

**Verschiedene Ansätze in der hepatischen retroviralen  
Gentherapie: Regulation der Genexpression,  
in vivo, ex vivo und second line Gentherapie**

Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.  
für das Fach Biochemie

Genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Claudia-Yasmin Paul  
geboren am 07.01.1973 in Peine

2003

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. J. Schmidtke

Tag der Promotion: 14.04.2003

## Abstract (deutsch)

**Schlagwörter:** retrovirale Gentherapie, hepatozelluläres Karzinom, embryonale Hepatozyten

Die Gentherapie ist eine prinzipiell neue Therapieform zur Behandlung von Krankheiten, die in einzelnen Bereichen der Medizin kurz vor der klinischen Anwendung steht, jedoch bei der Mehrzahl der möglichen Indikationen das experimentelle Stadium noch lange nicht verlassen kann. Besonders die Gentherapie von Tumoren steht noch vor sehr großen ungelösten Problemen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit aktuellen Fragestellungen, Problemen und neuen Konzepten der retroviralen Gentherapie in der Leber. Schwerpunkt der Arbeit bilden hierbei spezielle Probleme in der Gentherapie des hepatozellulären Karzinoms. Da die Prognose von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen oft von der Leberfunktion abhängt, dürfen neue gentherapeutische Optionen die gesunden Leberzellen nicht beeinträchtigen.

Hinsichtlich der retroviraler Gentherapieansätze wurden mehrere Gebiete bearbeitet. Das erste Thema beschäftigt sich mit der durch Doxycyclin regulierbaren Genexpression nach retroviraler Transduktion von hochdifferenzierten Hepatomzellen (HepG2) und der Entwicklung optimierter Vektoren. Weiterhin wurden die Möglichkeiten der retrovirale Gentherapie in und ex vivo untersucht. Die Gentherapie in vivo führte jedoch nur zum Erfolg, wenn die transduzierten Hepatozyten durch eine Nachselektion in vivo einen Wachstumsvorteil erhielten.

Außerdem wurde gezeigt, daß eine Chemotherapie-vermittelte Selektion von Tumorzellen möglich ist, die mit einem bicistronischen Retrovirus (dnFADD-IRES-EGFP oder dnFADD-IRES-HSV-TK) transduziert wurden. Hierdurch ergeben sich neue experimentelle Therapieansätze, die aufbauend auf den Mechanismen der Tumorprogression eine second line Gentherapie mit Ganciclovir ermöglichen.

Letztlich wurde gezeigt, daß die adenovirale p53-Gentherapie, die aufgrund der schlechten Transduktionsrate von Tumoren, auch bei Unterstützung durch das Protein VP22, bislang zu keinem durchschlagenden Erfolg geführt hatte, durch Kotransfektion mit retroviralen Vektoren, die für Faktoren der Leberregeneration und der hepatischen Genregulation kodieren, verbessert werden kann.

## Abstract (english)

**Keywords:** retroviral gene therapy, hepatocellular carcinoma, embryonal hepatocytes

Gene therapy represents a conceptually new approach to the treatment of disease, and a small quantity is brief before clinical application, but the majority of all possible indications cannot leave the experimental state for a long time yet. In particular the gene therapy of tumors faces a lot of unsolved problems.

This submitted work deals with current questions, problems and new concepts of retroviral gene therapy concerning hepatic diseases. The main point of the work focuses on special problems of the gene therapy of hepatocellular carcinomas. As the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma is dependent on remaining liver function, new options of hepatic gene therapy must not affect healthy hepatocytes.

With regard to new concepts in retroviral gene therapy, this work deals with several fields. First, it is about the regulation of gene expression with doxycycline after retroviral transduction of highly differentiated human hepatoma cells (HepG2) and the development of optimized vectors. Second, the possibilities of retroviral gene therapy in vivo and ex vivo were examined. The gene therapy in vivo only lead to success in the case that transduced hepatocytes harboured a selective advantage over resident hepatocytes and obtained a selection in vivo.

Furthermore it was shown that a chemotherapy-mediated selection of tumor cells, which are transduced with a bicistronic retrovirus (dnFADD-IRES-EGFP or dnFADD-IRES-HSV-TK), is possible. From this arise new experimental therapeutical concepts that render a second line gene therapy with gangciclovir based on the mechanisms of tumor progression.

Finally it was demonstrated that the adenoviral p53 gene therapy, which has not lead to a striking success because of low transduction rates in tumors, even with support by the protein VP22, can be improved by cotransfection with retroviral vectors which code for factors of liver regeneration and hepatic gene regulation.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorgelegte Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 28.04.2003

Claudia-Yasmin Paul

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Universität Hannover und für seine stets freundliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. J. Schmidtke danke ich für die Übernahme des Koreferates.

PD Dr. S. Kubicka danke ich für seine Vorversuche, die dieses interessante Thema hervorgebracht haben, für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

PD Dr. Ott danke ich für Hilfe und Rat bei der Arbeit mit embryonalen Hepatozyten.

Dr. C. Fritsch danke ich für die Klonierung und die Überlassung des Vektors pTOITA.

S. Krause danke ich für die Klonierung und Überlassung der Vektoren tTA2, 3 und 4.

Dr. L. Zender danke ich für Betreuung, Rat und Hilfe bei schwierigen Operationen, verschiedenen Klonierungen, den Chemotherapien und der Arbeit mit Adenoviren.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover für ihre Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Christian Stanik, ohne dessen seelische und computertechnische Unterstützung diese Dissertation sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das Chemie-Studium ermöglicht haben und mich auch während der Promotion weiter unterstützt haben.

Ich danke all meinen Freunden, die mich durch die schwierige Zeit begleitet haben.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Gentherapie	1
1.1.1	Einsatzmöglichkeiten der Gentherapie	1
1.1.2	Methodik und Ziele der Gentherapie	1
1.1.3	Methoden des Gentransfers	2
1.1.4	Gentherapie in der Hepatologie	3
1.2	Viren	3
1.2.1	Eigenschaften der Viren	3
1.2.2	Retroviren	4
1.2.3	Aufbau der Retroviren am Beispiel MoMLV	5
1.2.4	Replikation der Retroviren	5
1.2.5	Retroviren in der Gentherapie	6
1.2.6	Aufbau retroviraler Vektorkonstrukte	6
1.2.7	Tetracyclin-induzierbare Systeme	7
1.3	Maligne Tumoren der Leber	9
1.3.1	Das HCC	9
1.3.2	Konventionelle Therapien des HCC	9
1.3.3	Resektion	9
1.3.4	Systemische Therapie	10
1.3.5	Regionale Chemotherapie und Chemoembolisation	10
1.3.6	Perkutane regionale Therapieverfahren	11
1.3.7	Therapieergebnisse	12
1.4	Verwendete Gene	12
1.4.1	GFP	12
1.4.2	HSV-TK	13
1.4.3	Das HSV-TK/Ganciclovir-System	13
1.4.4	dnFADD	14
1.4.5	p53-Proteine	15
1.4.6	DNA-Synthese in der Leber: HGF und c-met	16
1.4.7	hepatische Regulation der Genexpression: C/EBP und HNF	16
1.5	Stammzellen	17
1.6	Zielsetzung	17

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1	Agarosegelelektrophorese	18
2.1.2	Klonierung von DNA in Plasmidvektoren	18
2.1.3	Restriktionsendonucleasen	19
2.1.4	Aufreinigung von DNA über eine Silikatsäule	20
2.1.5	Dephosphorylierung mit SAP	20
2.1.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	20
2.1.7	Mengenbestimmung von DNA	21
2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien	22
2.1.10	Präparation von Plasmid-DNA	22
2.1.11	Linker	23
2.1.12	Klenow-fill-in	24
2.1.13	Phosphorylierung	24
2.2	Zellbiologische Methoden	25
2.2.1	Zellextrakte	25
2.2.2	Gewebeextrakte	25
2.2.3	GFP-Screening	25
2.2.4	$\beta$ -Galactosidase-Färbung von lacZ-transfizierten Zellen	26
2.2.5	Proteinassay nach Bradford	26
2.2.6	Western-Blot	26
2.2.7	Allgemeine Zellkulturbedingungen	27
2.2.8	Zelllinien	27
2.2.9	Vektoren	28
2.2.10	Kryokonservierung von Zellen	28
2.2.11	Primärkultur embryonaler Maushepatozyten	28
2.3	Retroviren	29
2.3.1	Producerzelllinien	29
2.3.2	Retrovirusproduktion	29
2.3.3	Infektion der Zielzellen	30
2.3.4	Ultrazentrifugation	30
2.3.5	Ultrafiltration	31



2.3.6	Selektion retroviral transduzierter Zellen	31
2.4	Operationstechniken	32
2.4.1	Tiere	32
2.4.2	2/3 Hepatektomie	32
2.4.3	Milzinjektion	32
2.4.4	Organentnahme	33
2.5	PCR	33
2.5.1	Allgemeine PCR-Bedingungen	33
2.5.2	Generierung von Schnittstellen durch PCR	34
2.6	Puffer und Lösungen	35
2.6.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	35
2.6.2	$\beta$ -Galactosidase-Färbung	36
2.6.3	Proteinanalyse durch Western-Blot	36
2.6.4	Zellkultur	37
2.7	Geräte	38
2.8	Chemikalien	39
2.9	Verbrauchsmaterialien	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Entwicklung von pTOITA	41
3.2	Entwicklung von tTA2, 3 und 4	44
3.3	Optimierung des Gentransfers	48
3.4	Gentherapie in vivo	51
3.5	Gentherapie ex vivo	54
3.6	Selektion von HSV-TK-transduzierten Tumorzellen durch antiapoptotische Mediatoren	61
3.7	Verbesserung adenoviraler Transduktion der Leber durch retrovirale Expression von Faktoren der Leberregeneration und der Genregulation	68

4.	Diskussion	71
4.1	Gentransfersysteme: Vorteile und Schwächen	71
4.1.1	Retroviren als Gentransfersysteme	71
4.1.2	Regulation der Genexpression in Retroviren	72
4.1.3	Das Tet-system	72
4.1.4	Problemstellungen in der retroviralen Gentherapie: Virustiter	73
4.1.5	Problemstellungen in der retroviralen Gentherapie: Transduktionseffizienz	74
4.2	Verschiedene Wege der Gentherapie	75
4.2.1	In vivo Gentherapie	75
4.2.2	Ex vivo Gentherapie	78
4.3	Weitere Ansätze zur retroviralen Gentherapie	83
4.3.1	second line Gentherapie	84
4.3.2	Selektionsvorteil in Kolonkarzinomzellen	84
4.4	Adenovirale p53-Gentherapie	85
4.4.1	Verbesserte adenovirale Therapie durch VP22	86
4.4.2	Verbesserte adenovirale Therapie durch retrovirale Kotransfektion	87
4.5	Die Zukunft	88
4.5.1	Retrovirus-Hybride	88
4.5.2	Nichtvirale Vektoren	88
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literatur	91

# 1. Einleitung

## 1.1 Gentherapie

### 1.1.1 Einsatzmöglichkeiten der Gentherapie

Nicht nur die klassischen Erbkrankheiten, sondern auch viele andere Erkrankungen des Menschen beruhen auf veränderten Genen. Durch die rasche Entwicklung in der molekularbiologischen Grundlagenforschung in den letzten Jahren scheinen jetzt die Techniken bereit zu stehen, um gezielt in die Regulation von Genen eingreifen zu können und somit eine vollkommen neue Therapie-Option für einzelne Erkrankungen etablieren zu können: die sogenannte „Gentherapie“ .

Es gibt drei große Bereiche, in der die Gentherapie zukünftig Eingang in die Klinik finden könnte:

- Erbkrankheiten (z.B. Hämophilie etc.)
- Krebserkrankungen
- virale Infektionserkrankungen.

Es steht außer Zweifel, daß die Gentherapie eine neue Therapieoption in der zukünftigen Medizin darstellen wird. Aber die Indikationen, die Methoden des Gentransfers und der Stellenwert dieser neuen Therapieoption sind noch vollkommen unklar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit aktuellen Fragestellungen, Problemen und neuen Konzepten der retroviralen Gentherapie in der Leber. Schwerpunkt der Arbeit bilden hierbei spezielle Probleme bei der Gentherapie des hepatozellulären Karzinoms.

### 1.1.2 Methodik und Ziele

Als Gentherapie wird das Einschleusen von genetischem Material in Körperzellen mit therapeutischem oder präventiven Nutzen bezeichnet. Eine zunehmende Zahl von Krankheiten lassen sich heutzutage molekular auf das Fehlen oder den Defekt eines einzelnen Gens zurückführen. Ziel einer gentherapeutischen Behandlung ist in diesem Fall die gezielte Substitution des entsprechenden Genprodukts [1].

Im Gegensatz zur Gensubstitution steht die Genblockade. Dieses gezielte Abschalten von Genen dient der Eliminierung unerwünschter Eigenschaften. Neben

ungezielter Auslösung von Mutationen durch mutagene Chemikalien oder Bestrahlung stehen heute gentechnische Methoden zur gezielten Abschaltung von Genen wie das *gene silencing* oder das *knock-out* zur Verfügung. Dazu werden sowohl Techniken auf den Ebenen der DNA und der mRNA verwendet. Die bekannteste Methode dürfte dabei die *Antisense*-Technik darstellen. Hierbei wird das Gen, das gehemmt werden soll, in umgekehrter Richtung in einen Expressionsvektor inkloniert. Die bei der Transkription des Vektors entstehende mRNA (*Antisense*-RNA, *asRNA*) ist somit komplementär zur mRNA des normalen Gens und verhindert durch Hybridisierung zu einem RNA-Doppelstrang, der nicht mehr an die Ribosomen anheften kann, die Synthese des Genprodukts [2].

Man unterscheidet zwei Arten der Gentherapie, die somatische und die Keimbahn-Gentherapie. Bei der somatischen Gentherapie werden veränderte Gene in das betroffene Organ eingeschleust, bei der Keimbahn-Gentherapie würde das veränderte Gen in eine Eizelle oder ein Spermium eingebracht, wodurch die genetische Veränderung auf die Nachkommen übertragen wird. Diese Art der Gentherapie unterliegt jedoch beim Menschen einem Moratorium. Weiterhin unterscheidet man die Gentherapie *ex vivo*, bei der Zellen außerhalb des Körpers transformiert, vermehrt und dem Patienten wieder zurückgegeben werden, und die Gentherapie *in vivo*, bei der der Patient direkt mit genetischem Material behandelt wird [3].

### 1.1.3 Methoden des Gentransfers

Der erste Schritt jeder Gentherapie ist die reproduzierbare Einschleusung von genetischem Material in die Zielzellen. Die bekannteste Methode hierzu ist das Prinzip der viralen Transfermethode, wobei genetisch modifizierte Viren als Transportvehikel für genetisches Material genutzt werden. Dazu wird mit Hilfe molekularer Klonierungstechniken das gewünschte Gen in das Erbgut eines Virus eingebaut. Dagegen stehen als Möglichkeit des nichtviralen Gentransfers die Behandlung mit nackter DNA oder mit Liposomen.

In den meisten Fällen wird der virale Gentransfer *ex vivo* durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Zielzelle genau charakterisiert ist und der Gentransfer selbst verifiziert werden kann. Zu den am besten untersuchten viralen Vektoren gehören die Retro- und die Adenoviren [4].

### **1.1.4 Gentherapie in der Hepatologie**

Soll ein für den Stoffwechsel wichtiges Protein ersetzt werden, bieten sich Hepatozyten für einen Gentransfer an [5,6]. Für eine Gensubstitution kommen in erster Linie in Frage: familiäre Hypercholesterinämie,  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel oder Morbus Wilson. Neben diesen primär metabolischen genetischen Erkrankungen kann das Ziel der Gensubstitution aber auch die Einschleusung eines Tumorsuppressorgens wie p53 in Tumorzellen sein, deren maligner Phänotyp durch eine Mutation dieses Gens bedingt ist [7 - 13].

Aktuelle Studien zur hepatischen Gentherapie konzentrieren sich zur Zeit in erster Linie auf die Lösung methodischer Probleme, wie etwa die Optimierung des Gentransfers und der Genexpression [14 - 18].

## **1.2 Viren**

### **1.2.1 Eigenschaften der Viren**

Gemeinsam ist allen Viren eine Grösse zwischen 20 und 300 nm, die sie ultrafiltrierbar macht. Die Viruspartikel oder Virionen bestehen aus Proteinen und enthalten jeweils nur eine Art von Nucleinsäure, entweder DNA oder RNA. Viren vermehren sich nicht durch Teilung, sondern sie replizieren sich in lebenden Zellen, die sie infizieren. Dort entfalten sie ihre Genomaktivität und produzieren die Komponenten, aus denen sie selbst aufgebaut sind. Sie codieren weder für eine eigene Proteinsynthesemaschinerie, den Ribosomen, noch für energiebildende Stoffwechselsysteme. Viren stellen damit intrazelluläre Parasiten dar. Sie können zelluläre Prozesse umsteuern und für den optimalen Ablauf ihrer eigenen Vermehrung modifizieren. Sie besitzen neben der Erbinformation für ihre Strukturkomponenten Gene für verschiedene regulatorisch aktive Proteine wie z.B. Transaktivatoren und für Enzyme wie z.B. Polymerasen [19].

Für eine erfolgreiche Infektion muss das Virion in der Lage sein, bestimmte Rezeptormoleküle auf der Cytoplasmamembran der Wirtszelle zu erkennen und sich an diese zu adsorbieren, bevor es die Zelle penetrieren kann. In der Zelle erfolgt die Freisetzung der viralen Nucleinsäure als Ergebnis eines noch weitgehend

ungeklärten Prozesses, der Uncoating genannt wird. Als Replikation werden die komplexen Vorgänge der viralen Genexpression und Genomvermehrung, die bei allen Virustypen unterschiedlich verlaufen kann, bezeichnet. An ihrem Ende liegen vielfache Kopien der viralen Strukturen in der infizierten Wirtszelle vor. Der Vorgang der Virusmorphogenese beschreibt den Zusammenbau der verschiedenen Komponenten zu infektiösen Viruspartikeln. Dieser Zusammenbau erfolgt weitgehend ohne Inanspruchnahme zellulärer Enzyme durch Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile und wird daher auch als Self-Assembly bezeichnet. Der Weg der Freisetzung der Viren ist die Knospung, auch Budding genannt [20,21].

### **1.2.2. Retroviren**

Einen ersten Hinweis auf die Assoziation von Viren mit Tumorerkrankungen erhielt man 1936 mit der Entdeckung des MMTV (murines Milchdrüsen-Tumor-Virus). Dieses Virus kann nicht nur als infektiöses, exogenes Partikel übertragen werden (horizontale Übertragung), sondern auch als endogener Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration (vertikale Übertragung). 1970 wurde bei den Retroviren die reverse Transkriptase entdeckt. Dieses Enzym kommt einzig bei den Retroviren vor und spiegelt sich in deren Namen wider. Das Enzym ist in der Lage, den üblichen genetischen Informationsfluss von DNA über RNA in Protein umzukehren, hiermit kann RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. 1980 beschrieb R. C. Gallo mit dem HTLV (humanes T-Zell- Leukämie-Virus) das erste Retrovirus, das beim Menschen Krebserkrankungen verursachen kann. In den folgenden Jahren konnte Gallo die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS identifizieren. Die große Forschungsaktivität, die dieser Befund nach sich zog, führte dazu, dass heute viele Einzelheiten der Molekularbiologie und Pathogenese retroviraler Infektionen bekannt sind und dass diese Viren zu den am besten untersuchten gehören.

Die Familie der Retroviridae ist in drei Unterfamilien, die Onkoviren, die Lentiviren und die Spumaviren, unterteilt. Das für die beschriebenen Experimente verwendete MoMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) gehört dabei der Gruppe der Onkoviren an, deren tumorerzeugendes Potential auf transformationsaktiven Proteinen (v-Onc) beruht. Diese ähneln zellulären Produkten (c-Onc), die gewöhnlich an der geregelten Zellteilung beteiligt sind. Die viralen Onc-Proteine sind gegenüber zellulären

Produkten durch Mutationen so verändert, dass sie keiner Kontrolle mehr unterliegen, also konstitutiv aktiv sind [22-24].

### 1.2.3 Aufbau der Retroviren am Beispiel von MoMLV

Der Retroviruspartikel besitzt einen Durchmesser von ca. 100 nm. Das sphärisch-ikosaedrische Capsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Cytoplasmamembran der Zelle abgeleitet ist. Das Capsid enthält zwei identische Moleküle einsträngiger RNA als Virusgenom sowie die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Das Virusgenom besitzt eine Länge von etwa 7000 Basen und codiert für die Produkte *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (enzymatische Aktivitäten) und *env* (Glycoproteine).

Nach der reversen Transkription wird die virale Erbinformation in Form von doppelsträngiger DNA als so genanntes Provirus durch das Enzym Integrase in das Genom der Zelle integriert. Dieses integrierte Provirusgenom hat an den Enden identische Sequenzfolgen, die im Verlauf des Umschreibens der RNA in die DNA generiert werden. Sie flankieren die Virusgene und werden als LTR (long terminal repeats) bezeichnet. Das LTR enthält alle *cis*-aktiven Sequenzen, die Promotor-, Enhancer- und Repressor-Elemente, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren. Spezifische Sequenzen der genomischen viralen RNA fungieren als Verpackungssignale ( $\psi$ ).

### 1.2.4 Replikation der Retroviren

Der externe Teil des Membranproteinkomplexes vermittelt die Adsorption der Retroviren an ihre Zielzellen, den zellulären Reaktionspartner konnte man allerdings nur beim HIV-Virus identifizieren. Die Virusmembran verschmilzt mit der Cytoplasmamembran und entlässt das Capsid ins Zellinnere. Im Cytoplasma schreibt die reverse Transkriptase das RNA-Genom in doppelsträngige DNA um und generiert die LTR. Die DNA wird zum Zellkern transportiert und infiziert die Zelle. Dabei stellen Lentiviren eine Ausnahme dar: Während alle anderen Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren können, infizieren Lentiviren auch ruhende Zellen. Im Zellkern wird das DNA-Molekül in das Genom der Wirtszelle integriert, ein Vorgang, der durch das Enzym Integrase vermittelt wird. Abhängig von der Lage der Integration können zelluläre Gene zerstört werden oder sie geraten unter den Einfluss des 3'-LTR-Promotors und werden so aktiviert. Die Produktion der viralen

*env*-Proteine erfolgt anschließend an der Membran des endoplasmatischen Retikulums, die Translation aller anderen Virusproteine erfolgt an freien Ribosomen im Cytoplasma. Mit Hilfe zellulärer Faktoren werden die Proteine zur Zellmembran transportiert, wo die Morphogenese zu infektiösen Virionen stattfindet. Im Falle von HIV sterben die Zellen durch die Virusvermehrung ab, der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird induziert. Andere Retroviren sind dagegen nicht cytolytisch, sie induzieren eine persistierende Infektion, in deren Verlauf kontinuierlich Nachkommenviren gebildet werden, ohne dass die Zelle hierdurch geschädigt oder abgetötet wird [25].

### 1.2.5 Retroviren in der Gentherapie

Retrovirale Vektoren finden in den letzten Jahren bevorzugt Einsatz bei gentherapeutischen Ansätzen. Sie sind meist von den murinen Leukämieviren abgeleitet, da deren Biologie detailliert untersucht ist, sie einen hohen Virustiter erbringen und eine hohe Verfügbarkeit von Varianten des MoMLV gegeben ist, die auch humane Zellen infizieren können. Da Retroviren nicht in der Lage sind, zusätzliche genetische Informationen zu tragen, müssen vor Einbau therapeutischer Gene die viruseigenen Gene *gag*, *pol* und *env* entfernt werden. Dies führt zu replikationsinkompetente Viren, was wiederum die Sicherheit bei Einsatz dieser Viren erhöht. Packungszelllinien wie die Zelllinie  $\Phi$ NX 293 T *ampho* oder *eco*, die die benötigten viralen Gene tragen, werden daher zur Virusherstellung eingesetzt. Um eine unerwünschte Entstehung von replikationskompetenten Viren in der Packungszelle zu vermeiden, wurden Zelllinien entwickelt, die jeweils die *gag-pol*-Gene und die *env*-Gene auf zwei verschiedenen Konstrukten tragen. Der Vorteil des Systems des retroviralen Gentransfers ist die stabile Integration der Fremdgene, die bei Teilungen an die Tochterzellen weitergegeben werden. Bei diesem stabilen Gentransfer mit chromosomaler Integration des Genmaterials kommt der Regulation der Expression des transferierten Gens natürlich eine besonders hohe Bedeutung zu. Mit Adenoviren kann man dagegen stets nur eine transiente Transfektion der Zellen erreichen, bei der die Kontrolle der Genexpression nicht vorderrangig ist. Nachteilig ist die den Retroviren eigene unspezifische Integration an willkürlichen Stellen des Zellgenoms [26,27].



### 1.2.6 Aufbau retroviraler Vektorkonstrukte

Heterologe Gene, die in einen retroviralen Vektor eingebaut werden, können auf unterschiedliche Weise exprimiert werden. Sollen z.B. zwei verschiedene heterologe Gene exprimiert werden, so kann ein Gen durch den viralen Promotor des LTR exprimiert werden, das andere durch einen zusätzlich eingefügten internen Promotor (IP). Der interne Promotor kann aber auch durch Einsatz einer Internal Ribosome Entry Site (IRES), die aus Picornaviren stammt, vermieden werden. IRES ermöglicht die Translation zweier Genprodukte, was zu einem höheren Virustiter, stabilerer Expression transduzierter Gene und zur Möglichkeit des Einbaus größerer Vektorkonstrukte führt [28-32].

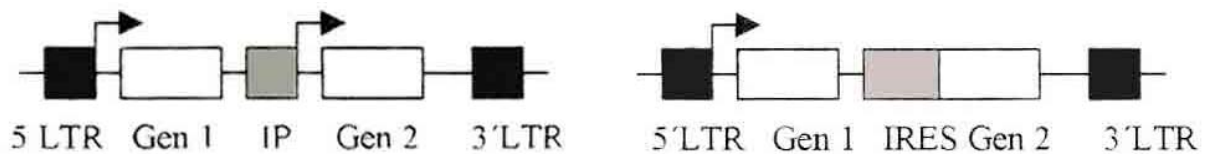


Abbildung 1.3: Retrovirale Vektorkonstrukte mit IP oder mit IHRES

### 1.2.7 Tetracyclin-induzierbare Systeme

Die Expression eines integrierten Genes mittels exogener Stimuli regulieren zu können, stellt einen wichtigen Aspekt in der Genterapie dar. Ein solches System („Tet-off“), welches die Regulation der Genexpression mittels von außen zugeführten Tetracyclin erlaubt, wurde 1992 von Gossen und Bujard entwickelt [33]. Die Hauptkomponenten dieses Systems bestehen aus einem minimalen CMV-Promotor (CMVmin), der downstream einer multiplen Operatorsequenz (tetO) des Tetracyclin-Operons von *E. coli* platziert ist, und einem Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor (tetR) und der transkriptionalen Aktivierungsdomäne des VP16 aus Herpes simplex. tetR und VP16 bilden den Transaktivator tTA, der an die tetO-Sequenzen (oder Tetracyclin Responsive Element, TRE) bindet und so den CMVmin stimuliert. TRE und CMVmin bilden die so genannte TO-Einheit. In Abwesenheit von Tetracyclin oder seinem effektiveren Derivat Doxycyclin [34,35] kann der Transaktivator aufgrund einer Konformationsänderung nicht mehr an die TO-Einheit binden, wodurch die Transkription unterbunden wird. Die Funktion dieses Systems wurde sowohl in Zellkultur als auch in transgenen Mäusen bestätigt [36-40].

Da sich die Anwesenheit von Tetracyclin störend auf verschiedene Versuche auswirkte, entwickelte Gossen et al. 1995 das „Tet-on-System“ mit einem reversen

Transaktivator rtTA, der gegenüber tTA umgekehrte DNA-Bindungseigenschaften besitzt, also auf die Anwesenheit von Tetracyclinen angewiesen ist, um aktiviert zu werden [41].

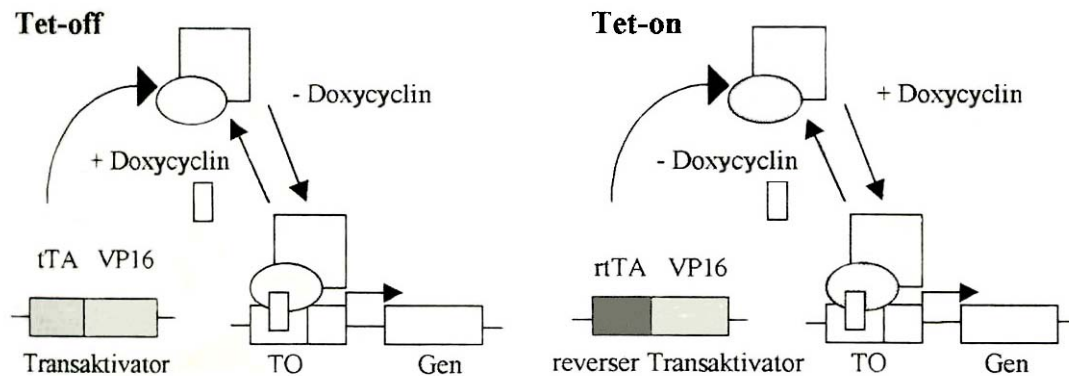


Abbildung 1.4 Das Tet-off und das Tet-on-System

Paulus et al. entwarfen 1996 einen vom MoMLV abgeleiteten retroviralen Vektor, in dem der Transaktivator tTa unter der Kontrolle eines internen SV(simian virus)40-Promotors stand, die Firma Clontech entwickelte mit pRetro-On den entsprechenden rtTA-Vektor. In humanen Hepatomzellen, der Zelllinie HepG2 ließ sich jedoch kein Zellklon generieren, der eine Regulation der Genexpression erlaubte [42].

Im Gegensatz hierzu entwarf Hofmann et al. 1996 den Vektor pBabeM-SIN (selbst-inaktivierend) CMV 15-1 mit einer Kopplung von IRES und tTA (alternativ rtTA), wodurch der interne SV40-Promotor überflüssig ist [43]. In Versuchen ergab sich eine gute Regulation der Genexpression, jedoch keine Selektionsmöglichkeit der transduzierten Zellen von nicht-transduzierten Zellen. Durch den SIN-Vektor, in dem der Enhancer deletiert ist und der sich nach einem Zyklus der Vektor-Replikation selbst inaktiviert [44-46], besteht keine Möglichkeit zum Einsatz eines Selektionsgens wie z.B. Puro<sup>r</sup> (Puromycinresistenz).

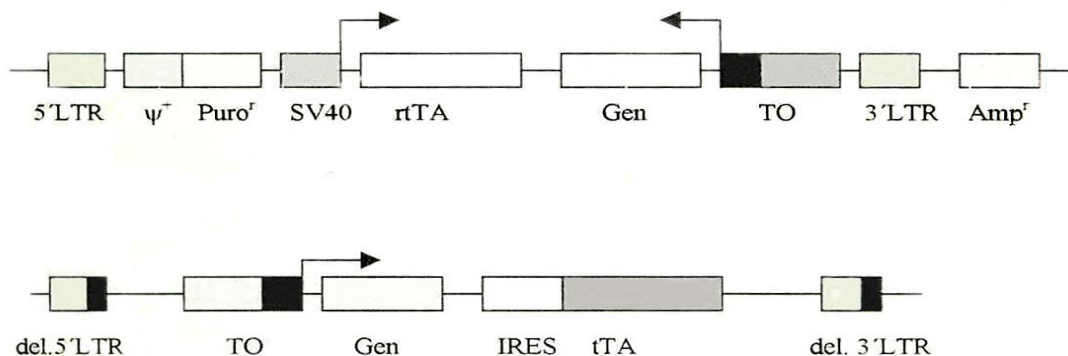


Abbildung 1.5: Die Vektoren pRetro-on (oben) und pBabeM-SIN CMV 15-1 (unten)

## **1.3 Maligne Tumoren der Leber**

### **1.3.1 Das HCC**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist klinisch ein hochmaligner Tumor mit rascher Progredienz (mittlere Überlebenszeit 6 Monate) und limitierten therapeutischen Möglichkeiten. Weltweit sind 6,2% aller Malignome beim Mann und 2,6% aller Malignome bei der Frau HCC's. Die Häufigkeit der Tumore zeigt dabei deutliche geographische Unterschiede: in Industrieländern treten etwa 2 HCC pro 100.000 Einwohner und Jahr auf, in Entwicklungsländern sind es 150. Klinisch-epidemiologische Studien zeigten, dass die HCC-Inzidenz sehr eng mit der Prävalenz der Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion korreliert. HCC entwickeln sich jedoch auch als Folge anderer chronischer Hepatopathien: Hepatitis C, Alkohol, Aflatoxine, Hämochromatose, Porphyrie etc. Auffallend selten entwickeln sich dagegen HCC bei Lebererkrankungen wie primärer biliärer Zirrhose (PBC) oder Morbus Wilson. Bei etwa 75% der HCC-Patienten besteht gleichzeitig eine Leberzirrhose, so dass jede Leberzirrhose als Präkanzerose anzusehen ist [47,48].

### **1.3.2 Konventionelle Theapien des HCC**

Zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms stehen zur Zeit verschiedene konservative Ansätze zur Verfügung:

### **1.3.3 Resektion**

Die Resektion (Hemihepatektomie) stellt die bisher einzige kurative Therapie des HCC dar. Voraussetzungen hierfür sind eine technisch resezierbare Läsion sowie die Erkennung des HCC in einem frühen Stadium, in dem der Tumor noch klein ist und noch nicht metastasiert hat. Resezierbare Metastasen eines kolorektalen Karzinoms sollten stets chirurgisch angegangen werden. Kleinere solitäre Metastasen werden dabei synchron mit dem Primärtumor entfernt, bei größeren solitären Massen oder bei mehreren Metastasen in einem Leberlappen ist eine Hemihepatektomie erforderlich, die nach Resektion des Primärtumors erfolgen sollte [49-52]. Metastasen, die wegen ihrer Lokalisation nicht resektionsfähig sind, z.B. im Bereich der Leberpforte oder der Vena cava, können kryochirurgisch zerstört werden [53]. Aber auch in niedrigen Tumorstadien kann oft aufgrund einer fortgeschrittenen

Leberzirrhose eine Resektion des Tumors nicht mehr möglich sein oder ein deutlich erhöhtes Risiko für den Patienten bedeuten. In beiden Fällen bietet sich die Lebertransplantation als chirurgische Therapiealternative an. Im Zusammenhang mit der bekannten Limitierung der Lebertransplantationen durch die geringe Zahl an Spenderorganen muß die Indikation zur Transplantation bei diesen Patienten jedoch sehr kritisch gestellt werden.

