutanten führte. Diese zeigten eine normale Infektiosität, die nach sequentieller Verdünnung quantifiziert werden konnte.

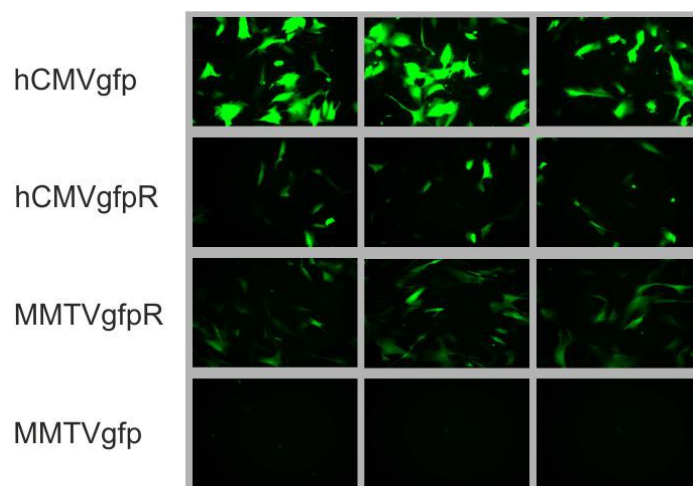
## 6.2. Transgenexpression in primären Fibroblasten

Primäre humane Fibroblasten, die mit rekombinanten Virusmutanten transduziert wurden, sollten durch die Tet-regulierbare Expressionskassette unter Dox-Induktion eGFP exprimieren. In den folgenden Versuchsreihen wurden die unterschiedlichen Virusvektoren,

deren Expressionskinetiken sowie verschiedene Transduktionsstrategien in Hinblick auf die eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten miteinander verglichen.

#### A) Vergleich der eGFP-Expression in Fibroblasten durch verschiedene Virusmutanten

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, konnten in dieser Arbeit vier verschiedene Virusmutanten durch Red-vermittelte Rekombination hergestellt werden. Hierfür wurden entweder der hCMV- oder der MMTV-Minimalpromotor verwendet. Die Transgenkassetten wurden zudem entweder in direkter oder in reverser Anordnung rekombiniert. Diese vier Konstrukte, hCMVgfp, hCMVgfpR, MMTVgfpR und MMTVgfp, wurden in Hinsicht auf ihre eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten untersucht. Für diese Versuche wurden jeweils am Vortag  $2 \times 10^4$  Fibroblasten in 24-Well-Gewebekultur-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit den verschiedenen Virusmutanten mit einer MOI = 1 transduziert. Die Dox-Induktion erfolgte am nächsten Tag mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Dox. Das Resultat wurde nach 48 h dokumentiert (Abb. 8).

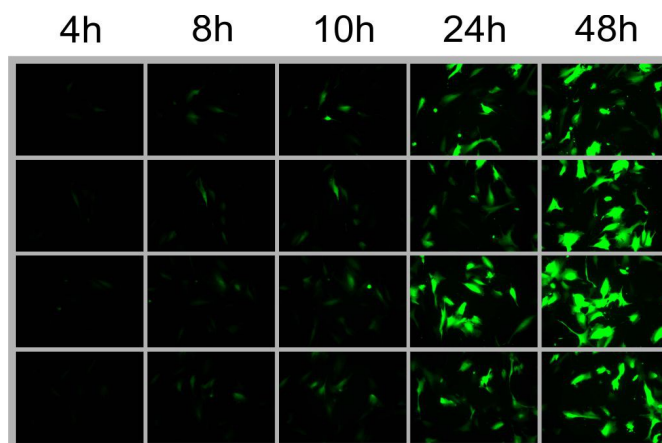


**Abb. 8: Vergleich der vier verschiedenen Viruskonstrukte 48 Stunden nach der Doxycyclin-Induktion.** Die Transduktion der primären humanen Fibroblasten erfolgte einen Tag vor Induktion (MOI = 1). Gezeigt sind hier die deutlichen Unterschiede der eGFP-Expression in Fibroblasten, abhängig von dem verwendeten Promotor sowie der Anordnung der Transgenkassette.

Der Einfluss des verwendeten Promotors sowie die Anordnung der Transgenkassette auf die eGFP-Expression wird hier deutlich. Die stärkste Expression konnte mit dem hCMV-Promotor insbesondere in direkter Anordnung erzielt werden. Wurde die reverse Anordnung gewählt, war die eGFP-Expression deutlich geringer ausgeprägt. Unter Verwendung des MMTV-Promotors, bei insgesamt geringerer Expression, waren die Beobachtungen entgegengesetzt: Die Transgenkassette in reverser Anordnung erbrachte gute Expressionsergebnisse, wohingegen mit dem selben Promotor und Verwendung der Transgenkassette in direkter Anordnung kaum eine Expression dokumentiert werden konnte.

### B) Kinetik der eGFP-Expression nach Doxycyclin-Induktion

Zur Dokumentation der Kinetik der eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten wurden dieselben Bedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen verwendet. Wie zu erwarten, war auch hier die stärkste Expression unter Verwendung des hCMVgfp-Konstrukts zu beobachten. Aufgrund dessen wurden die Ergebnisse mit diesem Konstrukt exemplarisch zur Dokumentation der Expressionskinetik ausgewählt (Abb. 9). Der zeitliche Verlauf konnte vergleichbar in allen untersuchten Konstrukten beobachtet werden.



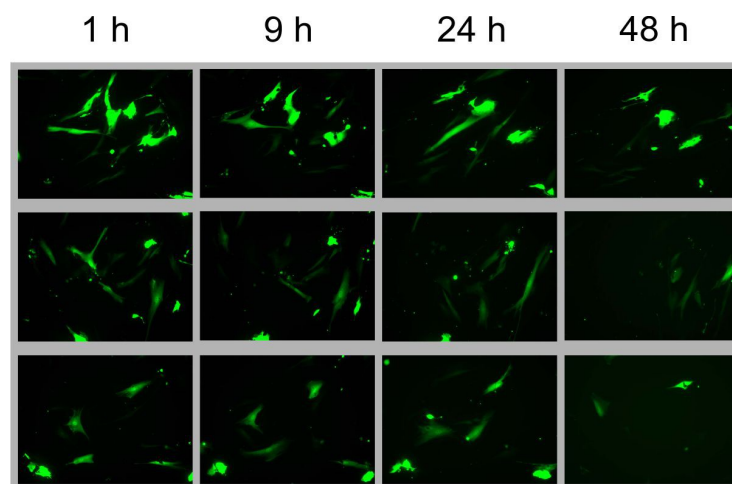
**Abb. 9: Induktion der eGFP-Expression durch Doxycyclin.** Dargestellt ist die Induktion der eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten durch Dox (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) unter Verwendung von hCMVgfp (MOI = 1) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die vier Zeilen entsprechen jeweils demselben Bereich in der untersuchten Gewebekulturplatte. Die Verwendung der anderen Konstrukte erbrachte einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf mit insgesamt schwächerer eGFP-Expression (Abb. 8).

Bereits 2 h nach Dox-Induktion konnten vereinzelt die ersten eGFP-exprimierenden Zellen mikroskopisch beobachtet werden (nicht dargestellt). Nach 8 h konnten die Signale mit der gewählten Kamera-Einstellung dokumentiert werden. Das Expressionsmaximum wurde nach ca. 48 h erreicht. Bei längerer Beobachtung blieben die Signale konstant, bis es nach ca. einer Woche zu einem langsamen Verlust der Expression kam.

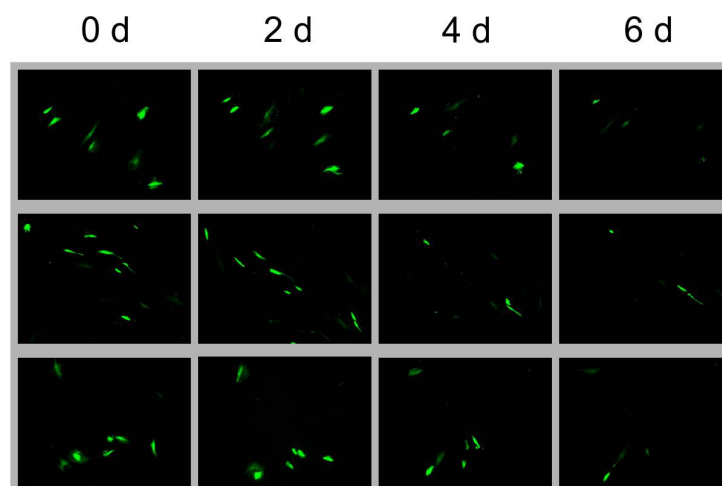
### C) Kinetik der eGFP-Expression bei Doxycyclin-Entzug

Zur Untersuchung der Expressionskinetik nach Entfernung von Dox aus dem System wurden die primären humanen Fibroblasten unter denselben Bedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen ausgesät, transduziert und mit derselben Dox-Konzentration induziert. Die Zellen wurden für eine Woche in Dox-haltigem Medium gehalten und anschließend wurde Dox durch tägliches Waschen aus dem System entfernt (Abb. 10, 11).

Bereits nach 2 d war mikroskopisch eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz zu beobachten, nach etwa 6 d waren nur noch vereinzelt eGFP-exprimierende Zellen sichtbar (Abb. 11) und nach 14 d war die eGFP-Expression mikroskopisch nicht mehr nachweisbar (nicht dargestellt).



**Abb. 10: eGFP-Expression nach Doxycyclin-Entzug innerhalb der ersten 48 Stunden.** Dargestellt sind primäre humane Fibroblasten, die zuvor für eine Woche GFP exprimierten und denen anschließend, durch täglichen Wechsel des Mediums Dox aus dem System entzogen wurde. Jede Zeile der Abb. entspricht jeweils demselben Bereich in der untersuchten Gewebekultur.

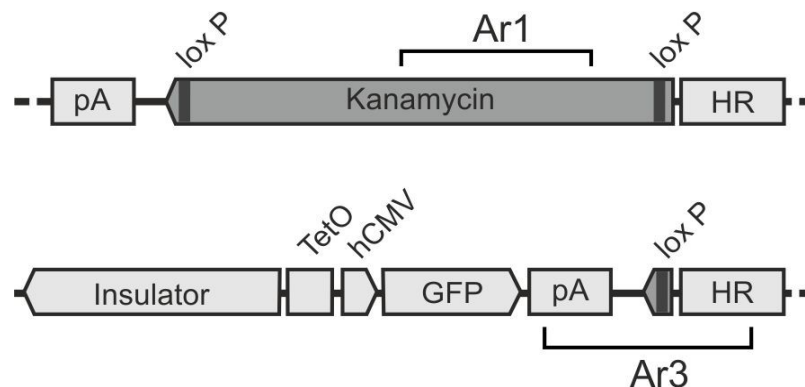


**Abb. 11: eGFP-Expression nach Doxycyclin-Entzug innerhalb der ersten sechs Tage.** Primäre humane Fibroblasten wurden unter denselben Bedingungen wie in Abb.10 innerhalb der ersten 6 d nach Dox-Entzug kultiviert. Jede Zeile der Abb. entspricht jeweils demselben Bereich in der untersuchten Gewebekultur.

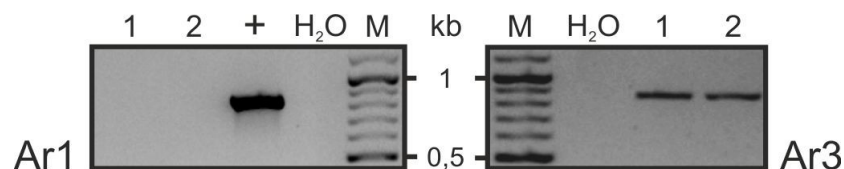
Einschränkend sei hier erwähnt, dass es auch ohne Dox-Entzug nach ca. einer Woche zu einem gewissen Expressionsverlust in den untersuchten Zellkulturen kam (Kapitel 6.2.B). Somit könnten die gemachten Beobachtungen, zumindest teilweise, auch auf einen natürlichen Expressionsverlust zurückzuführen sein. Damit eine bessere Aussage über die Auswirkungen eines Dox-Entzugs auf die eGFP-Expression in transduzierten und induzierten Fibroblasten möglich wird, sollten weiterführende Versuchsanordnungen dies berücksichtigen. Entsprechend könnte der Entzug z.B. 2 d nach Dox-Induktion begonnen werden. Dennoch konnte aber in dieser Versuchsanordnung beobachtet werden, dass der Dox-Entzug aus dem System zu einem schnelleren Expressionsverlust führte als in den mitgeführten Kontrollen ohne Dox-Entzug (nicht dargestellt).

### D) Einfluss einer deletierten Kanamycin-Kassette auf die eGFP-Expression

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe hatte es sich gezeigt, dass bessere Ergebnisse bei der Virusrekonstitution und der eGFP-Expression erreicht werden können, wenn die inserierten Sequenzen auf ein Minimum reduziert werden. Da die Kanamycin-Resistenzkassette nur als Marker zur Selektion der Rekombinationsprodukte dient, ist die Entfernung dieser Sequenz nach erfolgreicher Selektion anzustreben. Die Kanamycin-Kassette wird beiderseits durch LoxP-Sequenzen flankiert, die es der Cre-Rekombinase ermöglichen, die vollständige Kassette zu entfernen, so dass nur noch eine einzige LoxP-Sequenz zurück bleibt (Abb. 12). In *E. coli* EL350 [araC-P<sub>BAD</sub>Cre] steht die Cre-Rekombinase in Arabinose-induzierbarer Form zur Verfügung. Zu diesem Zweck wurde eine alkalische Plasmid-Extraktion der rekombinanten BACs aus *E. coli* GS1783 durchgeführt und die so erhaltene BAC-DNA in zuvor elektrokompent gemachte *E. coli* EL350 elektroporiert. Nach Kontrolle und Selektion der transformierten Bakterien erfolgte die Arabinose-Induktion (Kapitel 5.6.). BAC-Varianten ohne Kanamycin-Resistenz wurden durch Kolonie-PCR mit spezifischen Primerpaaren identifiziert (Abb. 12, 13; Kapitel 5.3) und mit dem Zusatz  $\Delta K$  (deletierte Kanamycin-Kassette) bezeichnet.

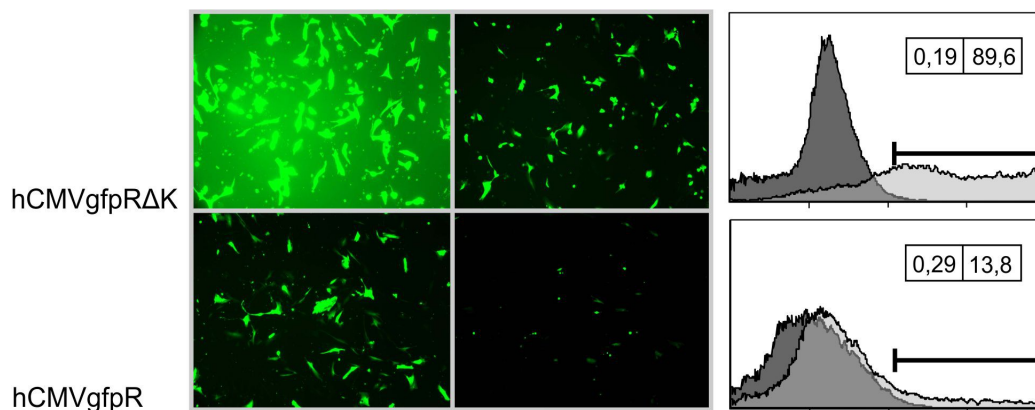


**Abb. 12: Entfernung der Kanamycin-Kassette durch die Cre-Rekombinase** (hier beispielhaft für das Konstrukt hCMVgfpR dargestellt). Oben ist die Kanamycin-Kassette mit beiderseits flankierenden LoxP-Sequenzen schematisch dargestellt. Nach erfolgreicher Arabinose-vermittelter Induktion der Cre-Rekombinase wird die Kanamycin-Kassette unter Zurückbleiben einer einzigen LoxP-Sequenz entfernt, wobei hCMVgfpR $\Delta K$  entsteht (unten). Ar1 und Ar3: verwendete Primerpaare (Kapitel 5.3).



**Abb. 13: Kontroll-PCR nach Arabinose-vermittelter Induktion der Cre-Rekombinase.** Primerpaar Ar1 bindet nur bei der Positivkontrolle (+), Primerpaar Ar3 bestätigt die erfolgreiche Entfernung der Kanamycin-Kassette bei den Klonen 1 und 2 (Abb. 12). M: Marker, H<sub>2</sub>O: Kontrolle.





**Abb. 14: Mikroskopischer und durchflusszytometrischer Vergleich von hCMVgfpR mit und ohne Kanamycin-Kassette.** Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder (3 dpi) zeigen die beiden Konstrukte nach Dox-Induktion jeweils mit denselben Belichtungseinstellungen. Aufgrund der starken Überstrahlung des  $\Delta K$ -Konstruktes (oben links) wurde in der zweiten Spalte die Belichtung angepasst. Die rechte Spalte zeigt die entsprechende durchflusszytometrische Auswertung. Auf der Ordinate ist die Zellzahl, auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die einzelnen Kurven zeigen die transduzierten Fibroblasten nach Dox-Induktion (hellgrau) und ohne Induktion (dunkelgrau). Die Zahlen geben die prozentuale Verteilung eGFP-exprimierender Zellen innerhalb des Markerbereiches (schwarzer Balken) an: links ohne Dox-Induktion, rechts nach Induktion. Deutlich zu erkennen ist eine ausgeprägte eGFP-Expression in den hCMVgfpR $\Delta K$ -transduzierten Fibroblasten (89,6%) im Vergleich zu den Zellen, die mit dem unveränderten Konstrukt (hCMVgfpR) transduziert wurden (13,8%). Die zusätzlich angegebenen Zahlen können als *leakiness* des Systems interpretiert werden. Zwischen den beiden Konstrukten bestand kein wesentlicher Unterschied.

Da die rekombinanten BACs nun auch ohne Kanamycin-Resistenzkassette zur Verfügung standen, wurden diese Virusvektoren durch Transfektion in permissive OMK-Zellen rekonstituiert (Kapitel 5.5). Hier soll der Vergleich von hCMVgfpR mit und ohne Kanamycin-Kassette dargestellt werden. Für diesen Versuch wurden primäre Fibroblasten mit hCMVgfpR einmal mit deletierter Kanamycin-Kassette (Titer  $3 \times 10^3$  pfu/ml) und zum Vergleich mit erhaltener Resistenzkassette (Titer  $7 \times 10^4$  pfu/ml) mit einer MOI = 0,02 nach der *über Nacht*-Methode (Kapitel 6.2.E) transduziert und mit der Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie ausgewertet (Abb. 14). Die Deletion der Kanamycin-Kassette führte zu einer deutlichen Zunahme der eGFP-Expression in transduzierten primären humanen Fibroblasten. Dies wurde zunächst in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen deutlich, konnte aber auch durchflusszytometrisch verifiziert werden. In der dargestellten Versuchsanordnung exprimierten 89,6% der transduzierten Fibroblasten innerhalb des Markerbereiches (*gating*) eGFP, wenn das Konstrukt mit deletierter Kanamycin-Kassette verwendet wurde. Im Vergleich dazu exprimierten nur 13,8% der Fibroblasten eGFP, wenn das unveränderte Konstrukt eingesetzt wurde. Eine geringgradige *leakiness*, also eine eGFP-Expression bei Zellen, die nicht mit Dox-induziert wurden, wurde beobachtet, wobei sich allerdings kein wesentlicher Unterschied bei den beiden Konstrukten ableiten ließ. In der eben beschriebenen Versuchsanordnung wurde das Konstrukt hCMVgfpR exemplarisch gewählt, da hiermit gute Expressionsergebnisse erreicht werden konnten (Kapitel 6.2.A). Aus den

anderen Konstrukten wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Kanamycin-Kassette deletiert. Diese Konstrukte zeigten vergleichbare Ergebnisse (nicht dargestellt).

