

Dissertation

**Der pCON^{CENP-A}-Vektor: Anwendbarkeit
für Diabetes mellitus Typ 1?**



Sarah-Miriam Koudaimi

2018

Aus der Abteilung Genvektoren des
Helmholtz Zentrum München
Wissenschaftlicher Geschäftsführer: Prof. Dr. Günther Wess

Der pCON^{CENP-A}-Vektor: Anwendbarkeit für Diabetes mellitus Typ 1?

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Sarah-Miriam Koudaimi

aus
Essen

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Aloys Schepers
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Klein Prof. Dr. Ralph A.W. Rupp
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	29.11.2018

„Ich kann, weil ich will, was ich muss.“

(nach Immanuel Kant)

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	V
II. Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Zusammenfassung/ Abstract	1
2 Einleitung	5
2.1 Diabetes mellitus	5
2.1.1 Diabetes mellitus Typ 1	6
2.1.1.1 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1.....	7
2.1.2 Das Hormon Insulin	8
2.1.3 Schwierigkeiten der Langzeittherapie des Diabetes mellitus Typ 1.....	10
2.1.4 Stand der aktuellen Forschung zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 1	11
2.2 Promotorelemente - die zentrale Steuerung der Genexpression.....	12
2.2.1 Glukose-reagible Insulinproduktion als Therapieansatz	13
2.3 Gentherapie.....	17
2.3.1 Genvektoren	18
2.3.1.1 Extrachromosomale, autonome, nicht integrierende Genvektoren....	20
2.3.1.1.1 S/MAR basierte Vektoren: pEPI und pEPito	20
2.3.1.1.2 Epstein-Barr Virus basierte Vektorsysteme und die Rolle von EBNA1.....	22
2.3.1.1.3 Der pCON ^{CENP-A} -Vektor – Nutzung des Zentromers.....	25
2.4 Zielsetzung.....	31
3 Material	33
3.1 Standards für DNA- und Protein-Gelelektrophorese	33
3.2 Antikörper und Farbstoffe	33
3.3 Enzyme.....	34
3.4 Geräte.....	35
3.5 Organismen	36
3.6 Oligonukleotide	36
3.7 Plasmide	37
3.8 Puffer und Lösungen	38

3.9	Reagenzien	39
3.10	Software	41
3.11	KITs.....	41
3.12	Verbrauchsmaterialien	42
3.13	Zelllinien	42
4	Methoden	45
4.1	Zellkultur	45
4.1.1	Kultivierung und Passagierung	45
4.1.2	Aufbewahrung von Zellen	45
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	46
4.1.4	Ausplattieren der Zellen	46
4.1.5	Transfektion	46
4.1.6	Generierung stabiler Zelllinien	47
4.1.7	Selektion	47
4.2	DNA-Arbeitstechniken	48
4.2.1	DNA-Präparation (Mini-/Maxi-Prep)	48
4.2.2	Restriktionsverdau	49
4.2.3	Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden	49
4.2.4	Agarose-Gel Analyse	49
4.2.5	Gelextraktion	50
4.2.6	Ligation.....	50
4.2.7	cDNA-Synthese.....	51
4.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	51
4.2.9	HIRT-Extraktion und Plasmid-Wiedergewinnungsversuche („Plasmid rescue“).....	51
4.3	Plasmidanreicherung	52
4.3.1	Transformation	52
4.3.2	Ausplattieren der Bakterien.....	53
4.3.3	Über-Nacht Bakterienkulturen.....	53
4.4	Gen- und Proteinexpressionsanalyse.....	53
4.4.1	Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung (FACS).....	53
4.4.2	SDS-Page und Western Blot.....	53
4.4.2.1	Proteinpräparation.....	53
4.4.2.2	Proteindetektion	54
4.4.2.3	Denaturierte SDS-PAGE und Western Blot	54

4.4.3	RNA-Gewinnung.....	56
4.4.4	Quantitative PCR („real-time-PCR“)	56
4.4.5	Mikroskopie.....	57
4.5	Statistik.....	57
5	Ergebnisse	59
5.1	Plasmiderhaltung in EBNA1-exprimierenden Hepatozyten.....	59
5.1.1	Generierung von HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 Zelllinien.....	59
5.1.2	Plasmid-Wiedergewinnungsversuche in HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1	60
5.1.2.1	<i>oriP</i> -Plasmid-Wiedergewinnung.....	61
5.1.2.2	pCON ^{CENP-A} -Plasmid-Wiedergewinnung	64
5.2	Vergleich zweier glukose-abhängiger Promotorelemente.....	71
5.2.1	Das GRE ₃ (L-PK)-BP1 Promotorsystem.....	71
5.2.1.1	Glukose-reagible Induktion des GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP	71
5.2.1.2	Insulin-reagible Repression des GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP	77
5.2.2	Das Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-L-PK Promotorsystem	79
5.2.2.1	Generierung einer HepG2-EBNA1-Enhancer(AldoB)- GRE ₄ (ACC)-L-PK-Insulin Zelllinie	80
5.2.2.2	Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-L-PK getriebene Insulin-mRNA Expression	82
6	Diskussion.....	85
6.1	Episomale Plasmiderhaltung in Hepatozyten	85
6.1.1	Beobachtungen zur Plasmiderhaltung in Hepatozyten	85
6.1.2	Kritische Evaluierung der pCON ^{CENP-A} -Experimente	88
6.1.3	Das EBNA1-Expressionsniveau als möglicher Ansatz zur Optimierung der Plasmiderhaltung	91
6.1.4	Vergleich vorteilhafter Aspekte der beiden episomalen Vektoren pEPito und pCON ^{CENP-A}	92
6.2	Metabolismus gesteuerte Gen-Induktion in Hepatozyten.....	97
6.2.1	Untersuchung der Glukose- und Insulin-Sensitivität des GRE ₃ (L-PK)-BP1	97
6.2.2	Untersuchung der Glukose-Reagibilität des GRE ₄ (ACC)-L-PK	99
6.2.3	Kritische Auseinandersetzung mit Diabetes mellitus Typ 1- Gentherapie	100

7	Ausblick	105
III.	Literaturverzeichnis	VII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	XIX
V.	Danksagung.....	XXI
VI.	Eidesstattliche Versicherung	XXIII

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 Struktur des Proinsulins.....	9
Abb. 2-2 Promotorelemente regulieren die Transkription	13
Abb. 2-3 Transkriptionsregulation des L-PK-Gens durch GRE und ChREBP	14
Abb. 2-4 Vergleich der Glukose-reagiblen Elemente (GRE) der ACC und L-PK.....	16
Abb. 2-5 pCON als Optimierung <i>oriP</i> -basierter Vektorsysteme	23
Abb. 2-6 CENP-A führt zur Ausbildung eines Kinetochor-Komplex.....	26
Abb. 2-7 Der pCON ^{CENP-A} bildet ein Neozentromer und erlaubt eine aktive Segregation..	27
Abb. 2-8 Langzeiterhaltung und Genexpression des pCON ^{CENP-A} in HEK293-EBNA1 Zellen	28
Abb. 5-1 Stabile EBNA-1-Expression in Hepatozyten	60
Abb. 5-2 <i>oriP</i> -Plasmide können aus Hepatozyten für bis zu 4 Wochen wiedergewonnen werden.....	63
Abb. 5-3 pCON ^{CENP-A} -Plasmide können aus Hepatozyten wiedergewonnen werden	66
Abb. 5-4 pCON ^{CENP-A} werden in Hepatozyten über 40 Tage erhalten	68
Abb. 5-5 Verwendete GFP-Expressionskassetten.....	72
Abb. 5-6 Glukose- abhängige Induktion des GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP in Hepatozyten	73
Abb. 5-7 Glukose- und Insulin-Abhängigkeit des GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP in HepG2-EBNA1.....	75
Abb. 5-8 Das GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP-Promotorsystem lässt sich nicht durch Insulin inhibieren.....	78
Abb. 5-9 Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-LPK-Insulin	80
Abb. 5-10 GLUT2-Nachweis in HepG2-EBNA1-Ins Zellen.....	81
Abb. 5-11 Der Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-L-PK erlaubt eine glukose- abhängige Insulin-mRNA-Expression	83

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Die pCON ^{CENP-A} -Erhaltung ist promotorabhängig	29
Tab. 2-2 Die Langzeiterhaltung und Gen-Expression der pCON ^{CENP-A} -Plasmide ist zelltypabhängig	29
Tab. 3-1 In dieser Arbeit verwendete Standards für DNA- und Protein- Gelelektrophorese	33
Tab. 3-2 In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Farbstoffe	33
Tab. 3-3 In dieser Arbeit verwendete Enzyme	34
Tab. 3-4 In dieser Arbeit verwendete Geräte	35
Tab. 3-5 In dieser Arbeit verwendete Organismen	36
Tab. 3-6 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	36
Tab. 3-7 In dieser Arbeit verwendete Plasmide	37
Tab. 3-8 In dieser Arbeit verwendete Reagenzien	39
Tab. 3-9 In dieser Arbeit verwendete Software	41
Tab. 3-10 In dieser Arbeit verwendete KITs	41
Tab. 3-11 In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	42
Tab. 3-12 In dieser Arbeit verwendete Zelllinien	42
Tab. 4-1 Ansatz PEI-Transfektion in einer 6-Loch-Zellkulturplatte	47
Tab. 4-2 Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion	47
Tab. 4-3 Ansatz Restriktionsverdau	49
Tab. 4-4 Ligationsansatz	50
Tab. 4-5 PCR Programm	51
Tab. 4-6 Ansatz 8%iges Polyacrylamid Trenngel	54
Tab. 4-7 Ansatz 4%iges Sammelgel	55
Tab. 4-8 Standard-Reaktionsansatz für qPCR	57
Tab. 5-1 Die Etablierungsphase von <i>oriP</i> -Plasmiden variiert in Hepatozyten	62
Tab. 5-2 Die Etablierungsphase von pCON ^{CENP-A} -Plasmiden ist promotor- und zelltypabhängig	65

1 Zusammenfassung/ Abstract

Als Stoffwechselerkrankung, die im Wesentlichen durch den Mangel eines einzelnen Proteins bestimmt wird, ist Diabetes mellitus Typ 1 ein guter Kandidat für eine gentherapeutische Behandlung. Durch den Untergang der insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen ist eine lebenslange Zufuhr von Insulin erforderlich. Durch verschiedene gentherapeutische Verfahren wird versucht, eine ektopische Expression von Insulin an den Metabolismus zu koppeln, um lebensgefährliche Hypo- und Hyperglykämien zu vermeiden. Die regulierte Langzeitexpression ist eine große Herausforderung, kann aber durch Glukose-sensitive Promotoren erreicht werden. Durch Verwendung der Glukose-reagiblen GRE₄(ACC)-L-PK Insulin-Expressions-kassette wurde in HepG2 Zellen mit zunehmender Glukosekonzentrationen eine signifikante Expressionssteigerung von Insulin-mRNA induziert. Die Insulinproduktion verhält sich somit ähnlich wie die endogene Insulin-Sekretion von gesunden Menschen.

Viele der bis dato verwendeten Gentransfer-Methoden basieren auf integrierenden viralen Vektoren, die jedoch schwerwiegende Mutationen hervorrufen können. Solche Mutationen werden durch nicht-integrierende Vektoren vermieden, allerdings ist die Langzeitstabilität von autonomen Vehikeln eine bisher ungelöste Herausforderung.

Der autonome Genvektor pCON^{CENP-A} ist eine Vektorvariante, die die Hürden der langfristigen extrachromosomalen Erhaltung und stabilen Transgen-Expression überwinden soll. Durch sequenzspezifisches Targeting der Zentromer-spezifischen Histonvariante H3 (CENP-A), wird die Ausbildung eines artifiziellen Zentromers auf dem Genvektor induziert. Das pCON^{CENP-A}-Plasmid besitzt so die Fähigkeit einen funktionellen Kinetochorkomplex auszubilden und Mikrotubuli am Plasmid anzulagern. Durch diese Ausbildung eines Neozentromers verhält es sich wie ein „Quasi-Chromosom“ und wird über viele Zellgenerationen extrachromosomal erhalten. Wir konnten zeigen, dass dieser Mechanismus den pCON^{CENP-A}-Vektor für mindestens 20 Wochen in HEK293-EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) Zellen stabil erhält. Wir verifizierten die Ergebnisse in den EBV-positiven nasopharyngeal Zellen D98/HR1 und in der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa. In beiden Zelllinien ermittelten wir vergleichbare Gesamtergebnisse, jedoch mit einer geringeren mittleren Kopienzahl pro Zelle erhaltenen Plasmiden (unveröffentlichte Daten).