#### **1.3.4 Systemische Therapie**

Hepatozelluläre Karzinome sprechen schlecht auf eine systemische Chemotherapie an. Kontrollierte Studien zeigten mit keiner Einzelsubstanz oder Kombinationschemotherapie objektive Ansprechraten über 20%. Es gibt zur Zeit keine Standard-Chemotherapie für metastasierte hepatozelluläre Karzinome. Nach bisheriger Erkenntnis verlängert eine systemische Chemotherapie nicht das Leben der Patienten mit einem HCC und auch die Palliation von Tumorsymptomen durch diese Therapie ist fraglich [54]. Seit man weiß, daß hepatozelluläre Karzinome Hormonrezeptoren exprimieren, galten Therapieversuche mit Rezeptorantagonisten als Alternative zur systemischen Chemotherapie. Antiandrogene zeigten jedoch keinen Effekt auf das Tumorwachstum [55] und auch die Wirksamkeit von Oestrogenrezeptorantagonisten konnte nach initialen positiven Daten in einer großen prospektiv randomisierten und placebokontrollierten Studie nicht belegt werden [56]. Allerdings liegt sehr oft ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium oder ein Stadium mit multiplen Lebertumoren vor. Dies hat wichtige Konsequenzen für die therapeutischen Optionen. Bei vielen Patienten kommt eine chirurgische Resektion nicht mehr in Betracht, während regionale Therapieverfahren prinzipiell attraktiv erscheinen. Grosse Hoffnung wird nun auf neu entwickelte Gentherapien gesetzt

#### **1.3.5 Regionale Chemotherapie und Chemoembolisation**

Hepatozelluläre Karzinome befallen oft allein die Leber, sind hypervaskularisiert und werden vorwiegend durch Äste der Arteria hepatica versorgt. Dies begründet die Ansätze der regionalen, intraarteriellen Therapieverfahren. Chemoembolisationen verfolgen zum einen das Ziel die Blutzufuhr zum Tumor zu unterbinden, zum anderen soll durch eine gleichzeitige intraarterielle Chemotherapie die Konzentration der Zytostatika im Tumor selektiv erhöht und somit die Ansprechrate im Vergleich zur systemischen Therapie gesteigert werden. Leider hat das Verfahren der

Chemoembolisation aufgrund der Lebertoxizität, trotz hoher Ansprechraten der Tumoren, zu keinem signifikant verlängerten Überleben der Patienten geführt [57]. Regionale gentherapeutische Therapien sind aus den oben genannten Gründen eine potentielle Option für viele Patienten mit hepatozellulären Karzinomen. Allerdings gilt die Schonung des normalen Lebergewebes als wichtige Voraussetzung, um für die Patienten einen klinischen Nutzen erzielen zu können.

### **1.3.6 Perkutane regionale Therapieverfahren**

Durch Vorsorgeuntersuchungen werden zunehmend kleine HCC-Herde in fortgeschrittenen Leberzirrhosen diagnostiziert. Aufgrund eingeschränkter Leberfunktionen ist in diesen Fällen eine Resektion oft nicht möglich. Durch perkutane regionale Therapieverfahren versucht man daher kleine hepatozelluläre Karzinome zu eradizieren. Die gängigste Methode ist die sonographisch gesteuerte perkutane Injektion von 100% Ethanol in die Tumorherde (perkutane Ethanolinjektion - PEI). Dieses Verfahren ist im Gegensatz zur Chemoembolisation nicht kostenintensiv und sehr einfach durchführbar. Die weiche Konsistenz der hepatozellulären Karzinome, die von relativ festem Lebergewebe umgeben sind, ermöglicht die weitgehend selektive Infiltration der malignen Herde. Die Ethanolinjektion ist ein sehr effektives Verfahren für solitäre hepatozelluläre Karzinome die kleiner als 3cm im Durchmesser sind. Durch diese Therapie können über 90% der kleinen Tumorherde komplett zerstört werden und die Langzeitergebnisse entsprechen den Daten der chirurgischen Resektion solcher Tumoren [58]. Tumorherde die größer als 3cm sind werden hingegen oft nur unvollständig eradiziert und die Effektivität der Ethanolinjektion bei solitären Tumoren von über 5cm Durchmesser ist gering [59]. Auch multilokuläre hepatozelluläre Karzinome sind durch eine perkutane Ethanolinjektion schlecht therapierbar. Die genaue Anzahl der Tumorherde als limitierender Faktor für eine perkutane regionale Therapie ist jedoch bisher nicht definiert. Im allgemeinen wird die perkutane Ethanolinjektion bei Patienten mit schlechter Leberfunktion und mit solitären Tumorherden von maximal 5cm Größe oder mit maximal 3 Tumorherden, die kleiner als 3cm sind, empfohlen [60]. Als Alternative zur Ethanolinjektion wurden weitere lokale Therapieverfahren beschrieben, die z.T. auch für größere solitäre Tumorherde Anwendung finden sollen (Injektion von 50% Essigsäure oder heißer physiologischer Kochsalzlösung, Laserkoagulation, Mirowellenablation).

### 1.3.7 Therapieergebnisse

Die relativ schlechten Therapieergebnisse bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen erfordern die Entwicklung neuer effektiverer Therapieoptionen. Neben der effizienten Zerstörung von Tumorzellen gilt es hierbei vor allem die Masse der nicht transformierten Hepatozyten keinen toxischen Effekten auszusetzen, da die Einschränkung der Leberfunktion durch eine Leberzirrhose oft die Prognose von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom beeinflusst. Neue gentherapeutische Strategien müssen diese beiden Voraussetzungen erfüllen um zukünftig Eingang in die klinische Praxis finden zu können.

## 1.4 Verwendeten Gene

### 1.4.1 GFP

Das green fluorescent protein (GFP) entstammt der Qualle *Aequorea victoria*. Bei diesen leuchtenden Quallen entsteht das Licht in ca. 7000 photogenen Zellen, deren Zytoplasma dicht mit Lumisomen, kleinen Partikeln von 0,2 µm Durchmesser, gepackt ist, die die notwendigen Komponenten für die Biolumineszenz enthalten [61]. Diese Komponenten bestehen aus einem calciumaktivierten Photoprotein, dem Aequorin, das blau-grünes Licht emittiert, und dem GFP, das Energie von dem Aequorin aufnimmt und wiederum grünes Licht emittiert [62]. Bei dem GFP handelt es sich um ein sehr stabiles Protein mit einer Länge von 238 Aminosäuren und einem Gewicht von 26 KD, das bei einer Wellenlänge von 400 nm zur Fluoreszenz angeregt wird und ein Licht der Wellenlänge 509 nm emittiert. Die Fluoreszenz des Proteins wird durch ein einzigartig konformiertes Chromophor hervorgerufen, das sich posttranslational im Protein nach Cyclisierung und Oxidation der Aminosäuren 65-67 ( Ser-Tyr-Gly ) bildet [63]. Neben dem ursprünglichen GFP werden eine Reihe von Klonen (z.B. EGFP, enhanced-GFP) mittlerweile in diversen Zelllinien exprimiert, da für die Ausbildung der Konformation des GFP anscheinend keine spezifischen zusätzlichen Faktoren benötigt werden. Die Konformationsänderung scheint autokatalytisch zu sein oder durch ubiquitäre Faktoren hervorgerufen zu werden [64]. GFP ist eins der bekanntesten Markergene [65].

### 1.4.2 HSV-TK

Bei den Herpesviren (griech. *herpein* = kriechen) handelt es sich um Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom. Sie codieren alle für mehrere Enzyme, die im Nucleinsäurestoffwechsel und bei der Genomreplikation aktiv sind. Die Wirtszellen, in denen sich Herpesviren lytisch vermehren, sterben bei der Produktion von Nachkommenviren ab. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Erstinfektion latent im Organismus zu verbleiben. In diesem Zustand ist die Produktion von infektiösen Partikeln unterbunden, und die Zellen überleben. Das Virus kann jedoch wiederholt aus der Latenz zum lytischen Infektionszyklus reaktiviert werden. Die Vertreter der Herpesviridae lassen sich drei Unterfamilien zuordnen, wobei das humane Herpes simplex Virus zu der Unterfamilie der  $\alpha$ -Herpesviren gehört. Diese zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum aus, vermehren sich *in vitro* mit kurzen Replikationszyklen und persistieren *in vivo* in den Nervenzellen der Ganglien. Die Virionen der Herpesviren haben einen Durchmesser von etwa 200 nm und bestehen aus insgesamt mehr als 30 Strukturproteinen und über 10 Nichtstrukturproteinen, die von dem 150000 Basenpaare langen Genom kodiert werden. Von den Nichtstrukturproteinen sind sieben für die Genomreplikation der Herpesviren essentiell, die Funktion der restlichen Proteine kann jedoch auch von den entsprechenden zellulären Proteinen übernommen werden. Das bekannteste dieser Enzyme ist die Thymidinkinase (TK). Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Thymidin, aber auch die von anderen Pyrimidin- und Purinderivaten, zum Mono- bzw. Diphosphat. Das Substratspektrum ist damit wesentlich breiter als bei der zellulären Thymidinkinase. Hierauf beruht die antivirale Wirkung verschiedener Nucleosidanaloga wie Aciclovir oder Gangciclovir, die von zellulären Thymidinkinasen nicht als Substrat akzeptiert werden [66].

### 1.4.3 Das HSV-TK/Gangciclovir-System

Das 1977 entwickelte Aciclovir, ein Guanosinderivat mit azyklischem Zuckerrest, bedeutete den Durchbruch bei der Therapie von Herpesvirusinfektionen. Es gehört zu der Obergruppe der Nucleosidanaloga, und hier zu der Gruppe, die von einem Enzym umgesetzt wird, in den wachsenden Nucleinsäurestrang eingebaut wird und einen Kettenabbruch bewirkt. Gangciclovir ist ein Derivat des Aciclovirs.

Das Medikament wird zunächst von viralen Thymidin-Kinasen (TK) phosphoryliert, danach folgt Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen. In seiner triphosphorylierten

Form hemmt Gangciclovir die DNA-Polymerisation, indem es zum Kettenabbruch führt. So kann Gangciclovir in virusinfizierten Zellen die Apoptose auslösen. Im Moment wird das Medikament genutzt, um in Tumoren, in die retroviral transduzierte Zellen injiziert wurden, die Apoptose einzuleiten. Die transduzierten Zellen, die das Gen für die Thymidin-Kinase aus dem Herpes simplex Virus (HSV) enthalten, produzieren den viralen Vektor und infizieren die benachbarten Tumorzellen. Das Virus selbst kann nicht benutzt werden, da es zu pathogen ist. Nachdem auch die Tumorzellen die Thymidin-Kinase exprimieren, kann mit Gangciclovir die Apoptose induziert werden. Ein Vorteil dieser Therapieform ist die hohe Selektivität zu Gunsten von Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen [67]. Da sich Tumorzellen besonders schnell teilen, umliegendes gesundes Gewebe (z.B. Gehirn, Leber) aber häufig gar nicht, ist erstens eine Infektion mit Retroviren begünstigt und zweitens eine Störung der DNA-Synthese viel schwerwiegender als in ruhenden Zellen [68]. Einen weiteren Aspekt dieser Therapie stellt der sogenannte „bystander effekt“ dar [69-74]. Das mono- oder diphosphorylierte Gangciclovir kann über gap junctions von infizierten in benachbarte, nichtinfizierte Zellen eindringen, wo zelluläre Kinasen die Phosphorylierung weiterführen und so auch die Apoptose auslösen können. So muss für eine effektive Therapie nicht jede einzelne Tumorzelle infiziert werden. Es wurde gezeigt, dass in kleinen Tumoren komplette Regression erreicht wurde, wenn nur etwa 10% der Zellen das HSV-TK-Gen enthielten. Es gibt weiterhin Hinweise darauf, dass das HSV-TK/Gangciclovir-System eine Immunantwort induzieren kann, das zum bystander-effect beiträgt. Es wurde gezeigt, dass *in vivo* tumorspezifische Killer-T-Zellen in hoher Konzentration vorlagen und dass MHC-1-Moleküle von den Tumorzellen verstärkt exprimiert wurden. Dies könnte das Wiederauftreten von Tumoren verhindern [75].

#### 1.4.4 dnFADD

Bei dem Molekül FADD (fas associating protein with death domain) handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein, das eine wichtige Rolle bei dem Vorgang der Apoptose (griech.: Wegfall), dem programmierten Zelltod, spielt [76,77]. Wie man heute weiß, besitzt jede kernhaltige Zelle, egal ob pflanzlich oder tierisch, einen Apoptoseapparat. Programmierter Zelltod ist für Embryonalentwicklung, Immunabwehr und Homöostase aller vielzelligen Organismen essentiell. Defekte wie z.B. die Überexpression bestimmter Inhibitorgene führen in diesem evolutionär



hochkonservierten Prozess zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z.B. Krebs. Ein wichtiger physiologischer Auslöser von Apoptose ist eine Untergruppe der Familie der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNF-R), die sogenannten Todesrezeptoren [78-80]. Diese Rezeptoren initiieren nach Stimulation über einen Signalweg, der über den als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichneten Zustand führt und das Adapterprotein FADD und die Initiatorcaspase-8 (FLICE) beinhaltet, zur Apoptose [81].

Die Überexpression einer dominant-negativen Mutante des Moleküls FADD unterbricht die Weiterleitung des CD95/Fas-Todessignals im Cytoplasma und blockiert somit die Apoptose [82,83].

### **1.4.5 p53-Proteine**

Die p53-Gene sind bei allen Säugetieren hochkonserviert. Sie codieren für Proteine von etwa 390 Aminosäuren Länge, die sich durch eine geringe Halbwertszeit von 6 bis 15 Minuten auszeichnen. Das Protein ist phosphoryliert und im Zellkern lokalisiert, wo es sich zu tetrameren Komplexen zusammenlagert. Es wird in drei Domänen unterteilt, wovon die aminoternale Dömane als Transaktivator dient. p53 interagiert mit bestimmten Promotoren beziehungsweise den dort gebundenen Transkriptionsfaktoren und transaktiviert sie. Das induziert die Synthese von Proteinen, welche die Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase arretieren. Erhöhte Konzentrationen von p53 findet man in Zellen, die vermehrt UV- oder  $\gamma$ -Strahlen ausgesetzt waren oder mit radioaktiven Substanzen oder Chemotherapeutika inkubiert wurden. Alle diese Agentien können Mutationen, also Veränderungen in der DNA-Sequenz, verursachen. Daher schreibt man dem p53 eine vergleichbare Funktion zu der SOS-Antwort in Bakterien zu. Diese verzögert die Verdopplung des Bakterienchromosoms, so dass den Reparatursystemen mehr Zeit zur Verfügung steht, um die DNA-Schäden zu korrigieren, bevor sie sich bei der nachfolgenden Replikation in den DNA-Tochtermolekülen manifestieren. Wenn die Reparatur nicht erfolgreich war, induziert p53 in eukaryotischen Zellen die Apoptose [84,85]. In Tumorzellen führen Veränderungen im p53-Gen zur Ausbildung einer nicht mehr funktionsfähigen Variante des p53-Proteins. In diesen Zellen kommt es in der Folge zu weiteren Mutationen, die nicht mehr repariert werden, die Zelle wird transformiert und möglicherweise maligne [86]. Somit stellt das p53 ein Tumorsuppressor-Gen dar.

### **1.4.6 DNA-Synthese in der Leber: HGF und c-met**

Die hepatische DNA-Synthese wird durch bestimmte Mediatoren wie hepatocyte growth factor (HGF, Hepatopoetin A), angeregt, durch andere Mediatoren wie z.B. hepatic proliferation inhibitor (HPI) wiederum gehemmt. Alle diese an der Regulation der Leberregeneration beteiligten Signalstoffe werden den Zytokinen zugerechnet. Es handelt sich um kleine Proteine mit Molekulargewichten von 10 bis 100 kD, ihre Konzentrationen liegen im pikomolaren Bereich. Alle diese Signalstoffe der Leberregeneration wirken über Rezeptoren in der Zellmembran der Zielzellen, z.B. wirkt HGF über seinen Rezeptor c-met [87].

Überhaupt ist unter den derzeit bekannten Wachstumsfaktoren für Hepatozyten HGF das wirksamste Mitogen, in Zellkultur ist die Stimulation der Mitose bereits bei einer Konzentration von 1 ng/l nachweisbar, das Maximum liegt bei 20 ng/l [88-90]. Bei dem Rezeptor für HGF handelt es sich um ein heterodimeres Protein, das vom c-met-Onkogen kodiert wird [91]. Dieses besitzt die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinkinase, die aber erst durch Bindung von HGF an den Rezeptor aktiviert wird. Mit dem Rezeptor ist eine Tyrosinphosphatase assoziiert, die der Abschaltung der Signaltransduktion dient [92].

### **1.4.7 hepatische Regulation der Genexpression: C/EBP und HNF**

Da ein bestimmter Zelltyp im Verlauf der Ontogenese ein unterschiedliches Muster von Proteinen exprimiert, muß die Genexpression einer fein abgestimmten Regulation unterliegen. Diese Regulation der Genexpression findet dabei meistens auf Transkriptionsebene statt. Hier binden Regulatorproteine an spezifische Abschnitte der DNA, die regulatorischen Sequenzen. Jede regulatorische Sequenz ist charakterisiert durch eine spezifische Nukleotidsequenz von meist weniger als 20 Basenpaaren. Bei den Regulatorproteinen selbst kann man zwischen Aktivatoren und Repressoren hinsichtlich auf ihre Wirkung auf die Transkription unterscheiden. Da die meisten Regulatorproteine die Transkription verstärken, werden sie auch als Enhancerproteine bezeichnet [93].

In der Leber sind mehrere Regulatorproteine identifiziert worden. Dabei können zwei Gruppen, die allgemeinen und die speziellen Regulatorproteine, unterschieden werden. Die speziellen Regulatorproteine werden nur bei Bedarf exprimiert. Die allgemeinen Regulatorproteine dagegen sind konstitutiv: Sie bestimmen die Erhaltung der differenzierten Organfunktionen und -strukturen und bilden die Basis,

auf der die speziellen Regulatorproteine ihre Wirkung entfalten können. Zwei Obergruppen allgemeiner Regulatorproteine der Leber sind bislang bekannt: Die Gruppe der hepatic nuclear factors (HNF) und die Gruppe der CCAAT-enhancer binding proteins (C/EBP). Die HNF-Gruppe umfasst drei Familien, HNF-1, HNF-3 und HNF-4, die C/EBP-Gruppe die Familien C/EBP  $\alpha$  und C/EBP  $\beta$ . Die HNF-Gruppe sorgt für die Expression leberspezifischer Gene, HNF-1 für die Differenzierung der Hepatozyten, HNF-3 für metabolische Leistungen, HNF-4 für Strukturbildung. Die C/EBP-Gruppe ist für die Expression von Genen für Proteine zur Regulation des Zellzyklus verantwortlich [94,95].

## 1.5 Stammzellen

Stammzellen sind die Ursprungszellen, die sich unbegrenzt vermehren und später alle spezialisierten Zelltypen des Körpers bilden können. Diese Fähigkeit wird als Pluripotenz der Stammzelle bezeichnet. Ein eigenständiger Organismus kann aus ihnen jedoch gewöhnlich nicht mehr entstehen, nur in der frühesten Embryonalphase sind Stammzellen totipotent. Stammzellen befinden sich in Embryonen und Föten, wurden aber auch schon in 20 Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen, z.B. im Knochenmark, das die hämatopoetischen Stammzellen enthält. Diese adulten Stammzellen weisen gegenüber embryonalen Stammzellen allerdings ein reduziertes Entwicklungspotential und nur eine begrenzte Lebensdauer auf, sie sind nur noch multipotent [96].

## 1.6 Zielsetzung

In Vorversuchen waren in der Arbeitsgruppe mehrere Vektoren entwickelt worden, die prinzipiell für einen Einsatz in der gentherapeutischen Behandlung von Lebererkrankungen und/oder in der gentherapeutischen Behandlung des HCC gut geeignet erschienen. Zielsetzung dieser Arbeit war, zunächst diese Vektoren für die Anwendung *in vitro* zu optimieren und ihre Wirkung in verschiedenen stabilen Zelllinien zu untersuchen. Anschließend sollte einer dieser optimierten Vektoren auf seine Anwendbarkeit *in vivo* geprüft werden, unter Einbeziehung verschiedener Methoden der Gentherapie (*in vivo/ex vivo*) und seiner Wirkung in einer primären Zellkultur embryonaler Stammzellen. Zusätzlich sollten weitere Vektoren kloniert werden, die bereits bestehende Ansätze in der Tumorthherapie des HCC unterstützen und verbessern können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer elektrischen Ladung im Gel auf die positive Elektrode zu, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmender Fragmentgrösse abnimmt. Die Elektrophoresen wurden stets in TAE-Puffer und in „blue marine“ Gelkammern der Firma Sigma durchgeführt. Der Anteil der Agarose im Gel und die angelegte Spannung sowie die Laufzeit variieren mit der Grösse der zu detektierenden Fragmente und werden individuell erwähnt. Zur Visualisierung der DNA-Banden im UV-Licht wurde dem Gel 0,01% Ethidiumbromid (10 mg/ml), ein DNA-interkalierender Farbstoff, der im UV-Licht bei 366nm orange aufleuchtet, in einer Konzentration von 0,2 µg/ml hinzugefügt. Die DNA-Proben wurden mit einem durch Bromphenolblau und Xylencyanol blau gefärbten Ladepuffer im Verhältnis 1:10 gemischt und dann auf das Gel aufgetragen. Die Grössenbestimmung der DNA-Fragmente wurde anhand 10 µl einer mitlaufenden DNA-Leiter durchgeführt. Diese besitzt eine Konzentration von 50 ng/µl und enthält Fragmente der Größen (in bp): 12.216/11.198/10.180/9.162/8.144/7.126/6.108/5.090/4.072/3.054/2.036/1.636/1.018/517/506/396/344/298/220/201/154/134/75.

#### 2.1.2. Klonierung von DNA in Plasmidvektoren

Alle hierzu benötigten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Bei Plasmiden (p) handelt es sich um ringförmige DNA-Moleküle, die stabil und extrachromosomal von Prokaryonten vererbt werden. Die Plasmide besitzen einen Ursprungsort der bakteriellen Replikation (Ori), der eine effiziente Vermehrung z.B. in *E.coli*-Bakterien ermöglicht. Weiterhin besitzen die Plasmide ein Antibiotika-Resistenzgen, mit dem sichergestellt wird, dass auf den entsprechenden antibiotikahaltigen Nährböden selektiv nur die plasmidhaltigen Bakterienklone wachsen können. Im Falle der hier gezeigten Experimente wurde die Ampicillin-

Resistenz verwendet. Durch Einfügung entsprechender Promotoren und Polylinker (diese enthalten Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, die meist nur einmal im Plasmid vorkommen), auch multiple cloning sites (MCS) genannt, in die Plasmide entstehen Systeme zur Kombination, Vervielfältigung und Expression gewünschter Gene. Hierbei wird das zu klonierende Gen mittels nicht innerhalb der Gensequenz schneidender Restriktionsenzyme aus dem Ursprungsplasmid ausgeschnitten.

### **2.1.3 Restriktionsendonucleasen**

Restriktionsenzyme sind bakteriellen Ursprungs und schneiden die DNA an exakt definierten Stellen innerhalb des DNA-Strangs, sie sind also Endonucleasen. Die Bezeichnung eines Restriktionsenzym erfolgt nach der Spezies, aus dem das Enzym isoliert wurde, ein Enzym aus *E. coli* heißt Eco. Jedes Enzym erkennt eine andere DNA-Sequenz, meist von 4 bis 6 Basenpaaren Länge. Restriktionsenzyme lassen zwei Arten von DNA-Fragmenten entstehen, die kohesiven („sticky“) Enden mit überhängenden 3'- oder 5'-Enden, und die glatten („blunt“) Enden. Diese Enden können mit anderen DNA-Fragmenten, die mit dem gleichen Enzym geschnitten wurden, also gleiche Enden aufweisen, neu verknüpft (ligiert) werden. Für alle wichtigen Vektoren ist eine Restriktionskarte, d.h. eine Auflistung und Lokalisierung aller vorhandenen Schnittstellen, verfügbar.

Das Zielplasmid (Vektor) wurde dazu mit Restriktionsenzymen bei 37°C aufgeschnitten (verdaut). Die benötigte Enzymmenge kann dabei nach einer einfachen Regel berechnet werden: 1 µg DNA wird in einer Stunde von einer Einheit (unit) des Restriktionsenzym verdaut. Zusätzlich sollte das Enzym in fünffachen Überschuß vorliegen, das Enzymvolumen jedoch nicht mehr als ein Zehntel des Reaktionsvolumens betragen. In dies Enzymvolumen müssen auch die 0,5 µl RNase pro Verdau einbezogen werden. Die Enzyme wurden stets in den vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer eingesetzt, durch Zusatz von und nach dem Verdau für 20 min. bei 65°C hitzeinaktiviert.

### **2.1.4 Aufreinigung von DNA über Silikatsäulen**

Oftmals empfiehlt es sich, das verwendete Restriktionsenzym nicht nur mit Hitze zu inaktivieren, sondern es ganz aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Hierzu wurde der „QIAquick PCR Purification“-Kit der Firma Qiagen verwendet. Zu dem Reaktionsansatz wurde die fünffache Menge des chaotropen PB-Puffer gegeben und die Lösung auf eine QIAquick-Säule gegeben. Diese Säulen besitzen eine integrierte Silikatmembran, die die DNA bei hoher Salzkonzentration und  $\text{pH} = 7,5$  bindet und bei reversen Bedingungen wieder freigibt. Bei einer Zentrifugation von 13.000 rpm und 1 min. bindet die DNA an die Säule. Zum Waschen wurden anschließend 750  $\mu\text{l}$  Puffer PE und zum Eluieren 50  $\mu\text{l}$  Puffer EB über die Säule gegeben. Mit dieser Methode werden alle Fragmente mit einer Größe über 100 bp wiedergewonnen, alle Fragmente unter 40 bp werden dagegen entfernt.

### **2.1.5 Dephosphorylierung mit SAP**

Damit sich die frisch aufgeschnittene DNA nicht nach kurzer Zeit wieder in ihrer Ursprungsform zusammenfügt, sollten die entstandenen Enden dephosphoryliert werden. Die alkalische Phosphatase trennt Phosphatgruppen vom 5'-Ende der DNA ab und lässt dabei eine 5'-OH-Gruppe zurück. Eine Re-Ligation wird somit unmöglich.

Gerade wenn zum Verdau eines Vektors nur ein Restriktionsenzym erforderlich war oder durch den Verdau glatte Enden erzeugt wurden, musste der Zielvektor zur Vermeidung seiner Re-Ligation nach seinem Verdau dephosphoryliert werden. Dies geschieht durch Einwirken von 1  $\mu\text{l}$  alkalischer Shrimp-Phosphatase (SAP, 10 U/ $\mu\text{l}$ ) im entsprechenden Puffer bei 37°C für eine Stunde, dann wurde bei 65°C für 25 min. das Enzym inaktiviert.

### **2.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Werden entstandene Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, können die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Zur Isolierung der DNA aus dem Agarose-Stück wurde der „QIAquick Gel Extraction“-Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde zu der ausgeschnittenen Agarose die dreifache Menge (100 mg = 100  $\mu\text{l}$  Volumenanteil) an QG-Puffer gegeben und für 10 min. bei 50°C inkubiert. Nachdem sich die Agarose aufgelöst hatte, wurde ein Volumenanteil Isopropanol hinzugefügt und die Mischung auf eine QIAquick-Säule gegeben. Bei

einer Zentrifugation von 13.000 rpm und 1 min. bindet die DNA an die Säule. Zum Waschen wurden 750 µl Puffer PE über die Säule gegeben, zum Eluieren schließlich 50 µl Puffer EB. Mit dieser Methode können alle Fragmente mit einer Größe über 70 bp sicher wiedergewonnen werden.

### 2.1.7 Mengenbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wird bestimmt, indem man ihre Absorption bei 260 nm misst. Eine  $A_{260}$  von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Wird noch die Absorption bei 280 nm gemessen, so erhält man mit dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  eine Aussage über die Verunreinigung der Lösung. Das Verhältnis sollte für reine DNA-Präparationen bei 1,8 liegen.

### 2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um die gewünschten DNA-Sequenzen aneinanderfügen zu können, benutzt man gewöhnlich die T4-DNA-Ligase (Ligase aus *E.coli*, das mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurde), die aufgebrochene Phosphodiesterbindungen wieder verbindet.

Dazu wurden Zielvektor und zu einzufügende Sequenz auf Eis mit 1 µl T4-Ligase (400 U/µl), 2 µl 10xLigase-Puffer und 1 µl ATP (10mM) zusammengegeben, bei 16°C über Nacht im Wasserbad ligiert und anschließend in kompetente Bakterien (Stamm JM 109) transformiert. Die genaue Zusammensetzung des Ligationsansatzes, der insgesamt 500 ng DNA enthalten soll, ergibt sich aus der Größe des Vektors, der Größe des einzubringenden Inserts und der Beschaffenheit der Enden:

Enden	Verhältnis Insert : Plasmid	Überschuß an Insert (-fach)
sticky	1 : 5	4
	1 : 4 oder weniger	2
	1 : 6 oder mehr	6
blunt	Insert über 1 kB	10
	Insert unter 1 kB	20

Man berechnet zunächst das Größenverhältnis von Plasmid zu Insert (1 : x), multipliziert den Anteil des Inserts mit dem ermittelten Überschuß, fügt dies in das

Verhältnis ein (1 : x\*y) und berechnet  $1 + x*y = 500$  ng DNA. Daraus ergibt sich die Menge an zu verwendendem Plasmid und Insert.

Die Konzentration von Plasmid und Insert kann man im Agarosegel anhand der 1 kB-Leiter abschätzen, da die 1.636 kB-Bande immer genau 10% der aufgetragenen Menge an DNA-Leiter enthält, also stets 50 ng.

### **2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien**

Zur Vermehrung des klonierten Konstrukts muss die DNA in eine Wirtszelle überführt (transformiert) werden. Zur Transformation der DNA wurden für die meisten Plasmide kompetente *E.coli* des Stammes JM 109 von der Firma Invitrogen verwendet. Für große Plasmide über 10 kB wurden Bakterien des Typs DH10B benutzt. Zu 100 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien wurden entweder 1 µl (10 ng/µl) reine Plasmid-DNA oder aber 10 µl Ligationsansatz gegeben. Nach 20 min. Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 2 min. bei 42°C unterworfen. Dabei öffnet sich die Bakterienwand und nimmt das Plasmid auf. Nach weiteren 2 min. auf Eis wurden 800 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C und starkem Schütteln (> 250 rpm), während sich die Plasmide etablieren und ihre Eigenschaften phänotypisch ausbilden können, wurden 150 µl des Ansatzes auf einer Ampicillin-Agarplatte ausplattiert. Nach 16 Stunden Brutzeit bei 37°C im Inkubator folgte das „Picken“ der sich bildenden Kolonien.

### **2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA**

Die sogenannte „Miniprep“ wurde zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus bakteriellen Klonen angewandt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden einzelne Bakterienkolonien von der Agar-Platte gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 mg/l) unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Die Bakterien aus 1,5 ml dieses Ansatzes wurden am nächsten Tag bei 13.000 rpm abzentrifugiert, in einer kleinen Menge LB-Medium wieder aufgenommen und mit 300 µl Lyse-Puffer versetzt. Nach 90 sec. bei 95°C waren die Bakterien lysiert und hatten ihr Plasmid freigegeben. 20 min. Zentrifugation bei 4°C und 15.300 rpm sammelten den Bakterienerschrott im Pellet, die Plasmide blieben im Überstand gelöst und wurden mit 400 µl Isopropanol und Zentrifugation für 15 min. bei 4°C und 15.300 rpm präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Nach



Lösung in 50 µl TE-Puffer konnten die erhaltenen Plasmide, deren Konzentration ca. 1 mg/ml betragen sollte, weiter untersucht werden.

Zur Gewinnung großer Plasmidmengen kam die sogenannte „Maxiprep“ zur Anwendung. Soll das gewonnene Plasmid z.B. für eine Transfektion eingesetzt werden, müssen während der Präparation eventuell vorhandene Endotoxine entfernt werden, die Präparation wird „endofree“. Für die Maxiprep wurden stets die Maxikits der Firma Qiagen verwendet, die nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Reinigung über eine Anionenaustauschersäule arbeiten. Von einer positiv auf das gewünschte Plasmid getesteten Miniprep wurden 500 µl in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 mg/l) gegeben und über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 5800 rpm und 4°C für 15 min. abzentrifugiert und in 10 ml des Puffers P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 und einer Inkubation von 5 min. bei Raumtemperatur wurden die Bakterien lysiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 zur Neutralisation und eine Inkubation von 20 min. auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 11500 rpm für 30 min. bei 4°C setzen sich die lysierten Bakterien ab. Die Flüssigkeit wurde zur Entfernung auch kleiner Pelletteile durch Gaze gefiltert und zur Entfernung der Endotoxine wurden 5 ml des Puffers ER zugesetzt. Nach erneuter Inkubation für 30 min. auf Eis wurde die Lösung über Säulen, die zuvor mit 10 ml Puffer QBT equilibriert wurden, gegeben. Diese Säulen haben die Eigenschaft, DNA unter niedriger Salzkonzentration zu binden und unter hoher Salzkonzentration wieder freizugeben. Das Plasmid blieb auf der Säule zurück, wurde anschließend mit 2x30 ml Puffer QC gereinigt und schließlich mit 15 ml Puffer QN eluiert. Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und bei 11500 rpm für 30 min. bei 4°C abzentrifugiert. Nach einer Waschung mit 5 ml 70% Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 200 µl Puffer TE aufgenommen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Reinheit wurde in einer verdünnten Lösung die Extinktion bei 260nm und 280nm gemessen.

### **2.1.11 Linker**

Fehlt in einem Plasmid eine für eine Klonierung notwendige Restriktionsschnittstelle, so kann diese über einen Linker eingefügt werden. Bei Linkern handelt es sich um selbstkomplementäre DNA-Oligomere, die diese Schnittstelle enthalten. Linker werden chemisch synthetisiert und über eine Ligation glatter Enden an die DNA

gekoppelt. Alle Linker wurden von der Firma IBA-NAPS in Göttingen bezogen, ihr Aufbau ist bei der entsprechenden Klonierung vermerkt. Da Linker stets als Einzelstrang-DNA, einmal in *sense* und einmal in *antisense*-Orientierung vorliegen, mussten sie zunächst annealed werden, d.h. nach einem Erhitzen von 15 min. auf 75°C wurde ihnen während einer sehr langsamen Abkühlungsphase die Möglichkeit gegeben, sich zu komplementären Doppelsträngen zusammenzulagern. Stellt der Linker ein Pallindrom dar, d.h. der *sense*-Strang ist komplementär zum *antisense*-Strang, wie bei den hier benutzten Linkern, wird der Linker ebenfalls in der Form von Einzelsträngen geliefert und muß annealed werden.