### E) Einfluss unterschiedlicher Transduktionsbedingungen auf die eGFP-Expression

Drei verschiedene Strategien wurden verfolgt, damit die optimalen Bedingungen für eine effiziente eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten definiert werden konnten. Hierzu wurden die folgenden Transduktionsbedingungen (Tab. 2) mit identischer Zellzahl und Infektionsmultiplizität verglichen:

A) Aussäen der Zellen in einer Gewebekulturplatte am Vortag und Transduktion der sedimentierten Zellen für 2 h bei 37°C und nachfolgender Entfernung des Überstands am **nächsten Tag**.

B) Transduktion der Zellen durch Zentrifugation (1.500 U/min) bei 26°C für 90 min in einem Reagenzgefäß mit anschließender Entfernung des Überstands und Aussäen der Zellen in einer Gewebekulturplatte (**Spinokulation**).

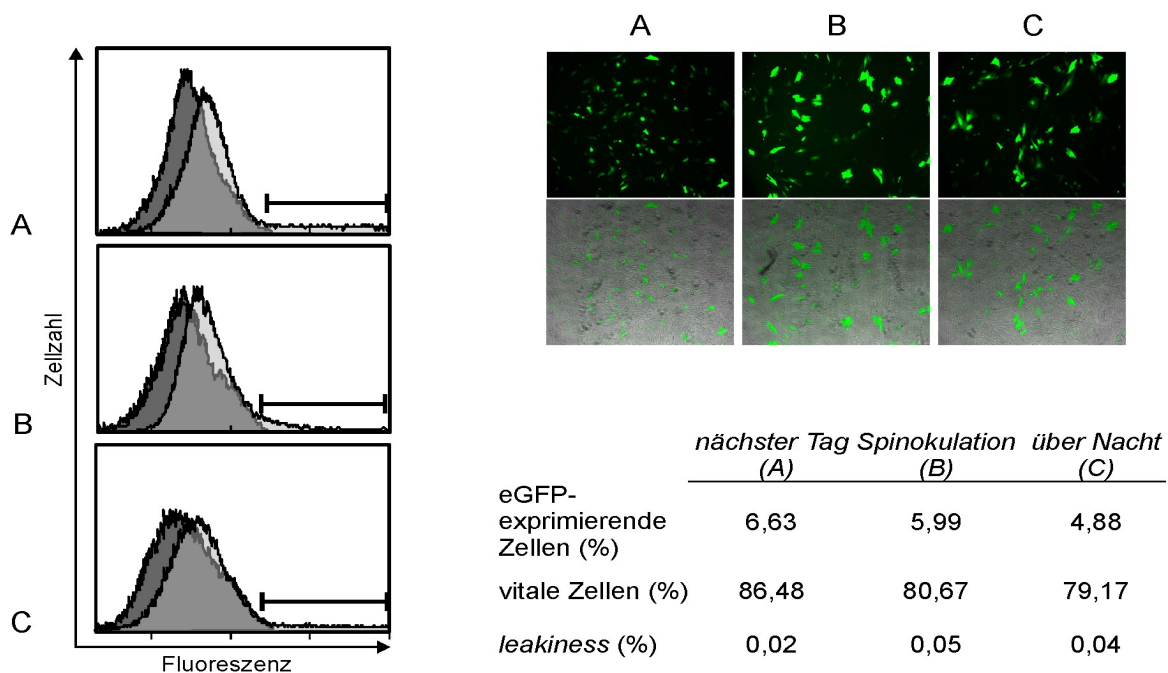
C) Sofortige Inkubation der Zellen mit dem Virusüberstand für 2 h bei 37°C in einem Reagenzgefäß mit anschließendem Aussäen in einer Gewebekulturplatte und fortgeführter Inkubation **über Nacht** für weitere 24 h im Brutschrank.

Parameter/Prozedur	A) nächster Tag	B) Spinokulation	C) über Nacht
Zeitpunkt	nächster Tag	selber Tag	selber Tag
Dauer	2 h	90 min	2 h plus 24 h
Temperatur	37°C	26°C	37°C
Dox-Induktion	selber Tag	nächster Tag	nächster Tag
Besonderheiten	Transduktion der bereits adhärenen Zellen	Zentrifugation der Zellen zusammen mit dem Virusüberstand	Während der Transduktion Sedimentation der Zellen zusammen mit dem Virusüberstand

**Tab. 2: Transduktionsbedingungen für primäre Fibroblasten mit rekombinanten Virusmutanten.**

Für die folgenden Experimente wurde das Konstrukt mit dem hCMV-Promotor in reverser Orientierung und deletierter Kanamycin-Kassette verwendet (hCMVgfpRΔK), da mit diesem Konstrukt gute Expressionsergebnisse erzielt worden waren (Kapitel 6.2.A). Bei den folgenden Versuchen wurde besonders die Anzahl der eGFP-exprimierenden Zellen, aber auch der Zellverlust und die Hintergrundexpression der einzelnen Methoden miteinander verglichen. Für die erste Versuchsreihe wurde das Konstrukt hCMVgfpRΔK und die MOI = 0,01 gewählt. Jeweils  $2 \times 10^5$  Fibroblasten wurden nach den unterschiedlichen Methoden transduziert (Tab. 2). Der eine Teil der Kulturen wurde mit Dox induziert, der andere Teil wurde nicht induziert. Zusätzlich wurden unter denselben Bedingungen Mock-Kontrollen mitgeführt.





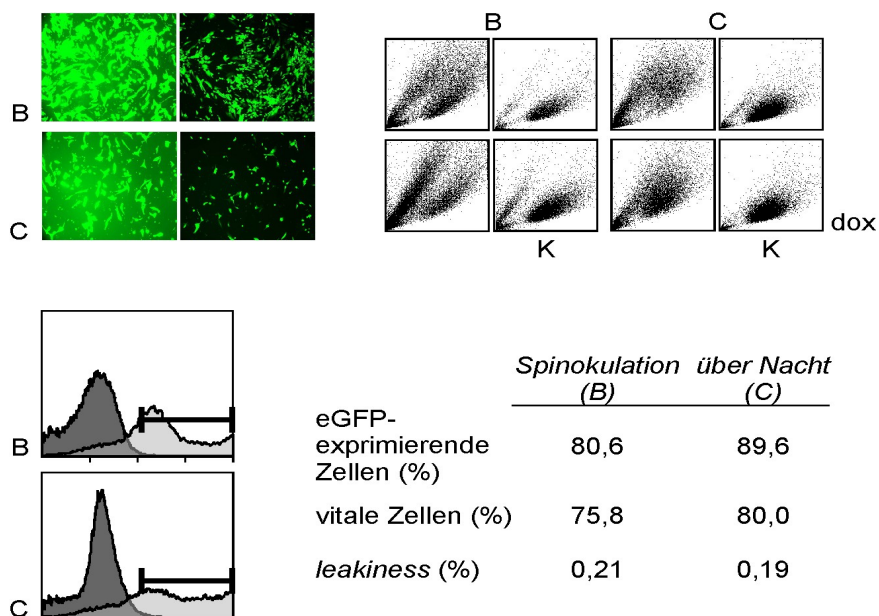
**Abb. 15: Vergleich der Transduktionsbedingungen.** A: *nächster Tag*, B: *Spinokulation*, C: *über Nacht*. Fluoreszenzmikroskopisch (oben rechts) zeigte sich 6 dpi bei Methode A eine gleichmäßige, wenn auch weniger intensive eGFP-Expression bei dichtem Zellrasen in der überlagerten Aufnahme. Die Methoden B und C erreichten eine stärkere Expression als Variante A bei sichtbaren Zellverlusten in der überlagerten Aufnahme mit weniger dichtem Zellrasen und atypischen, deformierten Zellen. In der durchflusszytometrischen Auswertung (links) ist die Anzahl vitaler Zellen (*gating*) bei unterschiedlichen Transduktionsbedingungen sowie der Anteil eGFP-exprimierender Zellen im Markerbereich ohne (dunkel grau) und mit (hellgrau) Dox-Induktion dargestellt. Die Tab. (rechts unten) stellt die gemessenen Parameter bei den verschiedenen Transduktionsmethoden zusammen.

Innerhalb der ersten Tage zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch die stärkste eGFP-Expression bei der Methode B (*Spinokulation*), gefolgt von Methode C (*über Nacht*). Die geringste Expression ließ sich bei Methode A (*nächster Tag*) feststellen. Diese Beobachtungen sowie die durchflusszytometrische Auswertung sind 6 d nach der Transduktion in Abb. 15 dargestellt, wobei nach 6 d in allen Ansätzen bereits ein deutlicher Expressionsverlust zu beobachten war. Wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht, fielen bei der *Spinokulation* (B) und der *über Nacht*-Methode (C) deformierte Zellen sowie ein weniger dichter Zellrasen im Vergleich zu Methode A (*nächster Tag*) auf (Abb. 15, oben rechts).

Zur Quantifizierung der Beobachtungen wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Durch *gating* wurden nur die vitalen Zellen erfasst. Die eGFP-Expression wurde über den Fluoresceinisothiocyanat-Kanal gemessen (Abb. 15, links und Tab. unten rechts). Grenzte man die Auswertung durch *gating* auf vitale Zellen ein, zeigte sich ein von den mikroskopischen Ergebnissen abweichendes Ergebnis: die besten Expressionsergebnisse wurden bei Methode A (*nächster Tag*) mit 6,63% eGFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zu B (5,99%) und C (4,88%) beobachtet. Ebenfalls war der Anteil vitaler Zellen bei A am

größten (86,48%) im Vergleich zu B (80,67%) und C (79,17%), was für A als schonendste Methode mit den geringsten Zellverlusten sprach. Betrachtete man die *leakiness* des Systems, also den Anteil eGFP-exprimierender Zellen ohne Dox-Induktion, zeigten sich die Methoden B und C nahezu vergleichbar, wobei Methode A das beste Ergebnis mit nur 0,02% aufwies.

In einer weiteren Versuchsreihe sollten die beiden Methoden *Spinokulation* und *über Nacht* näher untersucht werden, da die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuchsaufbau vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Expressionsraten, dem Anteil vitaler Zellen sowie der Hintergrundexpression (*leakiness*) erbrachten. Hierfür wurden Fibroblasten ebenfalls mit dem Konstrukt hCMVgfpRΔK transduziert, wobei in diesem Versuch eine MOI = 0,02 gewählt wurde. Entsprechend dem eben beschriebenen Versuch wurde ein Teil Dox induziert, der andere nicht. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Mock-Zellen unter denselben Bedingungen mitgeführt. Die Auswertung dieser Versuchsanordnung erfolgte bereits am dritten Tag nach der Infektion (Abb. 16).



**Abb. 16: Vergleich der Transduktionsbedingungen *Spinokulation* (B) und *über Nacht* (C).** Fluoreszenzmikroskopisch (*oben links*) zeigte sich bei Methode B nach 3 dpi im Vergleich zu C eine intensivere eGFP-Expression. In der rechten Spalte wurde die Überstrahlung angepasst. In der durchflusszytometrischen Auswertung unterschieden sich die verschiedenen Populationen deutlich in Bezug auf Deformitäten (Punktwellen *oben rechts*), wobei sich selbst bei der Mock-Kontrolle (K) bei Methode B vermehrte Zellverluste darstellten. Die Histogramme (*unten links*) zeigen die beiden Methoden im Vergleich nach *gating* vitaler Zellen sowie eGFP-exprimierender Zellen im Markerbereich, wobei die hellgraue Population mit Dox induziert wurde, die dunkelgraue nicht. Die Tab. (*unten rechts*) stellt die gemessenen Parameter zusammen.

Vergleichbar mit dem vorangegangenen Versuch schien die Transduktion nach der Methode *Spinokulation* (B) eine intensivere eGFP-Expression in den Fibroblasten hervorzurufen, wie in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich wurde (Abb. 16, oben links). Wurden hier durch *gating* nur die vitalen Zellen untersucht (Abb. 16, unten links und Tab. unten

rechts), kehrten sich die Verhältnisse um: bessere Expressionsergebnisse zeigten sich bei der *über Nacht*-Methode (89,6%) im Vergleich zur *Spinokulation* (80,6%). Wenn der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtpopulation betrachtet wird, erscheint Methode C als die noch etwas schonendere Methode (80,0% vitale Zellen) im Vergleich zu Methode B (75,8% vitale Zellen). Dieses wird durch die Punktwolken in Abb. 16 (oben rechts) bestätigt. Bei den transduzierten Fibroblasten kam es zu einer ausgeprägten Streuung, die bei den Dox-induzierten Zellen bei Methode B am deutlichsten war, sich aber auch in den nicht-induzierten Zellen zeigte. Ebenso verhielt es sich mit den mitgeführten Mock-Kontrollen (K): bei Methode B stellte sich eine Population geringerer Größe (*forward scatter*, Abszisse) und erhöhter Granularität (*side scatter*, Ordinate) dar, die bei Methode C weniger deutlich zu erkennen war. Bezüglich der Hintergrundexpression (*leakiness*) beider Methoden ergaben sich hier keine wesentlichen Unterschiede.

In Zusammenschau beider Versuchsanordnungen zeigt die *Spinokulation* fluoreszenzmikroskopisch die intensivste eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten zu den untersuchten Zeitpunkten (3 dpi und 6 dpi) sowie bei den verwendeten Infektionsdosen (MOI = 0,01 und 0,02). Nach durchflusszytometrischer Auswertung und Reduktion der Gesamtpopulation auf vitale Zellen (*gating*) kam es bei dieser Methode allerdings zu erhöhten Zellverlusten, die bei hoher Infektionsmultiplizität (MOI = 0,02) und frühem Untersuchungszeitpunkt (3 dpi) am stärksten ausgeprägt waren. Die *über Nacht*-Methode zeigte im Vergleich ähnliche Expressionsraten 6 dpi, mit allerdings besseren Ergebnissen 3 dpi und einer MOI = 0,02 durch offensichtlich geringere Zellverluste. Die *nächster Tag*-Methode stellte sich anhand der Ergebnisse als die schonendste Methode mit den geringsten Zellverlusten dar, wobei dabei geringere Expressionsraten in Kauf genommen werden mussten. In Bezug auf die Hintergrundexpression (*leakiness*) konnten mit der *nächster Tag*-Methode die besten Ergebnisse erzielt werden, wobei in diesen Versuchen die *Spinokulation* und die *über Nacht*-Methode vergleichbare Resultate aufwiesen.

#### **F) Einfluss unterschiedlicher Infektionsdosen auf die eGFP-Expression**

In den vorangegangenen Versuchsreihen zeigten nicht nur die verschiedenen Transduktionsbedingungen, sondern auch unterschiedliche Infektionsdosen einen erheblichen Einfluss auf die Expressionsergebnisse, die im Folgenden weiter untersucht werden sollten. Zu diesem Zweck wurde die schonende *nächster Tag*-Methode zur Transduktion primärer Fibroblasten mit Infektionsdosen von MOI =  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  verwendet. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Expressionsraten, aber auch die Zellverluste und die Hintergrundexpression gelegt. Dabei zeigte sich, dass eine MOI > 1 die eGFP-Expression zwar verbessern konnte, auf der anderen Seite aber erhöhte Zellverluste und eine vermehrte Durchlässigkeit (*leakiness*) des Systems hingenommen werden mussten. Bei der

Verwendung einer MOI < 0,01 waren die eben beschriebenen Probleme nicht vorhanden, aber auch die eGFP-Expression nur relativ schwach ausgeprägt. Daraus lässt sich insgesamt ableiten, dass die besten Ergebnisse unter Verwendung einer MOI = 0,01-1 erreicht werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt).

### **G) Einfluss des Alters der verwendeten Fibroblasten auf die eGFP-Expression**

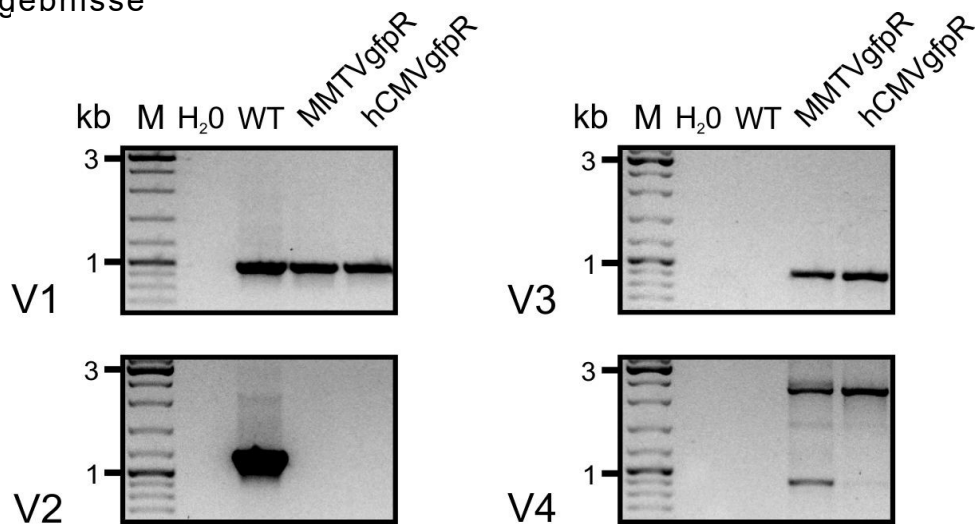
In den zu Beginn durchgeführten Versuchen wurden primäre humane Fibroblasten verwendet, die sich bereits in der Passage 17 befanden. Interessanterweise wichen die gemachten Beobachtungen deutlich von den Ergebnissen der später durchgeführten Versuche ab. So wurde initial schon bei einer MOI = 0,125 eine *leakiness* in nicht-induzierten Fibroblasten und ab einer MOI = 0,5 vermehrtes Zellsterben beobachtet (nicht dargestellt). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass ältere Zellen weniger tolerant gegenüber Virusreplikation und intrazellulärem eGFP sind, aber auch das Tet-System weniger dicht reguliert wird. Das Alter der Zellen scheint demnach eine wesentliche Rolle für die Toleranz gegenüber hohen Infektionsdosen und entsprechend hohen intrazellulären eGFP-Konzentrationen zu spielen.

## **6.3. Längerfristiger Expressionsverlust**

Im Rahmen der vorangegangenen Versuche wurde immer wieder beobachtet, dass die Anzahl der eGFP-exprimierenden Zellen sowie die Intensität der Fluoreszenz mit der längerfristigen Kulturzeit nachließ. Das Maximum der Expressionsrate lag bei etwa einer Woche nach der Dox-Induktion und das eGFP-Signal nahm danach sukzessive ab. Die folgenden Experimente zielten auf Ursachen für diesen Expressionsverlust ab.

### **A) Untersuchungen zum eGFP-Expressionsverlust auf DNA-Ebene**

Auf der Suche nach den Ursachen für den längerfristigen Funktionsverlust wurden zunächst einige strukturelle Aspekte des viralen Genoms untersucht. Zuerst sollte bestätigt werden, dass die rekombinanten Viren tatsächlich die erwartete Genomstruktur aufwiesen sowie eine fehlerfreie Rekombination und Rekonstitution vorlagen. Dafür wurden OMK-Zellen mit hCMVgfpR-, MMTVgfpR- und WT BAC C488 DNA transfiziert und die virale DNA aus dem Virusüberstand gewonnen (Kapitel 5.5., 5.6. und 6.1.). Die PCR-Primer für diese Versuche wurden so gewählt, dass Gensequenzen der Expressionskassette (*egfp*), der Regulationskassette (*tetr*) und virale Gene (*stpC/tip* und *orf75*) nachweisbar waren (Kapitel 5.3).