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde das pCON^{CENP-A}-Vektorsystem erstmals in Hepatozyten getestet, die sich aufgrund der ähnlichen Stoffwechseleigenschaften zu

pankreatischen β -Zellen als mögliches Ziel für eine gentherapeutische Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 eignen. Zunächst erfolgte die Generierung EBNA1-exprimierender HUH7 und HepG2 Zelllinien, um die Replikation des Vektors pCON^{CENP-A} zu gewährleisten. Die episomale Erhaltung der pCON^{CENP-A}-Plasmide konnte in diesen Zelllinien für 40 bzw. 54 Tage verifiziert werden. Somit konnte eine generelle Funktionalität des pCON^{CENP-A}-Systems in Hepatozyten bestätigt werden. Der Mechanismus, der zur effizienten Langzeitetablierung der pCON^{CENP-A}-Plasmide in den jeweiligen Zelllinien führt, muss jedoch noch eingehender untersucht und für Hepatozytenlinien optimiert werden.

Gelingt die Langzeitetablierung des pCON^{CENP-A} in primären Hepatozyten wäre durch die Kombination mit der Glukose-reagiblen Insulinexpression eine aussichtsreiche Grundlage für eine mögliche gentherapeutische Langzeitbehandlung von Diabetes mellitus Typ 1 geschaffen.

Abstract

As a disease with a single-protein deficiency, diabetes type 1 is a logical target for gene therapy. Due to destruction of the insulin-producing pancreatic β -cells, a life-long insulin administration is required. To avoid life threatening periods of hypo- or hyperglycemia, it is necessary to link the ectopic insulin production to the metabolic demand. This however, is still challenging, but can be overcome by the use of glucose-responsive promoters. Using the glucose-responsive GRE₄(ACC)-L-PK insulin expression system led to a significant increase of insulin mRNA expression within HepG2 cells, according to rising concentrations of glucose.

Up to date most of the gene transfer methods are based on integrating viral vectors which, however, carry the risk for severe mutations. The use of non-integrating vectors is challenging with respect to the long-term stability but prevents such mutations.

The autonomous pCON^{CENP-A} vector system is a promising tool to achieve the goal of long-term extrachromosomal maintenance and stable transgene-expression. Sequence-specific targeting of the centromere-specific histone H3 variant (CENP-A) leads to the assembly of an artificial centromere on the gene vector. The pCON^{CENP-A} plasmid is capable to form a functional kinetochore complex and attach microtubule to the vector. Due to the formation of this neocentromere, the pCON^{CENP-A} behaves like a „quasi-chromosome“, and is maintained extrachromosomally over many cell cycles. We were

able to demonstrate that the vector is stably maintained for at least 20 weeks in HEK293-EBNA1. We verified these results in EBV-positive D98/HR1 and HeLa cells, however plasmid copy number per cell is much lower compared to HEK293 (unpublished data).

As part of this thesis the pCON^{CENP-A} plasmid was tested for the first time in hepatocytes. The glucose-sensing mechanism of hepatocytes and pancreatic β -cells is similar, which makes them a good candidate for the gene therapy treatment of diabetes type 1. EBNA1-expressing HUH7 and HepG2 cell lines were generated to ensure pCON^{CENP-A} replication. In both cell lines episomal vector maintenance were verified for 40 to 50 days respectively. These results prove the functionality of the pCON^{CENP-A} in hepatocytes. However, the mechanism leading to an efficient long-term establishment of the pCON^{CENP-A} plasmids requires further investigation and needs to be optimized for each cell line.

If the pCON^{CENP-A} can be long-term maintained in primary hepatocytes, we expect the most promising future development for gene therapy of diabetes type 1, by combining the pCON^{CENP-A} with the glucose-responsive insulin expression.

2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit umfasst eine Machbarkeitsstudie der Anwendbarkeit des pCON^{CENP-A}-Vektorsystems zur gentherapeutischen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 in humanen Zelllinien. Im Folgenden möchte ich zum besseren Verständnis auf die Themen Diabetes mellitus Typ 1, Gentherapie im Allgemeinen und dafür zur Verfügung stehende Vektorsysteme im Speziellen eingehen.

2.1 Diabetes mellitus

Mit Diabetes mellitus bezeichnet man eine heterogene Gruppe der häufigsten Stoffwechselerkrankungen weltweit, deren gemeinsames Kennzeichen eine chronische Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglykämie) ist. Dies beruht entweder auf einer Störung in der Insulin-Sekretion, dem Insulin-Effekt oder einer Kombination aus beidem.

Hauptsymptome aller Formen sind zunächst Polydipsie, das pathologisch gesteigerte Durstgefühl, und Polyurie, die krankhaft erhöhte Urinausscheidung. Überschreitet die Blutglukosekonzentration die Nierenschwelle kommt es aufgrund einer osmotischen Diurese zur Glukosurie, dem Ausscheiden von Glukose im Urin. Dieses Phänomen verschaffte der Erkrankung schon in der Antike ihren Namen, der „honigsüßer Durchfluss“ bedeutet.

Es wird zwischen mehreren Typen unterschieden, wobei Diabetes mellitus Typ 2 mit etwa 90% aller Diabetes Erkrankungen die häufigste Variante ist. Während sich dieser Typ in der Regel im mittleren Lebensalter manifestiert, tritt Diabetes mellitus Typ 1, der etwa 5% der Fälle ausmacht, bereits im Kindes- und Jugendalter auf.

Beim Typ 1 kommt es zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse (griech./ med. Pankreas), woraus langfristig ein absoluter Mangel dieses den Blutzucker regulierenden Hormons resultiert. Dahingegen hat der im Volksmund als „Zuckerkrankheit“ bekannte Diabetes mellitus Typ 2 sowohl eine starke genetische Komponente, ist aber auch mit der Überernährung und dem metabolischen Syndrom vergesellschaftet. Hier führt eine gestörte Wirkung des Insulins an den Körperzellen (Insulinresistenz) zu einer zunächst kompensatorisch erhöhten und im Verlauf verminderten Insulinsekretion aus den morphologisch intakten β -Zellen. Neben der Insulinresistenz sind eine abdominelle Fettleibigkeit, Bluthochdruck und

Fettstoffwechselstörungen Faktoren des metabolischen Syndroms. Aus den verschiedenen Pathomechanismen der Diabetes Subtypen resultiert in beiden Fällen die Hyperglykämie (Himsworth, 1940).

Weiter werden verschiedene Typen differenziert, die nicht den oben genannten Klassen zugeordnet werden können. Dazu gehört zum Beispiel der Gestationsdiabetes oder medikamenten- beziehungsweise infektionsinduzierte Diabetesformen.

Gefürchtet sind neben akuten Blutzuckerentgleisungen vor allem die Langzeitwirkungen der dauerhaft erhöhten Blutglukosekonzentration wie die Mikro- und Makroangiopathie. Diese führen mitunter zu schwerwiegenden Organschädigungen insbesondere von Herz-, Kreislauf-, Augen-, Nieren- und Nervensystem (Herold, 2017).

Therapeutisch steht neben der Reduktion weiterer Risikofaktoren für das Herz-Kreislauf-System vor allem die Normalisierung des Glukosestoffwechsels im Vordergrund. Aufgrund der längeren Erkrankungsdauer spielt dies insbesondere bei Typ 1 Diabetikern eine enorme Rolle. In den folgenden Kapiteln erfolgt eine detaillierte Beschreibung dieser Erkrankung.

2.1.1 Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 Patienten haben in der Regel und im Gegensatz zu den häufig adipösen Typ 2 Diabetikern einen asthenischen Körperbau. Aufgrund der Unfähigkeit des Körpers, ausreichend Insulin zu produzieren, haben die Patienten eine labile Stoffwechsellage mit starker Neigung zur Ketonkörperbildung. Resultierend aus der nicht-verwertbaren Glukose und der enthemmten Lipolyse muss der Körper zur Energiebereitstellung auf die Fettreserven zurückgreifen. In den Mitochondrien der Leber kommt es beim Abbau dieser zur Bildung von Acetessigsäure, β -Hydroxybuttersäure und Aceton (Prisco, Picardi et al., 2006). Die daraus potentiell resultierende Ketoazidose ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen des Typ 1 Diabetes und kann im lebensgefährlichen *Coma diabeticum* - dem diabetischen hyperglykämischen Koma - enden, das sofortiger intensivmedizinischer Betreuung bedarf. Aufgrund des frühen Erkrankungsalters sind allerdings auch Spätkomplikationen wie diabetesassoziierter Retino-, Nephro-, Angio- und Polyneuropathie von großer Relevanz, da sich bereits ab dem fünften Erkrankungsjahr deutliche Pathologien abzeichnen können. Klinisch manifest wird der Typ 1 Diabetes mellitus, wenn die Anzahl an β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas auf unter 20 % vermindert

sind. Ab diesem Zeitpunkt ist eine rasche Progredienz der Erkrankung zu beobachten (Herold, 2017).

2.1.1.1 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1

Die Pathogenese der Erkrankung konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden und beruht wahrscheinlich auf einer Vielzahl von Ursachen, wie zum Beispiel einer Fehlsteuerung des Immunsystems, erblicher Veranlagung oder Infektionen.

Klinisch symptomatisch wird Diabetes mellitus Typ 1 ab einer Destruktion von etwa 80% der pankreatischen β -Zellen, allerdings geht diesem zum Teil eine stille Krankheitsphase von Monaten bis Jahren voraus. Man konnte zeigen, dass es in Abhängigkeit der Dauer der Erkrankung zu einem β -Zellverlust von 60 - 100 % kommt. Allerdings sind auch funktionelle Defizite in der Insulinproduktion möglich, zum Beispiel in der glukoseabhängigen Sekretion oder einer verzögerten Konversion von Proinsulin zu Insulin (siehe Abschnitt 2.1.2).

Bei der Mehrzahl der Patienten lassen sich Autoantikörper detektieren, deren Nachweis für eine Autoimmuninsulinitis spricht. Bisher sind mehrere T-Zell-spezifische β -Zell-Antigene detektiert worden (Pociot, Akolkar et al., 2010). Die Autoimmunität wird vermutlich durch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Subtypen vermittelt. Das Auftreten der Autoantikörper wird vermehrt im Anschluss an Virusinfektionen beobachtet (Filippi & von Herrath, 2008, Lieberman & DiLorenzo, 2003, Santamaria, 2010, Tsai, Shameli et al., 2008).

Es gibt jedoch auch Subtypen des Diabetes mellitus Typ 1, bei denen sich keine Autoantikörper detektieren lassen. Neben der immunologischen Pathogenese gilt insbesondere eine prädisponierende Rolle durch genetische Faktoren als gesichert. 20 % der Erkrankten haben eine positive Familienanamnese für Diabetes Typ 1. Hier scheint der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und die HLA-Merkmale (Human Leukocyte Antigen) DR3 und/ oder DR4 eine entscheidende Rolle zu spielen (Herold, 2017, Pociot, Akolkar et al., 2010).

Allerdings werden aufgrund von Beobachtungsstudien auch nicht-genetische Variablen für die Pathogenese der Erkrankung angenommen. So wurde eine Inzidenzerhöhung bei Personen, die von Indien nach Großbritannien migrierten, beobachtet, welches den Einfluss von Umweltfaktoren nahe legt (Bodansky, Staines et

al., 1992). Ebenso weist die unterschiedliche Penetranz bei monozygoten Zwillingen auf eben solche Einflüsse hin (Redondo, Jeffrey et al., 2008).

Die sinkende Zahl an Infektionen in Industrieländern und die steigende Inzidenz in diesen Nationen für allergische- und autoimmune Erkrankungen – wie Diabetes mellitus Typ 1 – wird mitunter mit der Hygiene Hypothese erklärt. Bei dieser wird von einer mangelnden Entwicklung von TGF- β - und IL-10-produzierenden regulatorische T-Zellen ausgegangen. Beide haben potentiell die Fähigkeit, die angeborene und erworbene Immunantwort abzuwenden, und somit eine Inselzellentzündung und dem damit einhergehenden Untergang an β -Zellen zu vermeiden (Kamradt, Goggel et al., 2005, Kondrashova, Seiskari et al., 2013, Strachan, 1989).

Da die Synthese, Speicherung und Sekretion von Insulin maßgeblich von Zink abhängig ist, ist eine weitere These, dass auch eine gestörte Homöostase dieser Ionen die β -Zellfunktion und den Insulin-Metabolismus beeinflussen kann (Li, 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz bis dato nicht eindeutig geklärtem Pathomechanismus der resultierende Insulinmangel entscheidend ist und Therapie bedarf.