Sequenz des EcoRI-Linkers: GGA ATT CC

Sequenz des NotI-Linkers: ATA AGA AAG CGG CCG CTT TCT TAT

### **2.1.12 Klenow-fill-in**

Das Auffüllen überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten nach vorangegangener Spaltung mit Restriktionsenzymen dient der Vorbereitung von Ligationen, die glatte Enden erfordern. Häufig werden glatte Enden zum insertieren eines Linkers benötigt. Dieses Auffüllen erfolgte durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment aus der DNA-Polymerase I, die aus *E.coli* stammt. Dieses Fragment besitzt die Fähigkeit, 5'-Überhänge aufzufüllen und 3'-Überhänge abzdauen. Zunächst sollte die DNA-Konzentration auf 50 ng/µl eingestellt werden. Zum Auffüllen des Volumens benutzt man neben Wasser den 10x-Puffer, weiterhin 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) je 50 µl Reaktionsansatz und 1 µl dNTP-Mix (2,5 mM) je 20 µl Ansatz. Nach einer Inkubation von 15 min. bei 25°C wurde die Reaktion mit 1 µl 0,5M EDTA pro 50 µl Reaktionsansatz gestoppt, anschließend wurde das Enzym für 10 min. bei 75°C hitzeinaktiviert. Trotzdem sollte dem Klenow-fill-in immer eine Aufreinigung über eine Silikatsäule folgen.

### **2.1.13 Phosphorylierung**

Entsprechend der Dephosphorylierung der Vektors mussten Linker vor einer Ligation phosphoryliert werden, damit die für die Ligation notwendigen Phosphatgruppen an den 5'- und 3'-Enden vorlagen. Zu 50 µl DNA-Lösung wurden hierfür 1 µl der T4-DNA-Kinase (10 U/µl), 5 µl des entsprechenden 10x-Puffers und 5 µl ATP (10 mM) gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgt für 20 min. bei 65°C.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellextrakte

Zur Gewinnung der Zellextrakte wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Dann wurden die Schalen, dem Protokoll der Firma Santa Cruz folgend, auf Eis gestellt und je Schale 300 µl RIPA-Puffer dazugegeben. Mit einem Schaber wurde die Zellschicht abgelöst, die Zellsuspension durch eine 21G-Nadel aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Schale wurde noch einmal mit 150 µl RIPA-Puffer nachgespült und die vereinigten Zellsuspensionen für 30 min. auf Eis inkubiert. Das entstandene Zelllysate wurde bei 10.000g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für weitere Experimente verwendet.

### 2.2.2 Gewebeextrakte

Zur Gewinnung von Gewebeextrakten wurde das Gewebe, das stets in Tissue Tek tiefgefroren war, zunächst gewogen und anschließend in 10 ml RIPA-Puffer pro 1 g Gewebe aufgetaut. Dann wurde das Gewebe auf Eis homogenisiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 10.000g und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 10.000g und 4°C zentrifugiert, diesmal jedoch für 15 min. Der Überstand dieses Schrittes wurde als Gewebeextrakt eingesetzt.

### 2.2.3 GFP-Screening

GFP wird vor allem als Marker *in vivo* verwendet, da es die Messung des Levels der Genexpression direkt in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubt, eine Fixierung oder Färbung der Zellen, die diese abtöten würde, ist überflüssig.

GFP behält seine Leuchteigenschaften auch unter verschiedenen Fixierungsmethoden bei, nicht jedoch bei Verwendung von absolutem Ethanol, da durch Dehydrierung die Konformation des GFP verändert wird. Am besten hat sich eine Fixierung in Cacodylatpuffer mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bewährt.

### 2.2.4 $\beta$ -Galactosidase-Färbung von *lacZ*-transfizierten Zellen

Das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Zur Bestimmung von Transduktionseffizienz oder Überlebensrate von *lacZ*-transfizierten Zellen wurden diese mit einem Substrat der  $\beta$ -Galactosidase inkubiert. Die Zellen, die DNA aufgenommen haben und nach 24 Stunden das entsprechende Gen exprimieren, wandeln das Substrat um, so daß durch eine Indolreaktion ein blauer Farbstoff entsteht. Ein Vorteil dieser Technik ist die exakte Quantifizierbarkeit, da sich die blauen Zellen deutlich von Hintergrund abheben. Ein Nachteil besteht in der Notwendigkeit, die Zellen vor der Reaktion zu fixieren und damit abzutöten.

Für die Färbereaktion wurden die Zellen zunächst gründlich mit PBS gewaschen und anschließend mit 100% Ethanol bei Raumtemperatur 10 min. fixiert. Danach wurden die Zellen erneut 2 mal 10 min. mit PBS gewaschen und für 4 Stunden bei 37°C mit je 2 ml der Färbelösung je 60 mm-Zellschale inkubiert. Die blau gefärbten Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

### 2.2.5 Proteinassay nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Bradford-Assay der Firma Biorad bestimmt. Dazu wurden als Leerwert 800  $\mu$ l Wasser und 200  $\mu$ l der Färbekomponente verwendet, die Proben enthielten 10  $\mu$ l Proteinlösung und entsprechend weniger Wasser. Schließlich wurde die Absorption der entstandenen blauen Lösung bei 595 nm ermittelt. Zusätzlich zu den Proben wurde ebenfalls die  $A_{595}$  einer frisch hergestellten Standardreihe, meist 2 bis 12  $\mu$ g/ml, bestimmt. Anhand des Vergleichs mit der Standardkurve konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

### 2.2.6 Western-Blot

Zur Separierung der Proteine wurden stets 20  $\mu$ g Protein auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dazu wurde die Proteinlösung, die auf 2  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt sein sollte, mit 8  $\mu$ l Ladepuffer versetzt. Zuerst durchlaufen die Proteine nach Anlegen einer Spannung von 200V das Sammelgel (3%), das eine Bündelung der Probe ermöglicht. Anschließend separieren sich die Proteine abhängig von ihrer Größe im Laufgel. Nach vollendeter Auftrennung wurde das Gel bei 180V mit einer Trockenblotkammer in 25 min. auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde die Membran zunächst eine Stunde in 5%

Magermilchpulver in TBS plus 0,3% Tween 20 inkubiert, es folgen die Inkubationen mit dem Erst- und Zweitantikörper für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper variieren stark und werden bei jedem Experiment individuell angegeben. Verwendet wurden zumeist Antikörper der Firma Santa Cruz. Zwischen den Inkubationen muss die Membran jeweils dreimal mit TBS-Tween für 5 min. gewaschen werden. Nach dem letzten Waschgang wurde der Blot 1 min. mit einem Chemoluminiszenzreagenz (ECL der Firma Amersham) gefärbt und auf einem Kodak-Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### 2.2.7 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zellkulturversuche wurden unter einer sterilen Flow durchgeführt, die Arbeit mit Viren fand dabei an einem separaten S2-Arbeitsplatz statt. Die Zellen wurden stets in einem humidifizierten Inkubator mit 5Vol.% CO<sub>2</sub> Anteil bei 37°C inkubiert. Die immortalisierten Zelllinien wurden von der Firma ATCC bezogen, wachsen alle adhärent und wurden in DMEM-Glutamax-Medium der Firma Gibco mit einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert.

### 2.2.8 Zelllinien

Die Bestellnummern der Firma ATCC sind in Klammern angegeben.

HepG2 (HB 8065): Diese hochdifferenzierte Zelllinie leitet sich von einem humanen hepatozellulären Karzinom ab.

Hepa 1-6 (CRL-1830): Diese Zelllinie stammt von einem Hepatom aus einer C57/L-Maus.

McA-RH7777(CRL-1601): Diese Zelllinie stammt von einem Hepatom aus einer Buffalo-Ratte.

HT29 (HTB-38): Diese Zelllinie leitet sich aus einem humanen colorektalen Adenokarzinom ab.

293 (CRL-1573): Diese Zelllinie leitet sich aus einer humanen fetalen Niere ab und wurde mit Adenovirus 5 DNA transformiert.

### 2.2.9 Vektoren

pLein (Firma Clontech): pLein ist ein von dem MoMLV abstammender retroviraler Vektor, der in seiner MCS das Reportergen EGFP (enhanced GFP) beinhaltet.

pRetro-on (Firma Clontech): pRetro-on ist ein von dem MoMLV abstammender retroviraler Vektor, der einen reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (rtTA) durch einen SV40-Promotor exprimiert. Das *tet-responsive element* (TRE) kontrolliert die Expression des *gene of interest*, das in die MCS kloniert wird. Außerdem beinhaltet pRetro-on das E.coli-Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp<sup>r</sup>) zur antibiotischen Selektion in Bakterien. Da in der Arbeitsgruppe am 5'-Ende des Puromycin-Resistenz-Gens durch Mutagenese eine ClaI-Schnittstelle eingefügt wurde, um einen späteren Austausch des Resistenz-Gens zu gewährleisten, wurde im Folgenden die Bezeichnung p617Retro-on verwendet.

## 2.2.10 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 80% Konfluenz trypsiniert, in Medium aufgenommen, zentrifugiert und in Freezemedium ( 20% FCS, 10% DMSO, kein Antibiotikum) resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt, um nach 2 Tagen bei -80°C in flüssigen Stickstoff aufbewahrt zu werden. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in warmes Medium gegeben, zur Entfernung des DMSO zentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

## 2.2.11 Primärzellkultur embryonaler Maushepatozyten

Eine trächtige Maus wurde am gewünschten Tag (14 oder 17) durch zervikale Dislokation getötet, der Bauch großzügig eröffnet und der Uterus entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurde der Uterus geöffnet und die 8 bis 12 Embryonen in 37°C warmes PBS überführt. Nun wurde ein Embryo mit zwei spitzen Pinzetten an beiden Seiten ergriffen und öffnete sich beim Ziehen. In der Mitte des Embryos befand sich die dunkelrote und daher leicht von anderen Organen abzugrenzende Leber, die in Attachment-Medium (RPMI-Medium der Firma Gibco mit 10% FCS und 2% P/S) überführt wurde. Nachdem überschüssiges Bindegewebe entfernt war, wurden die Lebern zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in 500µl Collagenase/Dispase-Lösung ( 1mg/ml, Firma Roche) für 30 min. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Medium wurden die Hepatozyten aus dem Gewebeverband gelöst und in Attachment-Medium auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Platten ausgesät. Nach 4 Stunden wird das Medium mit Erythrozyten, die sich nicht absetzen, entfernt und durch HGM-Medium ersetzt.

## 2.3 Retroviren

### 2.3.1. Producerzelllinien

Als Retroviren produzierende Zelllinien wurden die Zelllinien  $\Phi$ NX 293 T *ampho* und *eco*, benutzt. Diese – im weiteren als Ampho- und Eco-Zellen bezeichnet - konnten unter den gleichen Bedingungen wie alle anderen immortalisierten Zelllinien kultiviert werden. Zur Erhaltung ihrer Produktionsfähigkeit mussten sie alle zwei Monate für sieben Tage mit einem Selektionsmedium, das 200  $\mu$ g/ml Hygromycin B (Firma Boehringer) und 2  $\mu$ g/ml Diphtherietoxin enthielt, behandelt werden.

Die Zusätze *ampho* und *eco* dieser Zellen beziehen sich dabei auf die *env*-Gene, die diese Zellen enthalten. Sie codieren für die benötigten Rezeptoren, die die in diesen Zellen hergestellten Viren bei einer späteren Infektion benötigen (Tropismus). Viren aus Zellen des Typs *ampho* sind amphotrop und infizieren jede beliebige Säugerzelle, Viren aus Zellen des Typs *eco* sind ecotrop und infizieren nur Zellen aus der Familie der Nagetiere, diese jedoch sehr effizient. Eine Zelllinie, die gar keine *env*-Gene besitzt, heißt 293<sub>gp</sub>. Mit dieser Zelllinie werden pseudotypisierte Viren, deren envelope aus dem VSV-G-Protein gebildet wird, produziert. Dazu muss die DNA für VSV-G mit dem gewünschten Gen kotransfiziert werden. Viren dieser Zelllinie benötigen einen in fast allen Zellen vorhandenen Rezeptor zur Infektion und werden als pantrop bezeichnet.

### 2.3.2. Retrovirusproduktion

Zur Retrovirusproduktion wurden die Zellen in 3 ml Medium 24 h vor Transfektion in 60 mm-Schalen ausgesät, so dass die Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70% betrug. Zur Transfektion wurde für jede Schale eine Mischung aus 428  $\mu$ l Wasser, 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) zu transfizierendes Plasmid und 62  $\mu$ l 2M Calciumchlorid vorbereitet. Bei pseudotypisierten Viren wurden 5  $\mu$ g VSV-G-Plasmid und 5  $\mu$ g zu transfizierendes Plasmid vorgelegt. 5 min. vor der Transfektion wurden 4  $\mu$ l Chloroquin-Lösung (25 mM) zu jeder Schale gegeben, dann wurden 500  $\mu$ l HBS-Puffer mit dem zuvor bei einer Probetransfektion ermittelten optimalen pH-Wert (um 7,4) zu der vorbereiteten Plasmidlösung gegeben und die Mischung für 15 sec. mit Luft durch“blubbert“. Dann wurde die Mischung auf die Schalen gegeben und für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach und 24 Stunden nach Transfektion erfolgten Medienwechsel mit frischem DMEM-Medium (10% FCS, 1% P/S). 48 und 72

Stunden nach Transfektion wurde der Überstand von den Zellen abgenommen, für 5 min. bei 1000 rpm zur Entfernung von Zellen zentrifugiert und konnte dann als infektiöses Agens benutzt werden. Bei Verwendung von GFP als Markergen wurden die Producerzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Qualität der Transfektion hin überprüft.

### **2.3.3. Infektion der Zielzellen**

Die Infektion der Zielzellen, auch Transduktion genannt, fand mit dem zentrifugierten Überstand der produzierenden Zelllinien statt. Dieser Überstand konnte entweder sofort nach Zufügen von 8 µg/ml Polybrene verwendet werden oder aber nach einer Aufkonzentrierung der Viren. Diese Aufkonzentration wurde mit den Methoden der Ultrafiltration oder der Ultrazentrifugation vollzogen. Die Viruslösung wurde an beiden Tagen halbiert und jeweils für drei Stunden auf die Zielzellen, die zum Zeitpunkt der ersten Transduktion eine Konfluenz von maximal 30% besitzen sollten, gegeben, so dass sich eine Infektionsdauer von insgesamt 4x3 Stunden ergab. Viruslösung, die nicht sofort verbraucht wird, kann für einige Stunden auf Eis gelagert werden.

### **2.3.4 Ultrazentrifugation**

Eine Ultrazentrifuge erlaubt es, Schwerefelder bis zum 500.000fachen der Erdanziehung (g) zu erzeugen. In solchen Schwerefeldern sedimentieren Moleküle wie Proteine, Nukleinsäuren und Viren, solange ihre Dichte größer ist als die der umgebenden Lösung. Dies zeigt sich besonders bei der sogenannten Gradientenzentrifugation, bei der sich Adenoviren im Gradienten zwischen zwei Cäsiumchloridlösungen der Dichten 1,2 und 1,4 nach einer Zentrifugation von 4h bei 27.500 rpm im SW28-Rotor in der Mitte anreichern. Die mit VSV-G pseudotypisierten Retroviren wurden dagegen ohne Gradient durch eine Zentrifugation im SW28.1-Rotor für 90 min. bei 24.000 rpm und 4°C sedimentiert und für die weitere Verwendung über Nacht bei 4°C in 30 µl TNE resuspendiert. Die Viren aus Amphi- oder Eco-Zellen wurden im SW28.1-Rotor für 90 min. bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert, so daß sie sich in der unteren Hälfte der Lösung sammeln sollten.



### 2.3.5 Ultrafiltration

Unter der Ultrafiltration versteht man die Filtration niedermolekularer Stoffe bei vollständiger Zurückhaltung der hochmolekularen Verbindungen. Welche Stoffe dabei zurückgehalten werden, hängt von der Porengröße der verwendeten Membran ab. Die menschliche Niere mit einer Porengröße von 2,9 nm erlaubt Molekülen unter einer Größe von 5 kD den ungehinderten Durchtritt, hält aber erst Moleküle über 65 kD vollständig zurück. Ultrafiltrationsmembranen in der Technik werden daher durch ihren „Nominal Molecular Weight Cut-off“ (NMWC) charakterisiert. Für die Viruskonzentration hat sich eine Membran mit einem NMWC von 100 kDa bewährt. Die Ultrafiltrationsmodule arbeiten stets im Cross-Flow-Betrieb. Im Gegensatz zur konventionellen Filtration (Dead End Filtration) wird hier die Rohlösung rezirkuliert und tangential über die Membran geführt, das Permeat dagegen wird auf einer Seite des Moduls gesammelt. Die rezirkulierte Rohlösung enthält Moleküle, die von der Membran zurückgehalten wurden und wird als Retentat bezeichnet. Das Permeat enthält dagegen das Lösungsmittel und Moleküle, die die Membran passieren konnten.

### 2.3.6 Selektion retroviral transduzierter Zellen

Zur Selektion retroviral transduzierter Zellen wurden diese für zwei Wochen in neomycinhaltigen Medium kultiviert. Dieses Medium ist das normale Zellkulturmedium, das zusätzlich noch 18 µl/ml Neomycin (50 mg/ml) enthält. Während der Selektion wurde das Medium alle zwei Tage erneuert.

## 2.4. Operationstechniken

### 2.4.1 Tiere

Für die *in-vivo*-Versuche wurden stets 6-8 Wochen alte weibliche Mäuse des Inzuchtstammes *balb/c* aus dem Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover verwendet. Die Tiere wurden dort unter sterilen Standardbedingungen mit normalem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

### 2.4.2 2/3 Hepatektomie

12 Stunden vor dem Operationsbeginn wurde den Tieren die Nahrung entzogen. Die Betäubung der Tiere erfolgte mit einer Mischung aus 10%-iger Ketamin-Lsg. (Fa. WDT) und 2%-iger Rompun-Lsg. (Fa. Bayer) und wurde wie folgt zusammengesetzt:

50 µl	2%-ige	Rompun-Lsg.
450 µl	10%-ige	Ketamin-Lsg.
4500 µl		physiologische Kochsalz-Lsg.

Den Tieren wurde 100 µl Narkosemittel pro 10g Mausekörpergewicht intraperitoneal injiziert. Das Abdomen der Tiere wurde unterhalb des Xyphoids auf einer Länge von ca. 1 cm geöffnet und der mediale, links laterale große Leberlappen, der mediale, links laterale kleine Lappen sowie der rechts laterale Leberlappen ligiert und entfernt. Das Peritoneum und die Dermis wurden anschließend mit getrennten Nähten geschlossen und postoperativ versorgt.

### 2.4.3 Milzinjektion

Die Maus wurde wie bereits beschrieben betäubt und auf der linken Seite gelagert. Bei behaarten Mäusen wurde das Fell abrasiert, so dass man die Milz dunkelrot durch die Haut schimmern sehen konnte. Hier wurde das Abdomen mit einem kleinen Schnitt von ca. 5 mm Länge eröffnet und die Milz hervorgezogen. Am äußeren Rand der Milz wurde mit einer feinen Kanüle eingestochen und diese ligiert. Nach der Injektion wurde der durchstochene Teil der Milz zur Vermeidung von Blutungen abgebunden und anschließend wurden die Hautschichten vernäht.

### 2.4.4 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum mit einem Y-Schnitt großzügig eröffnet. Das gewünschte Organ wurde entnommen und in einem Cryomold in Tissue-Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Untersuchung wurden die Organe später am Kryostaten geschnitten. Die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wurden über Nacht getrocknet und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet.

## 2.5 PCR

### 2.5.1 Allgemeine PCR-Bedingungen

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine automatisierbare Methode zur selektiven Vervielfältigung auch geringer Mengen an DNA-Material ( template ) dar. Zunächst werden die DNA-Doppelstränge erhitzt, so daß sie sich voneinander trennen (Denaturierung). Komplementär zu den beiden Enden der Zielsequenz, die vervielfältigt werden soll, werden Primer, Oligonucleotide von etwa 20 Basen Länge, zugefügt, die sich entsprechend an die DNA anlagern (annealing). Die optimale Temperatur für das annealing ( $T_m$ ) lässt sich dabei aus dem Primereigenschaften berechnen:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 59,9 + (0,41 \times \text{GC-Anteil des Primers [\%]} ) - (675 / \text{Länge des Primers [bp]})$$

Mit Hilfe einer DNA-Polymerase (meist die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) und der vier Nucleotidtriphosphate (dNTP's) werden die beiden Einzelstränge bei dem Temperaturoptimum der Polymerase von den Primern ausgehend wieder verdoppelt (elongation), diese beiden Doppelstränge werden wieder durch Erhitzen getrennt, usw. So gelangt man zu einer logarithmischen Amplifikation der DNA. Nach 30 Zyklen aus Denaturierung, annealing und elongation erhält man damit aus einem DNA-Molekül  $10^9$  Moleküle.

### 2.5.2 Generierung von Schnittstellen durch PCR (PCR-Klonierung)

Um ein bestimmtes DNA-Fragment für eine Klonierung zu präparieren, lassen sich statt durch Linker auch durch eine PCR Restriktionsschnittstellen an den Enden anhängen. Dazu werden teilkomplementäre *sense*- und *antisense*-Primer synthetisiert, die jeweils an ihrem 5'-Terminus zusätzlich die Erkennungssequenz für das gewünschte Restriktionsenzym enthalten. Über diese Sequenz hinaus werden die Primer um mindestens zwei Basen verlängert, um später einen effizienten Restriktionsverdau zu gewährleisten. Im ersten Schritt der PCR hybridisiert jeweils der komplementäre Teil eines Primers mit einem template und wird im anschließenden Elongationsschritt zu einem vollständigen Fragment mit neuer Schnittstelle verlängert. Dieses steht im nächsten Schritt wiederum als neues template zur Verfügung, so daß bereits nach wenigen Zyklen die Mehrzahl der neusynthetisierten Oligonucleotide die gewünschten Restriktionsschnittstellen enthält.

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS-Puffer:	140 mM	NaCl	
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	2,5 mM	KCl	
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,1 g/l	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	
	0,1 g/l	CaCl <sub>2</sub>	pH = 7,4

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-acetat	
	2 mM	EDTA pH 8,0	

DNA-Gelladepuffer:	0,25%	Bromphenolblau	
	0,25%	Xylen-Xyanol	
	30,0%	Glycerol	in H <sub>2</sub> O

LB-Medium:	50g	Tryptone	
	25g	Hefe-Extrakt	
	50g	NaCl	für 5 l
	100 mg/ ml	Ampicillin	

Bei der Herstellung von Bakterienkulturplatten wurden 15 g/ l Agarose zugesetzt

Lysepuffer ( Miniprep ):	250 µl	1 M Tris pH 8,0	
	250 µl	1 M EDTA	
	250 µl	Triton X	
	4,0 g	Sucrose	
	1,667 ml	Lysozym ( 10 mg/ml )	für 50 ml

Lysozym wird vor Gebrauch frisch zugesetzt

**2.6.2  $\beta$ -Galactosidase-Färbung**

Färbelösung:	2 ml	10 mg/ml X-Gal, Substrat des Enzyms (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Galactosid)	
	200 $\mu$ l	0,5 M Kaliumhexacyanoferrat III ( $K_3[Fe(CN)_6]$ )	
	200 $\mu$ l	0,5 M Kaliumhexacyanoferrat II ( $K_4[Fe(CN)_6]$ )	
	60 $\mu$ l	1 M Magnesiumchlorid $MgCl_2$	
			mit PBS auf 20 ml

**2.6.3 Proteinanalyse durch Western-Blot**

RIPA-Puffer:	10 ml	Igepal	
	5 g	Natriumdeoxycholat	
	1 g	SDS	mit PBS auf 1 l

vor Verwendung den Puffer auf 4°C kühlen und frisch 5  $\mu$ l PMSF-Inhibitor-Mix je ml Puffer zugeben

Laemmli-Ladepuffer:	1,25 ml	1 M Tris pH 6,8	
	2,00 ml	Glycerol	
	2,00 ml	SDS 20%	
	1,00 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol	
	10,0 mg	Bromphenolblau	
	3,75 ml	H <sub>2</sub> O	

Elektrophoresepuffer :	140 g	Tris	
	30 g	Glycine	
	10 g	SDS	für 100 ml

Transferpuffer :	2,42 g	Tris	
	11,45 g	Glycine	
	200 ml	Methanol	
	50 g	SDS	für 1 l

TBS-Tween :	8,7 g	NaCl	
	20 ml	1 M Tris pH 7,5	
	3 ml	Tween 20	für 1 l

SDS-Polyacrylamidgel, 12,5% Laufgel und 3% Sammelgel, Dicke 0,75 mm

1,25 ml	-	1,5 M Tris pH 8,8
-	0,625 ml	0,5 M Tris pH 6,8
2,03 ml	0,25 ml	Acrylamid 40%
1,64 ml	1,55 ml	dH <sub>2</sub> O
50 µl	25 µl	SDS 10%
25 µl	12,5 µl	APS 10%
3,75 µl	3,75 µl	TEMED

APS ist Ammoniumpersulfat in Wasser gelöst

Acrylamid 40% besteht aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1

#### 2.6.4 Zellkultur

HGM-Medium:	44,0 ml	DMEM-Medium
	5,0 ml	FCS
	0,5 ml	P/S
	0,5 ml	Albumin ( 200 g/l)
	50 µl	ITS ( 10 mg/ml )
	2 µl	Dexamethasone ( 1 µg/l)
	1 µl	HGF ( 1µg/µl )

ITS ist Insulin-Transferrin-Supplement

HGF ist hepatocyte growth factor

HEPES zur Transfektion:	8,0 g	NaCl	
	6,5 g	HEPES	
	10 ml	Dinatriumhydrogenphosphat ( 10,5 g / l )	für 1l

TNE für VSV-G-Viren:	605 mg	TRIS	
	760 mg	NaCl	
	37 mg	EDTA	für 100 ml
Cacodylat-Fixierung:	10,7 g	Cacodylatnatriumsalz	
	41,5 ml	0,1 M Salzsäure	
	950 ml	Wasser	
	40 g	Paraformaldehyd	
	735 mg	Calciumchlorid-Dihydrat	

löst sich bei längerer Erwärmung auf 70°C

## 2.7 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Bakterienschüttler	Bühler
Brutschrank	Heraeus
Cryostat Mikrom HM 500 OM	Omega
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus
Gelelektrophoreseapparatur	Serva
Kühlzentrifuge J 2-21	Beckmann
mit Rotoren JA-20 und JA-10	
Spannungsquelle EPS 200	Pharmacia Biotech
Photometer	Tecan
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrafiltrationseinheit	Schleicher & Schuell
Ultrafiltrationsmodul UFP-100-C-MB01	Schleicher & Schuell
UV-Leuchttisch	Intas
Vortexer	Omnilab
Western-Blot-Kammer	Biometra

## 2.8 Chemikalien

Agar	Gibco BRL
Agarose	Gibco BRL
Albumin	Roche
Ampicillin (Na-Salz)	Sigma
Anti-Flag M2	Sigma
ATP (Na-Salz)	Sigma
1 kB-Leiter	Gibco BRL
Bactotrypton	Gibco BRL
Bromphenolblau	Biorad
Cacodylat (Na-Salz)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Chloroquin	Sigma
DOGS	Promega
Doxycyclin	Sigma
DTT	Sigma
EDTA (Di-Na-Salz)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Biorad
Gelatine	Sigma
Glycerol	Sigma
Hand-Homogenisator	Merck
Hefeextract	Gibco
HEPES	Sigma
HGF	Pepru Tech Inc.
Isopropanol	Merck
ITS	Roche
JO2	PharMingen
Kaliumhexacyanoferrat II und III	Fluka
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Natriumhydrogenphosphat	Merck
dNTP	Appllichem
Neomycin	Calbiochem



Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
PMSF	Sigma
Polybrene	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Biochrom
X-Gal	Sigma
Xylencyanol FF	Serva

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

Cryomolds	Miles
Gewebekulturflaschen (75 und 250 ml)	Greiner
Immobilon-P (Membran für Proteine)	Millipore
Objektträger	Menzel
Petrischalen (60 mm)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf
Polypropylenröhrchen ( 15 und 50 ml)	Greiner
Polypropylenröhrchen (15 ml, steril)	Falcon
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt
TissueTek	Sakura

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung von pTOITA

Der Transfer von Genen mit potentiell therapeutischen Nutzen ist aktueller Gegenstand von der Forschung und in der Klinik, um eine Reihe von genetisch und viral bedingten Erkrankungen zu behandeln. Obwohl eine Vielzahl von Methoden für den Gentransfer - wie die Anwendung adenoviraler Vektoren - Gegenstand klinischer Studien waren, repräsentieren retrovirale Vektoren die häufigste Methode in den heutigen Gentherapie-Strategien. Ein wichtiges Merkmal eines jeden Gentransfer-Systems ist die Fähigkeit, die Expression des eingeführten Gens zu regulieren. Durch die Einführung des Tetracyclin-regulierbaren System wurden die Möglichkeiten, einen retroviralen Vektor in der Genexpression zu kontrollieren, deutlich erweitert. Da vorliegende Konstrukte in Vorversuchen in humanen Hepatomzelllinien keine Regulation zeigten, wurde in der Arbeitsgruppe aus dem Vektor p617Retro-on (Firma Clontech) und aus dem Vektor pBabeM-SIN CMV 15-1 (G.P. Nolan, Stanford University/USA) ein neuer optimierter Vektor dargestellt, der als backbone den Vektor pRetro-on und damit dessen Vorteile wie z.B. das Vorhandensein eines Selektionsgens ( $Puro^r$ ) für die Selektion in eukaryoten Zellen sowie das Ampicillin-Resistenzgen ( $Amp^r$ ) zur Selektion in prokaryonten Zellen trägt, aber mit den Vorteilen des pBabeM-SIN-Vektors wie z.B. die IRES-Einheit, die die Verwendung eines internen Promotors überflüssig macht, kombiniert ist.

Nach dem Packungssignal  $\Phi$  wurde in den Stammvektor pRetro-On durch Mutagenese eine Cla I-Schnittstelle eingeführt, um für spätere Anwendungen den Austausch des Resistenzgens zu gewährleisten. So wurde im weiteren Verlauf der Klonierung neuer Vektoren  $Puro^r$ , also die Puromycinresistenz, durch  $Neo^r$ , also eine Neomycinresistenz, ersetzt.

Aus mehreren der klonierten Chimären, deren Regulation in HepG2-Zellen überprüft wurden, stellte sich schließlich der Vektor pTOITA als der Vielversprechendste heraus, weil er zum einen eine sehr enge Regulierbarkeit der Genexpression ermöglicht und zum anderen die basale Expression im nicht-induzierten Status sehr gering ist (C. Fritsch, nicht publizierte Daten).