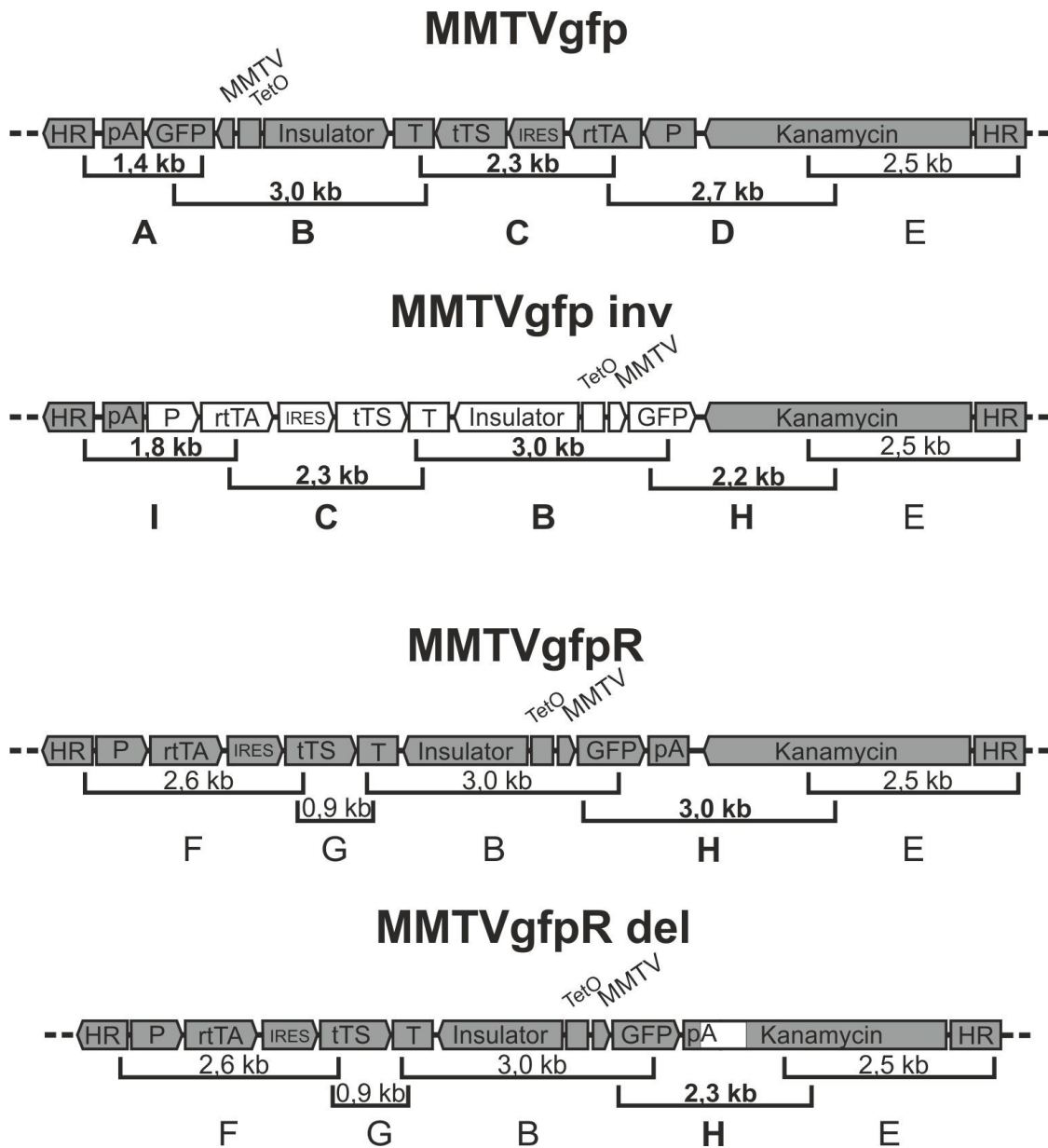
**Abb. 17: Nachweis verschiedener Gene aus dem Virusüberstand transfizierter OMK-Zellen.** Die Abb. zeigen die erwarteten Banden und damit die fehlerfreie Rekonstitution der Virusmutanten. V1: *stpC/tip* (1056 bp), V2: *orf75* (1186 bp), V3: *egfp* (923 bp), V4: *tetr* (2303 bp), M: Marker, H<sub>2</sub>O: Kontrolle.

Das virale Gen *stpC/tip* (V1) konnte nach Rekonstitution von HVS WT, MMTVgfpR und hCMVgfpR intakt nachgewiesen werden (Abb. 17, oben links). *orf75* (V2) konnte nur in HVS WT nachgewiesen werden, da der Leserahmen bei den Virusrekombinanten gezielt deletiert ist (Abb. 17, unten links). Die eGFP-Expressionskassette (V3) konnte nur bei den rekombinanten Viren MMTVgfpR und hCMVgfpR detektiert werden, da sie im Wildtyp fehlt (Abb. 17, oben rechts). Bei der Tet-Regulationskassette (V4) konnte die erwartete Bande (ca. 2,3 kb) bei den rekombinanten Virusvektoren nachgewiesen werden. Im Fall von MMTVgfpR (sowie geringgradig auch bei hCMVgfpR) trat zusätzlich eine kleinere Bande von ca. 0,9 kb auf. Zusätzlich zeigte sich eine unerwartete Bande von ca. 2,6 kb bei MMTVgfpR, die bei hCMVgfpR nicht nachweisbar war (Abb. 17, unten rechts). Diese Beobachtungen legten nahe, dass es nach Rekonstitution der rekombinanten Virusvektoren zu Mutationen im Bereich der Regulationskassette kommen könnte, weshalb diese durch Sequenzierung einzelner Komponenten weiter untersucht wurden.

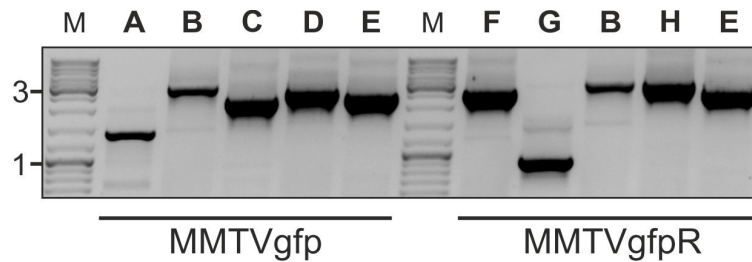
Im Folgenden wurden die für die Regulatorproteine rTA und tTS kodierenden Abschnitte der viralen DNA komplett sequenziert, wobei sich kein Hinweis auf eine Mutation ergab (Daten nicht dargestellt). Allerdings wurden nur diese beiden Bereiche untersucht und somit konnten mögliche Mutationen in anderen Bereichen der Transgenkassette (z.B. im Promotor- oder Terminator-Bereich) nicht erfasst werden.

Zur Aufklärung der Ursache für die unklaren Ergebnisse der Regulationskassetten-PCR wurde das gesamte Transgen von MMTVgfp und MMTVgfpR durch PCR amplifiziert, sowohl aus der BAC-DNA als auch aus viraler DNA. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass das gesamte Konstrukt mit überlappenden Fragmenten erfasst wurde (Abb. 18). Der Nachweis

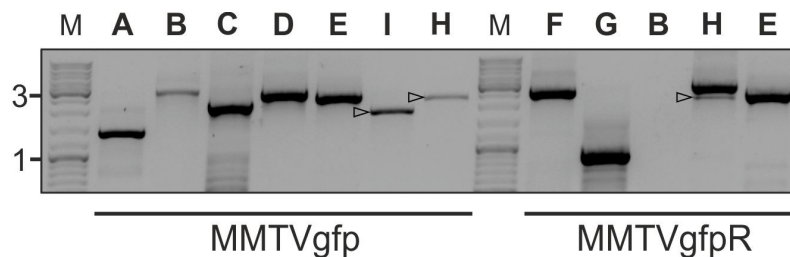
des kompletten Transgens aus der BAC-DNA konnte problemlos mit den gewählten Primerpaaren durchgeführt werden (Abb. 19).



**Abb. 18: Schematische Darstellung des Transgenbereichs der viralen DNA.** Dargestellt sind die unveränderten Konstrukte sowie Mutationen, die mit den verwendeten Primerpaaren (A-I) nachgewiesen werden konnten. Die oberste Schemazeichnung zeigt MMTVgfp in unveränderter Form. Darunter ist eine Variante dargestellt, die aus der Inversion der Transgenkassette (MMTVgfp inv) resultieren könnte. Die dritte Darstellung zeigt MMTVgfpR in normaler Konfiguration. Unten ist die Variante skizziert, die sich aus der Deletion eines Teiles der Kanamycin-Resistenzkassette sowie im Bereich der SV40-PolyA-Sequenz (MMTVgfpR del) ergibt. Die verschiedenen Primerpaare (mit Angabe der Amplifikatgröße) sind mit den Buchstaben A-I beschriftet (Kapitel 5.3) und gelten ebenfalls für die PCRs in den Abb. 19 und 20. Fett markiert sind die Primerpaare, die auf die weiß dargestellte Mutation hinweisen. Zu den verwendeten Abkürzungen vgl. Kap. 6.1., Abb. 5.



**Abb. 19: PCR des Transgenbereichs aus BAC-DNA.** Nachweis des gesamten Transgenbereichs aus der BAC-DNA von MMTVgfp in direkter (links) und reverser (rechts) Anordnung. M: Marker, die Bezeichnung der Primerpaare A-H entsprechen denen in Abb. 18 und 20 (vgl. auch Kapitel 5.3).



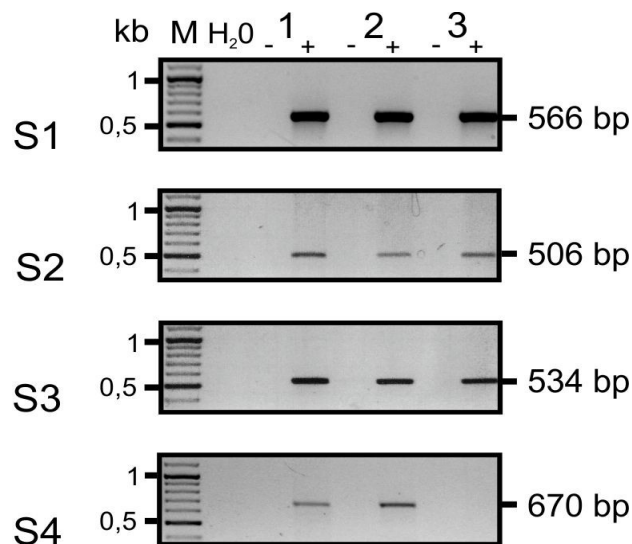
**Abb. 20: PCR des Transgenbereichs aus viraler DNA.** Dargestellt sind hier MMTVgfp in direkter (links) und in reverser (rechts) Anordnung. M: Marker, die Bezeichnung der Primerpaare A-I entsprechen denen in Abb. 18 und 19 (vgl. auch Kapitel 5.3). Die Primerpaare A-E (links) weisen das Konstrukt unverändert nach. I und H können nur binden, wenn es zu einer Drehung des gesamten Konstrukts gekommen ist (Pfeilspitzen). Rechts binden F, G und E regelrecht, H zeigt eine doppelte Bande bei 2,3 und 3 kb (Pfeilspitze). Dies weist eine Deletion eines Fragments von ca. 700 bp nach, wenn auch in geringem Maße. Das Primerpaar B zeigt keine Bande. Da dieses Paar in anderen Versuchsanordnungen erfolgreich verwendet wurde, ist ein Problem der Primer selber unwahrscheinlich. Es spricht eher dafür, dass es noch zu weiteren Mutationen an oder zwischen den Bindestellen gekommen ist.

Die Darstellung des Transgens aus dem Virusüberstand nach Rekonstitution in OMK-Zellen (Abb. 20) erbrachte Schwierigkeiten: Unerwartete Banden in den unterschiedlichen PCRs ließen den Verdacht aufkommen, dass es zu Verlusten von Fragmenten und zu Inversionen innerhalb des Konstrukts gekommen sein könnte. Zur Bestätigung des Verdachtes wurden andere Primerpaare gewählt, die eine entsprechende Deletion oder Inversion detektieren konnten. Hier zeigte sich, dass es im geringen Maße zu Deletion und Inversion innerhalb der Transgenkassette kommt, während daneben unveränderte Sequenzen nachweisbar blieben. Dabei konnte weiter gezeigt werden, dass MMTVgfp von einer Inversion, d.h. einer vollständigen Drehung der Regulations- und Expressionskassette betroffen ist. Eine Deletion von ca. 700 bp konnte bei MMTVgfpR nachgewiesen werden, wobei das linke Ende der Kanamycin-Resistenzkassette und ein Teil der SV40-PolyA-Sequenz verloren gehen (Abb. 20). Eine schematische Darstellung der Konstrukte und nachgewiesenen Mutationen mit den verwendeten Primerpaaren sowie deren Amplifikatgröße sind in Abb. 18 dargestellt.



### B) Untersuchungen zum eGFP-Expressionsverlust auf RNA- und Protein-Ebene

Zur weiteren Aufklärung möglicher Gründe für den längerfristigen Expressionsverlust auf Genom- und Transkriptions-Ebene wurde mit der RT-PCR die vom Virusvektor ausgehende Expression auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde die RNA hCMVgfpR-transduzierter Fibroblasten in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.6.). Durch verschiedene PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren (Kapitel 5.3) wurde die Transkription der einzelnen Vektor-Komponenten nachgewiesen. Als Kontrolle der erfolgreichen RT-PCR diente der mRNA-Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), eines Enzyms der Glykolyse, das konstitutiv in allen Zellen exprimiert wird (Abb. 21, S1). Zusätzlich wurde kontrolliert, ob eine Kontamination mit viraler DNA vorlag. Hierfür wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase mitgeführt. Bei Kontamination mit viraler DNA würden die Primer ebenso wie im Ansatz mit der erzeugten cDNA binden und die typische Bande zeigen.



**Abb. 21: RT-PCR aus hCMVgfpR-transduzierten Fibroblasten.** Die korrekte RNA-Expression in transduzierten primären Fibroblasten wurde durch RT-PCR nachgewiesen. S1: GAPDH (566 bp), S2: rtTA (506 bp), S3: tTS (534 bp), S4: GFP (670 bp), M: Marker, H<sub>2</sub>O: Kontrolle, 1 und 2: hCMVgfpR-transduzierte Fibroblasten, Dox-induziert, 3: hCMVgfpR-transduzierte Fibroblasten ohne Dox-Induktion, +/- : Reverse Transkriptase.

Der Nachweis von rtTA und tTS (Abb. 21, S2, S3) bestätigte die korrekte Expression der Regulationskassette auf RNA-Ebene in transduzierten Fibroblasten. Des Weiteren wurde die eGFP-Expression in Dox-induzierten Zellen mit dieser Methode bestätigt (Abb. 21, S4, Klone 1 und 2), wohingegen keine eGFP-Expression in nicht-induzierten Zellen nachweisbar war (Abb. 21, S4, Klon 3). Unter denselben Versuchsbedingungen wurde die RNA der Gene *stpC* und *tip* untersucht. Interessanterweise gelang der Nachweis dieser viralen Onkogene, die für die T-Zell-Transformation essentiell sind, weder in der RT-PCR noch in dem weiterführenden Immunblot, in dem ein StpC-Antiserum verwendet wurde (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies könnte an der weitgehenden T-Zell-Spezifität des entsprechenden viralen



Promotors liegen (Fickenscher et al., 1996). Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auf BAC-Ebene eine fehlerfreie Insertion der gesamten Transgenkassette gelungen war (Abb. 19). Nach Virusrekonstitution in OMK-Zellen kam es allerdings zu Abweichungen im Bereich der Transgenkassette, insbesondere bei Verwendung des MMTV-Promotors. Einerseits wurden PCR-Amplifikate unterschiedlicher Größe bei dem Nachweis der gesamten Transgenkassette unter Verwendung von Primern nachgewiesen, die im Bereich des PGK-Promotors und PGK-Terminators binden (Kap. 6.3., Abb. 17). Andererseits konnten bei der Untersuchung der einzelnen Komponenten der Transgenkassette Mutationen im Sinne einer Deletion oder Inversion nachgewiesen werden (Abb. 18 und 20).

#### **6.4. Strategien zur Verbesserung der Transgenexpression**

Da die Untersuchungen zur Virusrekonstitution sowie die weiteren Transduktions-Versuche in primären humanen Fibroblasten keine hinreichende Erklärung für den längerfristigen Expressionsverlust erbrachten, wurde das Augenmerk auf weitere, zelleigene Mechanismen gelegt, welche die Genexpression beeinflussen. Hierfür kamen besonders epigenetische Modifikationen infrage, die zu einer reduzierten Genexpression führen, dem sogenannten *Silencing* (Riggs & Porter, 1996), für das die Deacetylierung der Histone und die DNA-Methylierung wesentliche Wege darstellen. Für die folgenden Versuche wurden die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Natriumbutyrat (NaB, Sigma) und Trichostatin A (TSA, Merck) und der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA; Sigma) verwendet.

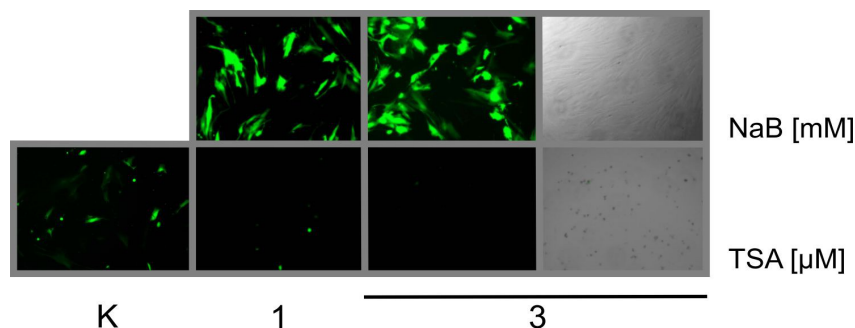
Die basischen Histone sind für die Kondensation der DNA und für die Bildung des Heterochromatins essentiell. Die Histon-Acetylierung korreliert mit der Genexpression (Allfrey et al., 1964). Durch die Acetylierung N-terminaler Lysinreste verlieren Histone positive Ladungen, die Anlagerung an die negativ geladene DNA wird reduziert, die Chromatinkondensation im Zellkern wird vermindert und die Genexpression wird gesteigert. Deacetylierte Histone weisen dagegen positive Ladungen auf, tragen zur Heterochromatin-Bildung bei und vermindern die Genexpression. NaB und TSA sind Inhibitoren der Histon-Deacetylase unterschiedlicher Klassen (Dokmanovic et al., 2007; Hodawadekar & Marmorstein, 2007; Yang & Seto, 2007).

Die kurzkettige Fettsäure Natriumbutyrat (NaB; 110 g/mol) ist wasserlöslich und kommt im Darm als bakterielles Abbauprodukt nach Fermentation von Pflanzenfasern vor. Für NaB ist eine Schutzwirkung auf die normale Darmflora beschrieben (Levison, 1973). NaB (Sobutir®) wird als diätetisches Lebensmittel zum Schutz der Mukosa bei Erkrankungen des Verdauungstrakts eingesetzt. Das Antimykotikum Trichostatin A (TSA; 302 g/mol) wird von *Streptomyces platensis* gebildet und ist in Alkohol löslich. Inhibitoren der Histon-Deacetylase können auch das Wachstum verschiedener Tumorzellen und die Angiogenese unterdrücken

und die Apoptose fördern (Davie, 2003; Drummond et al., 2005; Hamer et al., 2009; Lane & Chabner, 2009; Shankar & Srivastava, 2008; Vanhaecke et al., 2004).