2.1.2 Das Hormon Insulin

Insulin ist ein anaboles Proteohormon und wird physiologisch bei erhöhter Blutzuckerkonzentration sekretiert. Dies geschieht über die Bindung von Glukose an spezifische Glukosetransporter (GLUT 1-3) und einer daraus resultierenden kaliumabhängigen Depolarisation der β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas. Insulin selbst ermöglicht eine Senkung der Blutglukosekonzentration durch Aufnahme von Glukose in die Zielzellen.

Translatiert wird es zunächst als das aus 110 Aminosäuren (AS) bestehende Präproinsulin an den Ribosomen direkt in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER). Es besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer 30 AS langen B-Kette (β -Kette), der C-Verbindungskette mit 31 AS (C-Peptid) und der A-Kette (α -Kette) mit 21 Aminosäuren. Im ER kommt es zur Ausbildung von drei Disulfidbrücken: zwei intermolekulare zwischen den A- und B-Ketten und einer intramolekularen Brücke innerhalb des A-Peptids. Durch die Abspaltung der Signalsequenz entsteht dann das Proinsulin mit 84 AS (Abb. 2-1), welches in spezifischen Vesikeln aus dem ER exportiert und im Golgi-Apparat aufgenommen wird

(Fang, Liu et al., 2015). Hier stehen zwei spezifische Peptidasen (Proprotein-Convertase 1 und 2) zur Verfügung, um vor der Speicherung des reifen Insulins das C-Peptid abzuspalten.

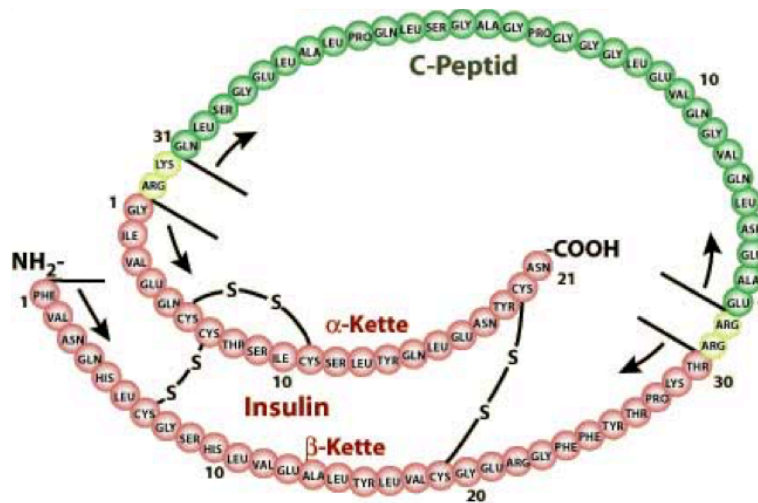


Abb. 2-1 Struktur des Proinsulins

Schematische Darstellung der Struktur des Proinsulins. Die durch zwei Disulfidbrücken verbundenen α-Kette und β-Kette sind mit ihrer Aminosäuresequenz rot dargestellt. Die α-Kette verfügt zudem über eine intramolekulare Disulfidbrücke. Das C-Peptid ist grün dargestellt. Nach der Abspaltung des C-Peptids im Golgi-Apparat durch spezifische Peptidasen an den durch Pfeile markierten Stellen entsteht das rot dargestellte reife Insulin (aus https://landarzt.files.wordpress.com/2007/11/insulin_struktur.jpg - geöffnet am 15.12.2017, 00:46 Uhr).

An Zink und Calcium-Ionen gekoppelt kommt es zur Aggregation von Hexameren in sauren Vesikeln, die sich durch Exozytose in den Blutkreislauf entleeren können. Ab einer Blutglukosekonzentration von 5 mM erfolgt die oszillierende Sekretion (Li, 2014). Der Mechanismus der glukoseinduzierten Sekretion beruht auf einer ATP-abhängigen Hemmung des Kalium-Kanals, der daraus resultierenden Depolarisation der Zellmembran und Öffnung von Kalzium-Kanälen, welches zur Exozytose der gespeicherten Granula führt.

Ebenso haben die Peptidhormone Sekretin, Gastrin, Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid (GIP) und Glucagon-like-Peptid 1 (GLP-1) die Fähigkeit, die β-Zellen zur Insulinsekretion anzuregen.

Im extrazellulären Milieu (pH7,4) dissoziiert das Insulin von den Zink-Ionen und kann als Monomer seine physiologische Rolle erfüllen (Gold & Grodsky, 1984). Im Blut beträgt die Halbwertszeit des Insulins etwa acht Minuten (Poy, Yang et al., 2002). Nach Endozytose des Insulin-Rezeptor-Komplexes in den Zielzellen erfolgt der Abbau in deren Lysosomen.

Die Entdeckung des Insulins durch Banting und Best im Jahre 1921 und der bald im Anschluss möglichen industriellen Produktion stellte die Grundlage für die erste Diabetes mellitus spezifische Therapie dar (Banting & Best, 2007). Allerdings gelang erst mit der Fähigkeit zur gentechnischen Herstellung von Humaninsulin im Jahr 1982 der wirkliche Durchbruch in der Behandlung des großen diabetischen Patientenkollektivs.

2.1.3 Schwierigkeiten der Langzeittherapie des Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 beruht auf dem Untergang insulinproduzierender pankreatischer β -Zellen. Dies führt im Laufe der Zeit zu einem absoluten Insulinmangel und kann nur durch Zugabe dieses lebenswichtigen Hormons therapiert werden.

Trotz der Entwicklung synthetischer Insuline mit unterschiedlichem Wirkspektrum und kontinuierlichen Patientenschulungen gelingt die optimale Blutzuckereinstellung bei Typ 1 Diabetikern oft nur unzureichend. Die benötigte Insulinzufuhr muss nahrungsadaptiert subkutan appliziert werden. Neben ausreichend kognitiven Fähigkeiten bedarf es aber auch einer lebenslang hohen Compliance, also einer guten Therapietreue, um gefährliche Hypo- und Hyperglykämien zu vermeiden. Gerade letzteres gestaltet sich oft schwierig und führt zum Teil zu nur unbefriedigenden Therapieergebnissen. Im Hinblick auf die Langzeitnebenwirkung der Erkrankung sind daher dringend neue Therapieoptionen gefragt.

Durch die Etablierung der Insulinpumpentherapie kann für geeignete Patienten eine Besserung therapeutisch relevanter Faktoren wie Auftrittshäufigkeiten von Hypoglykämien und diabetischer Ketoazidosen und einer Verringerung der benötigten Insulindosen erreicht werden. Der durchschnittliche Blutglukosewert von Kindern mit Insulinpumpentherapie in Langzeitstudien liegt jedoch weiterhin deutlich über dem gesunder Kinder (Johnson, Cooper et al., 2013).

Neben der Pankreas-Transplantation besteht durch die Etablierung des Edmonton-Protokolls auch die Möglichkeit einer isolierten Inselzell-Transplantation (Shapiro, Lakey

et al., 2000, Shapiro, Ricordi et al., 2006). Aufgrund des allgemeinen Organmangels stehen diese Therapien jedoch nur für eine begrenzte Anzahl an Patienten zur Verfügung und sind zum Teil mit gravierenden Komplikationen verbunden (Vrochides, Paraskevas et al., 2009). Auch die lebenslang notwendige Immun-suppression geht mit vielen Einschränkungen einher.

Eine endogene, an den Metabolismus angepasste, Insulinproduktion wäre in vielerlei Hinsicht ein Lichtblick in der zukünftigen Therapie von Diabetes mellitus Typ 1.

2.1.4 Stand der aktuellen Forschung zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 1

Wie zuvor beschrieben, scheint die ausgeprägte Immunantwort in virusinfizierten β -Zellen zu deren Destruktion zu führen. Da insbesondere einige der zu den Enteroviren gehörenden Cocksackievirus-Typen eine große Rolle zu spielen scheinen, wird derzeit an einem Impfstoff geforscht, der die Immunantwort neutralisieren soll. Larsson *et al.* haben kürzlich gezeigt, dass die Impfung von nicht-adipösen diabetischen Mäusen (NOD) mit formalinfixiertem Cocksackievirus B1 Serotyp (CVB1) zu einer effektiven Antikörperproduktion führt und sowohl die Virusreplikation hemmen als auch das Auftreten von Diabetes Typ 1 in diesen Mäusen mindern (Larsson, Lakshmikanth et al., 2015). NOD-Mäuse sind ein etabliertes Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1, da sie die den autoimmunen, insulinabhängigen Diabetes spontan entwickeln können (Delovitch & Singh, 1997).

Ebenso stehen antivirale Medikamente, die allerdings derzeit noch nicht für den Einsatz bei Enterovirus-Infektionen zugelassen sind, zur potentiellen Reduktion der Immunantwort bereit.

Aufgrund des gemeinsamen endodermalen Ursprungs von Leber und Pankreas wurde bereits der Versuch unternommen Lebergewebe zu Pankreasgewebe zu transdifferenzieren. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass dies in Abhängigkeit von β -Zell-Transkriptionsfaktoren geschieht (Ber, Shternhall et al., 2003, Gefen-Halevi, Rachmut et al., 2010). Ferber *et al.* gelang es in diabetischen Mäusen für acht Tage normoglykämische Zustände herzustellen, die Transdifferenzierung hatte jedoch eine Hepatitis zur Folge (Ferber, Halkin et al., 2000, Ren, Tao et al., 2016).

In der Wissenschaft stehen verschiedenste Konzepte zur möglichen Behandlung der Erkrankung bereit, die bisher jedoch noch keinen Einzug in klinische Studien geschafft haben. 2013 gelang es Forschern in Diabetes-induzierten Beagles durch Transgen-

Coexpression von Insulin und Glukokinase im Skelettmuskel eine deutliche Reduktion der Langzeit-Blutglukosekonzentration zu erreichen (Callejas, Mann et al., 2013). In einem weiteren vielversprechender Ansatz wird versucht, eine gentherapeutisch induzierte Insulinproduktion an den körpereigenen Metabolismus zu koppeln (Olson, Paveglio et al., 2003, Thule, Liu et al., 2000, Zhang, Jia et al., 2009, Zhang & Dong, 2015). Dies soll durch das Einbringen von Expressionskassetten in den Organismus geschehen, die durch einen zelltypspezifischen glukose- und insulinsensitiven Promotor getrieben werden. Dieser Ansatz wird im Zuge dieser Arbeit aufgegriffen und in den folgenden Kapiteln detaillierter beschrieben.

2.2 Promotorelemente - die zentrale Steuerung der Genexpression

Um die Menge an einem bestimmten Protein zu regulieren stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Am energieeffizientesten für die Zelle ist eine Regulation auf Transkriptionsebene. Wie oft eine codierende DNA-Sequenz (Gen) abgelesen wird, ist abhängig von der Aktivität des vorgeschalteten Promotors.

Die Initiation der Transkription geschieht durch Bindung allgemeiner Transkriptionsfaktoren an basale Promotorelemente, wie der TATA-Box. Anschließend erfolgt die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und die Synthese einer RNA-Kopie des DNA-Matrizenstranges. Über die allgemeinen Transkriptionsfaktoren wird nur eine sehr schwache Transkriptionsrate vermittelt. Weiter proximal oder distal vom Startpunkt gelegene Promotorelemente wie Enhancer, Silencer und regulatorische Elemente besitzen die Fähigkeit, die Transkriptionsrate durch Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren zu modulieren (Abb. 2-2). Dies gelingt ihnen, indem sie die große Distanz zum Basalpromotor durch DNA-Schleifenbildung überwinden und dann die Bindungsaffinität der RNA-Polymerase II regulieren. Spezifische Transkriptionsfaktoren werden meist auf ein bestimmtes Wachstums- oder hormonelles Signal hin gewebe- oder zelltypspezifisch synthetisiert oder aktiviert. Sie erlauben so eine metabolismusgekoppelte Genexpression (Rassow, Hauser et al., 2016).

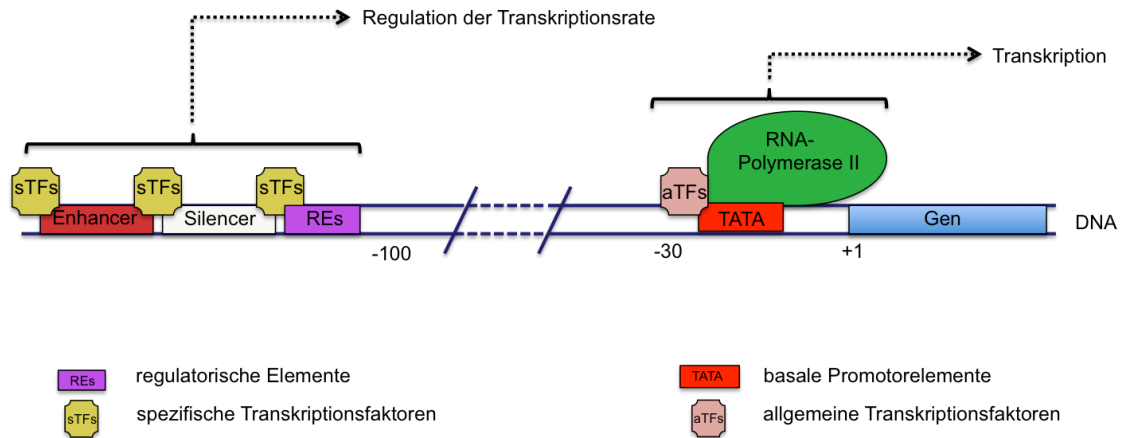


Abb. 2-2 Promotorelemente regulieren die Transkription

Schematische Darstellung, wie die Transkription in Eukaryoten durch verschiedene Promotorelemente reguliert werden kann.