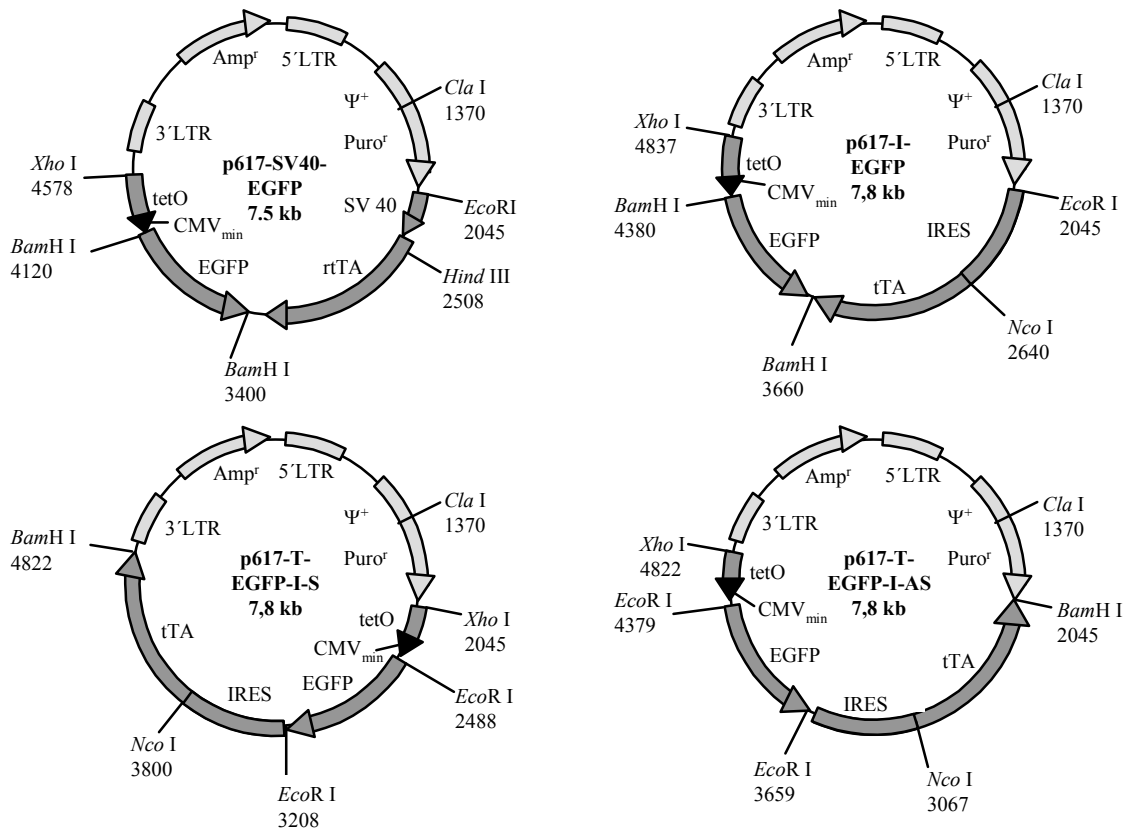
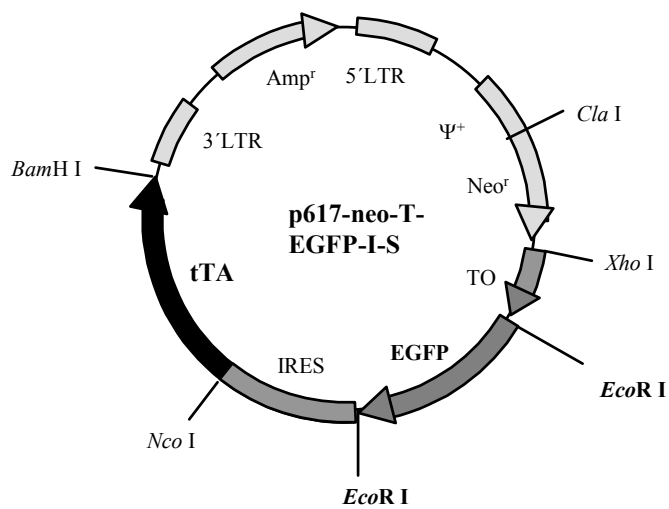


Abbildung 3.1 (oben): Klonierte Chimären aus pRetro-on und pBabeM-SIN

Abbildung 3.2 (unten): Optimierter Vektor pTOITA (=617-neo-T-EGFP-I-S)



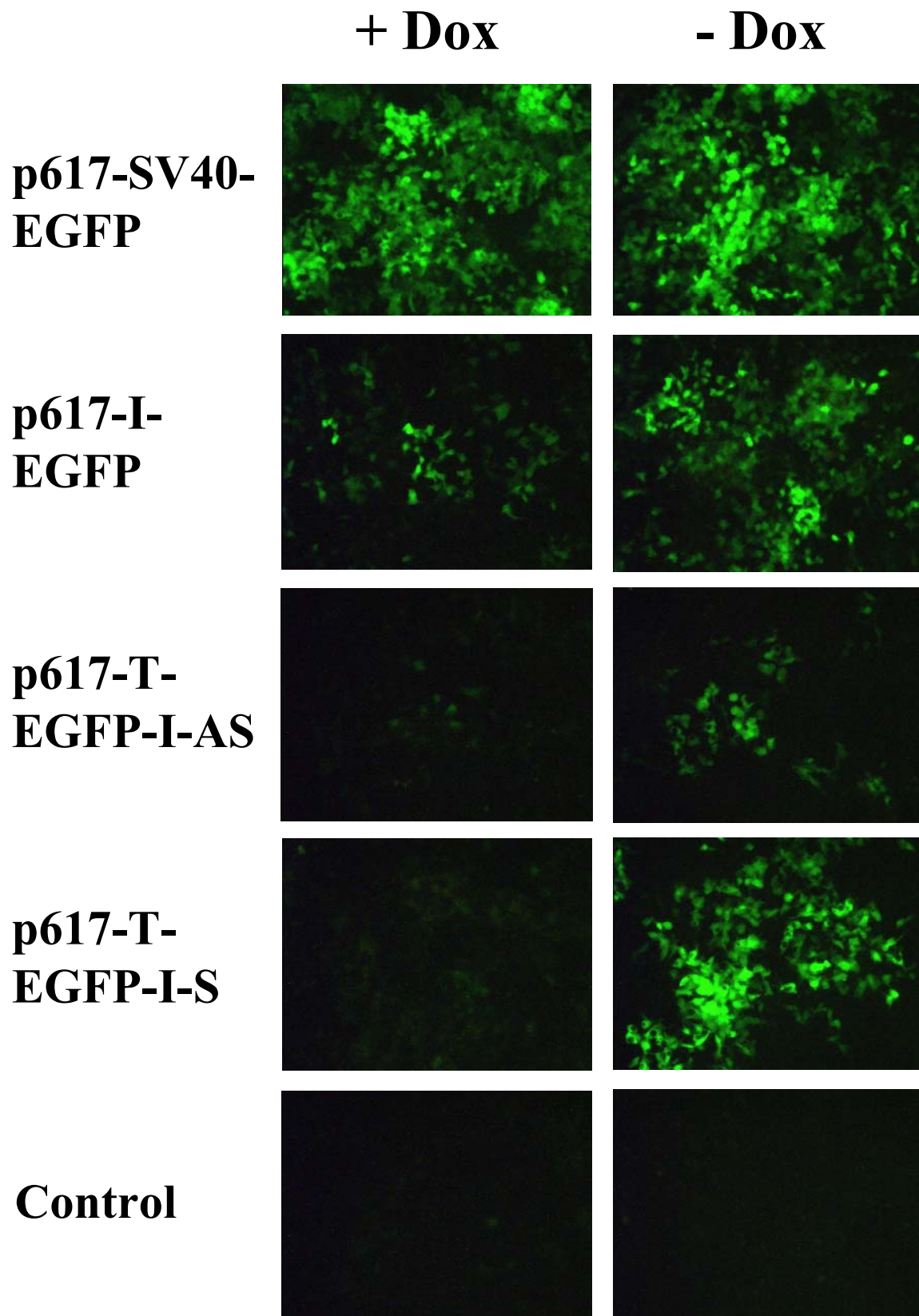


Abbildung 3.3: Regulationsfähigkeit der klonierten Chimären in HepG2-Zellen  
(C. Fritsch, nicht publizierte Daten)

Nach Neomycin-Selektion von pTOITA-transduzierten Zellen wurden jedoch nur sehr wenige Zellklone erhalten, die beim Versuch der Expansion dieser Zellen auch noch abstarben, was auf die Toxizität des Vektors zurückzuführen war.

### 3.2 Entwicklung von tTA2,3 und 4

Es ergab sich schließlich die Notwendigkeit zur Konstruktion weiterer Transaktivatoren, von denen intrazellulär höhere Konzentrationen geduldet wurden. Hierzu entschloß man sich, den VP16-Anteil des tTA auf ein Minimum zu reduzieren, um mögliche Ziele für Interaktionen mit zellulären Faktoren zu umgehen. Die minimale Aktivierungsdomäne von VP16 war bereits als die Aminosäuren 435 bis 447 mit der Sequenz PADALDDFDLML identifiziert worden, so daß synthetische Oligonucleotide, die für diese Region codieren bzw. Variationen dieser Region darstellen, indem das Phenylalanin (F) an Position 442 ersetzt wird, nun statt des gesamten VP16 kloniert wurden. Insgesamt wurden so drei neue Vektoren geschaffen (S. Krause, nicht publizierte Daten).

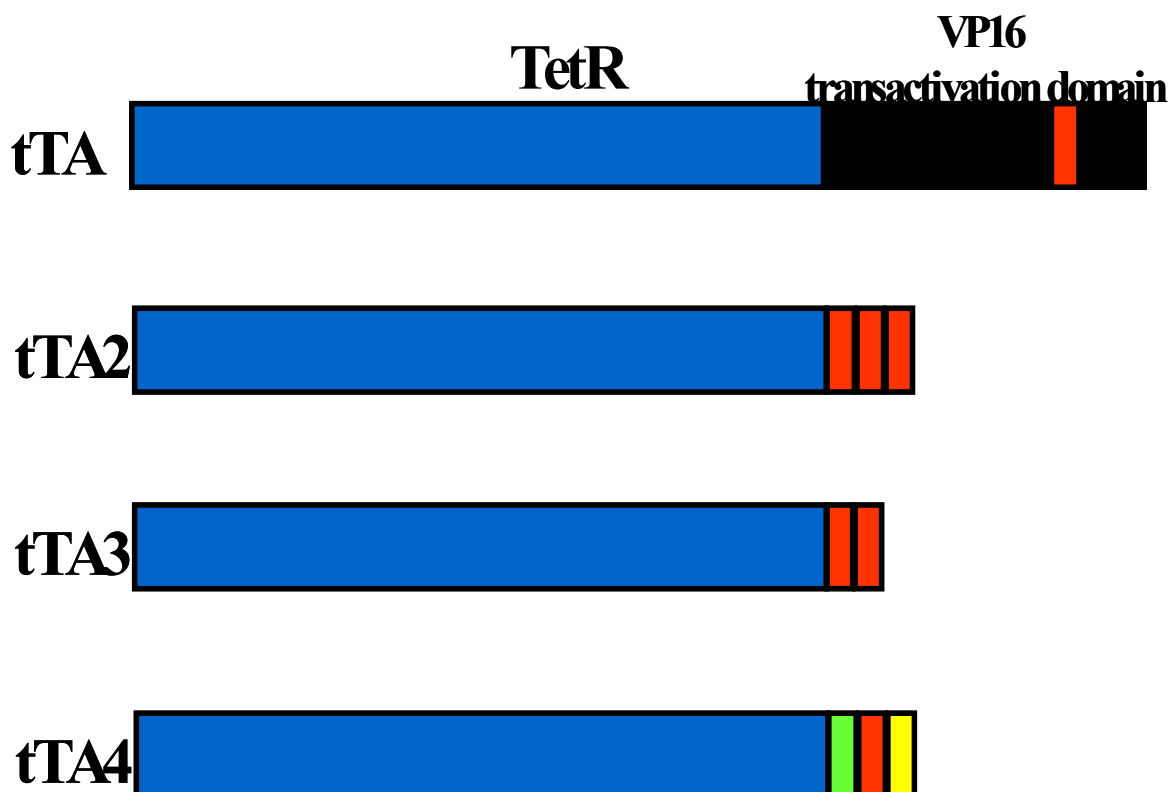


Abbildung 3.4: tTA und seine Varianten. Rot steht für die Wildtyp-Sequenz der minimalen Aktivierungsdomäne von VP16, grün für den Ersatz von Phenylalanin durch Glycin, gelb für den Ersatz von Phenylalanin durch Tyrosin.

Im Vergleich mit dem Vektor pTOITA (ptTA) wurden diese neuen Vektoren in drei- bis zu neunfach höheren intrazellulären Konzentrationen toleriert, ohne eine toxische Wirkung zu entfalten. Bei der Neomycin-Selektion wurden die klonierten Vektoren nun zusätzlich mit dem Vektor pLEIN der Firma Clontech verglichen, der die maximale Anzahl der zu erwartenden stabilen Zellklone vorgab.

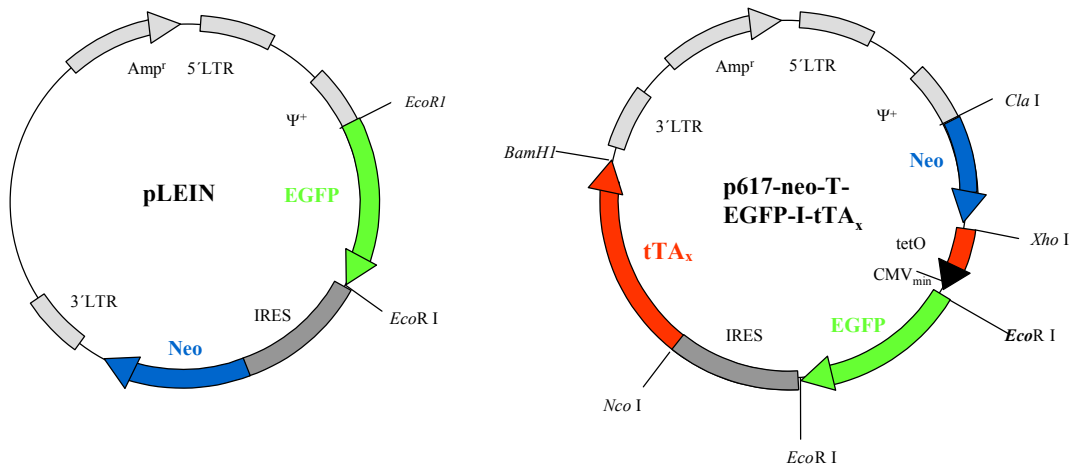


Abbildung 3.5: Die Vektoren pLEIN und pTAX mit x = 2, 3 oder 4

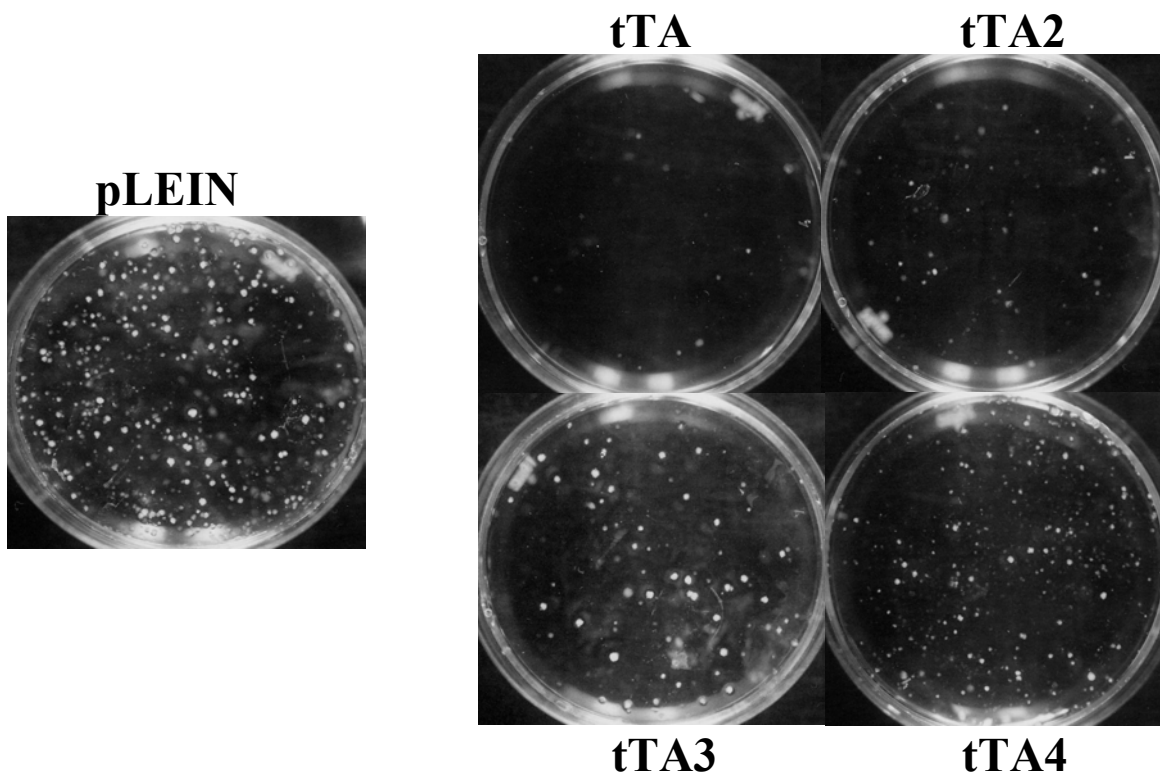


Abbildung 3.6: Stabile Zellklone nach Neomycinselektion

Gleichzeitig dient pLEIN auch sowohl als Positivkontrolle für die EGFP-Fluoreszenz als auch als Negativkontrolle für die Doxycyclin-Regulierbarkeit.

Die nach zweiwöchiger Neomycinselektion und Doxycyclingabe erhaltenen Klone wurden sowohl in ihrer Gesamtheit als auch ihr Anteil mit EGFP-Fluoreszenz ausgezählt. Danach wurden die Zellen eine weitere Woche unter Doxycyclinentzug kultiviert und wiederum der Anteil der leuchtenden Klone bestimmt. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle dargestellt:

<b>Vektor</b>	<b>Zahl der stabilen Zellklone</b>	<b>Zahl der Klone mit Expression unter Doxycyclin</b>	<b>Zahl der Klone mit Expression unter Doxycyclin</b>	<b>Zahl der Klone mit Expression ohne Doxycyclin</b>	<b>Prozentsatz der Doxycyclin-regulierbaren Klone</b>
p617-SV40-EGFP	72	53	53	0	0
p617-I-EGFP	23	9	9	0	0
p617-T-I-EGFP-AS	0	0	0	0	0
p617-T-I-EGFP-S	3	0	0	0	0
pLEIN	73	70	70	0	0
p617-neo-T-I-EGFP	6	0	0	0	0
p617-neo-T-I-EGFP-TA2	42	0	11	26	26
p617-neo-T-I-EGFP-TA3	64	0	31	48	48
p617-neo-T-I-EGFP-TA4	65	0	29	45	45

Obwohl sich die Vektoren tTA3 und tTA4 in ihrer EGFP-Expression und ihrer Regulierbarkeit als gleichwertig herausgestellt haben, so sollte der Vektor tTA4 jedoch theoretisch über eine geringere Toxizität verfügen. Daher wurde in allen weiteren Experimenten der Vektor tTA4 verwendet.

Zusätzlich zu geringerer Toxizität und höherer EGFP-Expression dürfte auch die geringe Größe der neuen Transaktivatoren von Vorteil sein, da viele Vektorsysteme nur über begrenzte Möglichkeiten zur Aufnahme fremder Sequenzen verfügen. So sollte die Größe eines Retrovirus 10 kB nicht überschreiten.

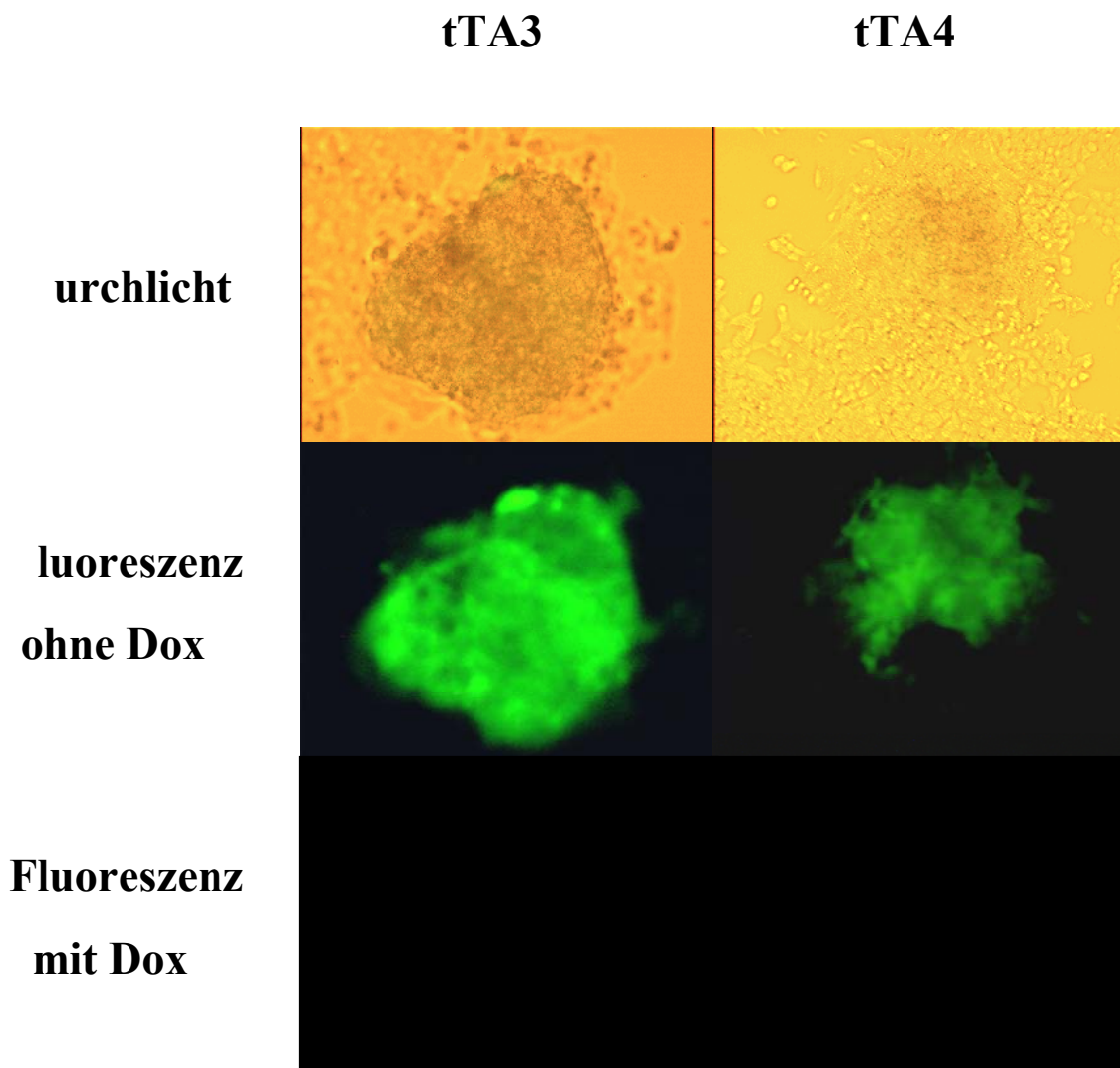
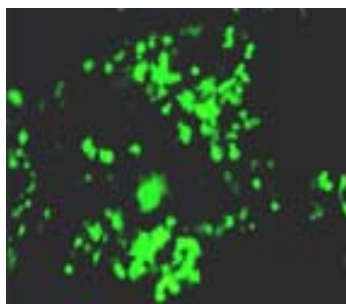


Abbildung 3.7: EGFP-Expression und Regulation in Klonen der Vektoren tTA3 und tTA4

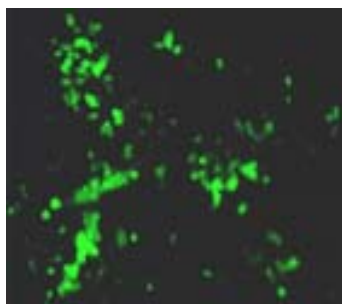


### 3.3 Optimierung des Gentransfers

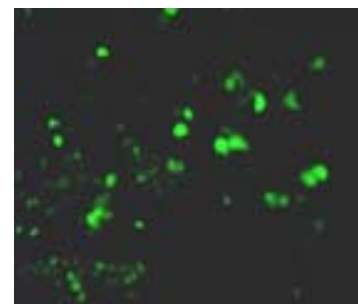
Für alle weiteren Versuche stellte sich zunächst das Problem des Virustiters. Mit allen gängigen Packungszellen können nur Titer des MoMLV bis zu  $10^6$  infektiöse Viren (infectious units, IU)/ml hergestellt werden, da Retroviren im Gegensatz zu Adenoviren instabiler sind und durch eine Ultrazentrifugation, die der Aufkonzentrierung dient, zerstört werden. Für die meisten Anwendungen wird jedoch ein wesentlich höherer Virustiter, etwa  $10^8$  IU/ml, benötigt. Durch den Austausch des retroviralen *env*-Proteins durch das G-Protein des *vesicular stomatitis virus* (VSV) kann man zum einen eine weitgehend zelltypunabhängige (pantrope) Aufnahme der Viren in Zellen erreichen, da der Rezeptor des VSV-G-Proteins in fast allen höheren eukaryotischen Zellen exprimiert wird, und zum anderen gewinnt man die Möglichkeit, diese pseudotypisierten Viren durch eine Ultrazentrifugation und Sedimentation stark zu konzentrieren, da die Verpackung des Virus mit VSV-G wesentlich stabiler ist. Dabei soll keine Infektivität verloren gehen, es wird beschrieben, daß mit diesen pseudotypisierten Viren ein Virustiter bis zu  $10^9$  IU/ml erreicht werden kann.



**Eco-Viren**



**Amphi-Viren**



**VSV-G-Viren**

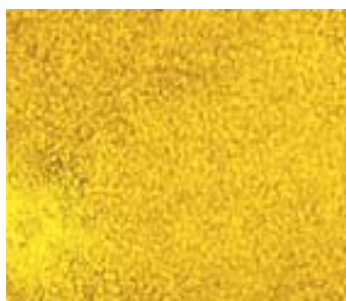


Abbildung 3.8: Aufkonzentrierung verschiedener Virustypen des Vektors pLEIN mittels Ultrazentrifugation, nachfolgend Transduktion von murinen Hepa 1-6-Zellen. Oben Fluoreszenzlicht, unten zum Zellrasenvergleich Durchlicht.

Beim Versuch der Ultrazentrifugation zeigte sich deutlich, daß durch die Pseudotypisierung der Viren keine höhere Transduktionsrate erreicht werden konnte. Im Gegenteil lieferten die nicht sedimentierten Viren eine bessere Transduktionsrate, insbesondere die Eco-Viren, die spezifisch den murinen Rezeptor der Hepa 1-6-Zellen benötigen.

Mit diesen Eco-Viren wurde anschließend untersucht, ob mittels Ultrafiltration höhere Virustiter erreicht werden.

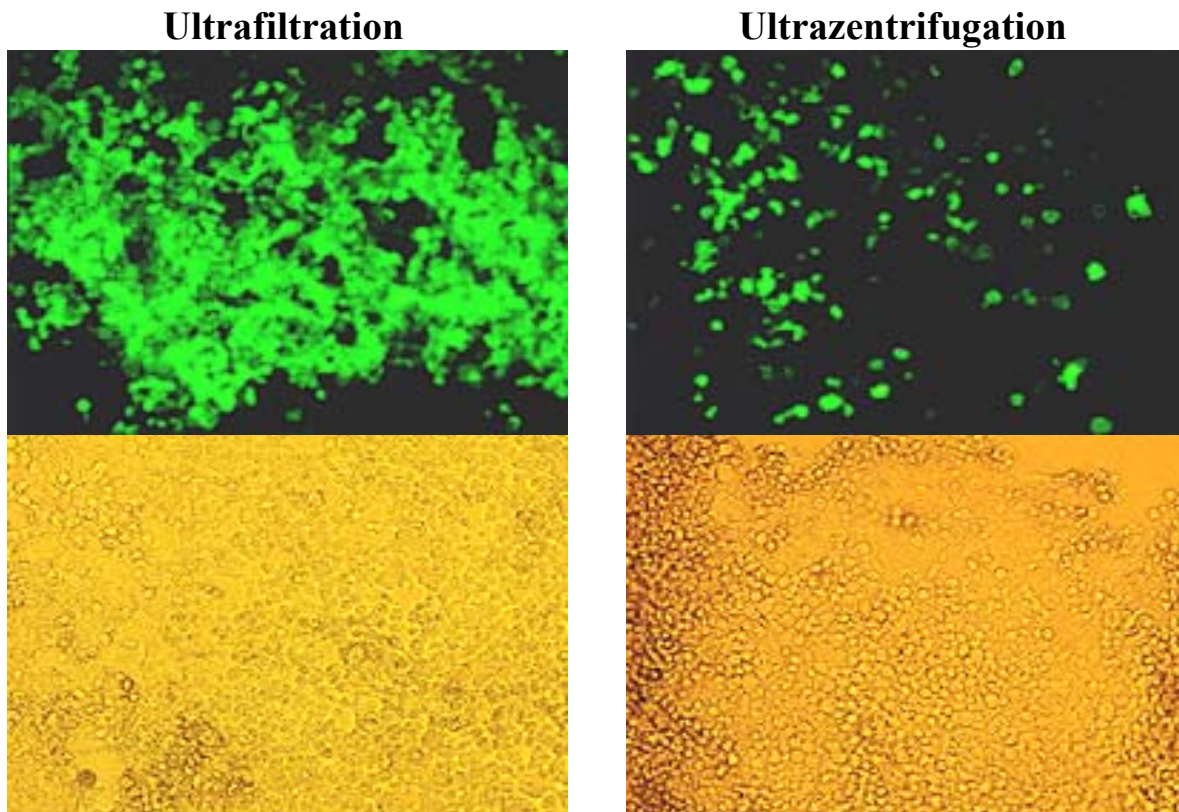


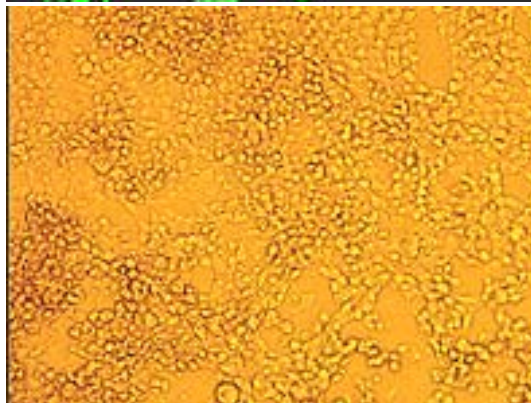
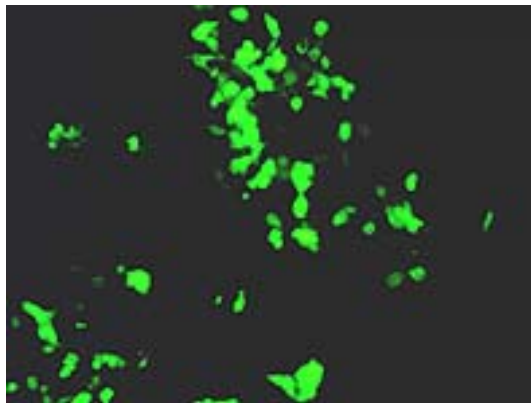
Abbildung 3.9: Vergleich von ultrafiltrierten und ultrazentrifugierten Eco-Viren des Vektors pLEIN, nachfolgend Transduktion von Hepa 1-6-Zellen unter Zugabe von Polybren. Oben Fluoreszenzlicht, unten zum Zellrasenvergleich Durchlicht.

Bei diesem Versuch zeigte sich, daß Viren, die zuvor durch Ultrafiltration aufkonzentriert wurden, später die höchste Transduktionsrate erzielten, und somit offenbar den höchsten Virustiter liefern. Daher wurde die Ultrafiltration Bestandteil aller folgenden Versuche.

Der Nutzen von Polykationen wie Polybren bei retroviralen Transduktionen ist bereits seit Jahrzehnten bekannt. Für den Gentransfer *in vivo* ist Polybren aufgrund seiner Toxizität schlecht anwendbar, außerdem muß der Vorgang der Transduktion hier sehr schnell verlaufen, da für den Kontakt zwischen Virion und Zielzelle nur eine

limitierte Zeit zur Verfügung steht. DOGS kann in 30fach höherer Konzentration als Lipofectin oder Lipofectamin angewendet werden, bevor es zytotoxisch wirkt. Außerdem besitzt es bei amphotropen Viren die gleiche optimale Konzentration (5µg/ml). Aus diesen Gründen wurde getestet, ob auch im vorliegenden Versuchsansatz die Verwendung von DOGS eine bessere Transduktionsrate liefern würde.

### Polybren



### DOGS

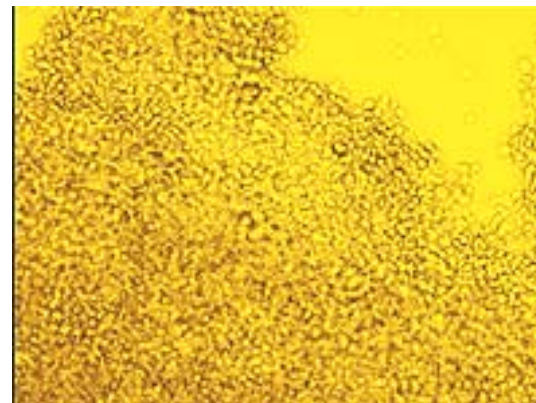
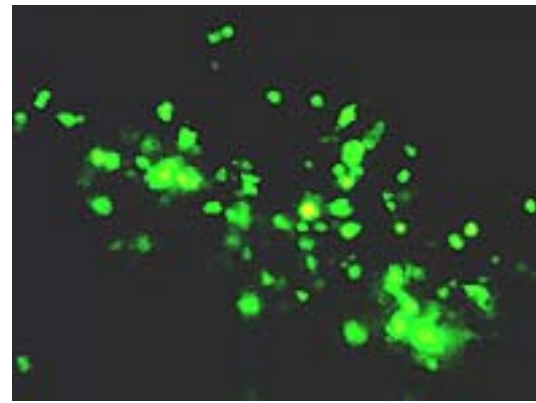


Abbildung 3.10: Vergleich der Transduktion von HepG2-Zellen mit Ampho-Viren des Vektors pLEIN (ohne Ultrafiltration) unter Beigabe von 5 µg/ml Polybren bzw. DOGS. Oben Fluoreszenzlicht, unten zum Zellrasenvergleich Durchlicht.

Eine signifikante Verbesserung der Transduktionsrate durch DOGS konnte nicht festgestellt werden. Da die Transduktion nach einer Ultrafiltration, die stets unter Zugabe von Polybren verlaufen muss, allein bereits zu einem deutlich erhöhten Virustiter und damit zu einer wesentlich höheren Transduktionsrate geführt hatte, wurde im Folgenden auf die kostspielige Variante mit DOGS verzichtet.

### 3.4 Gentherapie in vivo

Adenoviren besitzen eine sehr hohe Affinität zu Leberzellen. Schon mit relativen geringen MOI (multiplicity of infection) können Hepatozyten in Kultur und in vivo zu 50-100% mit adenoviralen Vektoren transduziert werden. Dies macht adenovirale Vektoren zu attraktiven Gentransduktionssystemen in der hepatischen Gentherapie. Dem Vorteil der hohen Transduktionseffizienz in der normalen Leber, stehen jedoch die Nachteile der Toxizität und Immunogenität gegenüber.

Retrovirale Vektoren besitzen nahezu keine Toxizität und Immunogenität nach der Zelltransduktion und stabilen Integration in das Wirtsgenom, jedoch auch keine Affinität zu Leberzellen, so daß eine systemische Gabe von Retroviren zu einer sehr schlechten Transduktionsrate in vivo führt.

Der Gebrauch von Retroviren in der somatischen Gentherapie ist jedoch limitiert, da für die Integration des proviralen Genoms in das Genom der Wirtszelle eine stattfindende DNA-Synthese, also eine Mitose notwendig ist. Ruhende oder terminal differenzierte Zellen wie z.B. Hepatozyten, werden nicht von retroviralen Vektoren infiziert.

Aus diesem Grund müssen für eine Gentherapie in vivo zuerst die Hepatozyten des Empfängers zur Proliferation angeregt werden. Dies kann durch eine Hemihepatektomie geschehen, die Proliferation kann aber auch durch Toxine angeregt werden. In Mäusen wurde das alkylierende Reagenz Dipin mit Erfolg eingesetzt, da dieses kommerziell jedoch nicht erworben werden konnte, wurde zur Anregung der Hepatozytenproliferation in den Versuchsmäusen 24 Stunden vor Gabe der Retroviren eine Hemihepatektomie durchgeführt.

Da eine systemische Gabe der Retroviren durch die Schwanzvene der Mäuse aufgrund der fehlenden Affinität nicht zu einer Lebertransduktion würde, kam eine der in der Literatur beschriebenen komplexen Methoden zur Anwendung, die blutlose Perfusion der Leber. Mäuse, die auf diese Weise behandelt wurden auf diese Art zu behandeln, die jedoch alle starben.

Insgesamt ergab sich aus diesen Vorversuchen der folgende Ablauf: Die Tiere wurden an Tag -1 hemihepatektomiert und an Tag 0 mit 200 µl Lösung des retroviralen Vektors pLEIN ( $10^8$  IU/ml) infiziert. Nach Vollendung der Leberregeneration wurden die Tiere an Tag 14 getötet, die Leber entnommen, tiefgefroren und Kryoschnitte angefertigt.

Trotz des optimierten Versuchsablaufs konnte in den Kryoschnitten jedoch kein EGFP detektiert werden. Dies war nicht weiter erstaunlich, da über eine niedrige Transduktionsrate selbst sich teilender Zellen mit Retroviren *in vivo* bereits mehrfach berichtet wurde, mit den üblichen retroviralen Vektoren wurde nur eine Transduktion von nur 0,3-1% der Leber erreicht. Da die Leber bei der Detektionswellenlänge des EGFP außerdem eine starke Autofluoreszenz besitzt, wäre es nicht verwunderlich, wenn die EGFP-Fluoreszenz überdeckt würde.

Aus diesen Gründen wurde ein anderer Vektor für die Versuche gewählt, ein Abkömmling von pLEIN, der außerdem das Gen von dnFADD enthält.