### A) Vergleich von Trichostatin A und Natriumbutyrat

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss der Histon-Deacetylase-Inhibitoren TSA und NaB auf die eGFP-Expression transduzierter Fibroblasten untersucht. Zunächst wurden je  $4 \times 10^4$  Fibroblasten in 12-Well-Kulturplatten ausgesät und am folgenden Tag mit hCMV-gfp $\Delta$ K (MOI = 0,1) infiziert. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und 1 ml frisches Medium entweder mit TSA (1  $\mu$ M oder 3  $\mu$ M), mit NaB (1 mM oder 3 mM) oder ohne Zusatz zugegeben. Jeder Ansatz wurde mit oder ohne Dox durchgeführt. Bereits nach 2 d waren deutliche Unterschiede in der eGFP-Expression erkennbar. Unter TSA kam es bei beiden Konzentrationen zu starken Zellverlusten und damit auch zu einer schlechten Expressionsrate. Die Zellverluste wurden in allen Ansätzen unabhängig von der Dox-Zugabe beobachtet. Der Effekt war demnach ausschließlich auf TSA und nicht auf die Dox-Induktion zurückzuführen. Dagegen wurde NaB von den Zellen gut toleriert. Relevante Zellverluste wurden nicht beobachtet, auch nicht in hoher Konzentration. Außerdem konnte eine deutlich verbesserte eGFP-Expression beobachtet werden. An d 6 nach der Infektion waren die beschriebenen Effekte immer noch deutlich sichtbar (Abb. 22).



**Abb. 22: Vergleich der eGFP-Expression mit Zusatz von Na-Butyrat oder Trichostatin A.** Die Zellen wurden 6 d zuvor transduziert (MOI = 0,1). Bei alleiniger Zugabe von Dox kam es zu einem Expressionsverlust über die Zeit (Kontrolle K, unten links). Bei gleichzeitiger Gabe von Dox und NaB war der Expressionsverlust konzentrationsabhängig deutlich vermindert (Bilder oben in der Mitte). Die Durchlichtaufnahme (oben rechts) zeigt einen gleichmäßigen Zellrasen ohne morphologische Veränderungen. Die Zugabe von TSA dagegen führt bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M TSA zu starken Zellverlusten, erkennbar an den abgekugelten, toten Zellen in der Durchlichtaufnahme (unten rechts, hier bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M dargestellt) und entsprechendem Expressionsverlust in der Fluoreszenz-Mikroskopie.

### B) Vergleich von verschiedenen Versuchsbedingungen mit Natriumbutyrat

Auf der Basis der vorangegangenen Experimente mit TSA und NaB wurden weitere Versuche allein mit NaB unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss anderer Konzentrationen von NaB, der Zeitpunkt der Behandlung, sowie Effekte bei höheren Infektionsdosen und höheren Zellzahlen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden je  $10^5$  Fibroblasten in 12-Well-Gewebekulturplatten ausgesät und am folgenden Tag mit einer

MOI = 0,5 mit hCMVgfp $\Delta$ K und WT infiziert. Die Hälfte der Zellen wurde direkt nach 2 h Inkubation bei 37°C entweder mit 2 mM oder 4 mM (jeweils mit und ohne Dox) behandelt. Die anderen Zellen erhielten ausschließlich D10-Medium (mit und ohne Dox). Erst eine Woche später wurde zu den bis dahin nicht behandelten Zellen NaB in den oben genannten Konzentrationen zugegeben. Zur Kontrolle wurden transduzierte Fibroblasten ohne NaB und nicht-transduzierte Zellen (Mock-Kontrolle) unter denselben Bedingungen mitgeführt. Die frühe Behandlung mit NaB direkt nach der Transduktion führte bei hCMVgfp $\Delta$ K zu guten Expressionsraten, aber auch zu deutlichen Konzentrations-abhängigen Zellverlusten bei hCMVgfp $\Delta$ K und WT. Bei hCMVgfp $\Delta$ K waren unter Dox-Induktion höhere Verluste im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen zu verzeichnen. Die Mock-Kontrolle zeigte dagegen keine relevanten Zellverluste. Diese Beobachtungen führten zu zwei wesentlichen Ergebnissen:

- 1.) Frühzeitig nach der Transduktion mit hCMVgfp $\Delta$ K und WT war die NaB-Toxizität erhöht.
- 2.) Die starke, Dox-induzierte eGFP-Expression war toxisch für primäre menschliche Fibroblasten. Dox zeigte aber an sich keine Toxizität, da weder WT- noch Mock-infizierte Zellen einen Unterschied zwischen den Ansätzen mit oder ohne Dox aufwiesen.

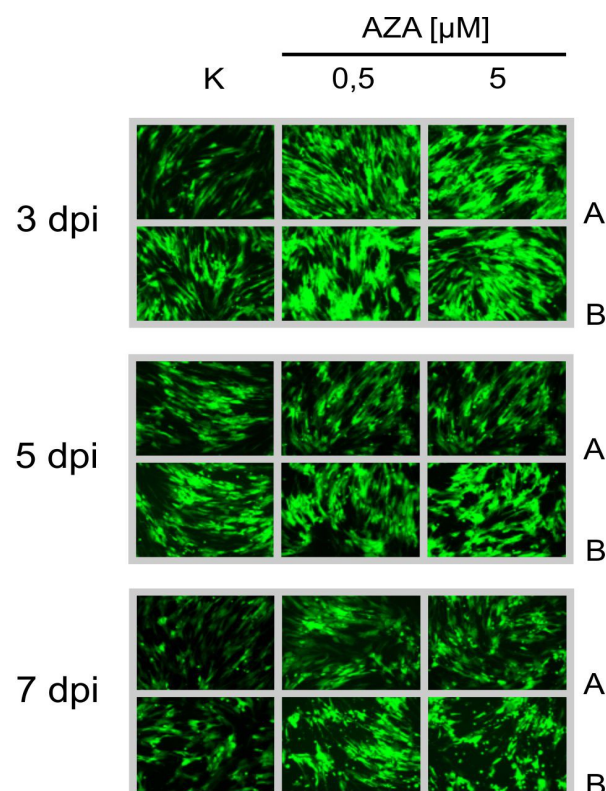
Bei der späten Behandlung, d.h. eine Woche nach Transduktion, zeigten sich ähnliche Veränderungen in Bezug auf die verbesserte eGFP-Expression nach NaB-Behandlung, allerdings war ein deutlicher Unterschied in den Zellverlusten zu beobachten: Bereits wenige Tage nach der NaB-Zugabe konnte eine deutlich verbesserte eGFP-Expression der Zellen im Vergleich zu nicht behandelten hCMVgfp $\Delta$ K-transduzierten Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt war bei 4 mM NaB deutlich stärker ausgeprägt als mit 2 mM, also von der NaB-Konzentration abhängig. Bei diesem Versuch waren allerdings die Zellverluste bei den hCMVgfp $\Delta$ K- und WT-transduzierten Zellen wesentlich geringer als bei der frühen NaB-Behandlung. Die Ergebnisse waren nach einer Woche deutlich und nach einem Monat am stärksten ausgeprägt. Auch hier zeigten sich gewisse Zellverluste unter sehr starker eGFP-Expression im Vergleich zu nicht induzierten Zellen. Dieser Effekt war gegenüber einer frühen Behandlung schwächer ausgeprägt. Diese Beobachtungen unterstützen die Überlegung, dass der frühe Zustand direkt nach der Transduktion die Zellen anfälliger für toxische Substanzen macht, sei es nun NaB oder eGFP.

### **C) Hemmung der DNA-Methylierung**

Die Hemmung der DNA-Methyltransferase kann durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) erreicht werden. Die DNA-Methylierung führt zu einer verminderten Genexpression. Entsprechend verbessert die Inhibition der DNA-Methylierung die Transkription und Genexpression (Jaenisch & Bird, 2003). Das Pyrimidinanalogon AZA oder Decitabin wird in den USA als Dracogen<sup>®</sup> zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms eingesetzt ist. Auch bei

anderen Malignomen wird AZA als Chemotherapeutikum erforscht (Christmann; 2002; Hsi et al., 2005; Moon et al., 2009).

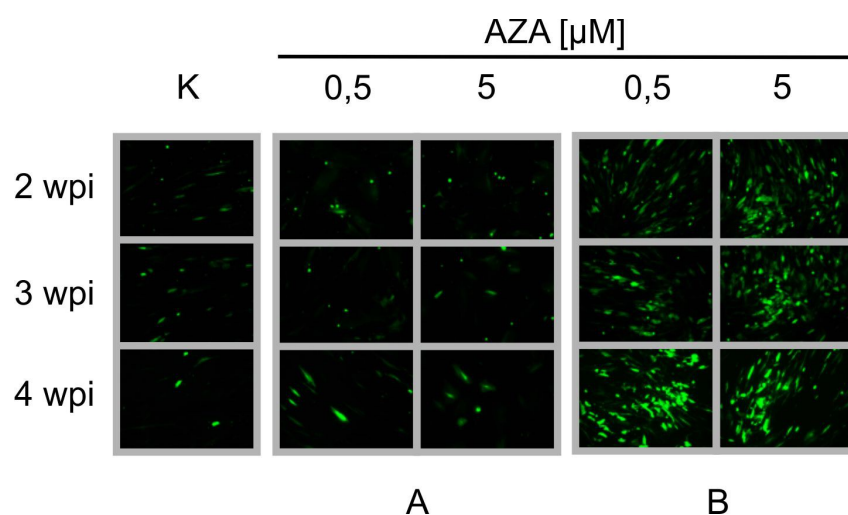
Hier sollte die Auswirkung von AZA auf die eGFP-Expression und Zellzahl transduzierter Fibroblasten untersucht werden. Wie in den vorherigen Versuchen wurden unterschiedliche Zeitpunkte der AZA-Behandlung sowie zwei verschiedene Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu\text{M}$ ) gewählt. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Infektionsdosen (MOI = 0,25 und 0,5) und eine geringere Zellzahl ( $0,5 \times 10^5$ ) verwendet. Neben hCMVgfp $\Delta\text{K}$ - und WT-transduzierten Zellen sowie der Mock-Kontrolle wurde außerdem eine DMSO-Kontrolle mitgeführt, da AZA in DMSO gelöst vorlag. Die frühe AZA-Behandlung, d.h. die Zugabe von AZA direkt nach der Transduktion und anschließender zweistündiger Inkubation wurde zuerst untersucht. Diese führte zu einer massiv gesteigerten eGFP-Expression in hCMVgfp $\Delta\text{K}$ -transduzierten Zellen bei gleichzeitiger Dox-Induktion. Die vermehrte Expression war bereits nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch sichtbar und nach 3 d maximal ausgeprägt. Der Effekt war abhängig von der verwendeten Infektionsmultiplizität, eine höhere MOI = 0,5 führte zu einer höheren Intensität, die sich innerhalb der ersten Woche immer weiter verstärkte (Abb. 23).



**Abb. 23: Frühe AZA-Behandlung in hCMVgfp $\Delta\text{K}$ -transduzierten primären Fibroblasten.** Dargestellt ist die erste Woche nach Zugabe von AZA in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu\text{M}$ ) bei unterschiedlichen Infektionsdosen (MOI = 0,25: A und MOI = 0,5: B) und Dox-Induktion im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (K) unter sonst identischen Bedingungen. Bereits nach 3 d ist eine verbesserte eGFP-Expression im Vergleich zu K zu beobachten. Die Abhängigkeit von der MOI wird nach 5 und 7 dpi deutlicher sichtbar. Nach einer Woche zeigen sich vermehrte Zellverluste, die jetzt stärker mit der AZA-Konzentration korrelieren, aber auch bei einer höheren Infektionsmultiplizität vermehrt ausgeprägt sind. In den Kontrollen zeigt sich bei AZA-behandelten Zellen besonders in der hohen Konzentration, bezogen auf die Zellverluste, eine ähnliche Tendenz (nicht dargestellt).

Die verwendeten AZA-Konzentrationen zeigten einen geringen Einfluss auf die anfängliche eGFP-Expression. Innerhalb der ersten 5 d nach AZA-Behandlung zeigten die Fibroblasten eine relativ gute Toleranz gegenüber AZA und der sehr starken eGFP-Intensität. Nach einer Woche waren aber deutliche Zellveränderungen und vermehrtes Zellsterben zu beobachten. Hierbei wurden eine hohe MOI, hohe AZA-Konzentrationen und eine starke eGFP-Intensität durch die Fibroblasten schlecht toleriert. Auch bei den Kontrollen war eine ähnliche Tendenz, bezogen auf die AZA-abhängigen Zellveränderungen, zu beobachten.

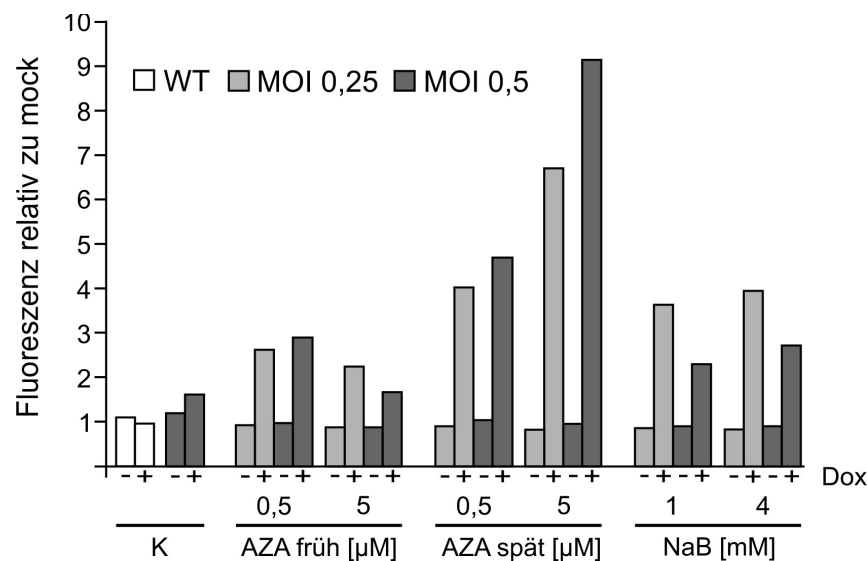
Die zeitverzögerte AZA-Behandlung (d.h. eine Woche nach der Transduktion) war Inhalt weiterer Versuche. Sie wurde ebenso wie bei den NaB-Versuchen besser toleriert und führte weiterhin zu guten Expressionsergebnissen nach der Dox-Induktion, auch noch acht Wochen nach der Transduktion. In Abb. 24 sind drei Zeitpunkte innerhalb des ersten Monats nach früher AZA-Behandlung (A) sowie später AZA-Behandlung (B) in verschiedenen Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu\text{M}$ ) bei einer MOI = 0,5 dargestellt. Wie oben beschrieben, kommt es bei der frühen Behandlung zu starken Zellverlusten (Abb. 24, A). Das mittlere eGFP-Signal konnte im Vergleich zur Kontrolle dadurch kaum verbessert werden. Bei der späten Behandlung (Abb. 24, B) zeigte sich bereits zu Beginn eine konzentrationsabhängige Verbesserung der eGFP-Expression. Außerdem exprimierten die Fibroblasten stabil das eGFP ohne mikroskopisch sichtbare Toxizität. Die zeitverzögerte AZA-Behandlung verbesserte also die eGFP-Expression über Wochen, ohne wesentliche Zellverluste zu induzieren.



**Abb. 24: Vergleich der frühen und späten AZA-Behandlung in primären Fibroblasten.** Hier wird der Effekt einer späten AZA-Behandlung (B) innerhalb des ersten Monats nach Infektion im Vergleich zur frühen Behandlung (A) und Kontrolle (K) dargestellt. Durch eine späte Behandlung wird ohne relevante Zellverluste eine stabile Expression über die Zeit erreicht. Exemplarisch wurden hier die Ergebnisse bei einer MOI = 0,5 gezeigt. Dieselbe Tendenz zeigte sich bei einer MOI = 0,25 in etwas schwächerer Ausprägung.

### D) Reinduktion der eGFP-Expression durch Natriumbutyrat und 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Sowohl der Histon-Deacetylase-Inhibitor NaB, als auch der DNA-Methyltransferase-Inhibitor AZA bewirkten eine deutliche Steigerung der eGFP-Expression hCMVgfp $\Delta$ K-transduzierter Fibroblasten unter Dox-Induktion im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen. Reproduzierbar war eine späte Behandlung der frühen Behandlung vorzuziehen. Die späte Behandlung war mit stabileren Expressionsraten und weniger ausgeprägten Zellverlusten verbunden. Während die AZA-Behandlung eine höhere Fluoreszenzintensität induzierte, zeigte die Behandlung mit NaB geringere Zellverluste. Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen wurde der Effekt einer späten Gabe von AZA und NaB direkt verglichen. Beide Substanzen konnten die eGFP-Expression im Vergleich zur Kontrolle deutlich intensivieren. Die mikroskopischen Beobachtungen wurden hier mit Hilfe der Fluorimetrie quantifiziert. In Abb. 25 wurde die gemessene Fluoreszenz relativ zur Mock-Kontrolle fünf Wochen nach der Infektion dargestellt. Hierbei wurden die Unterschiede verschiedener Behandlungszeitpunkte, unterschiedlicher Konzentrationen und zweier Infektionsdosen (MOI = 0,25 und 0,5) gegenüber gestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden die zu jeder Behandlung mitgeführten Kontrollen in der Abb. 25 nicht dargestellt.

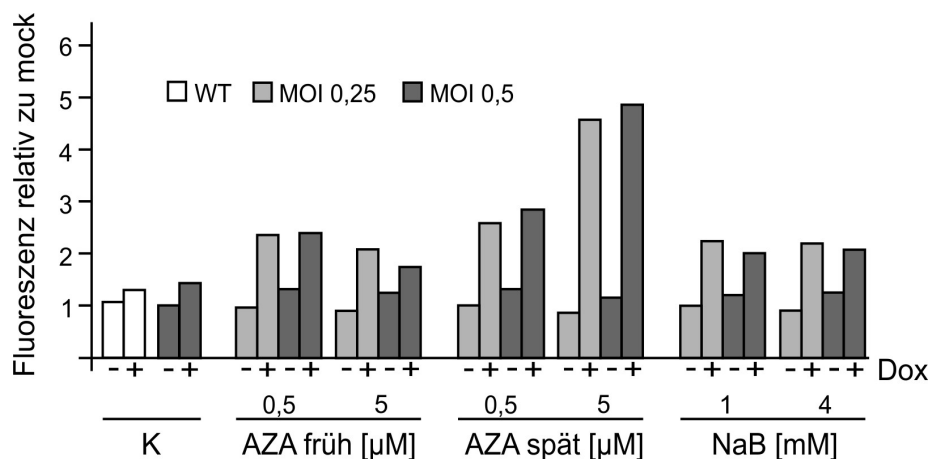


**Abb. 25: Fluoreszenzintensitäten relativ zur Mock-Kontrolle, fünf Wochen nach der Transduktion.** Auf der Ordinate ist die gemessene Fluoreszenz relativ zur Mock-Kontrolle aufgetragen, die Abszisse veranschaulicht die unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Die Kontrolle (K) zeigt hCMVgfp $\Delta$ K- (dunkelgrau) und WT-infizierte (weiß) Fibroblasten, jeweils mit einer MOI = 0,5. Die übrigen Säulen zeigen hCMVgfp-transduzierten Zellen mit einer MOI = 0,25 (hellgrau) und 0,5 (dunkelgrau). AZA wurde dabei entweder früh (d.h. 2 h nach Infektion) oder spät (d.h. eine Woche nach Infektion) in zwei Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu$ M) appliziert. NaB (1 oder 4 mM) wurde nur spät (eine Woche nach der Infektion) verabreicht. Die Dox-Induktion erfolgte bei allen mit + gekennzeichneten Zellen direkt 2 h nach der Infektion. Die mit – gekennzeichneten Zellen wurden nicht mit Dox behandelt.