Manche Enhancer scheinen bestimmte Basalpromotoren zu präferieren, zum Beispiel in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Motiven wie der TATA-Box (Butler & Kadonaga, 2001). Diese Selektivität der Promotoren und Enhancer nutzt man in der Gentherapie, um das therapeutische Gen in physiologisch relevanten Mengen zu exprimieren. Es ist elementar, die gewünschte Transgen-Expression gezielt und bei bestimmten Therapien eventuell nur temporär zu gestalten. Dies kann durch den Einsatz von induzierbaren Expressionssystemen und/oder gewebespezifischen Promotoren gelingen (Bigger, Tolmachov et al., 2001, Bortesi, Rademacher et al., 2012, Geyer, Green et al., 1990).

Für die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen sind gewebsspezifische Promotoren Mittel der Wahl, um eine ubiquitäre Expression zu vermeiden. Die Verwendung von endogenen Promotoren limitiert die Transgen-Expression zudem auf ein physiologisches Level (Gill, Pringle et al., 2009). Im folgenden Abschnitt wird auf Promotor-basierte Möglichkeiten für eine Typ 1 Diabetes Therapie eingegangen.

2.2.1 Glukose-reagible Insulinproduktion als Therapieansatz

Für die erfolgreiche Therapie von Diabetes mellitus Typ 1 ist es wünschenswert, die Insulinproduktion an den körpereigenen Metabolismus zu koppeln, um lebensbedrohliche Zustände von Hyper- und Hypoglykämien zu vermeiden.

Es ist bekannt, dass Glukose und Insulin den Stoffwechsel auf verschiedenste Arten beeinflussen können, indem sie die Transkription von Genen herauf- oder herunter regulieren. Im Laufe der Jahre sind einige Promotorelemente von Stoffwechsell-enzymen erforscht worden, auf die Glukose oder Insulin Einfluss nehmen können.

Eine der ersten Regionen im Fokus war das Kohlenhydrat-reagible Element (ChRE) der leberspezifischen L-Typ Pyruvatkinase (L-PK), einem Schlüsselenzym im Glukosestoffwechsel. Die Elemente L-II und L-III des ChRE der L-PK, die der TATA-Box des Promotors vorgeschaltet sind, kooperieren eng miteinander. Insbesondere die durch fünf Basenpaare getrennten palindromischen E-box Sequenzen (5'-C[C/A]CG[G/T]G-3') innerhalb von L-III, scheinen die Elemente zu sein, die bei hohen Glukosespiegeln regulierend wirken (Bergot, Diaz-Guerra et al., 1992, Diaz Guerra, Bergot et al., 1993, Thompson & Towle, 1991, Yamada, Tanaka et al., 1999, Yamashita, Takenoshita et al., 2001). Übersichtshalber wird ChRE im weiteren Verlauf der Arbeit GRE (Glukose-reagibles Element) genannt.

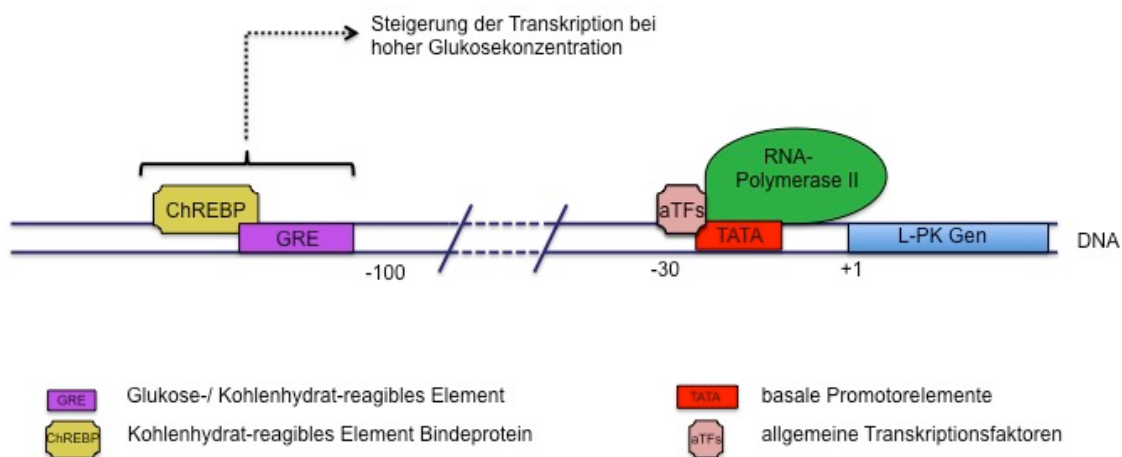


Abb. 2-3 Transkriptionsregulation des L-PK-Gens durch GRE und ChREBP

Schematische Darstellung, wie die Transkription des L-PK-Gens durch GRE reguliert werden kann. Bei hoher Glukosekonzentration erfolgt die Translokation des spezifischen Transkriptionsfaktors ChREBP vom Zytosol in den Zellkern, wo es an das distale Promotorelement GRE der L-PK binden kann. Nach DNA-Schleifenbildung wird dann die Transkriptionsrate des Basalpromotors verstärkt.

Die Transkriptionsregulation des L-PK-Gens erfolgt durch Bindung eines spezifischen Transkriptionsfaktors, dem Kohlenhydrat-reagibles Element Bindeprotein (ChREBP) an das ChRE/GRE (Abb. 2-3). Phosphoryliertes ChREBP wird aktiv aus dem Zellkern

transportiert, wo es an 14-3-3-Proteine gebunden in inaktiver Form gelagert wird. Beim Glukoseabbau kommt es zur Akkumulation von Xylose-5-Phosphat, welches die Protein Phosphatase 2A (PP2A) stimuliert. Die daraus resultierende Dephosphorylierung von ChREBP ermöglicht eine erneute Translokation des etwa 100 kDA großen spezifischen Transkriptionsfaktors zurück in den Zellkern. Dort dimerisiert ChREBP mit dem Max-like Protein X (Mix) und kann so an dem ChRE/GRE-Enhancer des L-PK Promoters binden (Uyeda & Repa, 2006).

Mittlerweile wurden solche GRE in den Promotoren vieler glukoseabhängiger Gene detektiert, beispielweise der Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und der Fettsäuren-Synthetase, sowie innerhalb des S14 Gens (O'Callaghan, Koo et al., 2001, Rufo, Teran-Garcia et al., 2001, Shih & Towle, 1994). Mithilfe von ChREBP wird die Transkription der Gene in Anwesenheit von Glukose stimuliert und durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reprimiert.

Die mehrstufige Synthese des Humaninsulins stellte zu Beginn der gentherapeutischen Experimente zur Behandlung von Diabetes Typ 1 eine Herausforderung dar. Eines der Hauptprobleme war, dass nur wenige Zellen im menschlichen Körper die Fähigkeit zur Abspaltung des C-Peptids des Proinsulins besitzen. Groskreutz *et al.* konnten dieses Problem im Jahr 1994 durch eine Mutagenese der humanen Proinsulin-cDNA lösen. Sie führten die Arginin-X-Lysin-Arginin Schnittsequenzen der ubiquitären Endoprotease Furin zwischen die B-C und C-A-Verbindungsstellen des Prohormons ein und ermöglichten so die Insulin-Prozessierung auch in Nicht-Betazellen (Groskreutz, Sliwowski et al., 1994).

Einen großen Vorstoß im Hinblick auf die Gentherapie von Diabetes Typ 1 machten im Jahr 2000 Thulé *et al.*, indem sie verschiedene wichtigen Puzzleteile zusammenfügten. Sie kombinierten die Furin-spaltbare humane Proinsulin-cDNA mit einem Trimer des stimulierenden GRE der L-PK und dem Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) Promotor der Ratte (Thule et al., 2000). IGFBP-1 ist ebenfalls leberspezifisch und wird durch Insulin inhibiert. Die Hemmung erfolgt über einen Insulin-reagiblen hormonempfindlichen Bereich innerhalb des Promotors. Sie konnten zeigen, dass die Verwendung von GRE-Multimeren großen Einfluss sowohl auf die Expressionsstärke des Insulins, als auch auf die Glukose-Reagibilität der Expressionskassette hat. Durch Einbringen dieses Genkonstrukts gelang es, primäre Hepatozyten der Ratte zu befähigen, Insulin in einem Regelkreis in Abhängigkeit von Glukose und mit negativem Feedback durch Insulin zu synthetisieren. In diesem Zusammenhang wird von hepatischer Insulin-Gentherapie gesprochen (HIGT) (Thule

et al., 2000). Die Funktionalität des Systems verifizierten sie in Ratten *in vivo*. Zunächst induzierten sie einen Diabetes mellitus mittels Streptozocin (STZ) in den Ratten. Streptozocin ist eine natürlich vorkommende Substanz aus dem Bodenbakterium *Streptomyces achromogenes*, welches spezifisch toxisch auf die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas wirkt. Als Glukose-Analogon gelangt es über den GLUT-2 Transporter in das Zytosol der β -Zellen, akkumuliert dort und wirkt zytotoxisch durch DNA Alkylierung (Lenzen, 2008). Thulé und Liu injizierten den rekombinanten Adenovirus Vektor durch die Portalvene in die Leber von 8 Tieren. Die Injektion hatte eine Normalisierung der Blutglukose für 50 Tage ohne das Auftreten von Hyperglykämien zur Folge (Thule & Liu, 2000). Diese Kriterien gelten als vielversprechend in Tierversuchen zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 1.

Für den Gentransfer benutzte die Arbeitsgruppe einen adenoviralen Vektor. Es konnte zuvor schon mehrfach gezeigt werden, dass die Nutzung eines adenoviralen Vektors zu einer hepatischen Gentransfer-Effizienz von über 90 % führt (Short, Okada et al., 1998, Wang, Greenburg et al., 1997). Trotz der erfolgreichen regulierten Transgen-Expression war das genutzte Vektorsystem limitierend für dauerhafte Therapieoptionen (Thule & Liu, 2000) (siehe Abschnitt 2.3.1).

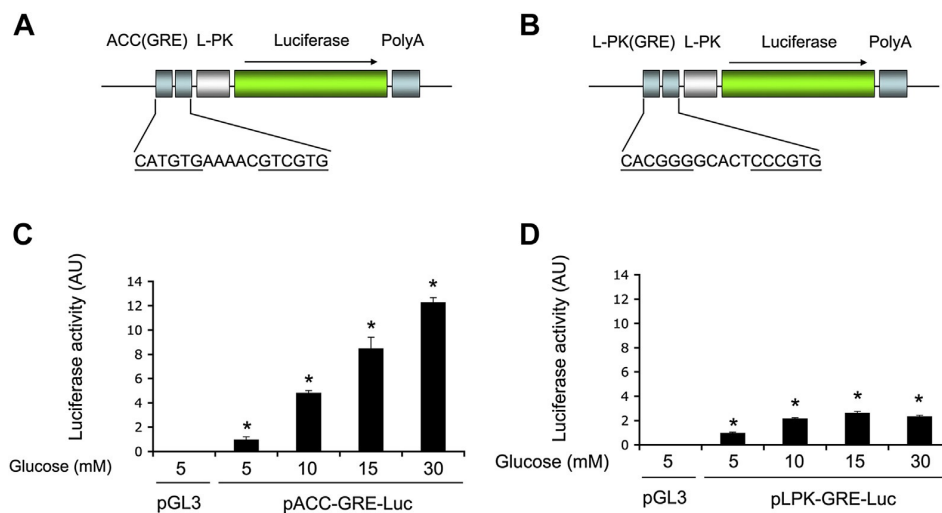


Abb. 2-4 Vergleich der Glukose-reagiblen Elemente (GRE) der ACC und L-PK

Die Glucose-reagiblen Elemente (GRE) der ACC und L-PK beeinflussen die Glukose-Induzierbarkeit des minimalen L-PK Promotors. Das **(A)** GRE vom ACC Promotor (-126/ -102 nt) und das **(B)** GRE vom L-PK Promotor (-171/ -147 nt) wurden dem durch den minimalen L-PK Promotor (-40/ +1 nt) getriebenen Luciferase Reportersystem vorgelagert kloniert. Um die Transfektionseffizienz zu

normalisieren wurde ein β -Galaktosidase-exprimierender Vektor ko-transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde im Verhältnis zur β -Galaktosidase-Aktivität in HepG2 Zellen definiert. **C** zeigt die mittlere Luciferase-Aktivität mit ACC-GRE, **D** die mittlere Luciferase-Aktivität mit L-PK-GRE in je vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0.001$ (Zhang & Dong, 2015).