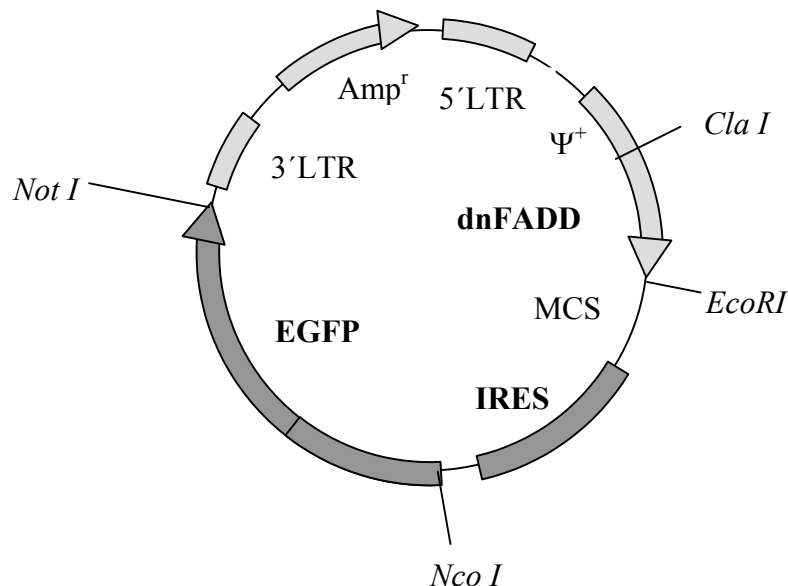


Abbildung 3.11: Vektor pIRES-EGFP-dnFADD

In diesem Vektor wird das EGFP zwar etwas schwächer exprimiert als in pLEIN, dafür können jedoch Zellen, die mit dnFADD transduziert wurden, später im lebenden Organismus selektiert werden. dnFADD blockiert in den Zellen die Apoptose, die durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann. So induziert eine subletale Gabe des anti-Fas-Antikörpers JO2 24 Stunden nach Gabe in 30% der normalen Hepatozyten die Apoptose. Mit dnFADD transduzierte Zellen dagegen überleben eine solche Behandlung und proliferieren im Rahmen der Leberregeneration in den folgenden 4-6 Tagen massiv. Nach mehreren Zyklen der JO2-Behandlung sollte also die Zahl der retroviral transduzierten Zellen in der Leber angestiegen sein, was die Detektion vereinfachen sollte.

24 Stunden nach Gabe des retroviralen Vektors in die Milz wurde den Versuchstieren erstmals 4 µg (0,15 mg/kg) JO2 systemisch über die Schwanzvene verabreicht. Eine Kontrollgruppe mit pLEIN transduzierter Tiere wurde ebenfalls JO2 verabreicht. Die Gabe von JO2 wurde alle 7 Tage für die Dauer von 8 Wochen wiederholt, so daß etwa 5% der Leber aus transduzierten Zellen bestehen sollte. Dann wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und tiefgefroren.

Ein Teil der tiefgefrorenen Lebern wurde zu Kryoschnitten verarbeitet, in denen jedoch wiederum kein EGFP detektiert werden konnte. Da es möglich sein könnte, daß das EGFP von Retroviren in der Leber wegen der hohen Autofluoreszenz und der immer noch geringen Transduktion nicht mittels Fluoreszenz detektiert werden kann, wurde aus den restlichen Lebern ein Proteinextrakt gewonnen, dessen charakteristische Bestandteile im Western Blot detektiert werden sollten. Da keine zufriedenstellenden Antikörper gegen EGFP vorhanden waren, wurde der monoklonale anti-Flag M2 Antikörper (10 µg/ml) gegen dnFADD verwendet.

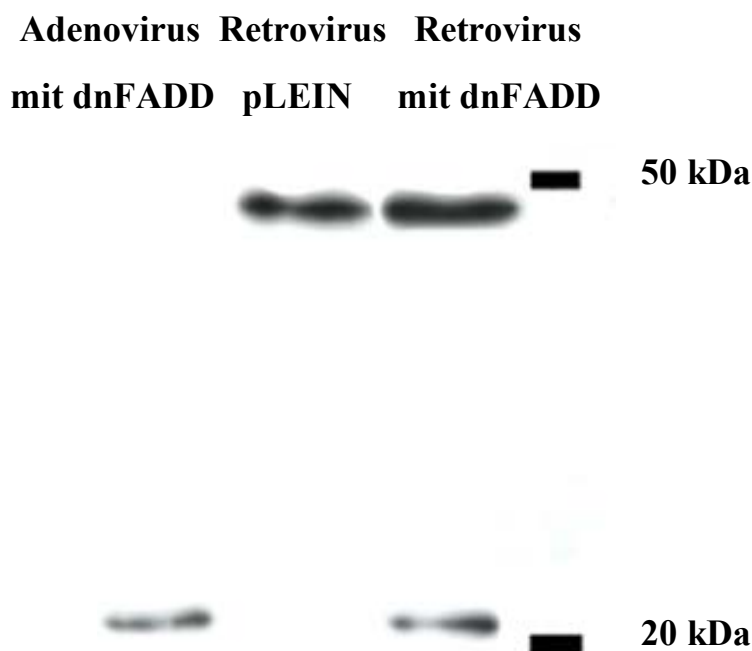


Abbildung 3.12: Western Blot auf dnFADD (23 kDa) mit typischer Kreuzreaktionsbande eines Retrovirusproteins bei 48 kDa, Auflegezeit >5 min.

Zum Vergleich wurde ein Adenovirus, der ebenfalls für dnFADD kodiert, einer Maus in einer sehr geringen Dosis von  $10^6$  IU/ml über die Schwanzvene gegeben, die Maus wurde am nächsten Tag getötet und ihre Leber kryokonserviert.

Tatsächlich konnte auf diese Weise eine Transduktion der Leber in vivo nachgewiesen werden, da aber für die meisten Vektoren keine Möglichkeit zur Nachselektion in vivo besteht, musste für weitere Versuche auf eine andere Strategie ausgewichen werden.

### **3.5 Gentherapie ex vivo**

Für die hepatische Gentherapie ex vivo werden Leberzellen kultiviert, in Kultur transduziert und anschließend in den Empfänger transplantiert. Der Spender der Zellen kann dabei der Empfänger selbst sein, z.B. nach einer Leberbiopsie, oder ein fremder Organismus. Als geeignete Zellen für die Gentherapie ex vivo wurden fetale Hepatozyten gewählt, da diese ein wesentlich höheres proliferatives Potential besitzen als enddifferenzierte adulte Hepatozyten. Embryonale und fetale hepatische Stammzellen können isoliert und kultiviert werden und differenzieren unter dem Einfluß geeigneter Mediatoren in vitro zu hepatischen Vorläuferzellen. Zunächst wurde ein möglichst frühes Embryonalstadium zur Isolierung der Hepatozyten gewählt, da die Differenzierung in diesem Stadium noch nicht weit fortgeschritten ist. Die an Gestationstag 9 entnommene embryonale Leber ist jedoch sehr klein und schwierig zu präparieren, so daß die Kultur häufig von mitgenommenen Fibroblasten überwuchert wird. Außerdem ist die embryonale Leber von Tag 8 bis Tag 12 der Ort der embryonalen Hämatopoese, so daß die Kultur unter den nicht-adhärenenten hämatopoetischen Zellen, die automatisch mitgenommen werden, schlecht zu beobachten ist. Aus diesen Gründen wurde auf fetale Hepatozyten, die an Gestationstag 14 entnommen wurden, ausgewichen.

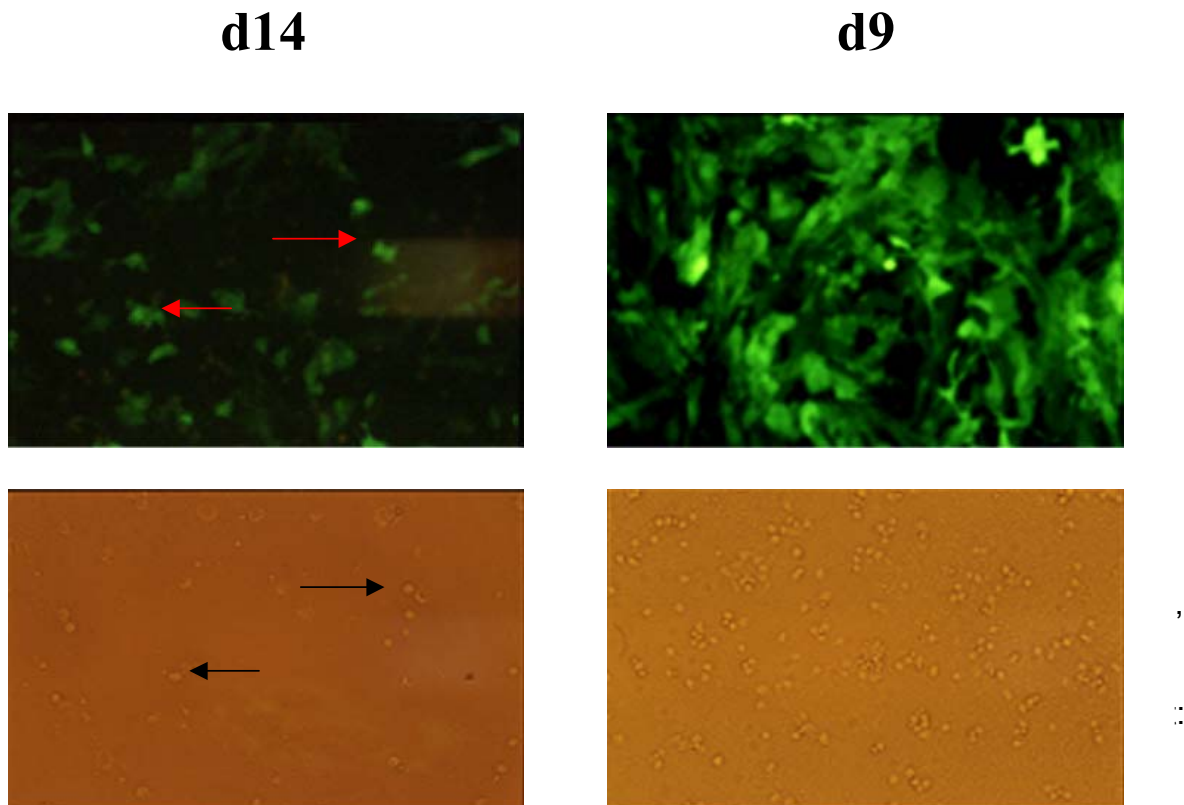


Abbildung 3.13: Kultur embryonaler Hepatozyten an Tag 14 und Tag 9 im Vergleich. Tag 9:  
 Im Durchlicht: Hämatoopoetische Zellen (rund) und im Fluoreszenzlicht:  
 Fibroblasten (länglich). Tag 14: Pfeile deuten auf Hepatozyten.

Angelehnt an die Transduktionsversuche mit immortalisierten Zelllinien wurde eine zweifache Transduktion, einmal 48 und einmal 72 Stunden nach Aussaat, gewählt. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Kultur embryonaler Hepatozyten ist der Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium. Ein starkes Mitogen für Hepatozyten ist HGF (hepatocyte growth factor). Hierfür werden jedoch Dosen benötigt, die den finanziellen Rahmen vieler Experimente sprengen. In niedrigen Dosierungen wie in vitro (20 ng/ml) optimiert HGF jedoch das Wachstumsmedium der Hepatozyten.



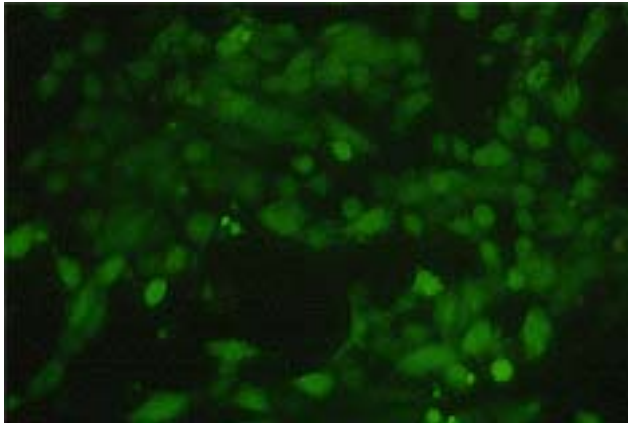


Abbildung 3.14: Optimale Transduktion embryonaler Hepatozyten mit pLEIN

Vor der Reimplantation der Hepatozyten an Tag 7 nach Aussaat müssen beim Empfänger noch die nötigen Bedingungen geschaffen werden, damit die Hepatozyten überhaupt aufgenommen werden und anwachsen können. Um den implantierten Hepatozyten einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, sollte bei dem Empfänger entweder eine Hemihepatektomie vorgenommen oder ein adenoviraler Leberschaden gesetzt werden. Bei dem Vorgang der Leberregeneration sollten die transplantierten Hepatozyten in der geschädigten Leber angesiedelt werden und unter dem Einfluß der frei werdenden Wachstumsfaktoren sollten sie proliferieren, so daß sie später gut zu detektieren sein sollten.

Weiterhin wurde über eine Gabe von KGF und/oder T3 berichtet. Da von KGF pro Tier etwa 25 µg gegeben werden müssten und bereits kleinste Mengen des rekombinanten Wachstumsfaktors sehr teuer sind, würde dies den finanziellen Rahmen des Projektes sprengen. T3 dagegen ist in größeren Mengen problemlos erhältlich, und für die folgenden Versuche wurde deshalb einen Tag vor Transplantation T3 injiziert, anschließend folgten 3 weitere Injektionen im Abstand von jeweils einer Woche, so daß die Proliferation der Leber über einen längeren Zeitraum angeregt wird.

Nachdem nun die Hepatozyten optimal kultiviert und die Empfängertiere optimal auf die Transplantation vorbereitet wurden, stellte sich die Frage nach der Transplantationstechnik. Eine Pfortaderinjektion, die die Hepatozyten direkt an ihr Ziel bringen würde, konnte aus den bereits bei der in vivo Gentherapie genannten Gründen nicht durchgeführt werden.

Aus vielen Vorversuchen, den besten Transplantationsort für Hepatozyten zu finden, waren die Milz und der intraperitoneale Raum als die besten Orte ausgewählt worden, von denen die transplantierten Hepatozyten weiter in die Leber wandern. Da von fast allen Arbeitsgruppen die Transplantation in die Milz favorisiert wird, wurde auch in den vorliegenden Versuchen die Transplantation in die Milz gewählt.

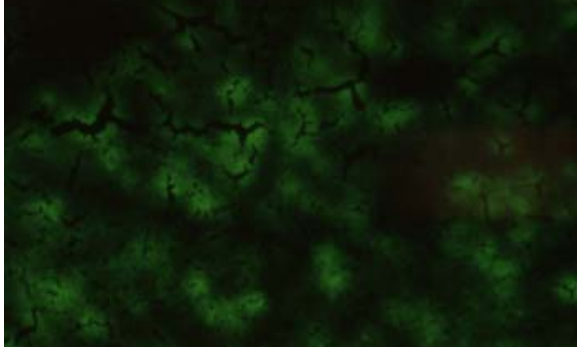
Ein letztes Problem stellte die Ablösung und Vereinzelung der sich in Kultur befindlichen Hepatozyten dar. Da die Hepatozyten auf einer Gelatin-Schicht kultiviert wurden, bildeten sich beim Ablösen mit Trypsin große Klumpen, die bei Injektion in jedem Fall einen Leberinfarkt hervorriefen. Es wurde jedoch eine Methode beschrieben, bei der die Hepatozyten in kalziumfreien PBS mit 0,1% EDTA für 15 min. bei Raumtemperatur angelöst, mit einem Zellschaber abgekratzt und schließlich durch Pipettieren mit einer 2 ml-Pipette vereinzelt werden. Da dies die schonendste Methode für die Hepatozyten darstellt, bei der die wenigsten Zellen absterben, wurde diese in allen folgenden Experimenten angewandt. Eine Verklumpung der Hepatozyten konnte aber sowohl diese Methode als auch die optimierte Injektion durch eine Hamilton-Spritze mit einer 26G-Nadel nicht verhindern.

Schließlich wurde die Hemihepatektomie erst am Tag nach der Transplantation durchgeführt, da die Hepatozyten etwa 20 Stunden benötigen, um von der Milz zur Leber zu gelangen. Auch minimiert diese Vorgehensweise das Narkoserisiko erheblich, da erst während der zweiten Operation Lebergewebe, das zum Abbau des Narkosemittels nötig ist, entfernt wird.

Hierbei wurde festgestellt, daß bei allen Tieren die Transplantation der Hepatozyten zu einem Leberinfarkt geführt hatte. Oft war mehr als die Hälfte des Lebergewebes farblos, weich und nekrotisiert. Aufgrund des schlechten Zustand des Gewebes konnten leider keine Kryoschnitte mehr angefertigt werden, in denen man vielleicht EGFP hätte detektieren können. Auch in der Milz der Tiere konnte kein EGFP nachgewiesen werden, so daß der geringe Erfolg der Gentherapie ex vivo wohl auf die Tatsache zurückgeführt werden muß, daß sich nur die wenigen vereinzelt Zellen in der Leber ansiedeln, die verklumpten Zellen jedoch vom Immunsystem beseitigt werden. Die EGFP-positiven Areale nach Transplantation von embryonalen Hepatozyten sind wesentlich kleiner (siehe Pfeil) als nach Transduktion der Leber mit Adenovirus. Aufgrund der schwächeren Expression bei Retroviren leuchten sie auch schwächer und sind aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Leber kaum vor der Umgebung auszumachen und können deshalb schlecht von

Artefakten abgegrenzt werden. Eine Beurteilung des Erfolges der Gentherapie ex vivo ist auf diese Weise nicht möglich.

## Adenovirus



## Retrovirus

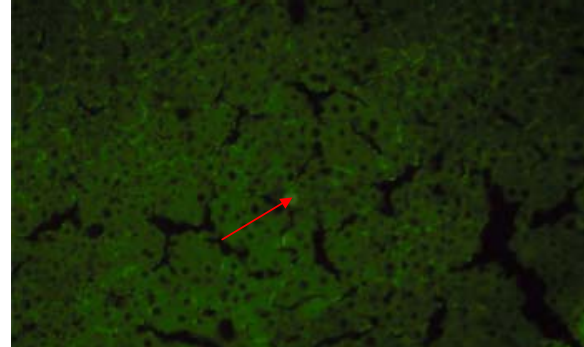


Abbildung 3.15: Leber nach Transduktion mit Adenovirus (2Tage) und nach Transplantation mit embryonalen Hepatozyten, die mit pLEIN transduziert wurden (24 Tage)

Ein Ursache für die geringe EGFP-Expression der retroviral transduzierten embryonalen Stammzellen könnte auch im sogenannten „silencing“ begründet liegen. Es ist bekannt, daß retrovirale regulatorische Elemente in vielen Zelltypen abgeschaltet werden, insbesondere in embryonalen Stammzellen. Es wäre also möglich, daß die embryonalen Hepatozyten in den ersten sieben Tagen in Kultur noch EGFP exprimieren, nach Transplantation der retrovirale Vektor in der Zeit bis zur Tötung der Tiere, die 24 bis 28 Tage beträgt, jedoch gesilenced wird. Aus diesem Grund wurde eine Langzeitkultur embryonaler Hepatozyten angelegt. Vier Wochen lang wurden embryonale Hepatozyten, die sowohl mit den Vektoren pLEIN als auch TA4 transduziert wurden, auf ihre EGFP-Expression hin kontrolliert. Es wäre außerdem möglich, daß der Vektor TA4, durch Doxycyclin-Gabe in diesen vier Wochen abgeschaltet, das silencing umgeht und später durch Doxycyclin-Entzug wieder aktiviert werden kann.

**pLein Tag 28      TA4 mit Dox Tag 28      TA4 ohne Dox Tag 28**

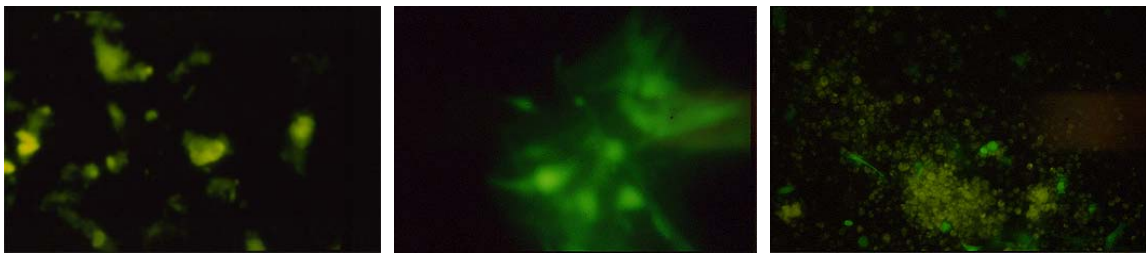


Abbildung 3.16: Langzeitkultur embryonaler Hepatozyten, transduziert mit pLEIN und TA4 nach 28 Tagen, bei TA4 ohne Dox wurde Doxycyclin seit einer Woche entzogen.

Tatsächlich wurde an Tag 28 nach Transduktion keine EGFP-Fluoreszenz in den embryonalen Hepatozyten, die mit pLEIN transduziert wurden, mehr festgestellt. Die Hepatozyten erscheinen durch ihre Autofluoreszenz nur noch gelb, nicht aber mehr in dem typischen EGFP-Grün (links).

Leider konnte die EGFP-Expression in embryonalen Hepatozyten durch Transduktion mit TA4 und späterem Doxycyclin-Entzug ebenfalls nicht wieder angeschaltet werden ( rechts).

Fibroblasten, die mit TA4 in Kultur ebenfalls transduziert wurden, wiesen dagegen sogar unter Doxycyclineinfluss stets eine EGFP-Fluoreszenz auf (Mitte).

Ein Verlauf des silencing lässt sich in der Langzeitkultur gut beobachten:

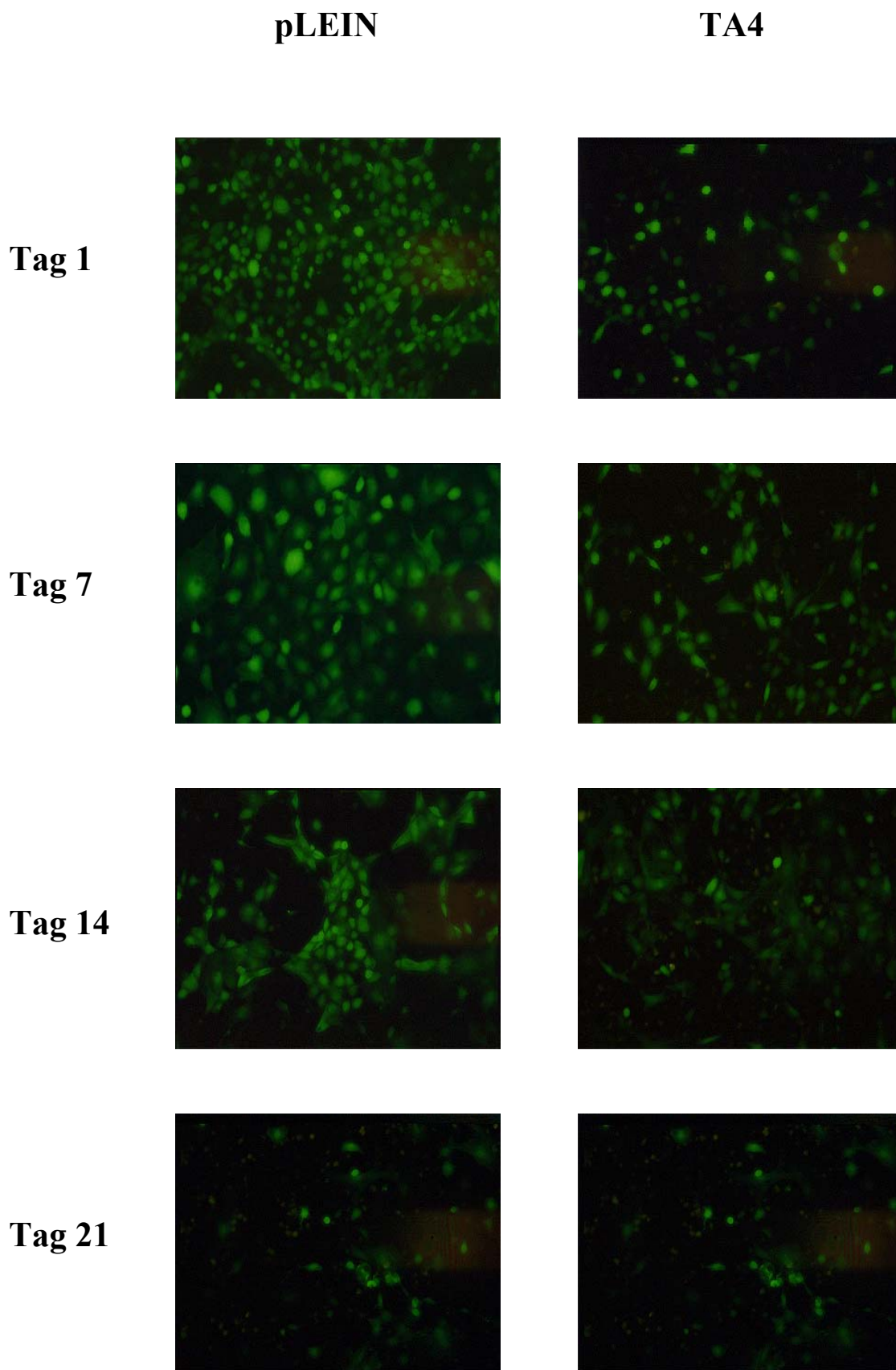


Abbildung 3.17: Langzeitkultur embryonaler Hepatozyten, transduziert mit pLEIN und TA4, bis Tag 21

Die hohe EGFP-Expression, die in Zellen, die mit pLEIN transduziert wurden, zunächst zu beobachten ist, nimmt offensichtlich zwischen Tag 14 und Tag 21 nach Transduktion erheblich ab. Embryonale Hepatozyten, die mit TA4 transduziert wurden, weisen auch unter Doxycyclineinfluß zunächst eine mittlere EGFP-Fluoreszenz auf, die analog zu mit pLEIN transduzierten Zellen abnimmt, sich durch Doxycyclinentzug aber auch nicht wieder anschalten lässt, wohingegen Fibroblasten, die mit TA4 transduziert wurden, auch unter Doxycyclineinfluß stets eine mittlere, nicht zu silencing EGFP-Fluoreszenz aufweisen.

Insgesamt läßt sich sagen, daß embryonale Hepatozyten sehr wohl retrovirale Vektoren silencen, was auch durch an- und abschaltbare Vektoren nicht umgangen werden kann. Außerdem ist der Vektor TA4, der in immortalisierten Zelllinien die beste Regulierbarkeit durch Doxycyclin zeigte, in Primärzelllinien kaum regulierbar.

### **3.6 Selektion von HSV-TK transduzierten Tumorzellen durch antiapoptotische Mediatoren**

Die Kontrolle des Wachstums und der Apoptose ist auch in malignen Tumoren nicht vollständig aufgehoben. Sowohl die Proliferation als auch die Apoptoserate sind in der Regel in soliden Tumoren erhöht. Es besteht jedoch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Zellproliferation. Die einzelnen Zellen konkurrieren hierbei um Wachstumsfaktoren, Angiogenese, Nährstoffe und Sauerstoff. Im Verlauf einer Tumorprogression setzen sich die bösartigsten Zellen durch und bilden den überwiegenden Anteil der Tumoren. Dieser Selektionsdruck auf die Tumorzellen wird durch therapeutische Maßnahmen (Chemotherapie, Strahlentherapie, etc.) verstärkt. Ziel eines neuen Ansatzes ist die klonale Selektion und Expansion von behandelbaren retroviral transduzierten Tumorzellen auf der theoretischen Grundlage der Mechanismen der Tumorprogression. In Vorversuchen wurden Expressionsplasmide verschiedener p53 Mutationen (220C, 249S und 249M), Bcl2, CrmA und dominant negatives FADD (dnFADD) in HepG2 Hepatomzellen transfiziert und eine Chemotherapie mit Adriamycin (2µg/ml) durchgeführt. Einen antiapoptotischen Effekt konnte bei diesen Vorversuchen nur durch die Transfektion von Bcl2, CrmA und dnFADD erkannt werden.

Aus diesem Grund wurden Bcl2, CrmA und dnFADD sowie ein Markergen (EGFP) als Kontrolle in einen MoMLV kloniert und es wurden anschließend transformierte embryonale Nierenzellen (293) und Kolonkarzinomzellen (HT29) retroviral transduziert. Durch eine 2-wöchige Selektion mit Neomycin wurden stabile Zelllinien gewonnen. Auch in diesen zeigte sich später eine protektive Wirkung der antiapoptotischen Mediatoren Bcl2, CrmA und dnFADD gegenüber einer Chemotherapie mit 5-FU. Unter einer Chemotherapie der HT29 Zellen mit Campto (CPT-11) zeigte dagegen nur dnFADD einen antiapoptotischen Effekt.

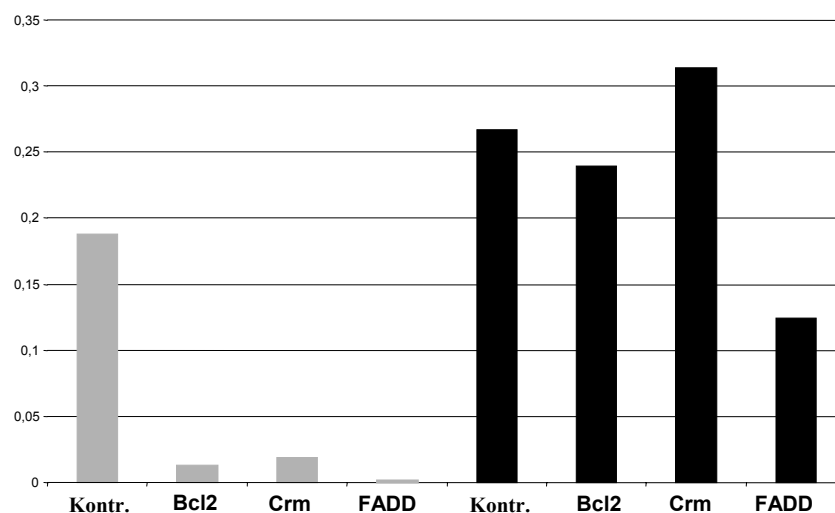


Abbildung 3.18: Histon Elisa zur Bestimmung der Apoptoserate von retroviral transduzierten und Neomycin-selektierten HT-29 Zellen nach einer Chemotherapie mit 5-FU (75 µg/ml über 24h) (graue Balken) oder Campto (0,1 µg/ml über 24h) (schwarze Balken). Vermittlung einer Chemotherapieresistenz durch die Transgene Bcl2, CrmA und dnFADD im Vergleich zur Kontrolle (EGFP).

Um die Selektion der retroviral transduzierten Tumorzellen in Zellkultur zu überprüfen, wurde die cDNA von dnFADD in pRetro-on einkloniert. Dafür wurde die Puromycinresistenz aus pRetro-on mittels ClaI und EcoRI ausgeschnitten und durch dnFADD, das mit den entsprechenden Schnittstellen in einem anderen Vektor vorlag, ersetzt. Weiterhin wurde der Vektor mit NotI (Schnittstelle liegt in der MCS) und XhoI verdaut, so daß das TO-Element aus pRetro-on wegfällt. Die kohesiven Enden

wurden mittels eines Klenow-fill-ins zu glatten Enden aufgefüllt und es wurde an dieser Stelle ein NotI-Linker eingefügt. Der entstandene Vektor wurde nun mit EcoRI und NotI geschnitten, so daß auch der SV40-Promotor und das rTA-Element aus pRetro-on wegfallen. Hier wurde die Einheit IRES-EGFP eingefügt, die in entsprechender Form in einem weiteren Vektor bereits vorlag. HSV-TK wurde mit Hilfe einer PCR und Primern, die für die entsprechenden Schnittstellen kodieren, aus einem anderen Vektor amplifiziert und statt EGFP in den vorliegenden Vektor inkloniert. Durch dieses dnFADD-IRES-EGFP (bzw. HSV-TK) Element wird eine verlässliche bicistronische Translation von dnFADD und EGFP (bzw. HSV-TK) erreicht.

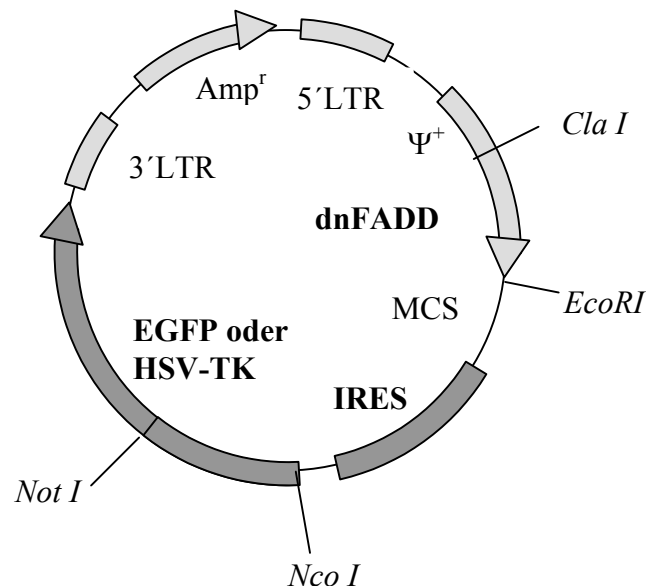


Abbildung 3.19: Plasmidaufbau des Retrovirus dnFADD-IRES-EGFP und dnFADD-IRES-HSV-TK

Es folgte eine Transduktion des Retrovirus dnFADD-IRES-EGFP in HepG2-Hepatomzellen und HT29-Kolonkarzinomzellen. Die Transduktionsrate lag bei beiden Zelllinien bei ca. 5%. Anschließend wurden die Zellen mit einer subletalen Dosis von 5-FU, CPT-11 oder Cisplatin behandelt und regelmäßig passagiert. Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine Anreicherung der dn-FADD transduzierten Zellen im Verlaufe der Therapie mit allen Chemotherapeutika, im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit pLEIN transduziert wurden.