Für die frühe AZA-Behandlung ergab sich eine leicht verbesserte Fluoreszenzintensität im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle, die aber besonders bei 5  $\mu$ M AZA durch hohe

Zellverluste relativiert wurde. Bei dieser Untersuchung konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit der verwendeten Infektionsmultiplizität beobachtet werden. Die späte AZA-Behandlung erbrachte dagegen eine erstaunliche Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle, wobei der Effekt Konzentrations- sowie MOI-abhängig zu sein schien. Die NaB-Behandlung zeigte eine etwas abweichende Tendenz: die unterschiedlichen Konzentrationen erbrachten nur minimale Unterschiede, dagegen schien die Infektionsmultiplizität größeren Einfluss auf die gemessene Fluoreszenz zu haben. Die besten Ergebnisse wurden mit der MOI = 0,25 erreicht.

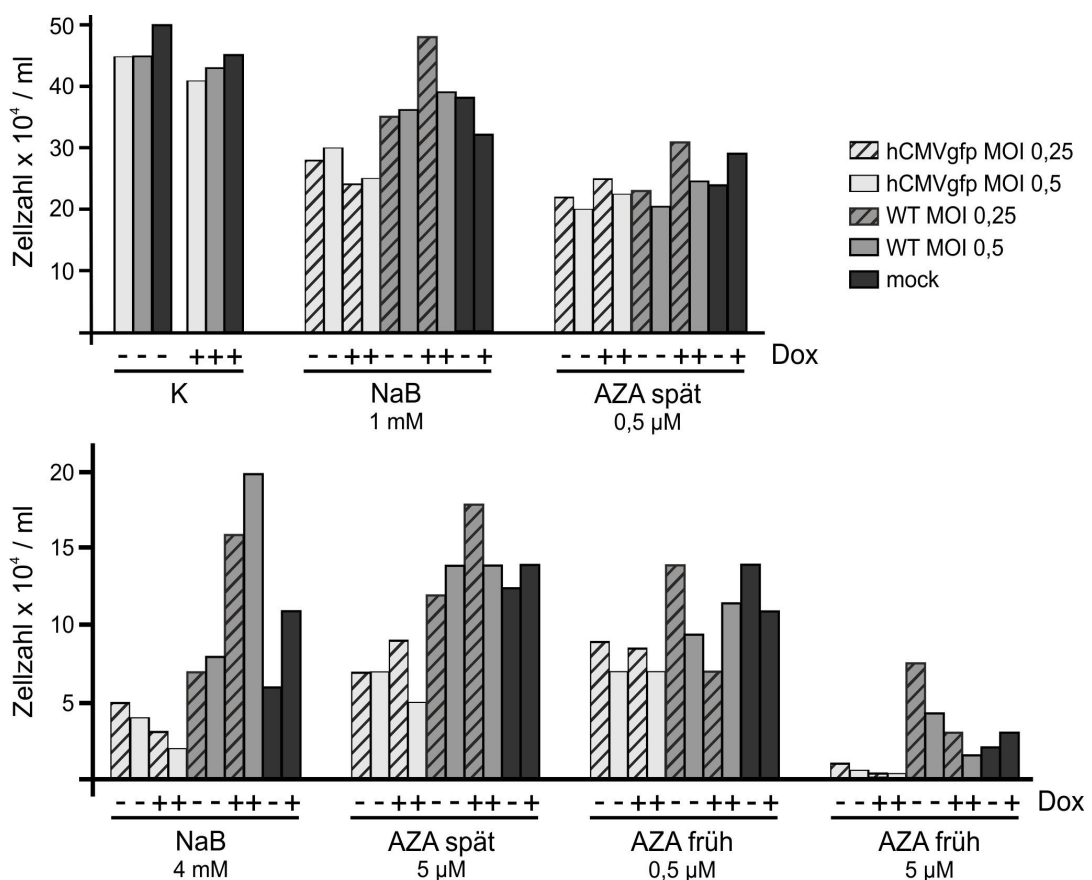
Die fluorimetrischen Messungen wurden zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Transduktion erneut durchgeführt (Abb. 26). Insgesamt zeigte sich gegenüber dem Zeitpunkt fünf Wochen eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität in Bezug zur Mock-Kontrolle, aber in der Tendenz blieben die Ergebnisse unverändert. Im Vergleich erbrachte die späte AZA-Behandlung die besten Ergebnisse, die von der AZA-Konzentration stärker abhängig als von der Infektionsmultiplizität waren. Bei NaB wurde die eGFP-Expression stärker von der MOI als von der Konzentration bestimmt, auch wenn dies nach acht Wochen weniger ausgeprägt war als nach fünf Wochen. Auch bei der frühen AZA-Behandlung blieb die Tendenz konstant, wobei aber auch hier die Unterschiede weniger ausgeprägt waren. Die eGFP-Expressionsintensitäten waren bei der frühen AZA-Behandlung und bei NaB fast identisch. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass die wenigen Zellen, die nach der frühen AZA-Behandlung noch leben, so intensiv eGFP exprimieren, dass die gemessene Intensität derjenigen der vielen, schwach exprimierenden Zellen nach NaB-Behandlung nahezu entspricht (Abb. 26-28).



**Abb. 26: Fluoreszenzintensitäten relativ zur Mock-Kontrolle, acht Wochen nach der Transduktion.** Die Ergebnisse stehen in direktem Vergleich zu Abb. 28 und 29. Auch hier zeigen sich die besten Ergebnisse bei der späten AZA-Behandlung und einer MOI = 0,5 bei CMVgfpΔK-transduzierten Fibroblasten. Der in Abb. 25 nach fünf Wochen sichtbare MOI-abhängige Unterschied bei der NaB-Behandlung ist nach acht Wochen deutlich weniger ausgeprägt.

Zum besseren Verständnis der beobachteten Zellverluste und ihrer Relevanz für das eGFP-Expressionsverhalten bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde neben der

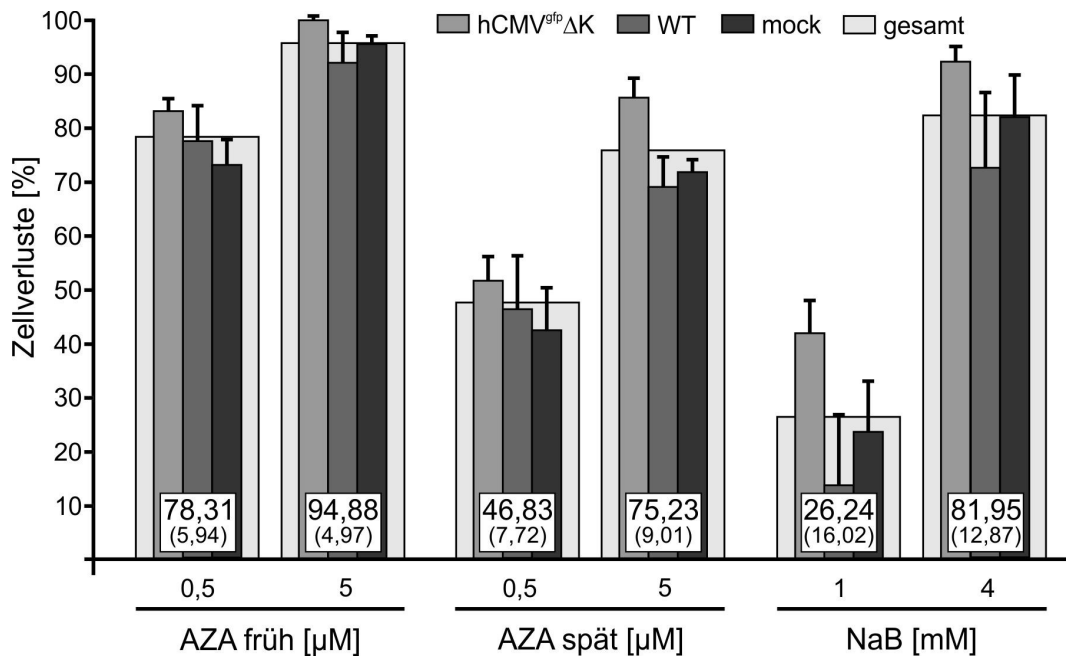
Fluoreszenzmikroskopie und der Fluorimetrie auch noch die absolute Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau bestimmt (Kapitel 5.5.). Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Transduktion sind in Abb. 27 gezeigt. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind nach den gemessenen Zellzahlen in absteigender Reihenfolge im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die hCMVgfp $\Delta$ K-transduzierten Fibroblasten zeigten Zellverluste bei der NaB-Behandlung vor allem eGFP-abhängig, bei der AZA-Behandlung dagegen vor allem MOI-abhängig. Am besten verträglich zeigte sich die NaB-Behandlung in niedriger Konzentration, gefolgt von der späten AZA-Behandlung in niedriger Konzentration. Bei der NaB-Behandlung (bei 1 und 4 mM) ist die geringere Zahl der eGFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen ohne Dox-Induktion auffällig. Dabei spielt die MOI offensichtlich keine wesentliche Rolle. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der AZA-Behandlung eine stärkere Abhängigkeit von der MOI. Bei MOI = 0,25 wurden stets geringere Verluste beobachtet. Die chemische Behandlung mit den beiden Substanzen wurde von WT- und Mock-Zellen besser vertragen als von hCMVgfp $\Delta$ K-transduzierten Zellen. Dies könnte auf eine Instabilität und einen damit einhergehenden Resistenz-Verlust der Zellen gegenüber externen Noxen hindeuten, ausgelöst durch die Transduktion der Transgenkassette.



**Abb. 27: Bestimmung der Zellzahlen zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Transduktion.** Die absoluten Zellzahlen zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Transduktion sind unter den verschiedenen Bedingungen dargestellt. Die unterschiedlichen Wertebereiche der beiden Ordinaten sind wesentlich.



Aus derselben Messreihe wurde außerdem der durchschnittliche prozentuale Zellverlust im Verhältnis zur Kontrolle berechnet (Abb. 28). Die schmalen Balken zeigen die hCMVgfp $\Delta$ K-, WT- oder nicht-infizierten Zellen im Vergleich. Der breite Balken gibt den durchschnittlichen Verlust aller Zellen unter der jeweiligen Behandlung an. Hieraus ergibt sich die beste Verträglichkeit bei 1 mM NaB mit einem durchschnittlichen Verlust von 26% gefolgt von 0,5  $\mu$ M AZA (spät) mit einem mittleren Verlust von 47%. Die größten Verluste sind bei der frühen AZA-Behandlung in hoher Konzentration (95%) zu verzeichnen. Weiter tolerierten die hCMV-gfp-transduzierten Zellen die chemische Behandlung weniger im Vergleich zur Mock-Kontrolle und zu WT-infizierten Zellen. Der Vergleich Mock-behandelter mit WT-infizierten Zellen zeigte bei der AZA-Behandlung kein einheitliches Bild. Bei der NaB-Behandlung dagegen scheint die WT-Infektion den Zellen einen geringen Vorteil gegenüber nicht-infizierten Zellen zu verschaffen (13 zu 23% bei NaB 1 mM und 72 zu 81% bei NaB 4 mM).



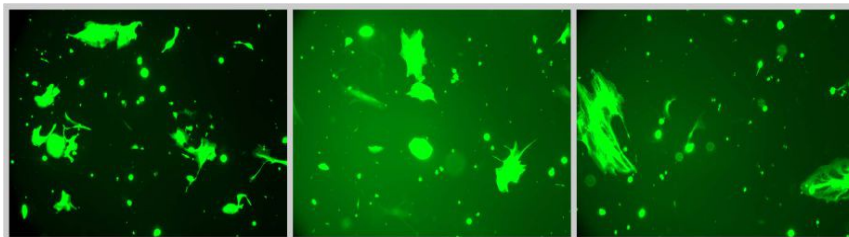
**Abb. 28: Durchschnittliche Zellverluste zum Zeitpunkt acht Wochen nach Transduktion.** Die Grafik zeigt die Zellverluste im Vergleich zur Kontrolle unter den unterschiedlichen Behandlungen (Abszisse). Die schmalen Balken stellen die Transduktion mit hCMV-gfp $\Delta$ K (hellgrau), WT (mittelgrau) und nicht-transduzierten Zellen (Mock-Kontrollen, dunkelgrau) gegenüber. Die breiten Balken im Hintergrund geben den Mittelwert aller Ansätze unter den entsprechenden Bedingungen (Zahl in weißem Kasten) an. Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

Zusammenfassend konnte die Hemmung sowohl der Histon-Deacetylierung als auch der DNA-Methylierung als epigenetische Modifikationen die eGFP-Expression steigern und verlängern. Durch TSA konnte in diesen Versuchen aufgrund massiver Zellverluste keine Verbesserung erzielt werden. Dagegen erbrachten die Versuche mit NaB und AZA vielversprechende Ergebnisse. Generell scheint eine bessere Toleranz der behandelten Zellen gegenüber den beiden Substanzen zu bestehen, wenn die Exposition zu einem späteren Zeitpunkt

erfolgt. In Bezug auf eine konstante Genexpression verbunden mit einem geringen Zelltod sind die niedrigen Konzentrationen der beiden Substanzen vorzuziehen. Die Unterschiede beider Substanzen zeigten sich vor allem bei einer intensiveren eGFP-Expression bei der Verwendung von AZA und einer besseren Verträglichkeit, gemessen an geringeren Zellverlusten, wenn NaB verwendet wurde.

### 6.5. Zellveränderungen unter Transgenexpression

Im Allgemeinen gilt eGFP als nicht toxisch und zellbiologisch inertes Genprodukt. In den Versuchen dieser Arbeit wurde in vielen Fällen eine außerordentlich hohe eGFP-Expressionsstärke in primären humanen Fibroblasten durch Transduktion mit rekombinanten, Dox-induzierbaren HVS-Vektoren erreicht. Eine moderate Expression wurde von den Zellen sehr gut toleriert. Wurde aber die Expression stark induziert, z.B. durch die Transduktion mit Kanamycin-deletierten Viren (Kapitel 6.2.D) oder durch Zugabe Expressions-fördernder Substanzen (Kapitel 6.4.) konnten mikroskopisch sichtbare Zellveränderungen wie die Ausbildung von Riesenzellen, Zellkondensation und Fragmentozyten-ähnliche Morphologie (Abb. 29) sowie ausgeprägte Vakuolenbildung im Zytoplasma (Abb. 30) beobachtet werden. In den entsprechend veränderten Kulturen kam es zu einem gestörten Wachstum bis hin zum Absterben der gesamten Zellpopulation. Diese Beobachtungen weisen auf eine konzentrationsabhängige Toxizität des stark überexprimierten eGFP hin. Dabei werden offenbar die Kompensationsmechanismen der Zellen überschritten, was in den apoptotischen Zelltod führt.



**Abb. 29: Zellveränderungen bei starker eGFP-Expression.** Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen morphologische Veränderungen eGFP-exprimierender Fibroblasten mit Ausbildung von Riesenzellen, Zellkondensation und Fragmentozyten-ähnlichem Erscheinungsbild.



**Abb. 30: Vakuolen in eGFP-exprimierenden Fibroblasten.** In einigen Fibroblasten kam es bei intensiver eGFP-Expression zu ausgeprägter Vakuolenbildung im Zytoplasma.

## 7. Diskussion

### 7.1. Entwicklung der Gentherapie

Die Therapie von Erkrankungen, die auf die Fehlregulation oder das Fehlen eines bestimmten Gens zurückzuführen sind, stehen seit den 1990er Jahren im Fokus der klinischen Forschung. Bis heute wurden über 1900 klinische Studien im Bereich der Gentherapie durchgeführt. Ein laufend aktualisierter Überblick über die durchgeführten, registrierten Studien, die verwendeten Vektoren, die Zielgene sowie die Ergebnisse kann im Internet eingesehen werden (<http://www.genetherapy.net/clinical-trials.html>).

Die erste klinische Studie wurde 1990 zur Behandlung einer angeborenen *severe combined immunodeficiency* durchgeführt, eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die auf das Fehlen der ubiquitär vorkommenden Adenosindesaminase zurückzuführen ist. In dieser Studie wurde in T-Lymphozyten die fehlende cDNA der Adenosindesaminase durch einen  $\gamma$ -retroviralen Vektor *ex vivo* ersetzt und den zwei behandelten Kindern autolog retransfundiert (Blaese et al., 1995). Beide behandelten Patienten reagierten mit einer gesteigerten T-Lymphozytenzahl und eines der behandelten Kinder mit einer erhöhten Adenosindesaminase-Aktivität. Obwohl weiterhin eine medikamentöse Enzym-Substitution notwendig war, zählt diese Studie als Pioniertat in der klinischen Gentherapie.

Bei der klinischen Gentherapie unterscheidet man die Genmanipulation außerhalb des lebenden Organismus (*ex vivo*) von der Therapie innerhalb des Patienten (*in vivo*) (Kaufmann et al., 2013). Bei der *ex vivo*-Manipulation wird ein höherer Grad der Sicherheit angenommen, da die Transduktion direkt kontrolliert werden kann und akute Nebenwirkungen und unvorhersehbare Ereignisse außerhalb des Organismus zunächst vermieden werden. Weiterhin spielt die Methode, mit der das Transgen in die Zielzelle eingebracht werden soll, eine entscheidende Rolle. Hier kommen virale Transduktions- und nicht-virale Transfektionsmethoden zum Einsatz. Bei den viralen Vektoren werden integrierende Vektoren (z.B.  $\gamma$ -Retroviren und Lentiviren) und nicht-integrierende Vektoren (z.B. Adenoviren und Herpesviren) unterschieden.

Von  $\gamma$ -Retroviren abgeleitete Vektoren sind bisher die am meisten verbreiteten Transgenvehikel bei der klinischen Gentherapie. Die spezifischen Vorteile der  $\gamma$ -retroviralen Vektoren liegen in der effizienten Genexpression durch starke Promotoren, in der großen Klonierungskapazität und in der stabilen Integration des Transgens in das Zielzellgenom, so dass eine stabile und lang anhaltende Genexpression in mitotisch aktiven Zellen möglich ist. Bei diesen integrierenden Vektoren bleibt aber die Tumorinduktion infolge der Insertionsmutagenese eine wesentliche Problematik, die bei einer klinischen Studie zur

Behandlung der primären Immundefizienz SCID-X1 unter Verwendung eines  $\gamma$ -retroviralen Vektors beobachtet wurde. Hierbei kam es bei zwei von insgesamt 20 behandelten Patienten zwei bis fünf Jahre nach der Gentherapie zu dem Auftreten einer akuten lymphoblastischen T-Zell-Leukämie (Cavazzana-Calvo et al., 2000, 2005). Wesentliche Weiterentwicklungen bei den integrierenden Vektoren waren die selbst-inaktivierenden retroviralen Vektoren, bei denen die viralen Promotor- und Enhancer-Regionen aus der 5'-gelegenen langen terminalen Region durch zelleigene Promotoren ersetzt wurden (Maetzig et al., 2011; Schambach et al., 2013). Diese selbst-inaktivierenden Vektoren führten zu einer eher physiologischen Genexpression und reduzierten zugleich das Risiko der Tumorinduktion (Modlich et al., 2006; Zychlinski et al., 2008).

Nicht-integrierende Vektoren lagern das Transgen episomal im Kern der Zielzelle und schließen deshalb die Gefahr der Insertionsmutagenese und der damit verbundenen Tumorinduktion aus. Allerdings wird bei nicht-integrierenden Vektoren häufig ein zunehmender Verlust des Transgens in mitotisch aktiven Zellen beobachtet. Der Schwerpunkt der klinischen Anwendung dieser Vektoren liegt daher bisher eher bei transienten Verfahren, z.B. bei der Vakzine-Entwicklung oder bei der Transduktion differenzierter, post-mitotischer Zielzellen wie z.B. Neurone.