Zhang et. al. entwickelten die Expressionskassette im Jahr 2015 weiter, indem sie die modifizierte humane Proinsulin cDNA mit stärkeren Promotorelementen kombinierten. Sie wählten den minimalen L-PK Promotor und koppelten ihn mit einem Tetramer der Glukose-reagiblen Elemente der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), welches in Abhängigkeit des Glukosemetabolismus synthetisiert wird (Zhang & Dong, 2015). Sie konnten zeigen, dass das ACC-GRE (Abb. 2-4 A) zu einer 3-4-fach erhöhten glukoseabhängigen Transgen Expression führt, als das von Thulé *et al.* verwendete L-PK-GRE (Abbildung 2-4 B, C, D). Zur weiteren Verstärkung der Insulin-Expression schalteten sie dem Genkonstrukt noch den Enhancer des Aldolase-B Gens vor, das für ein Enzym der Glykolyse codiert. Sie konnten die Zellen zur Synthese und Sekretion von reifem Insulin anregen, welches im Zellüberstand detektierbar war. Im weiteren Verlauf testeten Zhang und Dong das Insulin-Expressionssystem im Mausmodell. Hierzu generierten sie STZ-induzierte diabetische CD1-Mäuse, denen sie das Transgen im adenoviralen Vektor injizierten. Dadurch konnten Sie für ungefähr einen Monat die Remission des STZ-induzierten Diabetes erzielen. Es konnten signifikant höhere Plasma-Insulinspiegel und verbesserte Blutglukose-Spiegel gemessen werden, auch ohne das Auftreten von Hypoglykämien beim Fasten.

Die Gruppe verifizierte ihre Ergebnisse in NOD-Mäusen (Zhang & Dong, 2015). Wie jedoch schon bei Thulé *et al.*, ist die Wahl der Transgen Überbringung mittels replikationsdefizienten Adenoviren das Ausschlusskriterium für eine Dauertherapie. Für die vorgestellten HIGT-Systeme steht aktuell noch kein geeigneter Transsportweg in die Zielzellen bereit. Anforderungen an geeignete Transportsysteme für die Gentherapie werden im Folgenden näher erläutert.

2.3 Gentherapie

Mit dem Abschluss des Humangenomprojekts im Jahr 2003 ist die gesamte Sequenz des menschlichen Genoms bekannt. Die daraus hervorgehende Zuordnung vieler Gene konnte einen großen Beitrag zum Verständnis des Ursprungs bestimmter

Krankheiten und neuer Therapiemöglichkeiten liefern. So konnten Krankheiten, die auf die Fehlfunktion eines einzelnen Proteins zurückzuführen sind, als sinnvolles Ziel für den Einsatz von gentherapeutischen Behandlungsoptionen identifiziert werden. Aus diesem Grund ist die Weiterentwicklung der Gentransfersysteme von großer Relevanz.

2.3.1 Genvektoren

An einen, bis dato noch nicht generierten, „idealen“ Genvektor werden eine Reihe von Anforderungen gestellt. Er sollte langfristig in den Zielzellen ohne Selektionsdruck mit einer stabilen Kopienzahl erhalten werden. Zu diesem Zweck muss eine stabile Replikation und Segregation gewährleistet sein. Er muss zudem die Kapazität für das Einbringen des Gens von Interesse haben und zu einer stabilen Genexpression führen. Zusätzlich ist eine sichere Applikationsmöglichkeit entscheidend. Ein „idealer“ Genvektor sollte außerdem nicht in das Wirtsgenom integrieren. In den folgenden Abschnitten werden diese Anforderungen näher erläutert und gängige Genvektoren in deren Zusammenhang vorgestellt.

In der Literatur sind verschiedene Klassifizierungen für Genvektoren vertreten. Während manche die Unterscheidung des viralen beziehungsweise nicht-viralen Ursprungs des Vektors wählen, ist die Klassifizierung nach der Integration der Transgene die häufigere. Unterschieden wird hier zwischen integrierenden und nicht-integrierenden, extrachromosomal erhaltenen Vektoren.

Durch die zum Teil ungezielte Integration des Vektors in das Wirtsgenom, wie es zum Beispiel bei Retro- oder Lentivirus-basierten Vektoren der Fall ist, kann es zu verschiedenen Fehlfunktion in der Zielzelle kommen. Sollte die Integration im kondensierten Heterochromatin erfolgen, kann eine Inaktivierung des Promotors des Transgens die Folge sein. Ebenso ist eine Mutagenese des Wirtsgenoms möglich, was besonders schwerwiegende Auswirkungen haben kann, wenn die Integration in der Nähe möglicher Onkogene erfolgt. Welche Rolle dies in der klinischen Anwendung spielt, zeigten erst kürzlich die Ergebnisse einer gentherapeutischen Studie zur Behandlung des Wiskott-Aldrich Syndroms (WAS). Beim WAS handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung bei der die Jungen unter insuffizienter Blutgerinnung und einer Schwächung beziehungsweise Autoreaktivität des Immunsystems leiden. Die Lebenserwartung der Kinder liegt bei etwa zehn Jahren. In der Studie wurde versucht das WAS-Gen mit Hilfe eines Y-Retrovirus in hämatopoetische Stammzellen einzubringen. Tatsächlich konnte der WAS-Gendefekt

in 9 von 10 Patienten korrigiert werden. Allerdings erkrankten 7 der 9 Patienten im Laufe der Studie an einer Leukämie, zwei davon tödlich (Braun, Boztug et al., 2014). Die onkologischen Folgeerkrankungen wurden, wie schon in anderen Gentherapie-Studien, der Virus-Integration innerhalb von Protoonkogen-Regionen zugesprochen, die zu deren Überexpression und so zu den malignen Erkrankungen führt (Deichmann, Hacein-Bey-Abina et al., 2007, Hacein-Bey-Abina, Garrigue et al., 2008, Hacein-Bey-Abina, von Kalle et al., 2003, Ott, Schmidt et al., 2006).

Die extrachromosomale Erhaltung von Vektoren im Zellkern stellt einen wesentlichen Sicherheitsgewinn dar, da eine mögliche Zelltransformation aufgrund einer Integration in das Wirtsgenom vermieden wird. Eine spontane Integration kann auch bei episomalen Vektoren nicht verhindert werden, die Wahrscheinlichkeit einer Insertionsmutagenese durch diese Vektoren wird jedoch als signifikant kleiner als die Wahrscheinlichkeit einer endogenen Mutation beschrieben (Prud'homme, Draghia-Akli et al., 2007). Ein weiterer Vorteil episomaler Vektoren ist die deutlich höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu konventionellen nicht-episomalen Vektoren, die nur in kleiner Anzahl in das Wirtsgenom integrieren und somit eine geringere Kopienzahl aufweisen.

Zu den nicht-integrierenden Virusvektoren gehören Adeno- und Adeno-assoziierte (AAV) Vektoren. Die beiden episomalen Vektortypen gehen auf replikationsdefiziente Viren zurück. Während AAV nur eine milde Immunantwort auslösen, fällt diese bei Adenoviren deutlich stärker aus und verhindert oftmals eine mehrfache Anwendung. Da das Immunsystem die virusbasierten Vektoren mit der Zeit erfolgreich bekämpft und eliminiert, wäre jedoch eine erneute Transgen-Verabreichung für eine effiziente Langzeittherapie entscheidend. Adeno- und AAV-abgeleitete Vektoren sind daher für die kurzweilige gentherapeutische Anwendung zur Behandlung onkologischer Erkrankungen geeignet, nicht aber für eine langfristige Genexpression bei genetischen Stoffwechselerkrankungen.

Wie bereits erwähnt spielt auch die Kapazität des Vektorsystems eine entscheidende Rolle. Virale Vektoren auf Basis von Retro-, Lenti- oder Adenovirus haben eine Transgen-Kapazität für lediglich zehn Kilobasenpaare (kbp). Mit der Nutzung eines Epstein-Barr Virus (EBV) basierten Vektorsystems konnte ein Transgen von 123 kbp in B-Zellen eingebracht werden (White, Wade-Martins et al., 2002). Bei extrachromosomalen Vektoren wie synthetischen Minichromosomen ist diese Kapazität zum Teil unbegrenzt (Lufino, Edser et al., 2008).

2.3.1.1 Extrachromosomale, autonome, nicht integrierende Genvektoren

Ziel der vektorbasierten Gentherapieforschung soll es sein, Vektoren zu entwickeln, die sich wie die Wirts-Chromosomen verhalten, keine Mutagenese induzieren und nicht das Immunsystem aktivieren. Man spricht in diesem Zusammenhang von humanen artifizialen Chromosomen. Extrachromosomale, autonome, nicht integrierende Genvektoren bringen einen Sicherheitsgewinn mit, der allerdings noch weiterer Optimierung bedarf. Die beiden Schlüsselfunktionen einer stabilen Erhaltung dieser Genvektoren sind Replikation und Segregation. Bisher sind zwei extrachromosomale, autonome, nicht integrierende Genvektorsysteme etabliert, der pEPI, beziehungsweise dessen Nachfolger pEPito, und das pCON^{CENP-A}-System, die Replikation und Segregation mit unterschiedlichen Mechanismen gewährleisten.

2.3.1.1.1 S/MAR basierte Vektoren: pEPI und pEPito

Der episomale, auf das Kerngerüst-/ Kernmatrixanheftungsregionen (*S/MAR*) basierte Vektor pEPI-1 wurde auf Grundlage des Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) generiert. Das große T-Antigen (TAg) des SV40, das für die Bindung des SV40-Replikationsursprungs verantwortlich ist und somit die Replikation initiiert, wurde durch die *S/MAR*-Sequenz aus dem Interferon- β -Gen ersetzt.

S/MAR sind 100 bis 1000 Basenpaar lange DNA-Abschnitte mit einem Adenosin-Thymidin (AT)-Gehalt von 70 % ohne offensichtliche Konsensussequenz. Sie sind für eine effiziente Transkription, Replikation, Rekombination und Kondensation der Chromosomen mitverantwortlich (Bode, Benham et al., 2000). *S/MAR* spielt eine essentielle Rolle bei der extrachromosomalen Replikation und Segregation. Über *S/MAR* kommt es zur Anheftung der Vektoren an das Zellchromatin, wo es gemeinsam mit den Wirtschromosomen ein Mal pro Zellzyklus in der S-Phase repliziert wird. Die mitotische Stabilität wird der Interaktion mit Metaphase-Chromosomen, dem passivem, sogenannten "Huckepack-Mechanismus", zugesprochen (Baiker, Maercker et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass pEPI-1-Plasmide *in vitro* ohne Selektionsdruck über viele Generationen extrachromosomal mit einer Kopienzahl von 5 bis 10 Molekülen pro Zelle erhalten bleiben, während solche ohne die *S/MAR*-Sequenz in das Wirtsgenom integrierten oder nicht stabil erhalten bleiben konnten (Haase, Argyros et al., 2010, Jenke, Eisenberger et al., 2005, Piechaczek, Fetzer et al., 1999).

Auch in *in vivo* Experimenten konnten mittels pEPI-1-Vektoren genetisch modifizierte Schweine-Föten generiert werden, bei denen in 9 von 12 Fällen eine vektorvermittelte Reporter-gen-Expression nachweisbar war. Eine episomale Erhaltung von pEPI-1 konnte in allen getesteten Geweben gezeigt werden (Manzini et al., 2006). In einer anderen Studie wurde jedoch beobachtet dass *S/MAR*-basierte Vektoren im Zellkern zwar bevorzugt extrachromosomal erhalten bleiben, eine gelegentliche Integration jedoch nicht ausgeschlossen werden kann (Wong, Argyros et al., 2011). Untersuchungen zu pEPI-Vektoren mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Chromatin-Immunpräzipitation konnten demonstrieren, dass die Plasmide im Zellkern hauptsächlich an transkriptionell aktivem Chromatin lokalisiert sind (Stehle, Postberg et al., 2007). Nach der Aufnahme von pEPI als „nackte DNA“ *in vitro* als auch *in vivo*, gehen die Vektoren schnell verloren und nur ein geringer Anteil von 0,5 bis 5 % werden über längere Zeit erhalten, benötigen dann allerdings keinen Selektionsdruck mehr (Haase et al., 2010, Wong et al., 2011).