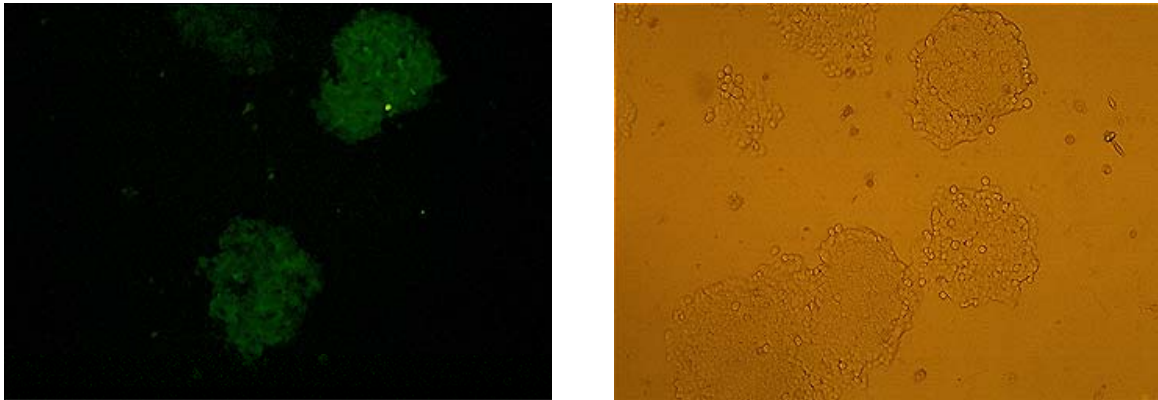


Abbildung 3.20: Anreicherung von Zellklonen, die mit dnFADD-EGFP transduziert sind, nach Chemotherapie mit CPT-11 ( 6,7 µg/ml über eine Woche)

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß eine chemotherapieinduzierte Selektion von Tumorzellen, die mit antiapoptotischen Mediatoren retroviral transduziert wurden, in Kultur möglich ist. Allerdings blieb immer ein gewisser Anteil an nicht transduzierten Zellen vorhanden.

Man weiß, daß eine Gentherapie mit HSV-TK / Ganciclovir den sogenannten „bystander-effekt“ ausübt. Hierunter versteht man, daß nicht nur die HSV-exprimierenden Zellen selbst, sondern auch nicht HSV-exprimierende Zellen in der Nachbarschaft durch die Gabe von Ganciclovir abgetötet werden. Dies hat zur Folge, daß nur eine ca. 30 – 50% Transduktionseffizienz für eine effektive HSV-TK / Ganciclovir Therapie notwendig ist.

Allerdings könnte ein antiapoptotischer Mediator wie dnFADD die Apoptose durch HSV-TK / Ganciclovir behindern und somit die Therapieresultate verschlechtern. Um den Effekt der Therapie zu überprüfen, wurden HepG2 und HT29 Zellen mit dem Retrovirus dnFADD-IRES-HSV-TK transduziert und anschließend mit Ganciclovir behandelt. Das Ergebnis zeigte, daß das neue Konzept der second line Gentherapie nach Chemotherapie-vermittelter Selektion von retroviral transduzierten Tumorzellen prinzipiell möglich ist.

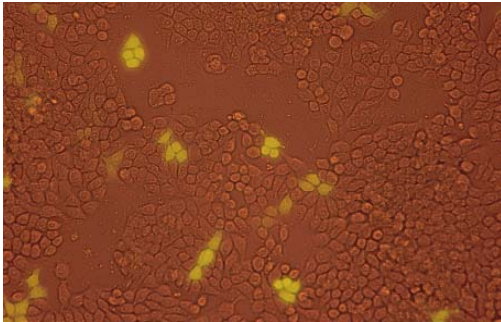
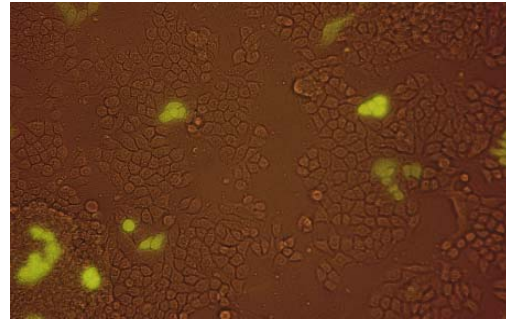
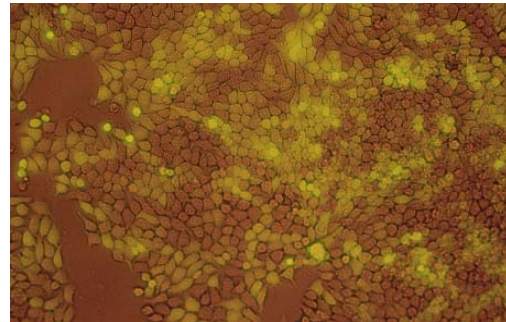
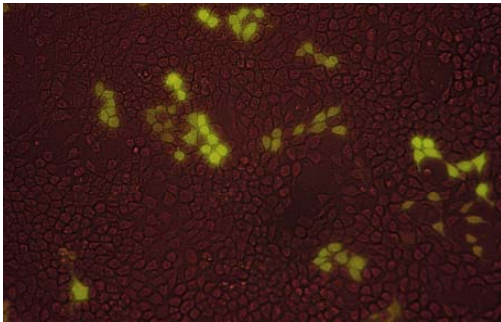
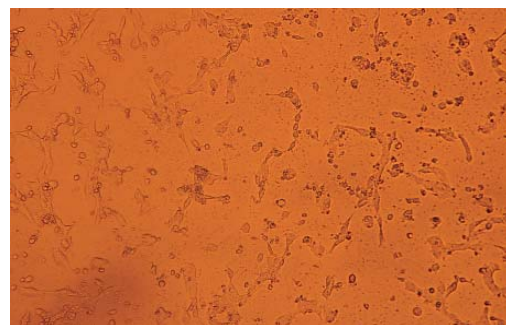
**pLEIN****dnFADD-EGFP bzw.  
dnFADD-HSV-TK****Chemotherapie: 0,3 mg/ml Cisplatin****1M Gangciclovir**

Abbildung 3.21: HT29 Zellen, transduziert mit pLEIN (EGFP) oder dnFADD-IRES-EGFP in Überlagerung von Fluoreszenzlicht und Durchlicht (oben) und nach Chemotherapie mit 0,3 mg/ml Cisplatin und Anreicherung von dnFADD (Mitte). Anschließend Behandlung von Zellen, transduziert mit EGFP oder dnFADD-IRES-HSV-TK nach Selektion durch Cisplatin, mit 1M Gangciclovir (unten). Komplette Apoptose der dnFADD-HSV-TK-transduzierten Zellen.

Die Abbildung zeigt die Selektion von dnFADD transduzierten HT29 Zellen während einer 3-wöchigen subletalen Chemotherapie mit Cisplatin und einer Selektionsphase mit Ganciclovir. Im Vergleich zu den Zellen, die mit pLEIN transduziert wurden, zeigt sich eine komplette Apoptose der Zellen, die mit dnFADD-IRES-HSV-TK transduziert wurden.

Um in weiteren Untersuchungen zu zeigen, ob dieses neue Therapieprinzip auch in Tumor-Mausmodellen in vivo möglich ist, wurden die selben Versuche zunächst noch einmal in McA-RH7777-Zellen, die syngen zu Buffalo-Ratten sind, durchgeführt.

Es wurden dabei folgende Konzentrationen an Chemotherapeutika gegeben:

- 5-Fluorouracil: 2,5 µg/ml
- Bleomycin: 0,6 µg/ml
- Cisplatin: 0,1 µg/ml
- Doxorubicin: 4 ng/ml

Die Chemotherapeutika wurden mit frischem Zellkulturmedium aufgegeben und 24 Stunden auf den Zellen belassen. In den nächsten drei Tagen wurden die Zellen täglich mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Insgesamt wurden 5 solcher Zyklen durchgeführt.

Aufgrund der hohen Autofluoreszenz dieser Zellen war eine einfache EGFP-Detektion wie bei den HT 29-Zellen jedoch nicht möglich, so daß aus den Zellen Proteinextrakte gewonnen wurden und im Western Blot auf dnFADD untersucht wurden.

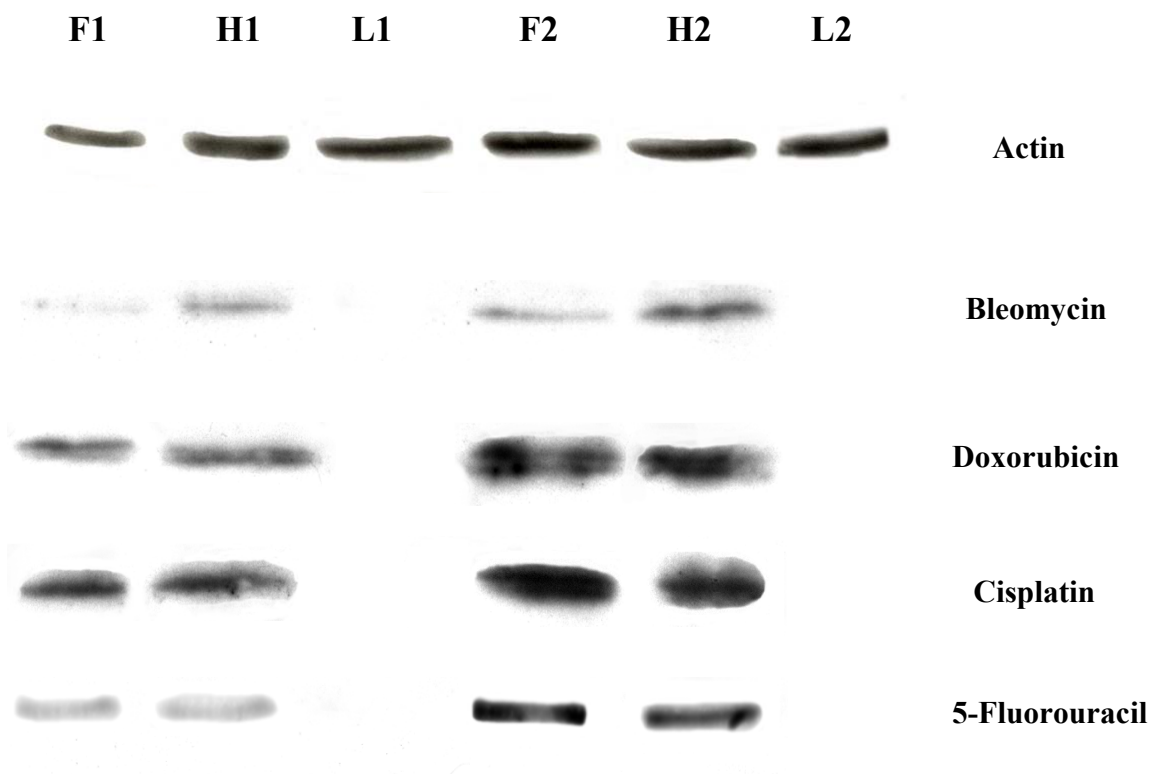


Abbildung 3.22: Western Blot auf dnFADD (oben zum Abgleich Actin) aus Zellextrakten von McA-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika.

1 = vor Chemotherapie, 2 = nach Chemotherapie, F = Zellen transduziert mit dnFADD, H = Zellen mit dnFADD-HSV-TK, L = Zellen mit pLEIN.

Leider konnte in den Hepatomzellen keine so eindeutige Selektion der mit dnFADD transduzierten Zellen wie in den Kolonkarzinomzellen erkannt werden. Offenbar sind viele der Hepatomzellen von Natur aus resistent gegen eine Chemotherapie und überleben, obwohl sie nicht mit dnFADD transduziert sind.

### **3.7 Verbesserung adenoviraler Transduktion der Leber durch retrovirale Expression von Faktoren der Leberregeneration und der Genregulation**

Unter allen bekannten Tumorsuppressorgenen nimmt p53 die herausragende Stellung ein, da in 50% aller menschlichen Neoplasien die p53-Funktion verlorengegangen ist. Aufgrund dieser Tatsache wird p53 eine besondere Rolle bei der Therapie von Tumoren zugeschrieben, indem durch seine Wiedereinführung in Tumorzellen deren Apoptose herbeigeführt wird.

Im Rahmen einer p53-Gentherapie wurden als Mittel zum Gentransfer zumeist Adenoviren benutzt. In Versuchen wurde jedoch eine effektive Transduktion von normalem Lebergewebe, nicht jedoch von Tumoren gezeigt. Ein erst kürzlich beschriebener Weg, die Transduktion von Zielgeweben zu verbessern, führt über das Strukturprotein VP22 aus Herpes simplex Typ 1 ( HSV-1). In der Arbeitsgruppe wurde ein Fusionsprotein aus p53 und VP22 in einen rekombinanten Adenovirus eingebracht und auf seine Fähigkeit zur interzellulären Ausbreitung in einer Hepatomzelllinie untersucht. Weitere Versuche sollten zeigen, ob die Wirkung des Fusionsproteins durch verschiedene Faktoren der Leber, die eine Rolle bei der Leberregeneration oder in der hepatischen Genregulation spielen, noch unterstützt werden kann. Die leberspezifische Genexpression wird durch eine Reihe von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren reguliert. Eine Gruppe davon bilden die Proteine der C/EBP-Familie, welche die Zelldifferenzierung der Leberzelle steuern, eine andere Gruppe bilden die Proteine der HNF (hepatic nuclear factor)-Familie, die die metabolische Leistung und die Strukturbildung der Hepatozyten regeln. HGF stellt bei dem Vorgang der Leberregeneration das wirksamste Mitogen für Hepatozyten dar und entfaltet seine Wirkung durch Bindung an seinen Rezeptor in den Zellmembranen der Hepatozyten, c-met. Insgesamt sollten die Faktoren C/EBP  $\alpha$  und  $\beta$ , HGF und c-met sowie HNF-4 $\alpha$  in einen Retrovirus kloniert werden, mit dem Adenovirus pp53-VP22 kotransfiziert werden und die folgende interzelluläre Ausbreitung beobachtet werden. Als backbone bot sich der Vektor pLEIN an, aus dem durch Verdau mit EcoRI EGFP entfernt werden konnte und der so zu dem Vektor pLXIN wurde. In die entstandene EcoRI-Schnittstelle konnten dann die Faktoren einkloniert werden.

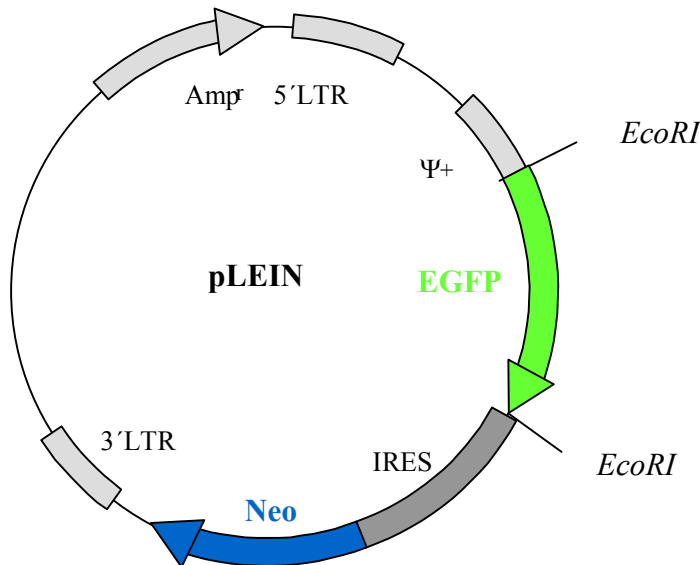


Abbildung 3.23: Vektor pLEIN, später Substitution von EGFP durch die Faktoren

Die Faktoren lagen in anderen Vektoren bereits flankiert von EcoRI-Schnittstellen vor, nur bei C/EBP  $\beta$  musste eine HindIII-Schnittstelle durch Klenow-fill-in entfernt und durch Einsatz eines Linkers eine EcoRI-Schnittstelle generiert werden.

Zur Ermittlung der Orientierung in entstandenen Klonen wurden in dem backbone eine Apal-Schnittstelle 100bp nach EcoRI, eine HindIII-Schnittstelle 200 bp nach EcoRI und eine DraIII-Schnittstelle 300 bp nach EcoRI genutzt sowie eine NcoI-Schnittstelle in C/EBP  $\beta$  (teilt 0,4 zu 1,1 kbp), eine HindIII-Schnittstelle in HNF-4 $\alpha$  (teilt 2,4 zu 0,4 kbp), eine Apal-Schnittstelle in c-met (teilt 0,9 zu 0,4 kbp), eine HincII-Schnittstelle in HGF (teilt 0,35 zu 1,05 kbp) und eine ClaI-Schnittstelle in C/EBP  $\alpha$  (teilt 2 zu 0,15 kbp). Klone, in denen das Konstrukt in *sense*-Orientierung vorlag, wurden im Western Blot auf die Expressionstärke überprüft, der jeweils beste Klon wurde im nächsten Experiment verwendet.

HepG2-Zellen wurden sowohl mit einem *lacZ*-Expressionsvektor als auch mit einem der retroviralen Konstrukte bzw. dem Leervektor pBS kotransfiziert. Drei Tage später wurden die Zellen zu einem Teil mit p53-VP22-Adenovirus, zu einem anderen Teil mit GFP-Adenovirus und zum letzten Teil mit 0,9% Natriumchlorid (saline) „mock“-infiziert. Sollte die Sensitivität der Zellen gegenüber p53 durch die Leberfaktoren verstärkt werden, so müssten entsprechend mehr Zellen in die Apoptose übergehen und wiederum nach *lacZ*-Färbung weniger blaue Zellen pro Schale vorhanden sein.

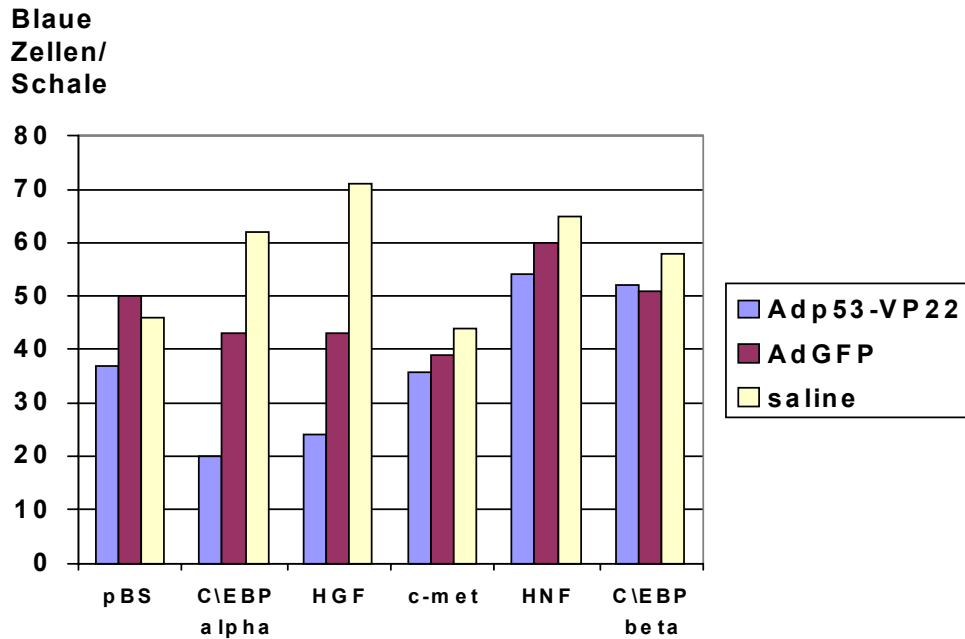


Abbildung 3.24: Blaue Zellen je Schale nach Behandlung mit verschiedenen Leberfaktoren

	pBS	C/EBP alpha	HGF	c-met	HNF	C/EBP beta
Adp53-VP22	37	20	24	36	54	52
AdGFP	50	43	43	39	60	51
saline	45,9	62	71	43,9	65	58

Die Tabelle stellt noch einmal die genauen Werte dar. Die Zellen, die statt mit Adenovirus p53-VP22 oder GFP mit 0,9% Natriumchlorid (saline) infiziert wurden, zeigen in der jeweiligen Versuchsgruppe die maximale Zahl an überlebenden Zellen an (gelber Balken). Warum diese Zahl bei Infektion mit dem Leervektor pBS niedriger liegt als die Zahl der Zellen nach Infektion mit Adenovirus GFP, dürfte auf einen Zufall zurückzuführen sein. Die Zellen, die mit Adenovirus GFP infiziert wurden, zeigen in der jeweiligen Gruppe die Zahl der Zellen an, die trotz des Vorhandenseins eines Adenovirus überlebt haben (roter Balken), sind also ein Maß für die Virustoxizität. Wie erwartet liegt diese Zellzahl stets höher als die Zellzahl nach Infektion mit p53-VP22. Der Unterschied zwischen dieser Zellzahl und der Zellzahl nach Behandlung mit p53-VP22 (blauer Balken) muß schließlich zur Beurteilung des Experiments herangezogen werden. Die Zellen, die durch Behandlung mit p53-VP22 allein überleben, zeigen sich im Versuch mit dem Leervektor pBS .

## 4. Diskussion

### 4.1 Gentransfersysteme: Vorteile und Schwächen

Unter dem Begriff „Gentherapie“ versteht man prinzipiell den Transfer von Genen in eine Zelle. Für diesen Transport müssen die therapeutischen Gene verpackt werden, so daß sie in die Zellen eindringen und dort abgelesen werden können. Hierbei unterscheidet man virale Verpackungssysteme von nicht viralen Transfertechniken. Die viralen Transfertechniken sind bisher in ihrer Effizienz den nicht viralen Gentransfermethoden deutlich überlegen, da sie die evolutionäre Anpassung der verwendeten Viren nutzen. Allerdings ist das theoretische Gefahrenpotential der viralen Vektoren deutlich größer. Zur viralen Transduktion von Hepatozyten im Rahmen von gentherapeutischen Strategien stehen zur Zeit folgende virale Vektoren zur Verfügung: die Adenoviren Typ 2 oder 5, die Retroviren Moloney Murine Leucemia Virus und Lentiviren, Adeno-assoziierte Viren, SV-40 Viren, Baculoviren und Herpes Simplex Viren. Während das MoMLV prinzipiell nur Zellen transduzieren kann, die sich in einer Zellteilung befinden, können Lentiviren ihr genetisches Material auch zum Teil in ruhende Zellen integrieren. Allerdings konnte gezeigt werden, daß bei Hepatozyten auch im Zusammenhang mit einer Infektion durch Lentiviren eine Zellreplikation zur Integration des viralen Genmaterials notwendig ist. Lentiviren scheinen somit in der hepatischen Gentherapie keine prinzipiellen Vorteile gegenüber MoMLV zu besitzen. Trotz aller Vorteile weisen die viralen Gentransfersysteme jedoch auch einige Schwächen auf.

#### 4.1.1 Retroviren als Gentransfersysteme

Retroviren gehören zu den ersten Vektoren, die für gentherapeutische Eingriffe entwickelt wurden. Die stabile Integration in das Wirtsgenom macht sie nach wie vor zu sehr attraktiven Werkzeugen, vor allem für die somatische Gentherapie. Nichtsdestotrotz muß auch auf die Gefahr bei der Verwendung retroviraler Vektoren aufmerksam gemacht werden: Da sie völlig zufällig in das Wirtsgenom integrieren, könnten sie nicht nur durch ihren Promotor *downstream* liegende Onkogene aktivieren, sondern sie könnten auch Gene zerstören, indem die diese durch ihre Integration zerreißen. Lediglich retrovirale Vektoren, die nur an bestimmten Stellen



im Genom integrieren können, sind über solche Zweifel erhaben. Und werden die Zukunft der retroviralen Gentherapie bilden.

#### **4.1.2 Regulation der Genexpression in Retroviren**

Soll ein defektes Gen im Rahmen einer somatischen Gentherapie einer Erberkrankung ersetzt werden, so stellt nicht nur der reine Gentransfer ein großes Problem dar. Auch die physiologische Regulation des Genproduktes sowie die Dauer der Genexpression sind weitere noch unbefriedigend gelöste Probleme.

Der LTR Promotor der Retroviren ist konstitutionell sehr aktiv. Oft werden jedoch im Rahmen von gentherapeutischen Interventionen unterschiedliche Mengen des gewünschten Proteins zu unterschiedlichen Zeitpunkten benötigt. Ein Problem der hepatischen Gentherapie ist daher die Regulation der Expression des heterologen Gens. Zur Lösung dieses Problems kann man zum einen auf physiologische Promotoren zurückgreifen, die im Rahmen der normalen Zellphysiologie reguliert werden. Der Nachteil dieser Promotoren ist jedoch, daß sie in der Regel sehr schwach sind und nach einer Transduktion einer geringen Fraktion von Hepatozyten keine ausreichenden Mengen an Protein für den Organismus generieren können.

#### **4.1.3 Das Tet-System**

Eine andere Möglichkeit ergibt sich durch externe Regulation der Genexpression, z.B. durch das Tet-System, das von Gossen und Bujard entwickelt und von Paulus vereinfacht wurde. In diesem System kann die Expression eines Gens durch die Gabe bzw. den Entzug von Doxycyclin reguliert werden. In der Arbeitsgruppe wurde dieses Vektorsystem zur Anwendung in einer hochdifferenzierten humanen Hepatomzelllinie optimiert, nachdem bei der Selektion des ersten gut zu regulierenden Vektors mit sehr niedriger Basalexpression und späterer großer Expressionssteigerung erhebliche Schwierigkeiten auftraten. Shockett, Gallia und Khalili [97,98] konnten nämlich zeigen, daß eine Hochregulation von tTA in den Zellen morphologische Veränderungen, eine Wachstumsverzögerung und Veränderungen im Zellzyklus hervorriefen. Kelleher und Berger [99,100] wiederum konnten zeigen, daß die Überexpression von VP16, einem der potentesten Transaktivatoren und Bestandteil des tTA, von Zellen nicht toleriert wird, da Überexpression von Transkriptionsfaktoren in Zellen das sogenannte „Squelching“ und damit einen Wachstumsstop auslöst [101].

In den vorliegenden Vektor pTOITA wurden verschiedene Varianten der Transaktivator-domäne von VP16 eingebaut, bei denen der VP16-Anteil des tTA auf ein Minimum zu reduzieren war, um mögliche Ziele für Interaktionen mit zellulären Faktoren zu umgehen. Nachdem die minimale Aktivierungsdomäne von VP16 durch Seipel als die Aminosäuren 435 bis 447 mit der Sequenz PADALDDFDLDM identifiziert worden waren, wurde postuliert, daß eine Wiederholung dieser minimalen Sequenz eine stark aktivierende Eigenschaft aufweisen würde. So soll die Verdopplung dieser Sequenz einen Anstieg der Aktivierbarkeit von 1% auf 90% verursachen [102]. Obwohl für die Aktivierbarkeit das Vorhandensein von hydrophoben und sauren Aminosäuren wie Asparaginsäure (D) in der Sequenz von Vorteil zu sein scheint, scheint bei einem Austausch des Phenylalanins (F) durch die hydrophileren Aminosäuren Tyrosin (Y) und Glycin (G) kein Nachteil zu entstehen. Es wird vermutet, daß Phenylalanin an Position 442 nicht nur eine Rolle bei der Transaktivierung spielt, sondern auch eine strukturelle Rolle. Diese kann durch Tyrosin wohl übernommen werden, durch Glycin aber wohl kaum. Es existiert weiterhin die Vermutung, daß eine einzelne Sequenz sehr wohl genug ist, um eine Transaktivierung hervorzurufen, sich diese jedoch in einem bestimmten Abstand von der DNA-Bindungsdomäne befinden muß. Insofern scheint eine Sequenz zwischen DNA-Bindungsdomäne und tatsächlicher Transaktivatorsequenz vonnöten zu sein, um eine Transaktivierung zu gewährleisten. Interessanterweise wird die Transaktivierung verbessert, wenn nach dieser zweiten Sequenz entweder gar nichts mehr folgt – TA3 besitzt nur zwei Sequenzen, TA2 dagegen drei – oder an dieser Stelle eine mutierte Sequenz mit Austausch des Phenylalanins durch Tyrosin erfolgt, wie es bei TA4 der Fall ist.

#### **4.1.4 Problemstellungen in der retroviralen Gentherapie: Virustiter**

Mit den gängigen Packungszellen können nur Titer des MoMLV von bis zu  $10^6$  IU/ml hergestellt werden, da Retroviren im Gegensatz zu adenoviralen Vektoren instabiler sind und durch eine Ultrazentrifugation, die der Aufkonzentrierung dient, zerstört werden [103]. Für die meisten Anwendungen wird jedoch ein wesentlich höherer Virustiter, etwa  $10^8$  IU/ml, benötigt. Besonders im Tierversuch erlauben die geringen Titer der Retroviren in der Regel nur eine direkte Injektion der Vektoren in bestimmte Tumorherde in vivo. Selbst hierdurch wurden aber bisher nur relativ geringe Transduktionsraten erreicht. Eine systemische Applikation, wie man sie für

eine effektive Tumorthherapie fordern muß, führte bislang nur zu verschwindend geringen Transduktionsraten unter 1%. Bislang liegen noch keine Lösungskonzepte vor, die eine selektive und effektive Transduktion von retroviralen Vektoren in Tumoren nach systemischer Applikation erhoffen lassen.

Durch den Austausch des retroviralen *env*-Proteins durch das G-Protein des *vesicular stomatitis virus* (VSV) [104] kann man zum einen eine weitgehend zelltypunabhängige (pantrope) Aufnahme der Viren in Zellen erreichen, da der Rezeptor des VSV-G-Proteins in fast allen höheren eukaryotischen Zellen exprimiert wird [105], und zum anderen gewinnt man die Möglichkeit, diese pseudotypisierten Viren durch eine Ultrazentrifugation und Sedimentation stark zu konzentrieren, da die Verpackung des Virus mit VSV-G wesentlich stabiler ist. Dabei soll keine Infektivität verloren gehen, es wird beschrieben, daß mit diesen pseudotypisierten Viren ein Virustiter bis zu  $10^9$  IU/ml erreicht werden kann [106].

Eine große Schwierigkeit stellte jedoch die Resuspension des nach Ultrazentrifugation erhaltenen Pellets dar. Obwohl es - wie in der Literatur beschrieben [107] – über Nacht behandelt wurde, ließ es sich am nächsten Tag nur schlecht resuspendieren. Eine Verklumpung der Viren könnte die darauf folgenden schlechten Transduktionsergebnisse erklären. Weiterhin berichteten andere Autoren darüber, daß sie mit amphotropen Retroviren *in vivo* wesentlich bessere Ergebnisse erzielten als mit pseudotypisierten Viren [108].

Weiterhin wird die Ultrafiltration als eine geeignete Methode beschrieben, um eine weitere Konzentrierung der Viren zu erreichen [109]. Bei der Erprobung dieser Methode zeigte sich, daß Viren, die zuvor durch Ultrafiltration aufkonzentriert wurden, später die höchste Transduktionsrate erzielten, und somit offenbar den höchsten Virustiter liefern.

#### **4.1.5 Problemstellungen in der retroviralen Gentherapie:**

##### **Transduktionseffizienz**

Es wird vermutet, daß Polykationen wie Polybren die elektrostatische Abstoßung zwischen Virion und Zellmembran neutralisieren, so die Adsorption erleichtern und damit die Transduktionsrate um das 10fache erhöhen [110,111].

Einige Autoren halten kationische Liposomen wie DOPE oder DOGS, aus der DNA-Technologie wohlbekannt, für die geeigneten Reagentien, um die Kinetik der Transduktion steuern zu können [112]. Es wurde bereits gezeigt, daß kationische

Liposomen die Infektivität des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) erhöhen können [113,114]. Lipofectin und Lipofectamin, Mischungen der kationischen Liposomen DOTMA bzw. DOSPA mit DOPE, erhöhen die Infektivität von Rotaviren [115] und dem Hepatitis-D-Virus [116] und sollen auch die Transduktion von Zellen mit MoMLV/Polybren um das 100fache erhöhen [117]. So wurde auch über das kationische Lipid DOGS berichtet [118], das im Gegensatz zu dem bekannten Polykation Polybren eine minimale Zytotoxizität aufweist und den Virustiter bereits ohne Konzentration auf  $1 \times 10^8$  IU/ml anheben soll, mit einer Konzentration durch Ultrafiltration sogar auf  $5 \times 10^8$  IU/ml.

Eine signifikante Verbesserung der Transduktionsrate durch DOGS, die ja das 100fache betragen sollte, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da von Themis [118] gezeigt wurde, daß sowohl die Verwendung von DOGS als auch die Ultrafiltration die Transduktionsrate theoretisch um das 10fache steigern und die Ultrafiltration bereits im vorliegenden Versuchsansatz sehr gute Erfolge gezeigt hatte, wurde auf die Verwendung von DOGS im Folgenden verzichtet. Die Verbesserung durch die erwähnte Ultrafiltration erwies sich zudem als besonders wertvoll, da sie zum einen das Virusvolumen auf das 10fache senkte, was besonders für die Tierversuche von Bedeutung war.

## 4.2 Verschiedene Wege der Gentherapie

Man unterscheidet zwischen der Gentherapie *ex vivo*, bei der Zellen außerhalb des Körpers transformiert, vermehrt und dem Patienten wieder zurückgegeben werden, und der Gentherapie *in vivo*, bei der der Patient direkt mit genetischem Material behandelt wird.

### 4.2.1 *in vivo* Gentherapie

Der Gebrauch von Retroviren in der somatischen Gentherapie ist limitiert, da für die Integration des proviralen Genoms in das Genom der Wirtszelle eine stattfindende DNA-Synthese, also eine Mitose notwendig ist [119-121]. Ruhende oder terminal differenzierte Zellen wie z.B. Hepatozyten, werden nicht von retroviralen Vektoren infiziert [122-123].

Aus diesem Grund müssen für eine Gentherapie *in vivo* zuerst die Hepatozyten des Empfängers zur Proliferation angeregt werden. Dies kann durch eine Hemihepatektomie geschehen, die die hepatozelluläre Regeneration so anregt, daß

sich jeder Hepatozyt ein- bis zweimal teilt [124,125]. Weiterhin kann die Leberregeneration in Ratten durch die Gabe verschiedener Toxine wie 2-Acetaminofluoren [127-128], D-Galactosamin [129, 130] oder Ethionin [131,132] angeregt werden. In Mausmodellen konnte auch durch die Gabe von leberschädigenden Substanzen oder durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie HGF, Triiodthyronin (T3) oder KGF eine hepatische Zellproliferation und effiziente Transduktion mit MoMLV ohne einen operativen Eingriff erzielt werden. In Mäusen wurde besonders das alkylierende Reagenz Dipin mit Erfolg eingesetzt [133-135]. Die Gabe von Dipin wäre als nicht-invasive Methode der Hemihepatektomie vorzuziehen, da Dipin kommerziell jedoch nicht erworben werden konnte, wurde zur Anregung der Hepatozytenproliferation in den Versuchsmäusen 24 Stunden vor Gabe der Retroviren eine Hemihepatektomie durchgeführt.