Die Eigenschaften der Zielzellen und ihre therapeutische Zugänglichkeit sind entscheidend für die Auswahl der geeigneten viralen Vektor-Varianten. Einerseits spielen zellbiologische Eigenschaften eine wesentliche Rolle, wie z.B. die Mitose-Aktivität oder der Differenzierungszustand. Andererseits wird durch die zellulären Oberflächenmoleküle der Zelltropismus des Virusvektors definiert. Bisher stehen differenzierte Zielzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen im Zentrum der Fragestellungen, während pluripotente Stammzellen aus ethischen Überlegungen kaum Anwendung gefunden haben. Die Anwendungen zielen einerseits auf den Ersatz eines fehlenden Gens oder auf die Korrektur eines fehlerhaften, veränderten Gens ab und andererseits auf die Fremdgenexpression zur funktionellen Korrektur, z.B. in der Onkologie. Gentherapeutische klinische Studien wurden für zahlreiche klinische Fragestellungen mit unterschiedlichen Typen von Zielzellen durchgeführt, z.B. wurden Keratinozyten zur Behandlung der Epidermolysis bullosa modifiziert (Mavillo et al., 2006), Hepatozyten zur Therapie der familiären Hypercholesterinämie (Grossmann et al., 1994), Neurone des Nucleus subthalamicus beim Morbus Parkinson (Kaplitt et al., 2007; LeWitt et al., 2011) und Zellen der Retina bei der Leber'schen kongenitalen Amaurosis (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008).

Außerdem werden immunkompetente Zellen als Zielzellen der Gentherapie eingesetzt. Hierbei sind besonders T-Lymphozyten interessant, die entweder direkt transduziert oder durch genetisch veränderte Antigen-präsentierende Zellen zu spezifischen Effektorzellen in

Form Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen stimuliert werden und sich besonders für die Tumorthherapie eignen (Riddell, 2007). Hierfür war die Entwicklung der Transduktion mit Transgenen für chimäre Antigenrezeptoren wesentlich, die auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert werden und Präsentations-unabhängig zur Erkennung des Tumor-Antigens, zur T-Zellaktivierung und zur gezielten Zytotoxizität führen (Gross et al., 1989). Klinische Studien in diesem Bereich wurden besonders für die Therapie von B-Zell-Lymphomen durchgeführt, bei denen CD19-spezifische chimäre Antigenrezeptoren eingesetzt wurden (Kochenderfer et al., 2010; Porter et al., 2011). HVS-Vektoren eignen sich sehr gut für die Expression rekombinanter chimärer Antigenrezeptoren in humanen T-Lymphozyten.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden große Fortschritte im Bereich der Gentherapie gemacht, die für spezielle seltene Fragestellungen mit fehlenden therapeutischen Alternativen den klinischen Alltag erreicht hat. Die weitere Entwicklung fokussiert daher auf die optimale Vektorkonfiguration, auf die optimalen Transduktions-Bedingungen der Zielzelle, auf den langfristigen Erhalt der Transgenexpression und auf die maximale Sicherheit für den Patienten.

## 7.2. Herpesvirus saimiri-basierte Vektoren für den Gentransfer

Das  $\gamma_2$ -Herpesvirus HVS gilt als vielversprechender Vektor für den Gentransfer und die Gentherapie aufgrund seiner wesentlichen natürlichen Eigenschaften:

- HVS kann ein breites Spektrum an Zielzellen inklusive primärer Fibroblasten infizieren (Alt & Grassmann, 1993; Simmer et al., 1991).
- Die virale DNA wird ohne genomische Integration episomal in hoher Kopienzahl in der Zielzelle gelagert und persistiert über viele Zellteilungen ohne Produktion infektiöser Viruspartikel (Biesinger et al., 1992; Fickenscher & Fleckenstein, 2001; Fickenscher et al., 1996).
- Beim Menschen sind keine wissenschaftlich überzeugend dokumentierten Erkrankungen durch HVS bekannt.
- Menschliche T-Zellen können in Kultur durch HVS C488 zu stabilem, Antigen-unabhängigem Wachstum ohne Verlust ihrer Antigen-spezifität transformiert werden (Biesinger et al., 1992).

HVS wurde erstmals bereits im Jahr 1985 für eine präklinische gentherapeutische Studie eingesetzt (Desrosiers et al., 1985). Damals wurde ein Expressionsvektor für bovines Wachstumshormon hergestellt, der zur Transduktion von T-Zellen aus *Saguinus oedipus in vitro* verwendet wurde. Außerdem wurden für das Virus permissive Neuweltaffen (*Saguinus fuscicollis* und *Aotus trivirgatus*) intramuskulär mit Virussuspension infiziert. In der Zellkultur war das bovine Wachstumshormon als RNA und als Protein über mehrere Monate

nachweisbar. Bei den experimentell transduzierten Neuweltaffen war ebenfalls das Hormon nachweisbar. Allerdings kam es hier zu einer starken Immunantwort, gemessen an der spezifischen IgG-Produktion, sowie nach drei Wochen zum Expressionsverlust (Desrosiers et al., 1985). Diese Ergebnisse zeigten, dass HVS-basierte Vektoren grundsätzlich zur Expression von Fremdgenen *in vitro* und *in vivo* geeignet sind, sowie zur effizienten Induktion einer Immunantwort gegen das produzierte fremde Protein. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar, da bei Neuweltprimaten eine besonders starke Permissivität für die Replikation von HVS besteht. Bei Rhesusaffen besteht dagegen eine stark eingeschränkte Replikationsfähigkeit von HVS in transduzierten T-Zellen, die stärker der Situation bei humanen Zellen ähnelt. Nach der Reinfusion transduzierter autologer T-Lymphozyten in die Spender-Makaken blieben diese T-Zellen längerfristig nachweisbar, ohne Pathogenität aufzuweisen (Knappe et al., 2000). Somit war der grundsätzliche Nachweis im menschnahen System geliefert, dass HVS-Vektoren für therapeutische Zwecke verwendbar wären.

Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit der Weiterentwicklung von HVS als Genexpressionsvektor (Alt et al., 1991; Calderwood et al., 2004; Duboise et al., 1996; Fickenscher & Fleckenstein, 2002; Grassmann & Fleckenstein, 1989; Griffiths et al., 2006; Stevenson et al., 1999; Whitehouse, 2003, 2011a, 2011b). HVS wurde weiter als Vektor zur Expression des Proteins Tax des Humanen T-Zell-Leukämievirus Typ 1 in humanen T-Zellen eingesetzt. Dabei konnten die transformierenden Tax-Funktionen definiert werden, u.a. auch unter Verwendung einer frühen Variante des Tet-regulierten Expressionssystems (Grassmann et al., 1989, 1992; Schmitt et al., 1998). HVS wurde auch für die Expression weiterer transformierender Funktionen erfolgreich eingesetzt, u.a. der zellulären Onkogene *c-fos* und *ras* und der humanen zellulären Telomerase (Alt & Grassmann, 1993; Guo et al., 1998; Toptan et al., 2010). HVS-Vektoren waren außerdem gut geeignet zur Transduktion von Tumorzellen (Brown et al., 2013; Hoggarth et al., 2005; Hong et al., 2011; Macnab et al., 2011; Smith et al., 2001; Stevenson et al., 2000; Turrell et al., 2011, 2012), von hämatopoetischen Zellen (Doody et al., 2005; Simmer et al., 1991) und von Knochenmark-Stromazellen (Frolova-Jones et al., 2000). Mit HVS-Vektoren transduzierte humane Tumorzellen konnten als Xenograft in Mäusen detailliert untersucht werden (Smith et al., 2005). Außerdem konnten HVS-Vektoren zur effizienten Transduktion muriner embryonaler Stammzellen und zu deren Untersuchung in Kultur und während der Differenzierung eingesetzt werden (Stevenson et al., 2000).

Mit der Absicht, HVS der einfacheren genetischen Manipulation zugänglich zu machen, wurde zunächst das Cosmid-Komplementationssystem erfolgreich eingesetzt (Ensser et al., 1999). Aus überlappenden HVS-Cosmiden gelang es in der Folge, ein komplettes BAC des

HVS-Genoms C488 zu generieren, so dass die bakterielle Genetik für effiziente Generierung von HVS-Mutanten verfügbar wurde (Toptan, 2010; Toptan et al., 2010).

Bei anderen Strategien zur Erstellung von HVS-BACs wurde die besondere Rolle der terminalen H-DNA-Repetitionen deutlich (Collins et al. 2002; White et al., 2003, 2007). Im Rahmen der technisch schwierigen Entwicklung von BAC-Konstrukten konnten auch Minimalvarianten (Amplicon-Systeme) für HVS entwickelt werden, in Anlehnung an frühere Ergebnisse an HSV und anderen Herpesviren (Epstein, 2005; Fraefel et al., 1996; Geller et al., 1990; Johnson et al., 1992; Saeki et al., 1998, 2001). Amplicons sind defektive Viruspartikel, die bis zu 150 kb fremder DNA aufnehmen können, die ihre infektiösen Eigenschaften beibehalten, aber wegen der Deletion essenzieller Gene nicht replizieren können. Notwendige Bestandteile von Amplicons sind eine Verpackungssequenz und ein lytischer Replikationsursprung. Infolge umfangreicher Deletionen wird die Klonierungskapazität des Vektors für Transgene stark erhöht. Amplicons können allerdings nur in Gegenwart von Helferviren replizieren, welche die deletierten Genfunktionen transkomplementieren, aber in der Regel von den Virus-ähnlichen Amplicon-Partikeln nicht abgereinigt werden können. Im Fall von HVS wurden die H-DNA als Verpackungssignal und das um *orf19-62* stark verkürzte HVS-Genom eingesetzt und die Amplicon-DNAs effizienter als die Helfervirus-Genome verpackt. Bei Deletion der H-DNAs konnte eine Helfervirus-Kontamination weitestgehend ausgeschlossen werden (Macnab et al., 2008; White et al., 2003, 2007). Somit könnten Amplicon-Systeme auch bei HVS für die Zukunft interessante Möglichkeiten für den Gentransfer ohne störende virale Genfunktionen eröffnen.

Bei vielen Fragestellungen der Gentherapie stellt die Nutzung von Suizid-Genen eine wichtige Strategie dar, so dass entweder Tumorzellen oder therapeutisch genutzte Zellen gezielt abgetötet werden können. Hierfür wird häufig das virale Enzym Thymidinkinase des HSV eingesetzt. Diese Thymidinkinase phosphoryliert die nicht toxische Substanz (*prodrug*) Ganciclovir zu einem Monophosphat, das durch zelluläre Kinasen zum Triphosphat modifiziert wird und ein Substrat der zellulären DNA-Polymerase darstellt. Bei der Zellteilung kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese, infolge des zellulären DNA-Schadens zur Apoptose und somit zur Elimination der Zielzellen (Aghi et al., 2000). HVS verfügt über eine eigene Thymidinkinase (Lang & Fleckenstein, 1990), die aber im Vergleich zu derjenigen des HSV eine geringere Aktivität aufweist und während der latenten Persistenz nicht exprimiert wird. Im Gegensatz zum Wildtyp-Virus waren rekombinante HVS-Varianten zur Expression der Thymidinkinase aus HSV in dem Neuweltaffen *Callithrix jacchus* deutlich stärker pathogen (Hiller et al., 2000a), da diese Thymidinkinase die virale Replikation *in vivo* wesentlich stärker unterstützt als diejenige des HVS. Dagegen konnten stabil transduzierte menschliche T-Zellen, in denen HVS nicht replizieren kann, in der Zellkultur nach Gabe von

GCV zuverlässig abgetötet werden (Hiller et al., 2000b). Somit kann diese heterologe Thymidinkinase als Sicherheitsmechanismus für persistierende HVS-Vektoren eingesetzt werden.

Der Einsatz Gewebe-spezifischer Promotoren zur Transgenexpression ist ein weiterer wesentlicher Faktor bei der Zelltyp-spezifischen Gen- oder Tumorthherapie. In vielen Fällen kann der Tumor durch direkte Punktion nicht selektiv erreicht werden, sei es auf Grund der primären Lage oder wenn bereits ein metastasiertes Stadium vorliegt. Wenn aber das therapeutische Transgen aufgrund eines Zelltyp-spezifischen Promotors nur in den Tumorzellen, aber nicht in den umgebenden Bindegewebszellen exprimiert wird, kann ein Zelltyp-spezifischer Effekt erreicht werden. Beispiele hierfür wären die Expression des Prostata-spezifischen Membranantigens in Prostatagewebe und Prostatakarzinomen oder diejenige des  $\alpha$ -Fetoproteins in hepatozellulären Karzinomen (Robson & Hirst, 2003). Gewebs-spezifische Promotoren können z.B. für die Expression von Suizid-Genen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde statt Zelltyp-spezifischen Promotoren eine Tet-regulierte Genexpression eingesetzt. Die strikte Regulation der Genexpression ist für die gezielte Nutzung eines therapeutischen Effekts von großer Bedeutung. Hier wurde das Tet-regulierte Zweischalter System verwendet, das durch die Gabe von Dox die Genexpression aktiviert und durch Entfernung von Dox aus dem System die Expression wieder aktiv unterdrückt. Die wesentlichen Komponenten dieses Systems sind der reverse, Tet-abhängige Transaktivator rTAS<sup>2</sup>-M2, der durch die Anwesenheit von Dox aktiviert wird, sowie der Transsuppressor tTS-PLDLS, der die Genexpression bei Abwesenheit von Dox aktiv reprimiert. Die Wirkung auf die Expression des Zielgens wird durch die Tet-Operatoren vor dem Minimalpromotor vermittelt (Gossen & Bujard, 1992; Hillen & Berens, 2002; Urlinger et al., 2000).

In diesem Projekt hatten die Wahl des hCMV-oder MMTV-basierten Minimalpromotors für die Expressionskassette und die Orientierung der Transgenkassette entscheidenden Einfluss auf die eGFP-Genexpression. Die Aktivitäten dieser beiden Minimalpromotoren in dieser Arbeit entsprachen den bereits beschriebenen Beobachtungen (Hoffmann et al., 1997), allerdings hier auf der Basis eines HVS-Promotors. Die eGFP-Expression war deutlich stärker unter der Kontrolle des hCMV-Minimalpromotors, zeigte aber im Vergleich zu dem MMTV-Minimalpromotor auch eine höhere Basalexpression in nicht-induzierten primären Fibroblasten. Außerdem führte die direkte Orientierung bei Verwendung des hCMV-Minimalpromotors zu besseren Expressionsergebnissen, dagegen war bei Verwendung des MMTV-Minimalpromotors die reverse Orientierung effizienter. Die aktuellen Beobachtungen erweitern die Ergebnisse, die mit episomalen Varianten des Epstein-Barr-Virus mit einem ähnlichen Regulationssystem erzielt wurden (Bornkamm et al., 2005). Zuvor konnte das Tet-



Regulationssystem bei HVS-Vektoren nicht effizient eingesetzt werden, da eine starke zelluläre Gegenregulation beobachtet wurde, die regelmäßig zu massiven Gendelektionen führte. Eine Ausnahme bildete hier allerdings die Tet-regulierte Expression des viralen Onkogens Tax durch HVS-Vektoren, bei der offenbar ein starker Selektionsdruck zugunsten des Transgens *tax* bestand (Schmitt et al., 1998). Als Alternative wurde zuvor das Mifepriston-aktivierte Regulationssystem in HVS-Vektoren zur Expression von Zytokinen erfolgreich eingesetzt (Wieser et al., 2005), das aber aufgrund der möglichen Wirkungen dieses Medikaments für Anwendungen im Menschen kontrovers diskutiert wird. Im Vergleich dazu hat das inerte Dox-Molekül große Vorteile.

### 7.3. Transduktion und Transgenexpression in Fibroblasten

#### Einfluss der verwendeten Infektionsmultiplizität auf die Genexpression

Die Infektiosität der rekombinanten Viren wird durch Titration als pfu/ml in Kulturen permissiver OMK-Zellen bestimmt. Die Infektionsmultiplizität, d.h. die Anzahl infektiöser Viruspartikel bezogen auf eine bekannte Zellzahl, wird als MOI angegeben. Dies ist Voraussetzung für den Vergleich von Virussuspensionen unterschiedlicher Konzentration. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche MOIs zwischen  $10^{-4}$  und  $0,5 \times 10^1$  verwendet, damit unterschiedliche Eigenschaften verschiedener Virusvektoren verglichen werden konnten. Dabei zeigte sich, dass Virussuspensionen mit einer MOI  $< 10^{-2}$  bei primären humanen Fibroblasten zu einer kaum messbaren eGFP-Expression führten. Bei Verwendung einer MOI  $> 1$  kam es zu einer ausgeprägten eGFP-Expression, aber auch zu vermehrter basaler Expression bei Zellen, die nicht mit Dox induziert wurden. Die Repression durch den Transsuppressor tTS reichte also bei hoher Infektionsmultiplizität, insbesondere bei Verwendung des hCMV-Minimalpromotors nicht aus, die eGFP-Expression vollständig zu unterdrücken. Anhand dieser Ergebnisse scheint eine MOI zwischen 0,1 und 0,5 für weiterführende Versuche die optimale Viruskonzentration zu sein, damit eine ausreichende Transgenexpression sichergestellt und eine ungewollte Basalexpression verhindert werden kann.

#### Einfluss der Transduktionsmethode auf die Genexpression

Die eGFP-Expression kann durch unterschiedliche Transduktionsmethoden beeinflusst werden. Dafür wurden die *über Nacht*-Methode, die *Spinokulation* und die *nächster Tag*-Methode miteinander verglichen. Dabei führte die *Spinokulation* kurzfristig zu verbesserten Expressionsergebnissen. Durch Zentrifugation scheint eine größere Anzahl von Virusvektoren in die Zellen zu gelangen, was der Steigerung der effektiven Infektionsmultiplizität entsprechen dürfte. Im weiteren Verlauf zeigten sich bei dieser Transduktionsvariante aber größere Verluste der eGFP-Expression durch vermehrten Zelltod. Etwas geringere Zellverluste ließen sich bei der *über Nacht*-Methode beobachten.

Beide Transduktionsvarianten haben gemein, dass Fibroblasten direkt nach der Behandlung mit Trypsin zum Ablösen von der Oberfläche und aus dem Zellverband transduziert werden. Einerseits bewirkt aber das Trypsinieren den Verlust von Oberflächenproteinen der Zellen, was die Infektion behindern könnte, andererseits führt das Trypsinieren aber auch zu einer Stimulation des Zellzyklus, was die Transduktionseffizienz verstärken könnte. Entsprechend könnten mitotische Zellen kurz nach der Transduktion empfindlicher für toxische Effekte durch die Virusvektoren, durch chemische Stimuli und durch intrazelluläres eGFP sein. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung gestützt, dass es bei der *nächster Tag*-Methode zu deutlich weniger Zellschäden kommt, d.h. nach Abschluss der ersten Mitosen und etablierter Adhäsion an die Oberfläche des Zellkulturgefäßes. Daher sollte die Transduktion primärer Fibroblasten frühestens 24 h nach Zellpassage erfolgen, damit die besten Expressionsergebnisse mit den geringsten Zellverlusten erreicht werden können.

### **Einfluss der Deletion der Resistenzkassette auf die Genexpression**

Die Kassette für das Kanamycin-Resistenz-Gen dient während der Herstellung rekombinanter Virusvektoren durch die Rekombination der HVS-BACs mit dem Transgen-tragenden Rekombinationskonstrukt als Selektionsmarker und wird für die anschließende Rekonstitution der rekombinanten Viren in permissiven, eukaryonten Zellen nicht mehr benötigt. Durch flankierende LoxP-Schnittstellen kann die Resistenzkassette durch die im *E. coli*-Stamm EL350 induzierbare Cre-Rekombinase unter Zurückbleiben einer einzelnen LoxP-Sequenz entfernt werden. Versuche mit Virusvektoren nach Deletion der Resistenzkassette zeigten, dass die Entfernung des Selektionsmarkers zu einem starken Anstieg der Expressionsstärke führte. Die Deletion des Selektionsmarkers und damit die Verringerung nicht-essentieller Bereiche innerhalb des Vektors führte zu einer reduzierten Genomgröße, zu höheren Titern und zu einer effizienteren Transduktion. Infolge dessen könnte die Infektionsmultiplizität der Virusvektoren und damit auch die Toxizität reduziert werden. Für zukünftige Experimente sollte versucht werden, die Genomgröße der Vektoren weiter zu reduzieren. Hierfür wäre die Entwicklung eines Amplicon-Systems interessant, bei dem das Vektorgenom auf eine Verpackungssequenz und einen lytischen Replikationsursprung zum Erhalt der Infektiosität reduziert werden müsste. Alternativ zu Amplicon-Systemen wäre es sinnvoll, verzichtbare, für die Replikation nicht essenzielle Virusgene aus dem Vektorgenom zu deletieren und damit die Klonierungskapazität zu erhöhen.