Haase *et. al.* gelang es 2010, die Effizienz der pEPI-basierten Vektoren weiter zu verbessern. Der wesentliche Unterschied dieser als pEPito bekannt gewordenen Vektoren liegt in der Anzahl an CpG-Inseln, die in der Genregulation eine tragende Rolle spielen, aber für eine persistente Langzeiterhaltung der Plasmide kontraproduktiv sind (Haase et al., 2010). Das Dinukleotid aus Cytosin- und Guanin-Monophosphat (CpG) kommt in Eukaryoten generell selten vor, die meisten Cytosine sind 5'-Ende methyliert. In Bakterien hingegen kommen CpG-Inseln deutlich häufiger vor, sind jedoch in der Regel nicht methyliert. Das angeborene Immunsystem kann über den Toll-like Rezeptor 9 Signalweg anhand des DNA-Methylierungsstatus bakterielle von eigener DNA unterscheiden und eine inflammatorische Zytokinantwort auslösen (Bauer, Kirschning et al., 2001). Die Methylierung von CpG-Motiven innerhalb des Promotors führt zu seiner Inaktivierung (Boyes & Bird, 1992).

Während in beide Vektoren eine *S/MAR*-Sequenz vorhanden ist, sind im pEPI-1 Grundgerüst 305 CpG-Motive vorhanden, im pEPito lediglich 37. Durch die Reduzierung des CpG-Anteils wurde zum einen die Etablierungseffizienz des Vektors deutlich erhöht, zum anderen aber auch das Expressionsniveau von Reporter-genen stabilisiert (Haase et al., 2010). Der pEPito Vektor zeichnet sich durch eine höhere und stabile Transgen-Expression *in vitro* und *in vivo* aus und ist zur biotechnologischen Anwendung und für die nicht-virale Gentherapie geeignet.

2.3.1.1.2 Epstein-Barr Virus basierte Vektorsysteme und die Rolle von EBNA1

Der Epstein-Barr-Virus (EBV oder HHV 4) gehört zur Familie der Herpesviren. Es ist ein 172 kbp großes, humanpathogenes, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, das mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert ist (Delecluse & Hammerschmidt, 2000). Während die weltweite Durchseuchung im mittleren Lebensalter bei fast 90 % liegt, kommt es nur bei bis zu 60 % der jugendlichen Primärfizierten zum Ausbruch der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Es konnten eine Reihe weiterer maligner Erkrankungen mit der Infektion durch das Virus in Verbindung gebracht werden. So sind epitheliale Tumoren wie Nasopharynx- und Magen-Karzinome, sowie mesenchymale Tumore, wie Sarkome, mit EBV assoziiert (Maeda, Akahane et al., 2009). Auch auf Zellen der hämatopoetischen Reihe hat EBV einen pathogenen Einfluss, so ist das Virus erstmals im Zusammenhang mit dem Burkitt-Lymphom entdeckt worden. Ebenfalls zeigen Morbus Hodgkin und weitere Lymphomarten einen Zusammenhang (Maeda et al., 2009). Obwohl die Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist, geht dies vermutlich auf die lebenslange Persistenz des Virus im Körper zurück. Im Laufe der Zeit konnten einige der Mechanismen verstanden werden, mit denen EBV seine Erhaltung in humanen Zellen gewährleistet. Nachdem die DNA des Virus in linearisierter Form in den Wirts-Zellkern gelangt, zirkularisiert sie dort mit wenigen Ausnahmen und bildet ein virales Episom (Morissette & Flamand, 2010). Das nicht-integrierende Virus wird in der latenten Phase synchron zum Wirts-Genom einmal pro Zellzyklus in der S-Phase in proliferierenden Zellen repliziert und autonom in die Tochterzellen segregiert (Sears, Ujihara et al., 2004, Yates & Guan, 1991).

Als latenter DNA-Replikationsursprung konnte *oriP* (engl. EBV origin of replication) identifiziert werden, auf dessen Basis schon bald die ersten rekombinanten Genvektoren generiert wurden (Sugden & Leight, 2001). Die *oriP*-vermittelte Replikation in *cis* basiert auf der Bindung des Epstein-Barr Virus nukleären Antigen 1 (EBNA1) in *trans* (Abb. 2-5 A, C). *oriP* besteht aus zwei essentiellen Elementen, der "family of repeats" (FR) und dem "dyad symmetry element" (DS), die beide Bindungsstellen für EBNA1 beinhalten. Während FR für die Segregation relevant ist, fungiert DS als Replikationsursprung.

Das FR Element trägt 20 Bindungsstellen für das EBNA1 Protein. Über das carboxy-terminale Ende, welches auch die Dimerisierungsdomäne des Proteins enthält, bindet EBNA1 an das FR Element und vermittelt so die Anheftung des Plasmids an das zelluläre Chromatin (Abb. 2-5 A). Dies gewährleistet den Verbleib im Zellkern und die Plasmiderhaltung. Die Anheftung an das Chromatin geschieht über die AT-hook

Motive im aminoterminalen EBNA1 Bereich (Chakravorty & Sugden, 2015, Sears et al., 2004). Dieser passive Retentionsmechanismus ist auch als "Huckepack-Mechanismus" bekannt (Calos, 1998, Ehrhardt, Haase et al., 2008).

Über die Bindung von EBNA1-Dimeren an die Zentren der vier Bindungsstellen innerhalb des DS Elements wird der zelluläre Replikationsursprungs-Erkennungs-komplex rekrutiert (ORC) (Abb. 2-5 A) (Schepers, Ritzi et al., 2001). ORC ist ein DNA-Bindungs-Komplex mit 6 Untereinheiten (ORC 1-6). Als zentrale Komponente der Replikation bleibt ORC während des Zellzyklus an die Replikationsursprünge des Chromatins gebunden. Hier initiiert es die Replikation durch Ausbildung des prä-Replikationskomplexes (pre-RC) gemeinsam mit weiteren Faktoren. Die Bildung von pre-RCs in der G1-Phase ist Voraussetzung für die DNA-Synthese in der S-Phase. Im Weiteren wird ORC an DS rekrutiert, welches die Replikationseffizienz von *oriP*-Plasmiden verstärkt (Atanasiu, Deng et al., 2006, Schepers et al., 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, dass DS in Abwesenheit von FR – in einem sehr viel kleineren Ausmaß – die Retentionsfunktion von FR übernehmen kann (Aiyar, Tyree et al., 1998, Yates, Camiolo et al., 2000).

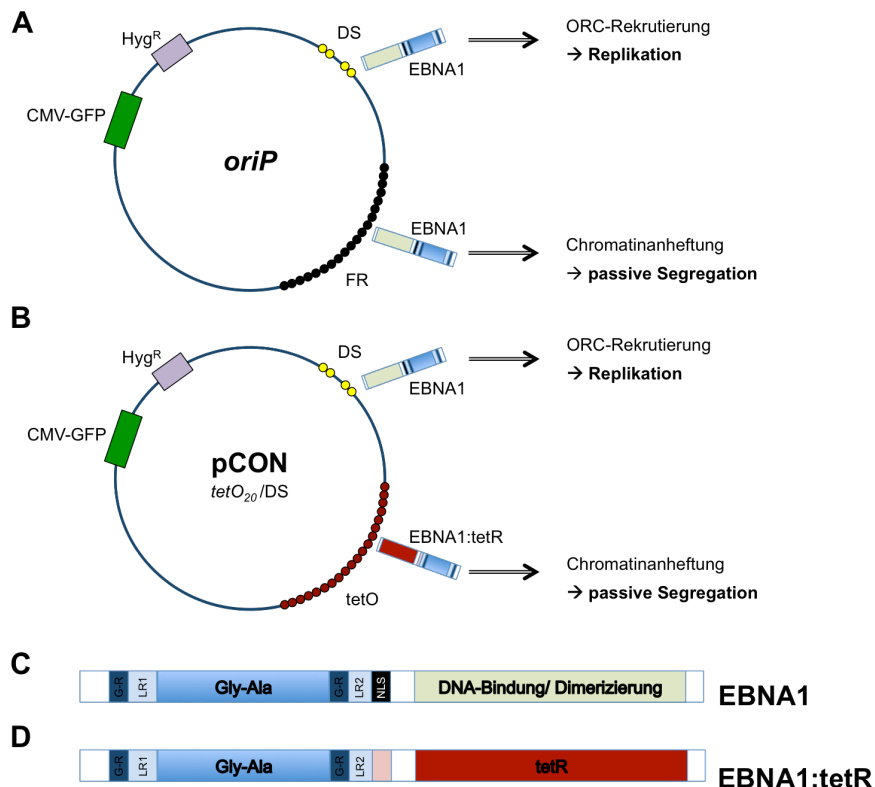


Abb. 2-5 pCON als Optimierung *oriP*-basierter Vektorsysteme

Schematisch Darstellung des *oriP*-Plasmids (p3230, **A**) und dessen Optimierung pCON (p3231, **B**). Beide Plasmide tragen ein Hygromyzin-Resistenzgen (Hyg^R)

zur Selektion und eine Expressionskassette für CMV-getriebenes grün fluoreszierendes Protein (CMV-GFP) als Reporter gen. Das *oriP* Plasmid exprimiert die beiden Wildtyp-Elemente FR und DS. Über die Interaktion von FR und EBNA1 (**C**) kommt es zur Chromatinanheftung des Plasmids und zur passiven Segregation (**A**). Durch Bindung von EBNA1 an DS wird ORC rekrutiert und das Plasmid infolgedessen repliziert. Dies ist beim pCON-Plasmid identisch. Beim pCON wurde das FR-Element mit seinen 20 EBNA1-Bindungsstellen durch 20 *tetO* ersetzt. Die passive Segregation erfolgt hier durch Interaktion mit einem EBNA1-*tetR* Fusionsprotein (**B,D**). Im pCON basiert der episodale Retentionsmechanismus somit zum Teil auf nicht-viralen Faktoren.

oriP-basierte Vektorsysteme sind als Grundlage einiger gentherapeutischer Ansätze etabliert (Conese, Auriche et al., 2004). Einzug in klinische Studien gelang jedoch bis heute nicht.

Um dem Ziel der Entwicklung von humanen artifizialen Chromosomen näher zu kommen, ist es wichtig, alle viralen Elemente aus einem Vektorsystem zu entfernen. Pich *et al.* haben im Jahr 2008 im Zuge einer Optimierung von Genvektoren Teile des viralen *oriP* Replikons durch prokaryontische Elemente ersetzt. Sie tauschten die 20 EBNA1-Bindungsstellen des FR-Elements durch die gleiche Anzahl des offenen Leserahmens des Tetrazyklin-Operators (*tetO*) aus (Abb. 2-5 B). Die *tetO*-Sequenz enthält hochaffine und spezifische Bindungsstellen für Homodimere des DNA-Bindungsproteins Tetrazyklin-Repressor (*tetR*) (Kleinschmidt, Tovar et al., 1988). Über dieses Operatorsystem konnte so, in das Fusionsprotein EBNA1-*tetR*-exprimierenden Zellen, mit dem *tetO*₂₀/DS-Vektorsystem (pCON) ein episodaler Plasmid-Retentionsmechanismus etabliert werden, der zum Teil auf nicht-viralen Faktoren basiert (Pich, Humme et al., 2008).

Auf der Suche nach nicht-viralen Replikationsursprüngen untersucht unsere Arbeitsgruppe ein DNA-bindendes Protein der High-Mobility-Group Proteine (HMG), das HMGA1a. HMGA1a besitzt, ähnlich wie EBNA1, eine AT-hook-Domäne. Mit dieser Domäne interagieren beide Proteine mit dem humanen ORC. Diese Interaktion wird über Guanin-reiche RNA vermittelt (Norseen, Johnson et al., 2009, Norseen, Thomae et al., 2008). Alternativ kann das DS Element auch durch zelluläre DNA Sequenzen ersetzt werden, welche die autonome Replikation im Plasmid-System unterstützen (Gerhardt, Jafar et al., 2006). Dabei wird allerdings selten eine ähnlich hohe Replikationseffizienz wie von DS erreicht.

Im folgenden Kapitel wird das im Rahmen dieser Arbeit genutzte pCON^{CENP-A}-Vektorsystem vorgestellt, das sich durch eine weitere Optimierung des Segregationsmechanismus auszeichnet.