Einen limitierenden Faktor der Gentherapie in vivo im Experimentalstadium stellte die geringe Größe der Versuchstiere dar, die viele der in der Literatur angegebenen und auch erfolgreichen Methoden nicht zur Anwendung kommen ließen. Da eine systemische Gabe der Retroviren durch die Schwanzvene aufgrund fehlender hepatischer Affinität der Retroviren nicht zu einer Lebertransduktion führen würde, sind viele Methoden beschrieben worden, um den retroviralen Vektor direkt in die Leber zu befördern. Ein Beispiel ist die blutlose Perfusion der Leber, bei der durch Unterbrechung der Blutzufuhr zuerst das Blut aus der Leber herausfließt, dann durch eine Injektion in die Pfortader die Leber mit der Retroviruslösung durchspült wird und außerdem der Abfluß aus der Leber unterbunden wird, so daß die Leber quasi in der Viruslösung „badet“ [136,137]. Diese Methode ist jedoch aufgrund der Größe der Pfortader technisch aufwendig und meist auf Ratten beschränkt. Außerdem sind die Tiere aufgrund der langen Operationsdauer (>20 min.) und der peritonealen Reizung einem großen Stress ausgesetzt, was zu einer hohen Mortalitätsrate von über 70% führt.

Neben operationstechnischen Schwierigkeiten könnte dies auf mehrere Gründe zurückgeführt werden:

- Die Tiere wurden bereits 24 Stunden zuvor hemihepatektomiert. Zum einen könnte sich das Narkosemittel des vorigen Tages im Fett der Tiere abgelagert haben und zusammen mit der erneuten Gabe von Narkosemittel zu einer tödlichen Dosis akkumuliert haben. Zum anderen könnte die verbliebene Leber nicht genug Kapazität zum Abbau des Narkosemittels besitzen.

- Das Volumen der Viruslösung war zu groß und löste einen hypervolämischen Schock aus. Auch könnte die Viruslösung zu kalt gewesen sein, da sie nach Ultrazentrifugation eine Temperatur von 4°C besitzt.
- Durch die Ultrafiltration reichern sich im Retentat nicht nur die Retroviren, sondern auch größere Proteine aus dem Zellkulturmedium wie z.B. Albumin an. Dies könnte bei direkter Gabe zu einer Unverträglichkeitsreaktion führen.

Aus diesen Gründen wurden die Retroviren im Folgenden über das Parenchym der Milz gegeben. Dieser Eingriff ist technisch einfach zu bewerkstelligen, erfordert wesentlich weniger Zeitaufwand, reduziert damit die Menge des Narkosemittels und die damit verbundenen Risiken und führt sowohl in Volumen als auch in Temperatur kaum zu peritonealen Reizungen. Aber auch diese Vorgehensweise führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg.

Über eine niedrige Transduktionsrate selbst sich teilender Zellen mit Retroviren in vivo wurde allerdings bereits mehrfach berichtet [138,139]. Mit den üblichen retroviralen Vektoren wurde eine Transduktion von nur 0,3-1% der Leber erreicht. Da die Leber bei der Detektionswellenlänge des EGFP außerdem eine starke Autofluoreszenz besitzt, wäre es nicht verwunderlich, wenn die EGFP-Fluoreszenz überdeckt würde.

Alle in vivo Gentransfer-Versuche aus der Literatur lieferten mit Ratten die wesentlich besseren Ergebnisse, und bei Mäusen wurden chirurgische Techniken angewandt, die hier nicht nachvollzogen werden konnten [140], so daß schließlich nur noch eine Möglichkeit zur Gentherapie in vivo bestand: Nur durch eine Nachselektion mit dem anti-Fas-Antikörper JO2 in vivo konnte nach schwacher Transduktion mit einem retroviralen Vektor, der für dnFADD kodiert, ein Nachweis der Transduktion in vivo erbracht werden. Mit dnFADD transduzierte Zellen überleben eine Behandlung mit JO2 und proliferieren im Rahmen der Leberregeneration in den folgenden 4-6 Tagen massiv [141]. Nach mehreren Zyklen der JO2-Behandlung sollte also die Zahl der retroviral transduzierten Zellen in der Leber angestiegen sein, was die Detektion vereinfachen sollte.

Tatsächlich konnte auf diese Weise eine Transduktion der Leber in vivo nachgewiesen werden, auch über in vivo Erfolge wurde berichtet [142]. Da aber für die meisten Vektoren keine Möglichkeit zur Nachselektion in vivo besteht, musste für weitere Versuche auf eine andere Strategie ausgewichen werden.

### 4.2.2 ex vivo Gentherapie

Als Alternative der „in vivo“ Transduktion bietet sich die „ex vivo“ Infektion von Hepatozyten oder embryonalen Hepatozyten mit anschließender Zelltransplantation an. Vor dem Hintergrund der Therapiesicherheit und der neuen Erkenntnisse über die Möglichkeiten der Repopulation der Leber durch eine Hepatozytentransplantation, gewinnt diese „ex vivo“ Transduktion immer mehr an Bedeutung.

Eine Hepatozytentransplantation stellt bei Lebererkrankungen mit und ohne der Notwendigkeit zur genetischen Korrektur gegenüber der Lebertransplantation im Hinblick auf den Mangel an gesunden Spenderorganen einen großen Fortschritt dar. Native Hepatozyten haben die Fähigkeit, kranke Lebern zu repopulieren, in denen sie große selektionale Vorteile haben [143]. Nach einer Größenbestimmung von Knoten, die aus einem einzelnen transplantierten Hepatozyten entstanden, konnte geschlossen werden, daß sich ein transplantiertes Hepatozyt etwa 20 Mal teilt [144]. In urokinase-plasminogen-activator (uPa) transgenen Mäusen konnte auf diese Weise eine Repopulation der kranken Leber von 80% durch transplantierte Hepatozyten, die zunächst nur 1% der Lebermasse bildeten, nachgewiesen werden [145]. Allerdings wurde auch gezeigt, daß die Repopulation wesentlich ineffektiver verläuft, wenn die Hepatozyten in eine Leber nach akutem Leberversagen transplantiert wurden. Man nimmt an, daß in diesem Fall der Aufbau eines normalen Leberparenchyms für die transplantierten Hepatozyten zu lange dauert und sich diese deswegen schlecht in der Leber ansiedeln können [146].

Über eine erfolgreiche hepatische Gentherapie ex vivo wurde schon mehrfach berichtet [147-150], obwohl diese arbeitsintensiver ist und höhere Risiken trägt als die Gentherapie in vivo.

Für die hepatische Gentherapie in vivo wurden embryonale hepatische Stammzellen verwandt, da diese im Gegensatz zu adulten hepatischen Zellen ein wesentlich höheres regeneratives Potential aufweisen und so auch durch Retroviren leichter zu infizieren sein sollten.

Embryonale und fetale hepatische Stammzellen können isoliert und kultiviert werden [151] und differenzieren unter dem Einfluß geeigneter Mediatoren in vitro zu hepatischen Vorläuferzellen [152]. Weiterhin wurde über eine Differenzierung fetaler Hepatozyten in Zellen mit biliären und hepatischen Phenotyp nach Transplantation im Empfänger berichtet [153,154].

In den vorliegenden Versuchen gelang es nach einigen Vorversuchen, embryonale Hepatozyten in vitro optimal zu transduzieren. Es existieren zahlreiche Berichte über die optimalen Wachstums- und Transduktionsbedingungen der embryonalen Hepatozyten. Die optimale Dichte bei Aussaat der Hepatozyten beträgt nach Soriano  $3 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm-Schale [155], was in etwa der Menge von drei embryonalen Lebern entspricht. Weiterhin wachsen embryonale Hepatozyten in Schalen, die mit Gelatine oder Collagen beschichtet wurden, wesentlich besser (Information Dr. Ott). Der optimale Zeitpunkt zur Infektion soll nach Soriano bei 23 Stunden nach Aussaat liegen und die Transduktionsrate 30% betragen, nach Andreoletti liegt der Zeitpunkt bei 48-60 Stunden und die Rate bei 90% [156], nach Koch können die Hepatozyten im Zeitrahmen von 48 bis 72 Stunden optimal transduziert werden [157].

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Kultur embryonaler Hepatozyten ist der Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium. Weber [158] benutzt ein hormonell exakt definiertes Wachstumsmedium, in dem EGF und Insulin (alternativ: Insulin-Transferrin-Supplement [159] ) zusammen die mitotische Aktivität der Hepatozyten steigern. Weiterhin wurde ein Teil des Serums durch Albumin ersetzt, da die Abwesenheit von Serum und die Anwesenheit von Dexamethason das Wachstum mitgeschleppter nichtparenchymaler Zellen begrenzt [160]. In diesen Versuchen wurde die Transduktion um das 10fache gesteigert.

Auch die Empfängertiere wurden auf eine optimierte Weise auf die Transplantation vorbereitet: Da Gao berichtete, daß eine intramuskuläre Injektion eines Adenovirus, der HGF exprimiert, die retrovirale Transduktion verbessert, könnte auf diese Weise in nur einem Schritt auch der adenovirale Leberschaden gesetzt werden [161]. Von dem HGF-Adenovirus ( eine freundliche Gabe von F. Balter, Nantes) wurden in einige Mäuse  $2 \times 10^{12}$  IU in 200 µl in die Beinmuskeln injiziert. Da diese Injektion für die Tiere jedoch sehr schmerzhaft zu sein schien und oft eine Lähmung der hinteren Extremitäten auftrat, wurde von diesem Versuchsvorhaben zurückgetreten.

Forbes berichtete dagegen, daß eine subkutane Gabe von 1 mg/kg KGF (keratinocyte growth factor) und 4 mg/kg des Schilddrüsenhormons T3 (Triiodthyronin) 24 Stunden nach Administration die Proliferation der Hepatozyten auf das 40fache steigert [162]. Die Gabe von KGF bzw. T3 allein soll die Proliferation dagegen nur auf das 10fache steigern.



Dabeva injiziert T3 allein, jedoch nicht nur einen Tag vor Transplantation, sondern gibt anschließend 3 weitere Injektionen im Abstand von jeweils einer Woche, so daß die Proliferation der Leber über einen längeren Zeitraum angeregt wird [163]. Diese Methode wurde für die folgenden Versuche gewählt.

Auch für die Operationsmethode bestehen verschiedene Ansätze:

Velde [164] stellte drei verschiedene Methoden für die Transplantation von Hepatozyten vor:

- Transplantation der Hepatozyten in die Milz (Hepatisierung der Milz)
- intraperitoneale Transplantation von Hepatozyten mit Mikrocarriern
- intraperitoneale Transplantation von umhüllten Hepatozyten

Die Milz und der intraperitoneale Raum waren stets als die besten Orte ausgewählt worden [165,166], von denen die transplantierten Hepatozyten weiter in die Leber wandern. Nachteile der Transplantation von Hepatozyten in die Milz sind der geringe Raum, der zur Verfügung steht, um das Transplantatvolumen aufzunehmen sowie die Gefahr der Klumpenbildung der transplantierten Hepatozyten und das Eindringen dieser Klumpen in die Blutzirkulation, die zu Embolien in Leber und Lunge führen können [167]. Im peritonealen Raum steht dagegen genügend Platz zur Verfügung, um das Transplantatvolumen aufzunehmen, allerdings ist hier die Lebensdauer eines Hepatozyten im Gegensatz zur Milz wesentlich verkürzt. Demetriou verlängerte die Überlebensdauer von transplantierten Hepatozyten im peritonealen Raum, indem er sie an kollagen-beschichtete Mikrocarrier band [168]. Um die Abstoßung transplantierte Hepatozyten zu vermeiden, zeigte Cai, daß Hepatozyten durch Umhüllen mit einer Alginat-Polylysin-Membran immunoisoliert werden können [169]. Velde selbst favorisiert die ersten beiden Methoden, von anderen Arbeitsgruppen wird jedoch stets die Transplantation der Hepatozyten in die Milz angewandt und beschrieben [170,171]. Aus diesen Gründen wurde auch in den vorliegenden Versuchen die Transplantation in die Milz gewählt.

Die Operationstechnik zur Transplantation in Empfängertiere wurde somit auf eine optimierte Weise durchgeführt [172]. Mit der angegebenen Methode gelang dieser Arbeitsgruppe die Transplantation frisch isolierter Hepatozyten problemlos und mit großem Erfolg, wogegen hier die Transplantation kultivierter Hepatozyten nur sehr schlecht gelang. Dies könnte auf die starke Verklumpung der Hepatozyten nach Ablösen aus der Kulturschale zurückzuführen sein. Die Klumpen riefen nach Injektion

entweder einen Leberinfarkt hervor, der mit dem Tod des Versuchstieres endete, oder sie wurden vom Immunsystem des Tieres abgeräumt, sobald sie in die Blutzirkulation gerieten, was zur Folge hatte, daß nur eine minimale Zahl der transplantierten Hepatozyten in die Leber gelangte und diese, auch nach einiger Zeit zur Zellteilung, entsprechend schlecht in der Leber nachgewiesen werden konnten. Weiterhin existieren folgende mögliche Gründe für die nur schwache Repopulation der Leber in den vorliegenden Experimenten:

- Die Größe der Versuchstiere war zu gering. In einer Maus können bereits kleinste Klumpen aus Hepatozyten, die in die Blutzirkulation geraten, einen Organinfarkt und damit den Tod der Tiere hervorrufen.
- Die verklumpten Hepatozyten sterben ab. Obwohl die vereinzelt Hepatozyten durch Trypanblau-Färbung auf ihre Viabilität hin untersucht wurden und diese >90% betrug, konnte über die Hepatozytenklumpen auf diese Weise keine Aussage getroffen werden.
- Die Zellklumpen lösen eine Abstoßungsreaktion im Tier aus. Durch Verwendung eines FACS-Gerätes (fluorescent activated cell sorting) könnten nicht nur die Zellen separiert, sondern auch die mit EGFP transduzierten Hepatozyten aufgrund ihrer Fluoreszenz angereichert werden.
- Obwohl die Zellen syngene waren, kam es zu einer Abstoßungsreaktion. Sowohl die Spendertiere als auch die Empfängertiere entstammten dem Inzuchtstamm *balb/c* und sind daher syngene, eine Abstoßungsreaktion sollte somit eigentlich nicht stattfinden. Die transplantierten Zellen wurden jedoch eine Woche in Kultur gehalten, und in den Hepatozytenklümpchen war mit Sicherheit noch Gelatine von der Beschichtung der Kulturschale enthalten, was eine Immunreaktion ausgelöst haben könnte. Weiterhin wird vermutet, daß EGFP ebenfalls immunogen wirkt. Die Verwendung nicht immunkompetenter Tiere wie SCID-Mäuse könnte eine solche Abstoßungsreaktion ebenso ausschließen wie die Immunsuppression der Empfängertiere, z.B. durch Verwendung von Cyclosporin A [164]. Yin wies außerdem darauf hin, daß eine enzymatische Ablösung der zu transplantierenden Zellen im Empfängertier eine massive Entzündungsreaktion hervorrufen kann [173]. In der Literatur wird selten beschrieben, wie die Klumpenbildung der abgelösten Hepatozyten vermieden werden kann, da zumeist auch frisch isolierte Hepatozyten aus oder in

transgene Tiere verpflanzt werden. Es existiert eine Methode, bei der die Hepatozyten in kalziumfreien PBS mit 0,1% EDTA für 15 min. bei Raumtemperatur angelöst, mit einem Zellschaber abgekratzt und schließlich durch Pipettieren mit einer 2 ml-Pipette vereinzelt werden. Diese wurde als die am wenigsten schädliche Methode bei allen Versuchen verwendet.

- Die Verwendung hemihepatektomierter Tiere ähnelt den Versuchen der Leberrepopulation nach akutem Leberversagen. Auch bei der Hemihepatektomie finden die transplantierten Hepatozyten kein Leberparenchym vor, in das sie sich integrieren könnten.
- Die verbliebenen Hepatozyten bieten den transplantierten Hepatozyten gegenüber keinen selektionalen Wachstumsvorteil. Sie liegen in viel größerer Zahl als die transplantierten Hepatozyten vor und repopulieren die Leber zum größten Teil selbst. Die Verwendung von uPa-Mäusen könnte Abhilfe schaffen. Transgene Mäuse, die uPa ihren Hepatozyten exprimieren, zeigen hepatozelluläre Lesionen, die zu kontinuierlicher Lysis und Repopulation der Leber führen. Transplantierte Hepatozyten haben in diesem System einen deutlichen selektionalen Wachstumsvorteil. Auch eine radioaktive Bestrahlung oder bestimmte Chemotherapeutika können den Zellzyklus im Tier verbliebenen Hepatozyten stoppen. Eine Bestrahlung würde jedoch eine zusätzliche Knochenmarkstransplantation bei den Tieren erfordern, die diese zusätzlich zur Hemihepatektomie schwerlich verkraften dürften. Chemotherapeutika, die den Zellzyklus stoppen, wie z.B. Dipin, waren leider nicht kommerziell erhältlich.
- Virale Promotoren werden oft nach Transduktion und stabiler Integration durch verschiedene Mechanismen der Wirtszelle (u.a. Methylierungen) nach einer gewissen Zeit abgeschaltet. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Silencing“. Das Silencing kann mit Hilfe des antiepileptischen Medikaments Valproinsäure (Dipropyllessigsäure) blockiert werden, so daß bereits weitere in vitro Versuche unter Einsatz von Valproinsäure wertvolle neue Erkenntnisse liefern können.

Es ist bekannt, daß retrovirale regulatorische Elemente in vielen Zelltypen abgeschaltet werden, insbesondere in embryonalen Stammzellen [174,175]. Diese Abschaltung oder „silencing“ wird hauptsächlich durch eine Methylierung des proviralen Genoms verursacht [176,177]. DNA-Methylierung wird als genereller

Mechanismus zur Abschaltung fremder DNA in Zellen betrachtet [178], wobei die DNA-Methylierung hauptsächlich mit der Abschaltung viraler Kontrollelemente in Verbindung gebracht wird [179,180]. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) weisen eine hohe Methylierungsaktivität auf, die zu einer effizienten Abschaltung retroviraler Vektoren führt, wogegen enddifferenzierte Zellen sehr geringe bis gar keine Methylierungsaktivität besitzen [181]. Tiere mit einer Mutation im Methyltransferase-Gen *Dnmt 1* weisen aufgrund der fehlenden Methylierung eine embryonale Letalität auf, was die Wichtigkeit der Methylierungsaktivität hervorhebt [182]. Erst im Jahr 2000 wurde ein muriner Stammzellenvirus (MSCV) vorgestellt, der EGFP zufriedenstellend in embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert [183]. Dieser Aspekt sollte in folgenden Experimenten weiter untersucht werden.

#### **4.4 Weitere Ansätze zur retroviralen Gentherapie**

Das größte Problem bei dem Einsatz viraler Gentransfersysteme stellt die vollkommen unzureichende und unspezifische Transduktion von Tumorzellen dar, was die Behandlung von Tumorerkrankungen erschwert. Ein neues System aus Kombination von dominant negativem FADD und der Thymidinkinase aus HSV-1 (HSV-TK) soll diese Schwäche nun überwinden.

Viele der heute bekannten Zytostatika können in den Tumorzellen eine starke Expression der Fas/CD95 Liganden induzieren, die über Fas/CD95 und FADD zu einer Aktivierung der Caspasen führen und so die Apoptose auslösen. Das Molekül FADD spielt eine wichtige Rolle bei dem Vorgang der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Programmierter Zelltod ist für Embryonalentwicklung, Immunabwehr und Homöostase aller vielzelligen Organismen essentiell. Defekte wie z.B. die Überexpression bestimmter Inhibitorgene führen in diesem evolutionär hochkonservierten Prozess zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z.B. Krebs. Die Überexpression einer dominant-negativen Mutante des Moleküls FADD unterbricht die Weiterleitung des CD95/Fas-Todessignals im Cytoplasma und blockiert somit die Apoptose.

#### **4.4.1 second line Gentherapie**

Tumorzellen können nun mit dominant negativen FADD aus einem Vektor, der ebenfalls HSV-TK trägt, transduziert werden, wobei die Transduktionsrate gewöhnlich bei 5% liegt. Nach erfolgter Chemotherapie sollten die meisten der gewöhnlichen Tumorzellen zu Grunde gegangen sein (Typ 1), allerdings reichern sich neben den mit dnFADD transduzierten Zellen, in denen die Apoptose blockiert ist, auch solche Tumorzellen an, die von Natur aus immun gegen die Apoptose sind (Typ 2).

Hier beginnt nun der zweite Schritt der sogenannten „second line“ Gentherapie. Man weiß, daß eine Gentherapie mit HSV-TK / Ganciclovir den sogenannten „bystander-effekt“ ausübt. Hierunter versteht man, daß nicht nur die HSV-exprimierenden Zellen selbst, sondern auch nicht HSV-exprimierende Zellen in der Nachbarschaft durch die Gabe von Ganciclovir abgetötet werden. Dies hat zur Folge, daß nur eine ca. 30 – 50% Transduktionseffizienz für eine effektive HSV-TK / Ganciclovir Therapie notwendig ist, die nach der vorherigen Selektion mit dem Zytostatikum erreicht werden kann. Durch die Behandlung mit Ganciclovir werden nicht nur die transduzierten Zellen, sondern auch benachbarte Zellen des Typs 2 mit in den Tod gerissen, was eine deutliche Tumorregression zur Folge haben sollte.

#### **4.4.2 Selektionsvorteil in Kolonkarzinomzellen**

Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden musste, lässt sich diese second line Gentherapie in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 mit guten Ergebnissen anwenden. Der Versuch der Selektion der mit dnFADD transduzierten Zellen durch verschiedene Chemotherapeutika in der Hepatomzelllinie McA lieferte jedoch nur mäßige Erfolge. Diese Zelllinie war bewusst gewählt worden, da sie syngen zu Buffalo-Ratten ist und so in einem in vivo-Modell anwendbar gewesen wäre. Durch die schlechte Chemotherapie-Selektion lässt sich für die Hepatomzellen aber weder in vitro noch in vivo eine erfolgreiche Apoptose durch Gabe von Ganciclovir erwarten.

Bedenkt man jedoch, daß die Inzidenz des Kolonkarzinoms die des hepatozellulären Karzinoms um das vierfache übersteigt, und Patienten mit einem Kolonkarzinom in etwa ein Drittel aller Fälle Lebermetastasen entwickeln, so liegt die Wahrscheinlichkeit für eine Lebermetastase aus einem Kolonkarzinom immer noch höher als die Wahrscheinlichkeit eines hepatozellulären Karzinoms. Zur Behandlung

des hepatozellulären Karzinoms stehen mehrere Möglichkeiten bereit (siehe oben), und gerade die Chemoembolisation erwies sich als vielversprechend. Weiterhin wird laufend nach verbesserten Therapiemöglichkeiten gesucht (siehe unten).

Die Fernmetastasen aus dem Kolonkarzinom sind nur zu 25% resektabel, und die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit Lebermetastasen nach der Diagnosestellung beträgt noch 4-6 Monate [184]. Eine Chemoembolisation kommt in diesem Fall nicht in Betracht, da Metastasen wesentlich schlechter durchblutet werden als das hepatozelluläre Karzinom und die Chemotherapeutika den Ort ihrer Bestimmung nicht erreichen. In dieser Hinsicht stellt das Ergebnis keinesfalls einen Rückschlag dar, wenn so auch das hepatozelluläre Karzinom - eines der Karzinome mit den schlechtesten Behandlungsmöglichkeiten, aber auch geringer Inzidenz – kaum behandelt werden kann, so können durchaus hepatische Metastasen aus dem Kolonkarzinom, die eine weit höhere Inzidenz aufweisen, auf diese Weise behandelt werden.

#### **4.4 Adenovirale p53-Gentherapie**

Unter allen bekannten Tumorsuppressorgenen nimmt p53 die herausragende Stellung ein, da in 50% aller menschlichen Neoplasien die p53-Funktion verlorengegangen ist [185-187]. Aufgrund dieser Tatsache wird p53 eine besondere Rolle bei der Therapie von Tumoren zugeschrieben, indem durch seine Wiedereinführung in Tumorzellen deren Apoptose herbeigeführt wird [188,189].

Der Verlust der p53-Funktion gilt somit als wichtiger Schritt auf dem komplexen Weg der Karzinogenese. Durch eine Mutation im p53-Gen wird in der Regel die Fähigkeit des Proteins zur sequenzspezifischen Transaktivierung teilweise oder ganz ausgesetzt, wodurch Zellzyklusarrest oder Apoptose nach DNA-Schädigung nicht mehr eintreten. Es entstand die Idee, Wildtyp-p53 (wtp53) in Tumorzellen einzubringen, um eine verbesserte p53-Funktion zu gewährleisten und so in diesen Zellen Apoptose auszulösen. Das am häufigsten in der p53-Gentherapie benutzte Gentransfersystem sind die Adenoviren. Die ersten p53 exprimierenden Adenoviren wurden therapeutisch erfolgreich in Mäusen bei einem Modell von Lungenkrebs appliziert [190]. In Tierversuchen zum hepatozellulären Karzinom konnten die Lebern der Versuchstiere effektiv mit Adenovirus transduziert werden, nicht jedoch die Tumoren.

Im Rahmen einer p53-Gentherapie wurden als Mittel zum Gentransfer zumeist Adenoviren benutzt. Diese infizieren ein breites Spektrum sowohl sich teilender als auch ruhender Zellen und integrieren sich nicht ins Genom, sondern werden als episomale Elemente im Nucleus der Wirtszelle repliziert und durch die Immunantwort des Körpers binnen Tagen bis Wochen wieder eliminiert [191]. Rekombinante Adenoviren können zudem in höheren Konzentrationen hergestellt werden und erreichen eine höhere Transduktionsrate als Retroviren [192]. Ein Problem stellen dagegen die starke Immunogenität der Adenoviren sowie das Vorhandensein von Antikörpern gegen adenovirale Kapsidproteine bei einem Grossteil der Bevölkerung dar [193]. Auch wurde in Versuchen zwar eine effektive Transduktion von normalem Lebergewebe, nicht jedoch von Tumoren gezeigt [194,195]. Diese insuffiziente Tumortransduktion kann unter anderem dadurch erklärt werden, daß maligne Tumoren auf anderem Wege mit Blut versorgt werden als normales Lebergewebe. Während die normale Leber zu 75% aus der Portalvene und nur zu 25% aus der Leberarterie versorgt wird, beziehen maligne Tumoren nahezu 100% ihrer Blutzufuhr aus der Leberarterie [196]. Trotz einer intraarteriellen Gabe der Adenoviren ist die erreichbare Transduktionseffizienz jedoch bis heute unzufriedenstellend geblieben.

#### **4.4.1 Verbesserte adenovirale Therapie durch VP22**

Diese ineffiziente Tumortransduktion sollte durch die Verwendung eines Fusionsproteins aus p53 und dem HSV-1-Strukturprotein VP22, verbessert werden. 1997 wurde gezeigt, daß VP22 aus einer Subpopulation von VP22-exprimierenden Zellen mit hoher Effizienz in die Nachbarzellen exportiert wurde [197]. Weitere Versuche zeigten, daß diese bemerkenswerte Form des intrazellulären Transports auch stattfand, wenn VP22 an seinem C-Terminus mit GFP oder p53 fusioniert war [198] und die Apoptose im Vergleich zu p53 allein noch verstärkt wurde. In der Arbeitsgruppe lagen Daten vor, die die interzelluläre Ausbreitung von p53 durch VP22 belegen, jedoch nur in sehr geringem Maße, besonders in einer humanen Hepatomzelllinie.

#### 4.4.2 Verbesserte adenovirale Therapie durch retrovirale

##### Kotransfektion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in einer weiteren, hochdifferenzierten humanen Hepatomzelllinie die Wirkung von p53 über die Kotransfektion mit Retroviren, die für Faktoren der Leberregeneration und der hepatischen Genregulation kodieren, verbessert werden kann. Die Zahl der im vorliegenden Versuch überlebenden Zellen bei Einsatz von HNF-4 $\alpha$  und C/EBP  $\beta$  liegen oberhalb des Wertes der normalen Apoptose, so daß diese beiden Faktoren offenbar eine Apoptose durch p53 behindern. Auch der Erfolg bei Einsatz von c-met ist nur sehr gering. C/EBP  $\alpha$  und HGF zeigen dagegen eine deutliche Steigerung der Apoptoserate von 44,2% (HGF) bzw. 53,5% (C/EBP  $\alpha$ ) gegenüber keinem Einsatz von zusätzlichen Faktoren (36%), was darauf hinweist, daß diese Faktoren die Sensitivität der Zellen gegenüber p53 und damit gegenüber der Apoptose deutlich erhöhen.

Der Unterschied zwischen den beiden Subtypen von C/EBP ist besonders auffällig. Nach einer Hemihepatektomie steigen die mRNA-Level von C/EBP $\beta$  auf das fünffache an, während die mRNA-Level von C/EBP $\alpha$ , die in terminal differenzierten Zellen wie Hepatozyten normalerweise recht hoch sind, deutlich absinken [199].

Für die gesteigerte Proliferation von Hepatozyten scheint dies von entscheidender Bedeutung zu sein, und so könnte auch hier C/EBP $\beta$ , das offenbar die Proliferation von Hepatozyten anregt, gleichzeitig mit einer verringerten Sensitivität gegenüber p53 einhergehen, dieser Faktor also die Proliferation gegenüber der Apoptose begünstigen, während es sich bei C/EBP $\alpha$ , dem ein antiproliferativer Effekt zugeschrieben wird, genau umgekehrt verhält.



## 4.5 Die Zukunft

### 4.5.1 Retrovirus-Hybride

Ähnlich wie bei den adenoviralen Vektoren wird auch bei Retroviren versucht, durch Veränderungen der Virushülle eine Veränderung des Tropismus zu erzielen und hierdurch die Transduktion auf bestimmte Zellen zu beschränken und effektiver zu gestalten [200-202]. Dieses „retargeting“ wird in Zukunft, ähnlich wie bei den Adenoviren, die Anwendungsmöglichkeiten der retroviralen Vektoren deutlich verbessern. Ein besonders interessanter Ansatz in diesem Zusammenhang stellt die in vitro Rekombination und anschließende Selektion von verbesserten retroviralen Vektoren dar [203]. Diese „Evolution im Reagenzglas“ ist gerade bei retroviralen Vektoren sehr effektiv und wäre vor allem für die Gentherapie von Tumoren von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß zwischen zwei unterschiedlichen Retroviren in einer Zelle bis zu 40% Rekombinationen pro Replikationszyklus auftreten. Die Entwicklung neuer retroviraler Vektoren mit spezifischem Tropismus und sehr effizienter Transduktion mit diesen neuen Methoden auf dem Boden der in vitro Mutation und Selektion könnte somit eine neue attraktive Zukunft für diese Genfähren eröffnen.

Durch die Entwicklung von Hybrid-Viren aus adenoviralen Vektoren und beiden LTRs von MoMLV konnte auch in der Abwesenheit der reversen Transkriptase und der Integrase eine stabile Integration eines Transgens in 10 – 15 % der transduzierten ruhenden und teilenden Zellen erzielt werden [204]. Dieser neue Ansatz ist vor allem für die hepatische Gentherapie sehr attraktiv, da die Transduktion von Leberzellen in vivo sowohl mit Lentiviren als auch mit MoMLV von einer Leberregeneration abhängig ist.

### 4.5.2 Nichtvirale Vektoren

Obwohl retrovirale Vektoren nach wie vor attraktive Genfähren darstellen, liegt die Zukunft der hepatischen Gentherapie wohl in der Entwicklung nicht viraler Vektoren, die durch Verwendung bestimmter DNA-Sequenzen eine stabile Integration eines Gens in die Hepatozyten vermitteln können. Erste Ansätze mit nackter DNA zeigten hoffnungsvolle Ergebnisse in Mäusen [205], so daß das klinische Ziel genetische oder virale Lebererkrankungen mit Hilfe einer Gentherapie besser zu beherrschen, erreichbar erscheint.

## 5. Zusammenfassung

Die Gentherapie ist eine prinzipiell neue Therapieform, die in einzelnen Bereichen der Medizin kurz vor der klinischen Anwendung steht, jedoch bei der Mehrzahl der möglichen Indikationen das experimentelle Stadium noch lange nicht verlassen kann. Besonders die Gentherapie von Tumoren steht noch vor sehr großen ungelösten Problemen.

Epidemiologische Untersuchungen zeigten, daß das hepatozelluläre Karzinom in Deutschland meist auf dem Boden einer Hepatitis und einer Leberzirrhose entsteht. Da die Prognose von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen oft von der Leberfunktion abhängt, dürfen neue gentherapeutische Optionen die gesunden Leberzellen nicht beeinträchtigen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit aktuellen Fragestellungen, Problemen und neuen Konzepten der retroviralen Gentherapie in der Leber. Schwerpunkt der Arbeit bilden hierbei spezielle Probleme in der Gentherapie des hepatozellulären Karzinoms.

Hinsichtlich der retroviraler Gentherapieansätze wurden mehrere Gebiete bearbeitet. Das erste Thema beschäftigte sich mit der durch Doxycyclin regulierbaren Genexpression nach retroviraler Transduktion von hochdifferenzierten Hepatomzellen (HepG2). Nach Konstruktion eines MoMLV, der sämtliche regulatorischen Einheiten des Tet-Systems zwischen seinen LTRs beinhaltet und nach Transduktion von HepG2 Zellen eine sehr enge Regulation der Markergenexpression zeigte, musste aufgrund seiner recht hohen Toxizität und schlechten Selektierbarkeit dieser Vektor durch verschiedene Varianten der Transaktivator-domäne von VP16 verändert werden. Die optimierten Varianten, die die minimierte Transaktivator-domäne von nur 13 Aminosäuren in zwei- oder dreifacher Wiederholung beinhalten, wurden anschließend auf ihre Selektierbarkeit und auf die Stärke ihrer Expression getestet. Interessanterweise stellte sich die Variante TA4, die die Sequenz in dreifacher Ausführung, zwei davon jedoch mutiert, enthält, als die optimale Variante heraus.

Weiterhin wurden die Möglichkeiten der retrovirale Gentherapie in und ex vivo untersucht. Die Gentherapie in vivo führte jedoch nur zum Erfolg, wenn die transduzierten Hepatozyten durch eine Nachselektion in vivo einen Wachstumsvorteil erhielten

Die Gentherapie ex vivo konnte durch eine bessere Kontrolle der Transduktionsrate der zu transplantierenden Zellen überzeugen, jedoch stellte sich die Transplantation als technisch schwierig heraus, so daß nur geringe Repopulationsraten der Empfängerleber festgestellt werden konnten. Die möglichen Gründe hierfür wurden bereits diskutiert, einer wäre das Silencing von retroviralen Vektoren in embryonalen Stammzellen.

Außerdem wurde gezeigt, daß eine Chemotherapie-vermittelte Selektion von Tumorzellen möglich ist, die mit einem bicistronischen Retrovirus (dnFADD-IRES-EGFP oder dnFADD-IRES-HSV-TK) transduziert wurden. Hierdurch ergeben sich neue experimentelle Therapieansätze, die aufbauend auf den Mechanismen der Tumorprogression eine second line Gentherapie mit Ganciclovir ermöglichen. Allerdings sprachen Zellen eines kolorektalen Karzinoms auf eine solche Selektion wesentlich besser an als Zellen eines hepatozellulären Karzinoms, was jedoch im Hinblick auf die häufige Metastasierung von kolorektalen Karzinomen in die Leber zwar nicht für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms, wohl aber für die Behandlung von Lebermetastasen vielversprechend ist.