Zur Deletion ungewollter Sequenzen bietet sich das gut etablierte Cre/Lox-System an, wobei allerdings der Verbleib einer LoxP-Schnittstelle, also einer potentiell störenden Sequenz, hingenommen werden muss. Außerdem ist diese Strategie nicht flexibel und nicht mehrfach für dasselbe Konstrukt einsetzbar. Diese Nachteile werden bei der *en-passant*-Mutagenese

vermieden, die zur nahtlosen Exzision ungewollter Sequenzen führt (Tischer et al., 2006). Hierbei werden eine I-SceI-Schnittstelle und ein Fragment eingefügt, das zu der die Zielsequenz flankierenden Region homolog ist. Durch Induktion der *homing*-Endonuklease I-SceI in *E. coli* wird ein dsDNA-Bruch an dieser Stelle herbeigeführt. Durch homologe Rekombination der beiden Homologie-Regionen kommt es dann zu einer Exzision des dazwischen liegenden Genbereiches sowie zu einer nahtlosen Rekombination der DNA (Tischer et al., 2006, 2010). Dieses Verfahren kann ebenso zur Insertion von Genen mit demselben Prinzip verwendet werden. Für das Herpesvirus Varicella-Zoster-Virus wurde unter Anwendung der *en-passant*-Mutagenese die autonome Entfernung der mini-F-Sequenz im Rahmen der Virus-Rekonstitution in permissiven eukaryonten Kulturzellen etabliert (Wussow, 2009). Eine analoge Strategie zur autonomen und nahtlosen Deletion der Resistenzkassette wäre für HVS-Vektoren sinnvoll.

#### **7.4. Chemische Reinduktion der Transgenexpression in Fibroblasten**

Die stabile Expression des Transgens ist Voraussetzung für den langfristigen Erfolg einer Gentherapie. Deshalb wurde in dieser Arbeit auch die Kinetik der eGFP-Expression untersucht. In primären Fibroblasten nahm die Fluoreszenzintensität längerfristig deutlich ab. Die maximale eGFP-Expression war ca. eine Woche nach der Transduktion erreicht, reduzierte sich weiter, bis nach etwa zwei Monaten die Expression fast vollständig verloren gegangen war. Zur Aufklärung dieses Phänomens kamen vier wesentliche Überlegungen in Betracht:

##### **A) Spontane Mutationen im Transgen**

Die Ursache für den Expressionsverlust könnte in dem Transgen selbst zu finden sein. Auf der BAC-Ebene konnten PCR-Analysen der Transgenkassette keinen Hinweis auf eventuelle Mutationen oder Konstruktionsfehler erbringen. Ebenso erschien die Kartierung durch Restriktionsfragmentanalyse unauffällig. Allerdings zeigte die PCR-Analyse aus Virusüberständen überraschender Weise heterogene Ergebnisse. Während der Rekonstitution und Replikation der Virusmutanten in permissiven OMK-Zellen ereigneten sich offenbar Mutationen in einigen Zellen, so dass es zu heterogenen Viruspopulationen kam, die auch eine Inversion der Transgenkassette in MMTVgfp und eine 0,7 kb Deletion in MMTVgfpR umfassten. Bei MMTVgfpR konnte außerdem ein Teil des Transgens nicht nachgewiesen werden, der durch einen eGFP- und einen pgkT-bindenden Primer amplifizierbar sein sollte. Da die Kontrollamplifikationen effizient funktionierten, ist es unwahrscheinlich, dass diese Lücke im DNA-Nachweis auf das verwendete Primerpaar zurückzuführen war. Zur genauen Identifizierung der Veränderungen innerhalb der Transgenkassette und des Virusvektors sollte die gesamte Transgenkassette nach Rekonstitution sequenziert werden, oder noch besser das gesamte BAC-Konstrukt. Dies wäre mit Hilfe des *deep sequencing* realisierbar. Immerhin konnten aber auf RNA-Ebene die

Transkription der relevanten Vektorbestandteile und funktionell die regulierte eGFP-Expression nachgewiesen werden, was grundsätzliche Probleme bei der Vektorherstellung weitestgehend ausschließt.

### **B) Verlust des Transgens während der Mitose**

Die episomalen, nicht genomisch integrierten viralen Vektoren können außerdem infolge der Zellteilung verloren gehen. Fibroblasten sind, ebenso wie die Zellen des Mukosaepithels, des hämatopoetischen und des lymphatischen Systems mitotisch hochaktiv. Im Gegensatz dazu wurde in postmitotischen primären sensorischen Neuronen der Maus eine stabile Dox-induzierte eGFP-Expression über sechs Wochen beobachtet (Toptan, 2010). Für diese Fragestellung müsste die episomale Kopienzahl mit quantitativer PCR aus transduzierten Fibroblasten über die Zeit bestimmt werden.

### **C) Silencing des Transgens durch virale Latenzfaktoren**

Im Rahmen der latenten Persistenz des Virusvektors kann epigenetisches *Silencing* eine Ursache für den sekundären Expressionsverlust sein. Wie alle Herpesviren kann HVS in latenter, episomaler Form im Zellkern persistieren. Während der Latenz werden Gene abgeschaltet, die für die Virusreplikation typisch sind. Befindet sich das Transgen nun innerhalb eines Bereichs des Virusgenoms, das während der latenten Persistenz nicht exprimiert wird, kann es zu einem Verlust der Expression des Zielgens kommen. Dieses Problem könnte gelöst werden, indem auf dem Virusgenom andere Insertionsstellen für das Transgen erprobt werden, die während der Latenz aktiv transkribiert werden. Hierfür käme z.B. die Region von *orf73* infrage, die das Latenz-assoziierte nukleäre Antigen kodiert.

### **D) Epigenetische Modifikation durch zelluläre Mechanismen**

Als Ursache für die Abschaltung der Transkription viraler Genregionen kommen zelluläre epigenetische Modifikationen der viralen DNA infrage. Die Histon-Deacetylierung und die DNA-Methylierung wurden in dieser Arbeit durch den Einsatz von Hemmstoffen untersucht. Die Histon-Deacetylierung betreffend wurden TSA und NaB verwendet. Mit TSA konnten keine positiven Effekte auf die Genexpression erzeugt werden, da es zu einem massiven Zellsterben unter der Behandlung kam. Dagegen wurde NaB von den Zellen gut toleriert. Bei frühzeitiger Induktion konnte die Expression bereits nach 2 d deutlich verstärkt werden. Aber auch die Reinduktion nach einer Woche erbrachte eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz bei noch besserer Verträglichkeit und geringeren Zellverlusten. AZA wurde in dieser Arbeit als Inhibitor der DNA-Methyltransferase verwendet und erbrachte mit NaB vergleichbare Ergebnisse: Bei beiden Substanzen wurde von den behandelten Zellen die späte Induktion besser toleriert. Außerdem sind niedrige Substanz-Konzentrationen den höheren vorzuziehen, da es darunter zu konstanteren Ergebnissen aufgrund besserer Verträglichkeit kam. Im direkten Vergleich von NaB mit AZA war AZA bei den gewählten Versuchsbedingungen

die effizientere, aber NaB die verträglichere Substanz. Hinsichtlich weiterer Versuche mit TSA und dessen Effekt auf die Transgenexpression und die Verträglichkeit sollten Versuche mit niedrigeren Konzentrationen und einer späten Reinduktion durchgeführt werden.

Im Rahmen der chemischen Induktion konnte beobachtet werden, dass primäre Fibroblasten, die mit dem Transgen transduziert wurden, im Vergleich zu Mock und zu Wildtyp-transduzierten Zellen offenbar weniger resistent gegenüber Noxen sind. Einerseits kam es allein bedingt durch die verwendete Substanz zu vermehrten Zellverlusten, andererseits reagierten auch die Dox-induzierten Zellen empfindlicher auf eine sehr starke eGFP-Expression. Nach der Transduktion mit den Virusrekombinanten, jedoch nicht mit dem Wildtyp-Virus, kam es zu einer erhöhten Empfindlichkeit auf schädigende Einflüsse, deren Ursache weiter untersucht werden müsste.

Insgesamt konnte die eGFP-Transgenexpression in transduzierten primären Fibroblasten durch NaB und AZA in relevantem Maß gesteigert werden, so dass das epigenetisch bedingte *Silencing* als eine wesentliche Ursache des sekundären Expressionsverlusts gesichert werden konnte.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AZA	5-Aza-2'-Desoxycytidin
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaar
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
dpi	Tage nach Infektion ( <i>days post infection</i> )
dsDNA	Doppelstrang-DNA ( <i>double strand DNA</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanidin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hCMV	humanes Cytomegalovirus
H-DNA	repetitive DNA-Region von HVS ( <i>heavy DNA, high density</i> )
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HVS	Herpesvirus saimiri
IRES	interne ribosomale Eintritts-Stelle
Kana	Kanamycin
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
LANA	latentes nukläres Antigen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L-DNA	kodierende, zentrale DNA-Region von HVS ( <i>light DNA, low density</i> )
LoxP	<i>locus of crossing over</i> des Bakteriophagen P1
M-DNA	komplettes HVS-DNA-Genom ( <i>medium density DNA</i> ), inkl. H-DNA und L-DNA
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
MOI	Infektionsmultiplizität ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger-RNA</i>
NaB	Natriumbutyrat

OD	optische Dichte
OMK	<i>owl monkey kidney cells</i>
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PGK	Phosphoglycerylkinase
pfu	Plaque-bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rtTA	reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
ssDNA	Einzelstrang-DNA ( <i>single strand DNA</i> )
StpC	Saimiri-Transformations-assoziiertes Protein von Subgruppe-C-Stämmen
SV40	Simianes Virus 40
T	Thymin
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
TetA	Tetracyclin-abhängiger Aktivator
TetO	Tetracyclin-abhängiger Operator
TetR	Tetracyclin-abhängiger Repressor
Tip	Tyrosinkinase-interagierendes Protein
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )
TSA	Trichostatin A
tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
tTS	Tetracyclin-abhängiger Transsuppressor/Transsilencer
U	Uracil oder Einheit ( <i>Unit</i> )
U/min	Umdrehung pro Minute
WT	Wildtyp

## 9. Literaturverzeichnis

- Ablashi, D.V., Sunder, K.S., Armstrong, G., Golway, P., Valerio, M., Bengali, Z., Lemp, J., Fox, R.R.** (1980) Herpesvirus saimiri-induced malignant lymphoma in inbred strain III/J rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 98:165-172.
- Aghi, M., Hochberg, F., Breakefield, X.O.** (2000) Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J. Gene Med.* 2:148-164.
- Agha-Mohammadi, S., O'Malley, M., Etemad, A., Wang, Z., Xiao, X., Lotze, M.T.** (2004) Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J. Gene Med.* 6:817-828.
- Albrecht, J.C., Nicholas, J., Biller, D., Cameron, K.R., Biesinger, B., Newman, C., Wittmann, S., Craxton, M.A., Coleman, H., Fleckenstein, B., Honess, R.W.** (1992) Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.* 66:5047-5058.
- Allfrey, V., Faulkner, R.M., Mirsky, A.E.** (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51:786-794.
- Alt, M., Fleckenstein, B., Grassmann, R.** (1991) A pair of selectable herpesvirus vectors for simultaneous gene expression in human lymphoid cells. *Gene* 102:265-269.
- Alt, M., Grassmann, R.** (1993) Resistance of human fibroblasts to c-fos mediated transformation. *Oncogene* 8:1421-1427.
- Ashley, R.L., Corey, L., Dalessio, J., Wilson, P., Remington, M., Barnum, G., Trethewey, P.** (1994) Protein specific cervical antibody response to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. *J. Infect. Dis.* 170:20-26.
- Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S.S., Thrasher, A.J., Fitzke, F.W., Carter, B.J., Rubin, G.S., Moore, A.T., Ali, R.R.** (2008) Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358:2231-2239.
- Baron, U., Gossen, M., Bujard, H.** (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 25:2723-2729.
- Berens, C., Hillen, W.** (2003) Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* 270:3109-3121.
- Biesinger, B., Müller-Fleckenstein, I., Simmer, B., Lang, G., Wittmann, S., Platzer, E., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B.** (1992) Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3116-3119.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J.J., Rosenberg, S.A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C.A., Ramsey, W.J., Muul, L., Morgan, R.A., Anderson, W.F.** (1995) T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.
- Bornkamm, G.W., Delius, H., Fleckenstein, B., Werner, F.J., Mulder, C.** (1976) Structure of herpesvirus saimiri genomes: arrangement of heavy and light sequences in the M genome. *J. Virol.* 19:154-161.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Hölzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., Feuillard, J.** (2005) Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucl. Acids Res.* 33:e137.
- Brown, H.F., Unger, C., Whitehouse, A.** (2013) Potential of herpesvirus saimiri-based vectors to reprogram a somatic Ewing's sarcoma family tumor cell line. *J. Virol.* 87:7127-7139.
- Calderwood, M.A., White, R.E., Whitehouse, A.** (2004) Development of herpesvirus-based episomally maintained gene delivery vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:493-505.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bouso, P., Deist, F.L., Fischer, A.** (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., Lagresle, C., Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A.** (2005) Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu. Rev. Med.* 56:585-602
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Chinnadurai, G.** (2007) Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:1593-1607.
- Chiu, W., Rixon, F.J.** (2002) High resolution structural studies of complex icosahedral viruses: a brief overview. *Virus Res.* 82:9-17.



- Chopra, I., Roberts, M.** (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- Christman, J.K.** (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21:5483-5495.
- Chung, J.H., Whiteley, M., Felsenfeld, G.** (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74:505-514.
- Chung, J.H., Bell, A.C., Felsenfeld, G.** (1996) Characterization of the chicken  $\beta$ -globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:575-580.
- Collins, C.M., Medveczky, M.M., Lund, T., Medveczky, P.G.** (2002) The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *J. Gen. Virol.* 83:2269-2278.
- Daniel, M.D., Silva, D., Ma, N.** (1976) Establishment of owl monkey kidney 210 cell line for virological studies. *In Vitro* 12:290.
- Danke, C.** (2010) A novel regulatory system for tightly controlled and long-term inducible transgene expression in human cell lines. *urn:nbn:de:bvb:29-opus-18257*.
- Davie, J.R.** (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 133:2485-2493.
- Desrosiers, R.C., Falk, L.A.** (1982) Herpesvirus saimiri strain variability. *J. Virol.* 43:352-356.
- Desrosiers, R.C., Kamine, J., Bakker, A., Silva, D., Woychik, R.P., Sakai, D.D., Rottman, F.M.** (1985) Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a herpesvirus vector. *Mol. Cell Biol.* 5:2796-2803.
- Deuschle, U., Meyer, W. K.-H., Thiesen, H.J.** (1995) Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* 15:1907-1914.
- Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P.A.** (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.* 5:981-989.
- Doody, G.M., Leek, J.P., Bali, A.K., Ensser, A., Markham, A.F., de Wynter, E.A.** (2005) Marker gene transfer into human haemopoietic cells using a herpesvirus saimiri-based vector. *Gene Ther.* 12:373-379.
- Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., Benz, C.C.** (2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:495-528.
- Duboise, S.M., Guo, J., Desrosiers, R.C., Jung, J.U.** (1996) Use of virion DNA as a cloning vector for the construction of mutant and recombinant herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11389-11394.
- Duboise, M., Guo, J., Czajak, S., Lee, H., Veazey, R., Desrosiers, R.C., Jung, J.U.** (1998a) A role for herpesvirus saimiri orf14 in transformation and persistent infection. *J. Virol.* 72:6770-6776.
- Duboise, S.M., Guo, J., Czajak, S., Desrosiers, R.C., Jung, J.U.** (1998b) STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J. Virol.* 72:1308-1313.
- Ensser, A., Thurau, M., Wittmann, S., Fickenscher, H.** (2003) The genome of herpesvirus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. *Virology* 314:471-487.
- Ensser, A., Fleckenstein, B.** (2005) T-cell transformation and oncogenesis by  $\gamma_2$ -herpesviruses. *Adv. Cancer Res.* 93:91-128.
- Ensser, A., Pfänder, A., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B.** (1999) The URNA genes of herpesvirus saimiri (strain C488) are dispensable for transformation of human T cells in vitro. *J. Virol.* 73:10551-10555.
- Epstein, A.L.** (2005) HSV-1-based amplicon vectors: design and applications *Gene Ther.* 12:154-158.
- Fickenscher, H., Biesinger, B., Knappe, A., Wittmann, S., Fleckenstein, B.** (1996) Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J. Virol.* 70:6012-6019.
- Fickenscher, H., Fleckenstein, B.** (2001) Herpesvirus saimiri. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356: 545-567.
- Fickenscher, H., Fleckenstein, B.** (2002) Growth-transformation of human T cells. *Meth. Microbiol.* 32:657-692.
- Fleckenstein, B., Desrosiers, R.C.** (1982). Herpesvirus saimiri and herpesvirus ateles. In: *The herpesviruses, Vol. 1, B. Roizman, ed. New York, London: Plenum Press* 253-332.
- Fleckenstein, B., Ensser, A.** (2007)  $\gamma$ -Herpesviruses of New World primates. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press*, Chapter 60.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P., Geller, A.** (1996) Helper virus-free transfer of herpes simplex type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* 70:7190-7197.
- Frolova-Jones, E.A., Ensser, A., Stevenson, A.J., Kinsey, S.E., Meredith, D.M.** (2000) Stable marker gene transfer into human bone marrow stromal cells and their progenitors using novel herpesvirus saimiri-based vectors. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 9:573-581.
- Gatz, C., Quail, P.H.** (1988) Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1394-1397.
- Geissendörfer, M., Hillen, W.** (1990) Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded tet regulatory elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:657-663.