2.3.1.1.3 Der pCON^{CENP-A}-Vektor – Nutzung des Zentromers

Nicht-integrierende und nicht-virale Vektoren stellen die Grundlage einer neuen Generation an Gentherapiesystemen dar. Aufgrund der enormen Relevanz für die Therapie einer Vielzahl an Krankheiten ist es wichtig, funktionierende, sichere Vektoren zu entwickeln. Das von Pich *et al.* generierte pCON-Vektorsystem (*tetO₂₀/DS*) wurde in diesem Zuge weiter optimiert. Dazu wurde der passive "Huckepack"-Segregationsmechanismus der EBNA1-basierten Vektoren unter Nutzung des Zentromers in einen aktiven Mechanismus umgewandelt.

Zentromere sind die Bereiche von Chromosomen, die in der Mitose vornehmlich die korrekte Segregation maßgeblich bestimmen. Die meisten Organismen besitzen Chromosome mit einer monozentrischen Zentromerregion (Drinnenberg, Henikoff *et al.*, 2016). Da humane Zentromere keine spezifische DNA Sequenz aufweisen, ihre Funktion aber evolutionär hochkonserviert ist, wird von einer epigenetischen Beteiligung ihrer Rolle ausgegangen.

Während der Mitose besteht über das Zentromer normalerweise die letzte Verbindung der Schwester-Chromatiden. Die korrekte Segregation der Chromosomen gelingt über die Anhaftung von Kinetochor-Proteinen und der Mikrotubuli des Spindelapparats (Allshire & Karpen, 2008, Bergmann, Martins *et al.*, 2012). Die Hauptaufgabe des Kinetochors ist die Interaktion als Bindeglied mit dem Zentromer auf der einen und den Mikrotubuli auf der anderen Seite (Abb. 2-6).

Das erste Protein des Zentromers wurde 1985 entdeckt und Zentromer-Protein A (CENP-A) genannt (Earnshaw & Rothfield, 1985). CENP-A ist eine Histon H3 Variante, dessen Vorhandensein heute zur Definition von Zentromeren beiträgt. Die Inkorporation von CENP-A an die Zentromerregion ist essentiell für die Anlagerung der Kinetochorproteine während der Mitose (Przewloka, Zhang *et al.*, 2007, Regnier, Vagnarelli *et al.*, 2005).

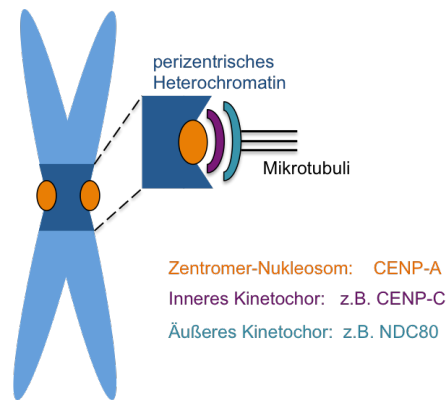


Abb. 2-6 CENP-A führt zur Ausbildung eines Kinetochor-Komplex

Schematische Darstellung der Kinetochor-Ausbildung eines monozentrischen Zentromers. Zunächst binden Proteine der inneren Lamelle des Kinetochors (z.B. CENP-C, violett) an das zentromerische Nukleosom CENP-A (orange) im perizentrischen Heterochromatin (dunkelblau). Durch Anlagerung der äußeren Kinetochorlamelle (z.B. NDC80, türkis) kommt es zur Anheftung der Mikrotubuli des Spindelapparats. So kann eine korrekte Trennung der Chromatiden erfolgen (nach (Olszak, van Essen et al., 2011)).

Wir konnten zunächst in *Drosophila melanogaster* zeigen, dass CENP-A ausreicht um die Bildung eines Neozentromers zu induzieren und eine funktionelle Kinetochor-Anheftung herbeizuführen. Plasmide, die eine Bindungsstelle für CENP-A aufweisen, können Kinetochorproteine und Mikrotubuli binden und somit über viele Zellgenerationen extrachromosomal erhalten bleiben. Diese Eigenschaft ist bereits nach einer viertägigen Etablierungsphase ausgebildet (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Dies führt zu dem Schluss, dass CENP-A zu einer epigenetischen Vererbung der Zentromerlokalisierung beiträgt. Durch diese wird eine weitergehende Plasmid-Fortpflanzung gewährleistet und die Zentromerfunktion weitervererbt. Das CENP-A Protein ist dafür essentiell und ausreichend (Mendiburo, Padeken et al., 2011).

Auf Basis dieser Erkenntnis wurde in das pCON-Vektorsystem eine Bindungsstelle für CENP-A integriert. Dies geschah über die Generierung eines Fusionsprotein aus CENP-A und einem einsträngigen *tetR* (sctetR:CENP-A). Durch die Expression dieses Fusionsproteins wird ein aktiver Segregationsmechanismus generiert. Das Anlagern von sctetR des Fusionsproteins an die *tetO* Bindungsstellen auf dem Plasmid stellt die Brücke zur Ausbildung eines Neozentromers am Vektor dar. An CENP-A kommt es zur Anlagerung von Kinetochorproteinen und somit zur Anheftung des Plasmids an die

Mikrotubuli der Wirtszelle (Abb. 2-7). Der Begriff $pCON^{CENP-A}$ beschreibt nachfolgend dieses $tetO_{20}/DS-sctetR:CENP-A$ Plasmid.

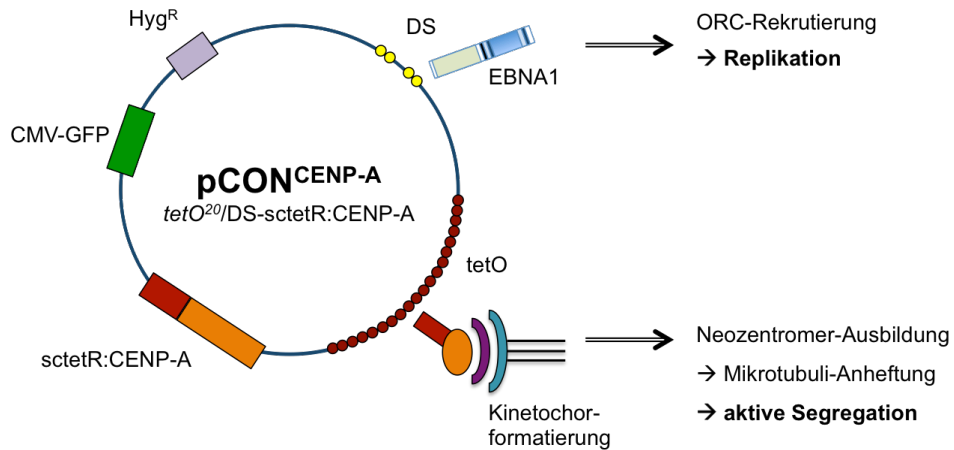


Abb. 2-7 Der $pCON^{CENP-A}$ bildet ein Neozentromer und erlaubt eine aktive Segregation

Der $pCON^{CENP-A}$ ist auf Basis des *oriP* bzw. $pCON$ Vektorsystems entwickelt worden. Er beinhaltet ebenso ein Hygromycin-Resistenzgen (Hyg^R) zur Selektion und eine Expressionskassette für CMV-getriebenes GFP (CMV-GFP) als Reportergen. Durch Integration der codierenden Sequenz für das $sctetR:CENP-A$ Fusionsprotein ist es gelungen, den zuvor passiven Segregationsmechanismus in einen aktiven zu überführen. Dies geschieht über die Bindung des $sctetR:CENP-A$ Fusionsproteins an die $tetO$ -Bindungsstellen des Plasmids mit nachfolgender Kinetochorausbildung und Anheftung an die Mikrotubuli der Wirtszelle. Der $pCON^{CENP-A}$ ist demnach in der Lage ein Neozentromer auszubilden.

Wir konnten zeigen, dass die $pCON^{CENP-A}$ -Plasmide für 20 Wochen in HEK293-EBNA1 Zellen auch ohne Selektionsdruck stabil erhalten bleiben. Nach einer initialen Minderung der mittleren Anzahl an pro Zelle erhaltenen Plasmiden erreichte diese nach wenigen Wochen ein Plateau und blieb stabil (Abb. 2-8 B).

Alle $pCON^{CENP-A}$ -Plasmide beinhalten eine CMV-getriebene Expressionskassette des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) zur Detektion. Dieses Reportergen kann später durch ein therapeutisches Gen ersetzt werden. Ohne Selektionsdruck waren *oriP* Plasmide lediglich für etwa 3 Wochen nachweisbar (Abb. 2-8 B). $pCON^{CENP-A}$ -Plasmide konnten hingegen über mehrere Monate stabil erhalten bleiben. Die GFP-Expression (Abb. 2-8 C) erfolgt in gleicher Kinetik.

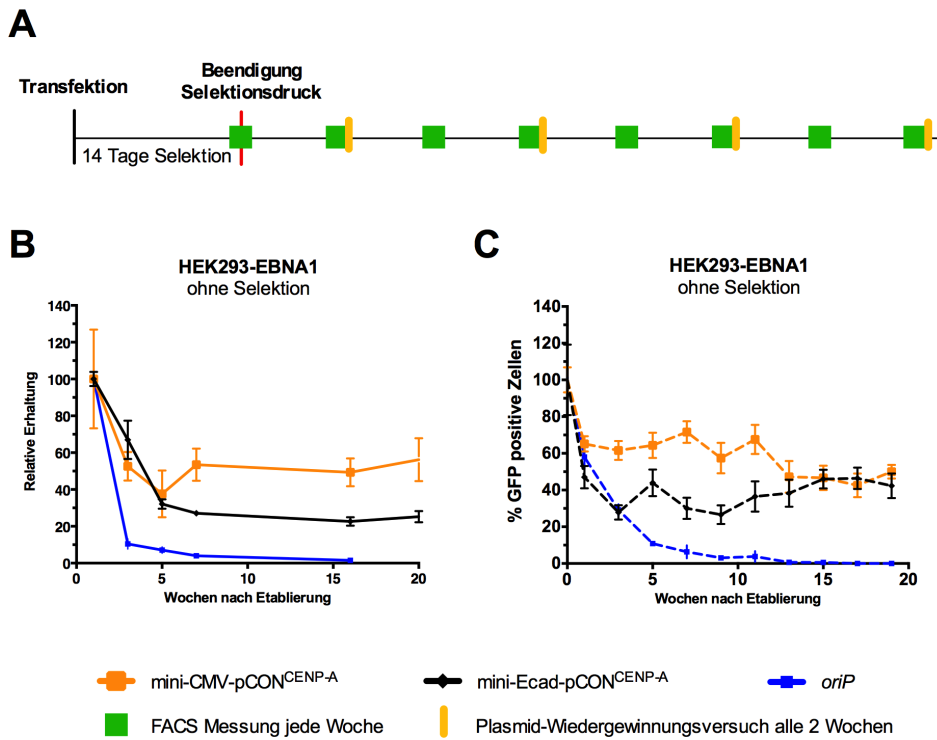


Abb. 2-8 Langzeiterhaltung und Genexpression des pCON^{CENP-A} in HEK293-EBNA1 Zellen

Zur Bestätigung der stabilen Langzeiterhaltung wurden pCON^{CENP-A}-Plasmide (mini-CMV oder mini-Ecad getriebenes scetR:CENP-A) bzw. *oriP* in HEK293-EBNA1 Zellen transfiziert und für 14 Tage selektioniert (**A**). Nach Beendigung des Selektionsdrucks wurden die Plasmide alle 2 Wochen aus den Zellen isoliert und mittels Plasmid-Wiedergewinnungs-Experimenten (**B**) quantifiziert. Zusätzlich erfolgte wöchentlich eine durchflusszytometrische Messung (FACS) der Expression des GFP-Reportergens (**C**).

Wir verifizierten die Ergebnisse in den EBV-positiven nasopharyngeal Zellen D98/HR1- und in der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa. In beiden Zelllinien ermittelten wir vergleichbare Gesamtergebnisse, jedoch mit einer deutlich geringeren mittleren Anzahl an pro Zelle erhaltenen Plasmiden (unveröffentlichte Daten). Es wurde deutlich, dass verschiedene Zelllinien extrachromosomale Plasmide mit einer unterschiedlichen Kopienzahl erhalten. Dies geschieht auch in Abhängigkeit der Promotorstärke und damit dem Expressionsniveau des CENP-A. Um eine genetische Instabilität zu vermeiden, wählten wir ein CENP-A Expressionsniveau, dass dem endogenen entspricht. Dramatische Überexpression kann zur Aneuploidie führen (Tomonaga, Matsushita et al., 2003). In HeLa Zellen konnten die pCON^{CENP-A}-

Plasmide am besten auf einer 126 bp langen mini-CMV-getriebenen Basis erhalten werden. In D98/H1 Zellen eignete sich ein mini-E-Cadherin Promotor (270 bp (-178/+92 bp), mini-Ecad) getriebene CENP-A-Expression zur effizientesten Plasmid-erhaltung. Der gleiche Promotor führte in HEK293 Zellen zu einer weitaus höheren Anzahl an Plasmiden, die langfristig erhalten blieben (Tab. 2-1, Tab. 2-2, unveröffentlichte Daten).