Letztlich wurde gezeigt, daß die adenovirale p53-Gentherapie, die aufgrund der schlechten Transduktionsrate von Tumoren, auch bei Unterstützung durch das Protein VP22, bislang zu keinem durchschlagenden Erfolg geführt hatte, durch Kotransfektion mit retroviralen Vektoren, die für Faktoren der Leberregeneration und der hepatischen Genregulation kodieren, verbessert werden kann. Die Faktoren HGF und C/EBP  $\alpha$  erhöhten die durch p53 verursachte Apoptose um 22,8 respektive 48,6%.

## 6. Literatur

1. Anderson WF: *Human gene therapy*, Science 1992, **256**: 808-13
2. Ding SW: *RNA silencing*, Curr. Opin. Biotechnol. 2000, **11**: 152
3. Günzburg WH, Salmons B: *Development of retroviral vectors as safe, targeted gene delivery systems*, J. Mol. Med. 1996, **74**: 171-82
4. Jolly D: *Viral vector systems for gene therapy*, Cancer Gene Ther. 1994, **1**: 51-64
5. Sandig V, Strauss M: *Liver-directed gene transfer and application to therapy*, J. Mol. Med. 1996, **74**: 205-12
6. Wilson JM: *Round two for liver gene therapy*, Nature Genetics 1996, **12**: 232-33
7. Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmänn JL, Klatzmann D: *Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene*, Proc. Nat. Acad. Sci. 1993, **90**: 7024-28
8. Gutierrez AA, Lemoine NR, Silkore K : *Gene therapy for cancer*, Lancet 1992, **339**: 715-21
9. Bishop JM: *Molecular themes in oncogenesis*, Cell 1991, **64**: 235-48
10. Sun Y, Nakamura K, Wendel E, Colburn N: *Progression toward tumor cell phenotype is enhanced by overexpression of a mutant p53 tumor-suppressor gene isolated from nasopharyngeal carcinoma*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, **90**:2827-31

11. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with *braintumour progression*, Nature 1992, **355**:846-47
12. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW: *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*, Nature 1996, **379**:88-91
13. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG: *Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions*, Cancer Res. 1997. **57**:4200-04
14. Ledley FD: *Hepatic gene therapy: present and future*, Hepatology 1993, **18**: 1263-73
15. Ghosh SS, Takahashi M, Thummala NR, Parashar B, Chowdhury NR, Chowdhury JR: *Liver-directed gene therapy: promises, problems and prospects at the turn of the century*, J. Hepatol. 2000, **32**:238-52
16. Shetty K, Wu GY, Wu CH: *Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium*, Gut 2000, **46**:136-9
17. Qian C, Drozdik M, Caselmann WH, Prieto J: *The potential of gene therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma*, J. Hepatol. 2000, **32(2)**:344-51
18. Ruiz J, Qian C, Drozdik M, Prieto J: *Gene therapy of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma*, J. Viral Hepat. 1999, **6**:17-34
19. Fields BN, Knipe DN, Howley PM: *Virology*, 3 Auflage, Raven Press, New York 1995
20. Cann AJ: *Principles of molecular Virology*, Academic Press, London 1993
21. Doerfler W, Böhm P: *Virus Strategies. Molecular Biology and Pathogenesis*, VCH-Verlag, Weinheim 1993

22. Modrow S, Falke D: *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997
23. Eglitis MA, Anderson WF: *Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells*, Biotechniques 1988, **6**: 608-14
24. McLachlin JR, Cornetta K, Eglitis MA, Anderson WF : *Retroviral-mediated gene transfer*, Prog. Nucl. Acis Res. Mol. Biol. 1990, **38**: 91-135
25. Cullen BR: *Human Retroviruses*, IRL Press, Oxford 1993
26. Morgenstern JP, Land H: *Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line*, *Nucl. Acis Res.* 1990, **18**: 3587-96
27. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D: *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, **90**: 8392-96
28. Koo HM, Brown AMC, Kaufmann RJ, Prorock CM, Ron Y, Dougherty JP: *A spleen necrosis virus-based retroviral vector which expresses two genes from a dicistronic mRNA*, Virology 1992, **186**: 669-75
29. Levine F, Yee JK, Friedmann T: *Efficient gene expression in mammalian cells from a dicistronic transcriptional unit in an improved retroviral vector*, Gene 1991, **108**: 167-74
30. Yang SK, Davies MV, Kaufmann RJ, Wimmer E: *Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5'nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo*, J. Virol. 1989, **63**: 1651-60

31. Yang SK, Krausslich HG, Nichlin MJH, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E: *A segment of the 5'nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*, J. Virol. 1988, **62**: 2636-43
32. Pelletier J, Sonenberg N: *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*, Nature 1988, **334**: 320-25
33. Gossen M, Bujard H: *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*, Proc. Natl. acad. Sci. 1987, **84**: 1197-1201
34. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H: *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*, Science 1995, **268**: 1766-69
35. Gossen M, Bujard H: *Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukariotic cells*, Nucl. Acid Res. 1993, **21**: 4411-12
36. Yin D, Zhu L, Schimke RT: *Tetracycline-controlled gene expression systems achieve high-level and quantitative control of gene expression*, Anal. Biochem. 1996, **235**: 195-201
37. Furth PA; Onge LS, Böger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Henninghausen L: *Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1994, **91**: 9302-06
38. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H: *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, **93**: 10933-38

39. Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA, Schmauss C: *The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines*, J. Biol. Chem. 1995, **270**:14168-74
40. Ackland-Berglund CE, Leib DA: *Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type*, Biotechniques 1995, **18**:196-200
41. Gossen M, Bonin AL, Bujard H: *Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements*, Trends Biochem. Sci. 1993, **18**:471-75
42. Paulus W, Baur I, Boyce FM, Breakefield XO, Reeves SA: *A self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells*, J. Virol. 1996, **70**: 62-67
43. Hofmann A, Nolan GP, Blau HM: *Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, **93**: 5185-90
44. Soriano P, Friedrich G, Lawinger P: *Promotor interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells*, J. Virol. 1991, **65**: 2314-19
45. Yee JK, Moores JC, Jolly DJ, Wolff JA, Respass JG, Friedmann T: *Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, **84**: 5197-5201
46. Yu SF, von Rüden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Rütger U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E: *Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1986, **83**: 3194-98
47. Blum HE: *Hepatitisviren und Leberkarzinom*, Dtsch. Ärztebl. 1993, **90**: 1665-69



48. Okuda K: *Hepatocellular carcinoma: recent progress*, Hepatology 1992, **15**: 948-63
49. Dusheiko GM, Hobbs KEF, Dick R, Burroughs AK: *Treatment of small hepatocellular carcinomas*, Lancet 1992, **340**: 285-88
50. Takayoshi T, Endo Y, Hattori N : *Primary liver cell cancer in Japan. Clinicopathological features and results of surgical treatment*, Ann. Surg. 1990, **211**: 277-87
51. Tang ZY, Yu YQ, Zhou D: *Surgery of small hepatocellular carcinoma. Analysis of 144 cases*, Cancer 1989, **64**: 536-41
52. Stone MJ, Klintmalm GBG, Polter D, Husberg BS, Mennel RG, Ramsay MAE, Flemens EE, Goldstein RM: *Neoadjuvant chemotherapy and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a pilot study in 20 patients*, Gastroenterology 1993, **104**: 196-202
53. Wanebo HJ, Semoglu C, Attiyeh F, Stearns MJ: *Surgical management of patients with primary operable colorectal cancer and synchronous liver metastases*, Amer. J. Surg. 1978, **135**: 81-91
54. Lai CL, Wu PC, Chan GC, Lok AS, Lin HJ: *Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial*, Cancer 1988, **62**:479-483.
55. Manesis EK, Giannoulis G, Zoumboulis P, Vafiadou I, Hadziyannis SJ: *Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: a randomized, controlled trial*, Hepatology 1995, **21**:1535-1542
56. Castells A, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Roca M, Boix L: *Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients*, Gastroenterology 1995, **109**:917-922

57. Kajanti M, Rissanen P, Virkkunen P, Franssila K, Mantyla M. Regional intra-arterial infusion of cisplatin in primary hepatocellular carcinoma. A phase II study. *Cancer* 1986; 58(11):2386-2388.
58. Castells A, Bruix J, Bru C, Fuster J, Vilana R, Navasa M: *Treatment of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a cohort study comparing surgical resection and percutaneous ethanol injection*, *Hepatology* 1993, **18**:1121-1126
59. Vilana R, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Sole M, Rodes J: *Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma*, *Hepatology* 1992, **16**:353-357
60. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de S, I, Bolondi L: *Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection*, *Radiology* 1995, **197**:101-108.
61. Anderson JM, Cormier MJ: *Lumisomes, the cellular site of bioluminescence in coelenterates*, *J. Biol. Chem.* 1973, **248**: 2937-43
62. Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J: *Intermolekular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*, *Biochemistry* 1974, **13**: 2656-62
63. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ: *Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*, *Gene* 1992, **111**: 229-33
64. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW: *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green fluorescent protein*, *Biochemistry* 1993, **32**: 1212-18
65. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*, *Science* 1994, **263**: 802-05
66. Roizman B, Whitley RJ, Lopez C: *Human herpesviruses*, Raven Press, New York 1993

67. G JC, Trask TW, Chen SH, Woo SL, Grossman RG, Carey KD, Hubbard GB, Carrier DA, Rajagopalan S, Aguilar-Cordova E, Shine HD: *Adenoviral-mediated thymidine kinase gene transfer into the primate brain followed by systemic ganciclovir: pathologic, radiologic and molecular studies*, Hum. Gene Ther. 1996, **7**: 1241-50
68. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH: *Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells*, Nat Med. 1997, **3**: 1354-61
69. Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder GM, Naus CC: *Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo*, Cancer Res. 1997, **57**:1523-28
70. Fick J, Barker FG, Dazin P, Westphale EM, Beyer EC, Israel MA: *The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, **92**:11071-5
71. Kuriyama S, Nakatani T, Masui K, Sakamoto T, Tominaga K, Yoshikawa M: *Bystander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma*, Hepatology 1995, **22**:1838-46
72. Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA: *Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells*, Cancer Res. 1996, **56**:2697-2702
73. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H: *Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, **93**:1831-35
74. Namba H, Tagawa M, Iwadate Y, Kimura M, Sueyoshi K, Sakiyama S: *Bystander effect-mediated therapy of experimental brain tumor by genetically engineered tumor cells*, Hum. Gene Ther. 1998, **9**:3-4

75. Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T: *Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice*, Cancer Gene Ther. 1997, **4**: 91-6
76. Ameisen JC: *The origin of programmed cell death*, Science 1996, **272**: 1278-79
77. Hug H: *Fas mediated apoptosis in tumor formation and defense*, Biol. Chem. 1997, **378**: 1045-1413
78. Miller LJ, Marx J : *Apoptosis*, Science 1998, **281** : 1301
79. Nagata S: *Apoptosis by death factor*, Cell 1997, **88**: 355-65
80. Vaux DL, Korsmeyer SJ: *Cell death in development*, Cell 1999, **96**: 245-54
81. Debatin KM, Beltinger C, Böhler T, Fellenberg J, Friesen C, Fulda S, Herr I, Los M, Scheuerpflug C, Sieverts H, Stahnke K: *Regulation of apoptosis through CD95 (APO-1/fas) receptor-ligand interaction*, Biochem. Soc. Trans. 1997, **25**: 405-10
82. Lüschen S, Ussat S, Scherer G, Kabelitz D, Adam-Klages S: *Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of FADD/caspase signalling: Requirement of cell cycle progression*, J. Biol. Chem. 2000, **275**: 24670-78
83. Herschkovitz I: *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*, Nature 1987, **329**: 219-22
84. Levine, AJ, Chang A, Dittmer D, Nottermann DA, Silver A, Thorn K, Welsh D, Wu M: *The p53 tumor suppressor gene*, J. Lab. Clin. Med. 1994, **123**: 817-23
85. Harris CC, Hollstein M: *Clinical implication of the p53 tumor suppressor gene*, New. Engl. J. Med. 1993, **329**: 1318-27

86. Gerbes AL, Caselmann WH: *Point mutations of the p53 gene, human hepatocellular carcinoma and aflatoxin*, J. Hepatol. 1993, **19**: 312-15
87. Brecque DR: *Hepatocyte growth factor: How do I know them? Let me count the ways*, Gastroenterology 1992, **103**: 1686-91
88. Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwögler S, Meyer zum Büschenfelde KH: *The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is down-regulated during cell growth and by transforming growth factor  $\beta$* , Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992, **183**: 739-42
89. Schirmacher P, Geerts A, Pierangelo A, Diens HP Rogler ChE: *Hepatocyte growth factor is expressed in fat storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells*, Hepatology 1992, **15**: 5-11
90. Maher JJ: *Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Up-regulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride*, J. clin. Invest. 1993, **91**: 2244-52
91. Komada M, Miyazawa K, Ishi T, Kitamura N: *Charakterisation of hepatocyte growth factor receptors on Meth A cells*; Europ. J. Biochem. 1992, **204**: 857-64
92. Villa-Moruzzi E, Lapi S, Prat M, Gaudino G, Comoglio PM: *A protein tyrosine phosphatase activity associated with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor*, J. Biol. Chem. 1993, **268**: 18176-80
93. Cowell IG: *Repression versus activation in the control of gene transcription*, TIBS 1994; **19**: 38-42
94. Xanthopoulos K, Mirkovitch GJ: *Gene regulation in rodent hepatocytes during development, differentiation and disease*, Europ. J. Biochem. 1993, **216**: 353-60

95. Zaret KS: *The Liver Biology and Pathobiology*, 3. Auflage, Raven Press, New York 1994
96. McKay R: *Stem cells, Hype and Hope*, Nature 2000, **406**: 361
97. Shockett PE, Schatz DG: *Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression* Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, **93**: 5173-76
98. Gallia GL, Khalili K: *Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system*, Oncogene 1998, **16**: 1879-84
99. Kelleher RJ, Flanagan PM, Kornberg RD: *A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus*, Cell 1990, **61**: 1209-15
100. Berger SL, Pina B, Silverman N, Marcus GA, Agapite J, Regier JL, Triezenberg SJ, Guarente L: *Genetic isolation of ADA2: A potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains*, Cell 1992, **70**: 251-65
101. Gilbert DM, Heery DM, Losson R, Chambon P, Lemoine Y: *Estradiol-inducible squelching and cell growth arrest by a chimeric VP16-estrogen receptor expressed in Saccharomyces cerevisiae: Suppression by an allele of PDR1*, Mol. Cell. Biol. 1993, **13**: 462-72
102. Seipel K, Georgiev O, Schaffner W: *A minimal transcription activation domain consisting of a specific array of aspartic acid and leucine residues*, Biol. Chem. Hoppe Seyler 1994, **375**: 463-70
103. Miller AD, Buttimore C: *Redesign of retroviral packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production*, Mol. Cell. Biol. 1986, **6**: 2895-902
104. Zavada J: *Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukemia and of avian myeloblastosis viruses*, J. Gen. Virol. 1972, **15**: 183-91

105. Marsh M, Helenius A: *Virus entry into animal cells*, Adv. Virus Res. 1989, **36**: 107-51
106. Emi N, Friedmann T, Yee JK: *Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus*, J. Virol. 1991, **65**: 1202-07
107. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK: *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, **90**: 8033-37
108. Guidotti JE, Mallet VO, Parlier D, Mitchell C, Fabre M, Jaffray P, Lambert M, Kahn A, Gilgenkrantz H: *Fas/CD95 pathway induces mouse liver regeneration and allows for highly efficient retrovirus-mediated gene transfer*, Hepatology 2001, **33**: 10-15
109. Paul RW: *Increased viral titre through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines*, Hum. Gene Ther. 1993, **4**: 609-15
110. Toyoshima K, Vogt PK: *Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions*, Virology 1969, **38**: 414-26
111. Kahn ML, Lees W, Dichek DA: *Optimization of retroviral vector-mediated gene transfer into endothelial cells in vitro*, Circ. Res. 1992, **71**: 1508-17
112. Porter CD, Lukacs KV, Box G, Takeuchi Y, Collins MK: *Cationic liposomes enhance the rate of transduction by a recombinant retroviral vector in vitro and in vivo*, J. Virol. 1998, **76**: 4832-40
113. Konopka K, Davis BR, Larsen CE, Alford DR, Debs RJ, Duzgunes N : *Liposomes modulate human immunodeficiency virus infectivity*, J. Gen. Virol. 1990, **71**: 2899-907
114. Konopka K, Stamatatos L, Larsen CE, Davis BR, Duzgunes N: *Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by cationic liposomes: The role of CD4, serum and liposome-cell interactions*, J. Gen. Virol. 1991, **72**: 2685-96

115. Bas DM, Baylor MR, Chen C, Mackow EM, Bremont M, Greenberg HB: *Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus*, J. Clin. Invest. 1992, **90**: 2313-20
116. Bichko V, Netter HJ, Taylor J: *Introduction of hepatitis d virus into animal cell lines via cationic liposomes*, J. Virol. 1994, **68**: 5247-52
117. Hodgson CP, Solaiman F: *Virosomes : Cationic liposomes enhance retroviral transduction*, Nat. Biotechnol. 1996, **14**: 339-42
118. Themis M, Forbes SJ, Chan L, Cooper RG, Etheridge CJ, Miller AD, Hodgson HJF, Coutelle C: *Enhanced in vitro and in vivo gene delivery using cationic agent complexed retrovirus vectors*, Gene Ther. 1998, **5**: 1180-86
119. Miyake K, Tohyama T, Shimada T: *Stable integration of human immunodeficiency virus-based retroviral vectors into the chromosomes of non-dividing cells*, Hum. Gene Ther. 1996, **7**: 2281-86
120. Ott M, Stockert RJ, Ma Q, Gagandeep S, Gupta S: *Simultaneous up-regulation of viral receptor expression and DNA synthesis is required for increasing efficiency of retroviral hepatic gene transfer*, J. Biol. Chem. 1998, **273**: 11954-61
121. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO: *Integration of murine leukemia virus depends on mitosis*, EMBO J. 1993, **12**: 2099-2108
122. Bosch A, McCray PB, Chang SMW, Ulich TR, Simonet WS, Jolly DJ, Davidson BL: *Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances in vivo retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes*, J. Clin. Invest. 1996, **98**: 2683-87
123. Lieber A, Vrancken Peeters MJ, Meuse L, Fausto N, Perkins J, Kay MA: *Adenovirus-mediated urokinase gene transfer induces liver regeneration and allows for efficient retrovirus transduction of hepatocytes in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, **92**: 6210-14



124. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL: *Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene*, Cell 1991, **66**: 245-56
125. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M: *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*, Am. J. Pathol. 1997, **151**: 1273-80
126. Tatematsu M, Ho RH, Kaku T, Ekern JK, Farber E: *Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetaminofluorene and partial hepatectomy*, Am. J. Pathol. 1984, **114**: 418-30
127. Sarraf C, Lalani EN, Golding M, Anilkumar TV, Poulosom R, Allison M: *Cell behaviour in the acetaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations*, Am. J. Pathol. 1994, **145**: 1114-26
128. Golding M, Sarraf C, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS, Allison MR: *Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetaminofluorene-treated regenerating rat liver*, Hepatology 1995, **22**: 1243-53
129. Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N: *Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine*, Am. J. Pathol. 1991, **139**: 535-52
130. Dabeva MD, Shafritz DA: *Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration*, Am. J. Pathol. 1993, **143**: 1606-20
131. Novikoff PM, Ikeda T, Hixson DC, Yam A: *Characterisation of and interactions between bile ductule cells and hepatocytes in early stages of rat hepatocarcinogenesis induced by ethionine*, Am. J. Pathol. 1991, **139**: 1351-68
132. Lenzi R, Liu MH, Tarsetti F, Slott Pa, Alpini G, Zhai WR, Paronetto F, Lenzen R, Tavoloni N: *Histogenesis of bile-duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. Evidence for a biliary epithelial nature of oval cells*, Lab. Invest. 1992, **66**: 390-402

133. Faktor VM, Uryvaeva IV, Sokolava AS, Chernow VA, Brodsky WY: Kinetics of cellular proliferation in regenerating mouse liver pretreated with the alkylating drug dipin, *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.* 1980, **33**: 187-97
134. Faktor VM, Radaeva SA: *Oval-cells-hepatocytes relationships in dipin-induced hepatocarcinogenesis in mice*, *Exp. Toxicol. Pathol.* 1993, **45**: 239-44
135. Faktor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson NL: *Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse*, *Am. J. Pathol.* 1994, **145**: 409
136. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM: *Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, **88**: 8377
137. Rozga J, Moscioni AD, Neuzil D, Demetriou AA: *A model for foreign gene delivery to rat liver cells in vivo*, *J. Surg. Res.* 1992: **52**: 209
138. Kay MA: *In vivo gene therapie of hemophilia B: Sustained partial correction in factor IX-deficient dogs*, *Science* 1993, **262**: 117-19
139. Cardoso JE: *In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver*, *Hum. Gene Ther.* 1993, **4**: 411-18
140. Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R, Kay MA: *Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice*, *Hepatology* 1998, **28**: 706-16
141. Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A: *Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes*, *Nat. Med.* 1998, **4**: 1185-88
142. Guidotti JE, Mallet VO, Mitchell C, Fabre M, Schoevart D, Opolon P, Parlier D, Lambert M, Kahn A, Gilgenkrantz H: *Selection of in vivo retrovirally transduced hepatocytes leads to efficient and predictable mouse liver repopulation*, *FASEB J.* 2001, **15**: 1849-51

143. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M: *Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I*, Nat. Genet. 1996, **12**: 266-73
144. Kvittingen EA, Rootwelt H, Berger R, Brandtzaeg P: *Self-induced correction of the genetic defect in tyrosinaemia type I*, J. Clin. Invest. 1994, **94**: 1657-61
145. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL: *Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation*, Science 1994, **263**: 1149-52
146. Braun KM, Degen JL: *Hepatocyte transplantation in a model of toxin-induced liver disease*, Nat. Med. 2000, **6**: 320-26
147. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM: *Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia*, Nature genetics 1994, **6**: 335-41
148. Grossman M, Wilson JM, Raper SE: *A novel approach for introducing hepatocytes into the portal circulation*, J. Lab. Clin. Med. 1993, **121**: 472-78
149. Grossman M, Raper SE, Wilson JM: *Transplantation of genetically modified autologous hepatocytes into nonhuman primates: feasibility and short-term toxicity*, Hum. Gene Ther. 1992, **3**: 501-10
150. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Lenard F, Fleming L, Parker Ponder K, Liu T, Finegold M, Darlington G, Pokorny W, Woo SLC: *Expression of human  $\alpha$ 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, **89**: 89-93
151. Rogler LE: *Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro*, Am. J. Pathol. 1997, **150**: 591-602
152. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N: *Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro*, FEBS Lett. 2001, **497**: 15-19

153. Suzuki A, Zheng YW, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H: *Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver*, Hepatology 2000, **32**: 1230-39
154. Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, Oren R, Laconi E, Hurston E, Shafritz DA: *Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver*, Am. J. Path. 2000, **156**: 2017-31
155. Soriano HE, Adams RM, Darlington G, Finegold M, Steffen DL, Ledley FD: *Retroviral transduction of human hepatocytes and orthotopic engraftment in SCID mice after hepatocellular transplantation*, Transplantation Proceedings 1992, **24**: 3020-21
156. Andreoletti M, Pages JC, Mahieu D, Loux N, Farge D, Sacquin P, Simon L, Hamza J, Bargy F, Briand P, Leperq J, Weber A: *Preclinical studies for cell transplantation: Isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction*, Human Gene Ther. 1997, **8**: 267-74
157. Koch KS, Brownlee GG, Goss SJ, Martinez-Conde A, Leffert HL: *Retroviral vector infection and transplantation in rats of primary fetal rat hepatocytes*, J. Cell Sci. 1991, **99**: 121-30
158. Weber A, Decaux JF, Bennoun M, Allemand L, Briand P, Kahn A: *Retroviral infection of primary hepatocytes from normal mice and mice transgenic for SV40 large T antigen*, Exp. Cell Res. 1993, **205**: 91-100
159. Richman RA, Clans TH, Pilkis SJ, Friedman OL: Proc. Natl. Acad. Sci. 1976, **73**: 3589-93
160. Isom HC, Secott T, Georgoff I, Woodworth C, Mimmaw J: Proc. Natl. Acad. Sci. 1985, **82**: 3252-56
161. Gao C, Jokerst R, Gondipalli P, Cai SR, Kennedy S, Parker Ponder K: *Intramuscular injection of an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor facilitates hepatic transduction with a retroviral vector in mice*, Human Gene Ther. 1999, **10**: 911-22

162. Forbes SJ, Themis M, Alison MR, Sarosi I, Coutelle C, Hodgson HJF: *Synergistic growth factors enhance rat liver proliferation and enable retroviral gene transfer via a peripheral vein*, Gastroenterology 2000, **118**: 591-98
163. Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, Oren R, Laconi E, Hurston E, Shafritz DA: *Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver*, Am. J. Path. 2000, **156**: 2017-31
164. Velde AA, Bosman DK, Oldenburg J, Sala M, Maas MAW, Chamuleau RAFM: *Three different hepatocyte transplantation techniques for enzyme deficiency disease and acute hepatic failure*, Artif. Organs 1992, **16**: 522-26
165. Mito M, Ebata H, Kusano M: *Morphological and functional studies of isolated hepatocytes transplanted into the spleen*, Transplantation 1978, **28**: 499-505
166. Makowa L, Rotstein LE, Falk RE, Langer B, Nossal NA, Blendis LM, Phillips MJ: *Reversal of toxic and anoxia induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation*, Surgery 1980, **88**: 244-53
167. Nieto JA, Canton T, Gonzales A: *Influence of the cellular dose on the effectiveness of hepatocellular transplantation in experimental liver disease*, J. Hepatol. 1988, **7**: 65
168. Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D, Levenson SM, Chowdhury N, Moscioni AD, Kram M, Chowdhury J: *Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes*, Science 1986, **233**: 1190-92
169. Cai Z, Sherman M, Sun AM: *Development of a system of microencapsulation of primary rat hepatocytes*, Hepatology 1989, **10**: 855-60
170. Parker Ponder K, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SLC: *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, **88**: 1217-21
171. Ohashi K, Park F, Kay MA: *Hepatocyte transplantation: Clinical and experimental application*, J. Mol. Med. 2001, **79**: 617-30

172. Cantz T, Zuckerman DM, Burda MR, Dandri M, Göricke B, Thalhammer S, Heckl WM, Manns MP, Petersen J, Ott M: *Quantitative gene expression analysis reveals transition of fetal liver progenitor cells to mature hepatocytes after transplantation in uPa/RAG-2-mice*, **in press**
173. Yin L, Sun M, Ilic Z, Leffert HL, Sell S: *Derivation, characterisation and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats*, *Hepatology* 2002, **35**: 315-24
174. Asche W, Coletta G, Warnecke G, Nobis P, Pennie S, King RM, Ostertag W: *Lack of retrovirus gene expression in somatic cell hybrids of friend cells and teratocarcinoma cells with a teratocarcinoma phenotype*, *Mol. Cell. Biol.* **4**: 923-30
175. Challita PM, Kohn DB: *Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, **91**: 2567-71
176. Gautsch JW: *Embryonal carcinoma stem cells lack a function required for virus replication*, *Nature* 1980, **285**: 110-12
177. Hoeben RC, Migchielsen AA, Jagdt RC, Ormond H, Eb AJ: *Inactivation of the moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position*, *J. Virol.* 1991, **65**: 904-12
178. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*, *Trends Genet.* 1997, **13**: 335-40
179. Cedar H: *DNA methylation and gene activity*, *Cell* 1988, **53**: 3-4
180. Jahner D, Jaenisch R: *Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity*, *Nature* 1985, **315**: 594-97
181. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E: *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*, *Development* 1996, **122**: 3195-3205

182. Li E, Bestor TH, Jaenisch R: *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*, Cell 1992, **69**: 915-26
183. Cherry SR, Biniszkiwicz D, Parijs L, Baltimore D, Jaenisch R: *Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells*, Mol. Cell. Biol. 2000, **20**: 7419-26
184. Fortner JG, Silva JS, Golbey RB, Cox EB, Maclean BJ: *Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer*, Ann. Surg. 1984, **199**: 306-16
185. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 mutations in human cancers*, Science 1991, **253**: 49-53
186. van Oijen MG, Slootweg PJ: *Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53*, Clin. Cancer Res. 2000, **6**: 2138-45
187. Zeimet AG, Riha K, Berger J, Widschwendter M, Hermann M, Daxenbichler G, Marth C: *New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer*, Biochem. Pharmacol. 2000, **60**: 1153-63
188. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH: *Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene*, Science 1990, **250**: 1576-80
189. Yonish E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6*, Nature 1991, **352**: 345-7
190. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E: *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*, Development 1996, **122**: 3195-3205
191. Ameis D: *Ansätze zur Gentherapie des hepatozellulären Karzinoms*, Internist (Berl) 2000, **41**: 208-12
192. Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, Cohen O, Gansbacher B, Russel S: *Vectors in cancer therapy: How will they deliver?*, Cancer Gene Ther. 1995, **2**: 291-7

193. Yen N, Ioannides CG, Xu K, Swisher SG, Lawrence DD, Kemp BL: *Cellular and humoral responses to adenovirus and p53 protein antigens in patients following intratumoral injection of an adenovirus vector expressing wild-type p53*, *Cancer Gene Ther.* 2000, **7**: 530-6
194. Bao JJ, Zhang WW, Kuo MT: *Adenoviral delivery of recombinant DNA into transgenic mice bearing hepatocellular carcinomas*, *Hum. Gene Ther.* 1996, **7**: 355-65
195. Qian C, Idoate M, Bilbao R, Sangro B, Bruna O, Vazquez J, Prieto J: *Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma*, *Hum. Gene Ther.* 1997, **8**: 349-58
196. Bookstein R, Demers W, Gregory R, Maneval D, Park J, Wills K: *p53 gene therapy in vivo of hepatocellular carcinoma and liver metastatic colorectal cancer*, *Semin. Oncol.* 1996, **23**: 66-77
197. Elliot G, O'Hare P: *Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division*, *J. Virol.* 2000, **74**: 2131-41
198. Phelan A, Elliot G, O'Hare P: *Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22*, *Nat. Biotechnol.* 1998, **16**: 440-3
199. Fausto N: *Liver regeneration*, *J. Hepatol.* 2000, **32**: 19-31
200. Cosset FL, Morling FJ, Takeuchi Y, Weiss RA, Collins MK, Russell SJ: *Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain*, *J. Virol.* 1995, **69**:6314-22
201. Valsesia-Wittmann S, Morling FJ, Nilson BH, Takeuchi Y, Russell SJ, Cosset FL: *Improvement of retroviral retargeting by using amino acid spacers between an additional binding domain and the N terminus of Moloney murine leukemia virus*, *J. Virol.* 1996, **70**:2059-64
202. Russell SJ, Cosset FL: *Modifying the host range properties of retroviral vectors*, *J. Gene. Med.* 1999, **1**:300-11
203. Soong NW, Nomura L, Pekrun K, Reed M, Sheppard L, Dawes G: *Molecular breeding of viruses*, *Nat. Genet* 2000, **25**:436-39



204. Zheng C, Baum BJ, Iadarola MJ, O'Connell BC: *Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector*, Nat. Biotechnol. 2000, **18**:176-8
  
205. Yant SR, Meuse L, Chiu W, Ivics Z, Izsvak Z, Kay MA: *Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system*, Nat Genet 2000, **25**: 35-41

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Claudia-Yasmin Paul  
Anschrift: Heidering 28, 30625 Hannover  
Telefon: 0511/5497171 oder 0173/2092900  
Geburtsdatum: 07.01.1973  
Geburtsort: Peine  
Eltern: Willy Paul, Ingenieur für Maschinenbau  
Renate Paul, geb. Ebeling, Sekretärin  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1979 - 1983: Grundschule Hämelerwald  
1983 - 1985: Orientierungsstufe Lehrte-Ost  
1985 - 1992: Gymnasium Lehrte  
Abschluß: Abitur

## Studium:

1992 - 1997: Studium der Chemie an der  
Universität Hannover  
Abschluß: Diplom

05.05.1997 - 25.11.1997: Diplomarbeit an der Medizinischen  
Hochschule Hannover, Abteilung  
Toxikologie unter Leitung von Prof. Dr.  
med. Dipl. Phys. H. H. Wellhoener,  
Thema: Untersuchungen am maritimen  
Naturstoff Pardaxin: Charakterisierung,  
Fluoreszenz - und Iodmarkierung  
der bislang unbekanntem Variante Asp-  
Pardaxin aus *Pardachirus marmoratus*.

01.03.1998 – 31.07.1998 Tätigkeit als wissenschaftlich geprüfte  
Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für  
Toxikologie und Aerosolforschung

01.09.1998 – 31.03.1999 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte  
im Bereich Physiologische Chemie der  
Medizinischen Hochschule Hannover

15.04.1999 – 14.04.2002:

Doktorandin an der Medizinischen  
Hochschule Hannover, Abteilungen  
Physiologische Chemie und  
Gastroenterologie & Hepatologie

Seit 15.05.2002:

Wissenschaftliche Angestellte an der  
Medizinischen Hochschule Hannover,  
Abteilung Humangenetik

#### Veröffentlichungen:

1. Mundt B, Kuehnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S: *Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis*, FASEB J. **in press**
2. Tietze MK, Wuestefeld T, Paul Y, Zender L, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S: *IkappaBalpha gene therapy in tumor necrosis factor-alpha- and chemotherapy-mediated apoptosis of hepatocellular carcinomas*, Cancer Gene Ther 2000, **7**: 1315-23
3. Kuehnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S: *NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of FAS (CD95) in adenoviral hepatitis*, J. Biol. Chem. 2000, **275**: 6421-7
4. Paul Y, Weiss A, Adermann K, Erdmann G, Kassebaum C, Lazarovici P, Hochmann J, Wellhoener H: *Translocation of acylated pardaxin into cells*, FEBS Lett. 1998, **440**: 131-4
5. Adermann K, Raida M, Paul Y, Abu-Raya S, Bloch-Shilderman E, Lazarovici P, Hochmann J, Wellhoener H: *Isolation, characterization and synthesis of a novel pardaxin isoform*, FEBS Lett. 1998, **435**: 173-7

#### Poster:

1. Paul CY, Fritsch C, Krause K, Kuehnel F, Zender L, Ott M, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S: *New retroviral vectors for tight regulated gene expression in hepatoma and embryonal liver cells*, EASL 2001, Prag

Hannover, 28.04.2003

Claudia-Yasmin Paul