- Geller, A.I., Keyomarsi, K., Bryan, J., Pardee, A.B.** (1990) An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors; potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8950-8954.
- Gibson, W.** (1996) Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39:389-400.
- Giles, M.S., Smith, P.G., Coletta, P.L., Hall, K.T., Whitehouse, A.** (2003) The herpesvirus saimiri ORF73 regulatory region provides long-term transgene expression in human carcinoma cell lines. *Cancer Gene Ther.* 10:49-56.
- Gossen, M., Bujard, H.** (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551.
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., Ramstedt, U.** (1992) Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.* 66:4570-4575.
- Grassmann, R., Dengler, C., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., McGuire, K., Dokhelar, M.C., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A.** (1989) Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a herpesvirus saimiri vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3351-3355.
- Grassmann, R., Fleckenstein, B.** (1989) Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J. Virol.* 63:1818-1821.
- Griffiths, R.A., Boyne, J.R., Whitehouse, A.** (2006) Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors. *Curr. Gene Ther.* 6:1-15.
- Gross, G., Waks, T., Eshhar, Z.** (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10024-10028.
- Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Muller, D., Lupien, P.J., Wilson, J.M.** (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat. Genet.* 6:335-341.
- Guo, J., Williams, K., Duboise, S.M., Alexander, L., Veazey, R., Jung, J.U.** (1998) Substitution of ras for the herpesvirus saimiri STP oncogene in lymphocyte transformation. *J. Virol.* 72:3698-3704.
- Hamer, H., Jonkers, D., Bast, A., Vanhoutvin, S., Fischer, M., Kodde, A., Troost, F., Venema, K., Brummer, R.-J.** (2009) Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin. Nutr.* 28:88-93.
- Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., Jacobson SG.** (2008) Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum. Gene Ther.* 19:979-990.
- Hillen, W., Berens, C.** (2002) Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *Biospektrum* 4:355-358.
- Hiller, C., Tamgüney, G., Stolte, N., Mätz-Rensing, K., Lorenzen, D., Hör, S., Thurau, M., Wittmann, S., Slavina, S., Fickenscher, H.** (2000a) Herpesvirus saimiri pathogenicity enhanced by thymidine kinase of herpes simplex virus. *Virology* 278:445-455.
- Hiller, C., Wittmann, S., Slavina, S., Fickenscher, H.** (2000b) Functional long-term thymidine kinase suicide gene expression in human T cells using a herpesvirus saimiri vector. *Gene Ther.* 7:664-674.
- Hodawadekar, S.C., Marmorstein, R.** (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26:5528-5540.
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N.** (1982) P1 site-specific recombination: Nucleotide sequence of the recombination sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3398-3402.
- Hoffmann, A., Villalba, M., Journot, L., Spengler, D.** (1997) A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res.* 25:1078-1079.
- Hoggarth, J.H., Jones, E., Ensser, A., Meredith, D.M.** (2005) Functional expression of thymidine kinase in human leukaemic and colorectal cells, delivered as EGFP fusion protein by herpesvirus saimiri-based vector. *Cancer Gene Ther.* 11:613-624.
- Hong, Y., Macnab, S., Lambert, L.A., Turner, A.J., Whitehouse, A., Usmani, B.A.** (2011) Herpesvirus saimiri-based endothelin-converting enzyme-1 shRNA expression decreases prostate cancer cell invasion and migration. *Int. J. Cancer* 129:586-598.
- Hsi, L.C., Xi, X., Wu, Y., Lippman, S.M.** (2005) The methyltransferase inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine induces apoptosis via induction of 15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 4:1740-1746.
- Jaenisch, R., Bird, A.** (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Gen.* 33:245-254.
- Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., Wimmer, E.** (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* 62:2636-2643.

- Ji, Y., Zhang, B., Van Horn, S.F., Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M.K., Rosenberg, M. (2001) Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* 293: 2266-2269.
- Johnson, P.A., Miyanojara, A., Levine, F., Cahill, T., Friedmann, T. (1992) Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 66:2952-2965.
- Jung, J.U., Choi, J.K., Ensser, A., Biesinger, B. (1999) Herpesvirus saimiri as a model for  $\gamma$ -herpesvirus oncogenesis. *Cancer Biol.* 9:231-239.
- Kaplitt, M.G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H.L., Mattis, P., Lawlor, P.A., Bland, R.J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., During, M.J. (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369:2097-2105.
- Kaufmann, K.B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., Grez, M. (2013) Gene Therapy on the move. *EMBO Mol. Med.* 5:1642-1661.
- Kim, H.-J., Gatz, C., Hillen, W., Jones, T. (1995) Tetracycline repressor-regulated gene repression in recombinant human cytomegalovirus. *J. Virol.* 69:2565-2573.
- Knappe, A., Feldmann, G., Dittmer, U., Meinel, E., Nisslein, T., Wittmann, S., Mätz-Rensing, K., Kirchner, T., Bodemer, W., Fickenscher, H. (2000) Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. *Blood* 95:3256-3261.
- Knappe, A., Hiller, C., Thurau, M., Wittmann, S., Hofmann, H., Fleckenstein, B., Fickenscher, H. (1997) The superantigen-homologous viral immediate-early gene ie14/vsag in herpesvirus saimiri-transformed human T cells. *J. Virol.* 71:9124-9133.
- Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.A., Lanier, B.J., Morgan, R.A., Rosenberg, S.A. (2010) Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116:4099-4102.
- Lane, A.A., Chabner, B.A. (2009) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 27:5459-5468.
- Lang, G., Fleckenstein, B. (1990) Trans activation of the thymidylate synthase promoter of herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 64:5333-5341.
- Lee, E.C., Yu, D., de Velasco, J.M., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (2001) A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73:56-65.
- Levison, M.E. (1973) Effect of colon flora and short-chain fatty acids on growth in vitro of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* 8:30-35.
- LeWitt, P.A., Rezai, A.R., Leehey, M.A., Ojemann, S.G., Flaherty, A.W., Eskandar, E.N., Kostyk, S.K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M.S., Tatter, S.B., Schwalb, J.M., Poston, K.L., Henderson, J.M., Kurlan, R.M., Richard, I.H., Van Meter, L., Sapan, C.V., During, M.J., Kaplitt, M.G., Feigin, A. (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* 10:309-319.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., Ke, N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:712-717.
- Lutz, R., Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR, the TetR/O and AraC/11-12 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 25:1203-1210.
- Macnab, S., White, R., Hiscox, J., Whitehouse, A. (2008). Production of an infectious herpesvirus saimiri-based episomally maintained amplicon system. *J. Biotechnol.* 134:287-296.
- Macnab, S.A., Turrell, S.J., Carr, I.M., Markham, A.F., Coletta, P.L., Whitehouse, A. (2011) Herpesvirus saimiri-mediated delivery of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor gene reduces proliferation of colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 39:1173-1181.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., Schambach, A. (2011)  $\gamma$ -Retroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses* 3:677-713.
- Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr, Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V.R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., Ma, J.X., Redmond, T.M., Zhu, X., Hauck, B., Zelenaia, O., Shindler, K.S., Maguire, M.G., Wright, J.F., Volpe, N.J., McDonnell, J.W., Auricchio, A., High, K.A., Bennett, J. (2008) Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358:2240-2248.
- Margolin, J.F., Friedman, J.R., Meyer, W.K.-H., Vissing, H., Thiesen, H.-J., Rauscher, F.J. 3rd (1994) Krüppel associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4509-4513.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro S, Conti A, Magnoni C, Giannetti A, De Luca M. (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* 12: 1397-1402.
- Medveczky, P., Szomolanyi, E., Desrosiers, R.C., Mulder, C. (1984) Classification of herpesvirus saimiri into three groups based on extreme variation in a DNA region required for oncogenicity. *J. Virol.* 52:938-944.

- Medveczky, M.M., Szomolanyi, E., Hesselton, R., DeGrand, D., Geck, P., Medveczky, P.G.** (1989). Herpesvirus saimiri strains from three DNA subgroups have different oncogenic potentials in New Zealand white rabbits. *J. Virol.* 63:3601-3611.
- Medveczky, M.M., Geck, P., Sullivan, J.L., Serbousek, D., Djeu, J.Y., Medveczky, P.G.** (1993) IL-2 independent growth and cytotoxicity of herpesvirus saimiri-infected human CD8 cells and involvement of two open reading frame sequences of the virus. *Virology* 196:402-412.
- Melendez, L.V., Daniel, M. D., Hunt, R. D., Garcia, F. G.** (1968) An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey. *Lab. Anim. Care* 18:374-381.
- Melendez, L.V., Hunt, R.D., Daniel, M.D., Garcia, F.G., Fraser, C.E.** (1969) Herpesvirus saimiri. II. Experimentally induced malignant lymphoma in primates. *Lab. Anim. Care* 19:378-386.
- Mikloska, Z., Cunningham, A.L.** (1998) Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* 79:353-361.
- Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knöss, S., Schambach, A., Baum, C.** (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108:2545-2553.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H.** (2010) Molekulare Virologie. *Spektrum Verlag Heidelberg*, 3. Auflage, 17-21.
- Moon, C., Kim, S.H., Park, K.S., Choi, B.K., Lee, H.S., Park, J.B., Choi, G.S., Kwan, J.H., Joh, J.W., Kim, S.J.** (2009) Use of epigenetic modification to induce FOXP3 expression in naïve T cells. *Transplant Proc.* 41:1848-1854.
- Papadakis, E.D., Nicklin, S.A., Baker, A.H., White, S.J.** (2004) Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 4:89-113.
- Pelletier, J., Sonnenberg, N.** (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.
- Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., June, C.H.** (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365:725-733.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.-J.** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Riddell, S.R.** (2007) Engineering antitumor immunity by T-cell adoptive immunotherapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2007:250-256.
- Riggs, A.D., Porter, T.N.** (1996) Overview of Epigenetic Mechanisms. *Cold Spring Harbor Monographs* 32:29-45.
- Robson, T., Hirst, D.G.** (2003) Transcriptional targeting in Cancer Gene Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2:110-137.
- Roizman, B., Pellett, P.E.** (2001) The family herpesviridae: a brief introduction. *In Fields Virology* 2:2381-2398.
- Roizman, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J.** (1992) The family herpesviridae: An update. The herpesvirus study group of the international comitee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 123:425-449.
- Rosenwirth, B., Kondova, I., Niphuis, H., Greenwood, E.J., Schmidt, F., Verschoor, E.J., Wittmann, S., Heeney, J.L., Bogers, W.M., Fickenscher, H., Koopman, G.** (2011) Herpesvirus saimiri infection of rhesus macaques: a model for acute rhadinovirus-induced t-cell transformation and oncogenesis. *J. Med. Virol.* 83:1938-1950.
- Russell, W.C.** (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81:2573-2604.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Rauscher, F.J., 3rd** (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19:4366-4378.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E.A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X.O., Fraefel, C.** (1998) Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: Rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 9:2787-2794.
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ischikawa, T., Breakefield, X.O., Chiocca, E.A.** (2001) Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA bacterial artificial chromosome. *Mol. Ther.* 3:591-601.
- Schäfer, A., Lengenfelder, D., Grillhösl, C., Wieser, C., Fleckenstein, B., Ensser, A.** (2003). The latency-associated nuclear antigen homolog of herpesvirus saimiri inhibits lytic virus replication. *J. Virol.* 77:5911-5925.
- Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B., Baum, C.** (2013) Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 24:132-142.
- Schmitt, I., Rosin, O., Rohwer, P., Gossen, M., Grassmann, R.** (1998) Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 72:633-640.

- Shankar, S., Srivastava, R.K.** (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 615:261-298.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y.** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223-239.
- Shimomura, O.** (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microscopy* 217:1-15.
- Shizuya, H., Kouros-Mehr, H.** (2001) The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J. Med.* 50:26-30.
- Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W., Niederweis, M.** (2000) Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 267:527-534.
- Simmer, B., Alt, M., Buckreus, I., Berthold, S., Fleckenstein, B., Platzer, E., Grassmann, R.** (1991) Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines. *J. Gen. Virol.* 72:1953-1958.
- Smith, P.G., Burchill, S.A., Brooke, D., Coletta, P.L., Whitehouse, A.** (2005) Efficient infection and persistence of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector into human tumor xenografts and multicellular spheroid cultures. *Cancer Gene Ther.* 12:248-256.
- Smith, P.G., Coletta, P.L., Markham, A.F., Whitehouse, A.** (2001) In vivo episomal maintenance of a herpesvirus saimiri-based gene delivery vector. *Gene Ther.* 8:1762-1769.
- Sternberg, N., Hamilton, D.** (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150:467-486.
- Steven, A.C., Spear, P.G.** (1997) Herpesvirus capsid assembly and envelopment. In: Structural Biology of Viruses, *Oxford University Press*, 312-351.
- Stevenson, A.J., Clarke, D., Meredith, D.M., Kinsey, S.E., Whitehouse, A., Bonifer, C.** (2000) Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors maintain heterologous expression throughout mouse embryonic stem cell differentiation in vitro. *Gene Ther.* 7:464-471.
- Stevenson, A.J., Cooper, M., Griffiths, J.C., Gibson, P.C., Whitehouse, A., Jones, E.F., Markham, A.F., Kinsey, S.E., Meredith, D.M.** (1999) Assessment of Herpesvirus saimiri as a potential human gene therapy vector. *J. Med. Virol.* 57:269-277.
- Stevenson, A.J., Frolova-Jones, E., Hall, K.T., Kinsey, S.E., Markham, A.F., Whitehouse, A., Meredith, D.M.** (2000) A herpesvirus saimiri-based gene therapy vector with potential for use in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 7:1077-1085.
- Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N.** (2006) Two-step Red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* 40:191-197.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., Osterrieder, N.** (2010) En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol.* 643:421-430.
- Toptan, T.** (2010) Rhadinovirus vector-mediated transgene expression and regulation. URL: <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/11259>.
- Toptan, T., Ensser, A., Fickenscher, H.** (2010) Rhadinovirus vector-derived human telomerase reverse transcriptase expression in primary T cells. *Gene Ther.* 17:653-661.
- Turrell S.J., Macnab, S.A., Rose, A., Melcher, A.A., Whitehouse, A.** (2012) A herpesvirus saimiri-based vector expressing TRAIL induces cell death in human carcinoma cell lines and multicellular spheroid cultures. *Int. J. Oncol.* 40:2081-2089.
- Turrell, S.J., Whitehouse, A.** (2011) Mutation of herpesvirus saimiri ORF51 glycoprotein specifically targets infectivity to hepatocellular carcinoma cell lines. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:785158.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., Hillen, W.** (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7963-7968.
- Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G., Rogiers, V.** (2004) Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* 11:1629-1943.
- Wagner, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H.** (2002) Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 10:318-324.
- White, R.E., Calderwood, M.A., Whitehouse, A.** (2003) Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J. Gen. Virol.* 84:3393-3403.
- White, R.E., Carline, L., Allday, M.J.** (2007) Mutagenesis of the herpesvirus saimiri terminal repeat region reveals important elements for virus production. *J. Virol.* 81:6765-6770.
- Whitehouse, A.** (2011a) Assessment of infectivity using a herpesvirus saimiri (HVS) recombinant that expresses HVS-GFP. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011:1520-1523.
- Whitehouse, A.** (2011b) Production of recombinant herpesvirus saimiri-based vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011:1515-1519.
- Whitehouse, A.** (2003) Herpesvirus saimiri: a potential gene delivery vector. *Int. J. Mol. Med.* 11:139-148.

- Wieser, C., Stumpf, D., Grillhösl, C., Lengenfelder, D., Gay, S., Fleckenstein, B., Ensser, A.** (2005) Regulated and constitutive expression of anti-inflammatory cytokines by nontransforming herpesvirus saimiri vectors. *Gene Ther.* 12:395-406.
- Wright, J., Falk, L. A., Collins, D., Deinhardt, F.** (1976) Mononuclear cell fraction carrying herpesvirus saimiri in persistently infected squirrel monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 57:959-962.
- Wussow, F.** (2009) Seamless manipulation of the varicella-zoster virus genome via bacterial artificial chromosome engineering. *Universitätsbibliothek Kiel: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:8-diss-45757>.*
- Yang, X.J., Seto, E.** (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26:5310-5318.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Court, D.L.** (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5978-5983.
- Zhao, L.J., Subramanian, T., Vijayalingam, S., Chinnadurai, G.** (2007) PLDLS-dependent interaction of E1A with CtBP: regulation of CtBP nuclear localization and transcriptional functions. *Oncogene* 26:7544-7551.
- Zielke, K., Full, F., Teufert, N., Schmidt, M., Müller-Fleckenstein, I., Alberter, B., Ensser, A.** (2012) The insulator protein CTCF binding sites in the orf73/LANA promoter region of herpesvirus saimiri are involved in conferring episomal stability in latently infected human T cells. *J. Virol.* 86:1862-1873.
- Zychlinski, D., Schambach, A., Modlich, U., Maetzig, T., Meyer, J., Grassman, E., Mishra, A., Baum, C.** (2008) Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol. Ther.* 16:718-725.

## 10. Lebenslauf

Name Hanna Langenberger  
 geboren 21. August 1980 in Wedel  
 Anschrift Osterkoppel 1, 24805 Hamdorf

### Schule

1987-93 Rudolf-Steiner Schule, Hamburg  
 1993-98 Gymnasium Marienthal, Hamburg  
 1998-00 Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg

### Berufspraktika

1996 AVUS, Gesellschaft für Arbeits- Verkehrs- und Umweltsicherheit mbH, Hamburg  
 1999 Experimentelle Dermatologie, Beiersdorf AG, Hamburg  
 2000 Möbeltischlerei Andreas Northe, Hamburg  
 2005 Centro de Salud de Monimbo und Hospital Dr. Humberto Alvarado, Masaya, Nicaragua  
 2007 Hospital Nuestra Señora de los Reyes, Valverde, El Hierro, Islas Canarias

### Berufsausbildung

2001-2004 Ausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin, MTA-Schule am UKSH in Kiel

### Studium

2005 Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel  
 2011 Approbation zur Ärztin

### Beruf

2004 MTLA, Mikrobiologie, Ferring Arzneimittel, Kiel  
 2012 Assistenzärztin, Urologie, imland Klinik Rendsburg  
 2014 Assistenzärztin, Anästhesie, imland Klinik Rendsburg  
 2015 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin, Rendsburg

### Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Dissertation

Toptan, T., Danke, C., Hüske, L., **Langenberger, H.**, Ensser, A., Hillen, W., Berens, C., and Fickenscher, H. (07.-11.04.2010) Highly efficient and regulatable transgene expression by non-integrating herpesvirus saimiri-based rhadinovirus vectors. 4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italia: Workshop Oncolytic viruses and Gene Therapy, Poster Session, 08.04.2010, 16:45-19:00, Poster Nr. 693.

## 11. Danksagung

Mein größter Dank geht an Herrn Prof. Fickenscher, der mir diese interessante Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mit konstruktiven Anregungen und Geduld stets an meiner Seite stand.

Weiterhin möchte ich von ganzem Herzen Tuna Toptan danken. Ohne sie wäre ich wohl im Dschungel der Labormethoden hoffnungslos verschollen gewesen. Mit ihrem Engagement und Ehrgeiz war sie immer bereit, eine Lösung für meine großen und kleinen Probleme zu finden. Aber auch in puncto Motivation und Mitgefühl hat sie mich nie im Stich gelassen, sei es bei dem Gefühl der Verzweiflung vor einem riesigen Berg neuer Dinge zu stehen, von denen ich bis dato noch nicht einmal etwas gehört hatte, oder im privaten Bereich in der Zeit, als mein Vater verstarb. Tuna, vielen Dank und alles Gute für Dich in Pittsburgh und auf Deinem weiteren Lebensweg!

Mein weiterer Dank geht an Felix Wussow, Tanja Spieckermann, Linda Hüske, Anne Brunemann, Björn Brändl und Oliver Braum für eine interessante Zusammenarbeit und eine sehr nette und entspannte Arbeitsatmosphäre. Auch möchte ich Gregor Maschkowitz danken. Mit Dir in der Zellkultur gab es neben konstruktiver Diskussionen auch immer was zu lachen. Danke auch an PD Dr. Michael Winkler, Ljudmilla Kolker und der Arbeitsgruppe von Prof. Eberhard Hildt. Manchmal war es doch recht eng im Zellkulturlabor, aber immer wurde eine positive Lösung gefunden.

Aber was wäre aus dieser Arbeit geworden ohne die große Unterstützung durch meine Familie. In erster Linie geht mein Dank hier an meine Mutter. Auch über eine Entfernung von mehreren tausend Kilometern war sie per Telefon und Internet immer ganz nah bei mir. Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Zwillingschwester Lena, ihrem Ehemann Hendrik und meiner kleinen Nichte Luisa, die mir immer die nötige Kraft gegeben haben niemals aufzugeben. Aber auch meinen anderen Schwestern, Eva und Anja, möchte ich danken – einfach nur, weil es euch gibt!

Zum Schluss, aber nicht weniger wichtig, möchte ich meinem Mann Oliver danken. Du hast mir Deine Liebe geschenkt, dazu gibt es eigentlich nicht mehr zu sagen.



## **12. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die Abhandlung der vorliegenden Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher und Frau Dr. med. Tuna Toptan, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Teile dieser Arbeit wurden bereits bei einer wissenschaftlichen Tagung veröffentlicht. Zudem entstand die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Hamdorf, den 12.01.2015

Hanna Langenberger