Tab. 2-1 Die pCON^{CENP-A}-Erhaltung ist promotorabhängig

Schematischer Vergleich der sc tetR:CENP-A-treibenden Promotorsysteme in HEK293-EBNA1 und EBV-positiven D98/H1 und HeLa Zellen. „+“-Zeichen spiegeln schematisch die Menge an erhaltenen und wiedergewonnenen Plasmiden unter dem jeweiligen Promotor in den einzelnen Zelllinien wieder. Der mit schwarzen „+“-Zeichen markierte Promotor stellte sich jeweils als der für die Zelllinie effizienteste heraus (unveröffentlichte Daten von Lara Schneider).

Promotor	HEK293-EBNA1	D98/H1	HeLa
mini-CMV	++	+	+
mini-Ecad	++++	++	(+)
Sm22s	+++	+	(+)

Tab. 2-2 Die Langzeiterhaltung und Gen-Expression der pCON^{CENP-A}-Plasmide ist zelltypabhängig

Schematischer Vergleich der Langzeiterhaltung und Langzeit-Genexpression von pCON^{CENP-A}-Plasmiden in HEK293-EBNA1 und EBV-positiven D98/H1 und HeLa Zellen mit dem zuvor ermittelten effizientestem Promotor (Tab. 22-1). „+“-Zeichen spiegeln schematisch die Menge an erhaltenen und wiedergewonnenen Plasmiden bzw. die Intensität der GFP-Transgenexpression in den einzelnen Zelllinien wieder. Die GFP-Expression wurde durchflusszytometrisch ermittelt (FACS) (unveröffentlichte Daten von Lara Schneider).

	HEK293-EBNA1	D98/H1	HeLa
effizientester Promotor	mini-Ecad	mini-Ecad	mini-CMV
Langzeiterhaltung	++++	++	+
Langzeit Gen-Expression	++++	++	+

Die Beobachtungen zur Plasmid-vermittelten GFP-Expression stimmen mit denen der Plasmiderhaltung überein (Tab. 2-2). Dies erlaubt Rückschlüsse auf den episomalen Charakter des pCON^{CENP-A}. Die Reduktion der Plasmidzahl im Verlauf von Wochen führt auch zu einer Reduktion der GFP-Expression. Eine Integration der Plasmide in das Wirtsgenom ist demnach nicht wahrscheinlich.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das pCON^{CENP-A}-Vektorsystems über mehrere Monate stabil erhalten bleibt und zu einer stabilen Reporter-gen-Expression führt. Diese Erhaltung variiert jedoch in Abhängigkeit von Promotorstärke und Zelltyp. Der Mechanismus, der zur effizienten Langzeitetablierung der pCON^{CENP-A}-Plasmide in den jeweiligen Zelllinien führt, muss noch weitergehend untersucht und wenn möglich optimiert werden.

2.4 Zielsetzung

Diese Doktorarbeit ist Teil eines Projektes, welches sich mit der neuen Generation von autonomen Vektoren für die Gentherapie beschäftigt. Nach Etablierung des Minichromosoms pCON^{CENP-A} steht die Stabilität des Plasmids in unterschiedlichen Zelllinien im Fokus der Untersuchungen. Die Verwendung des Vektorsystems im Zusammenhang mit der Erkrankung Diabetes mellitus Typ 1 ist zudem ein erster Versuch, das System in die therapeutisch relevante klinische Anwendung zu rücken.

Als ein Teilziel sollte hierzu die im Jahr 2000 von Thulé *et al.* vorgestellte und im weiteren Verlauf von Zhang und Dong 2015 verbesserte glukoseabhängige Insulin-Expressionskassette im eigenen Labor etabliert werden. Die Testung der Induzierbarkeit der Promotoren durch Glukose sollte hierbei auf 2 Ebenen erfolgen. Zum einen wird mit einer durchflusszytometrischen Messung die GFP-Transgen Intensität gemessen, zum anderen soll mittels RT-PCR eine Glukose-responsive Insulin-mRNA Detektion erfolgen.

Parallel dazu sollte in einem zweiten Teilziel die Funktionalität des pCON^{CENP-A}-Systems in Hepatozyten untersucht werden, die sich aufgrund der ähnlichen Stoffwechseleigenschaften zu pankreatischen β -Zellen als mögliches Ziel für eine gentherapeutische Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 eignen. Da die Replikation des pCON^{CENP-A}-Vektors aktuell noch EBNA1 abhängig ist, müssen hier zunächst stabile Zelllinien generiert werden. Als Basis wurden zwei etablierte humane Leberzellkarzinom-Zelllinien gewählt, die HepG2 und die HUH7-Zelllinie. In den neu generierten Zelllinien sollten analog zu den Experimenten in HEK293-EBNA1 Zellen Plasmid-Wiedergewinnungsversuche des pCON^{CENP-A} mit *oriP* Kontrollvektoren durchgeführt werden.

3 Material

Im folgenden sind alle Materialien, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, thematisch sortiert und in alphabetischer Reihenfolge zusammen mit den Herstellerangaben aufgelistet.

3.1 Standards für DNA- und Protein-Gelelektrophorese

Tab. 3-1 In dieser Arbeit verwendete Standards für DNA- und Protein-Gelelektrophorese

<i>Marker</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Listennummer</i>
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific	SM0331
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific	SM0312
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM1811

3.2 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 3-2 In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Farbstoffe

<i>Spezifität</i>	<i>Spezies, Isotyp, sonstiges</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Verdünnung</i>
EBNA1	Ratte, 1H4, IgG2a (monoklonal)	E. Kremmer, GSF	1:20
GLUT2	Ratte, H-67, IgG (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology sc-9117	1:200
HA	Ratte, R001, IgG1 (monoklonal)	E. Kremmer, GSF	1:20
Insulin B	Maus, C-12, IgG (monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology sc-377071	1:200
dsDNA	To-Pro®3 Farbstoff,	Thermo Scientific T3605	1:200
α -Maus	Pferd, HRP, IgG	Cell Signaling #7076	1:10000

Spezifität	Spezies, Isotyp, sonstiges	Bezugsquelle	Verdünnung
α -Ratte	Ziege, HRP, IgG	Jackson ImmunoResearch h 112-035-167	1:10000

Für Western-Blot-Analysen beziehungsweise Zelfärbung wurden die angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

3.3 Enzyme

Tab. 3-3 In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Listennummer
Alkaline Phosphatase, Calf Intestine (CIP)	New England Biolabs	M0290S
DNAseI (RNAse-free)	New England Biolabs	M0303S
<i>DpnI</i>	New England Biolabs	R0176L
<i>HindIII</i> -HF	New England Biolabs	R3104T
<i>MfeI</i> -HF	New England Biolabs	R3589L
<i>NaeI</i>	New England Biolabs	R0190S
<i>NotI</i> -HF	New England Biolabs	R3189L
<i>PstI</i>	New England Biolabs	R0140T
<i>PvuII</i>	New England Biolabs	R0151S
<i>Pwo</i> -Polymerase	Peglab	
RNAse-free DNAse I	Qiagen	79254
<i>SacII</i>	New England Biolabs	R0157L
<i>Sall</i> -HF	New England Biolabs	R3138L
<i>ScaI</i> -HF	New England Biolabs	R3122S
<i>SpeI</i>	New England Biolabs	R0133L
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	M0202S
<i>XhoI</i>	New England Biolabs	R0146L
<i>XmaI</i>	New England Biolabs	R0180L

3.4 Geräte

Tab. 3-4 In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Autoradiographie Kassette	CHF	Ampli
Einfrierbox NUNC	Thermo Fisher	Cyro container
Eismaschine	Scotsman	AF 206
Elektrophorese Netzgerät	Consort	E443
Elektrophorese Netzgerät	Consort	EV202
Elektroporator	Bio-Rad	Gene Pulser II
ELISA-Reader	Tecan	Infinite F200 Pro
ELISA-Waschautomat	Tecan	M8 / 2R
Flow Cytometry Analyzer	BD Biosciences	BD FACSCalibur
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss	Axiovert 10
Fotofilm-Entwicklungsautomat	Typon	Optimax
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Comfort
Gefrierschrank (-80°C)	Telstar	Igloo 830L
Gel Dokumentations-System	Vilber	Quantum
Gel Kammer	Thermo Scientific	Owl Easy Cast B1/B3
Heizblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
Inkubator	Heraeus	B 5060 EK/CO ₂
Kühlschrank (4°C)	Liebherr	Premium
LightCycler	Roche	480 II
Magnetrührer	IKA Labortechnik	RH basic
Messbecher	Brand	PlastiBrand
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 40 C
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 200M
Mikrowelle	Sharp	Easy
NanoDrop Spectrophotometer	Thermo Scientific	ND-1000
Pipette	Eppendorf	Research plus
Photometer	Eppendorf	BioPhotometer plus
Pipette-Boy	IBS Integra Biosciences	Pipetboy acu
Qubit Fluorometer	Invitrogen	Fluorometer
Rollator	CAT	RM5
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific	Innova 4400

Gerät	Hersteller	Typ
Semi-Dry Blotter	Hoefler	TE 77
Sonifizierer	Diagenode	Bioruptor
Sterilwerkbank	Heraeus	LaminAir HBB 2448
Video Drucker	Sony	D897
Vortex	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Waage	Kern	470
Waage	Scaltec	SBC 32
Wasserbad	Lauda	Ecoline 011
Zählkammer	Neubauer	0,0025mm ²
Zentrifuge	Eppendorf	5415 R
Zentrifuge	Hettich	Rotina 38R
Zentrifuge	Heraeus	Multifuge 3 L-R
Zentrifuge	Sigma	2K15
Zentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J-26 XP

3.5 Organismen

Tab. 3-5 In dieser Arbeit verwendete Organismen

Organismus	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Invitrogen
Ultracompetent Cells	Invitrogen

3.6 Oligonukleotide

Tab. 3-6 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Hersteller	Sequenz (5' – 3')
751-Insulin_rev2	Metabion	CAA TGC CAC GCT TCT GCC
752-Insulin_for3	Metabion	AAG TGC CAC AAC TGG AGC
Aktin_for	Metabion	CCA ACC GCG AGA AGA TGA
Aktin_rev	Metabion	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG

3.7 Plasmide

Falls nicht anders angegeben wurden alle Plasmide im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Tabelle gibt alle verwendeten Plasmide aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder. Die mit „*“ markierten Plasmide wurden lediglich als Hilfsvektoren für weitere Klonierungsschritte generiert. Für die Plasmide p3230 (Abb. 2-5) und p4292 (Abb. 2-7) sind in den Kapiteln 2.3.1.1.2 und 2.3.1.1.3 der Einleitung schematische Vektorkarten abgebildet.

Tab. 3-7 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

<i>Nummer</i>	<i>Plasmid</i>	<i>Kloniert von</i>
p3056	CMV-mRFP	S. Geley
p3230	<i>wt-oriP</i> -Reporterplasmid (FR-DS)	W. Hammerschmidt
p3231	tetO ₂₀ /DS -Reporterplasmid	W. Hammerschmidt
p3279	pCMV-EBNA1 ^{ΔGA}	J. Mautner
p4291	mini-CMV- tetO ₂₀ /DS-sctetR:CENP ^A	S. Fülöp/M. Deutsch
p4292	mini-Ecad-tetO ₂₀ /DS-sctetR:CENP ^A	S. Fülöp/M. Deutsch
p5654	Sm22s-sctetR:CENP ^A	
p5975	pLCX-HINS	P.M. Thulé
p5976	pGIRE ₂ -BP1-Luc	P.M. Thulé
p6027*	pJET-eGFP	P. Gorny
p6028*	pJET-HINS	P. Gorny
p6035*	pJET-GRE	P. Gorny
p6036	tetO ₂₀ /DS – GRE ₂ (L-PK)-BP1	P. Gorny
p6037	tetO ₂₀ /DS – GRE ₂ (L-PK)-BP1-GFP	
p6038	tetO ₂₀ /DS– GRE ₂ (L-PK)-BP1-HINS	
p6048	CMV-HINS	P. Gorny
p6061	tetO ₂₀ /DS –GRE _{3mut} (L-PK)-BP1-HINS	
p6081	tetO ₂₀ /DS –GRE _{3mut} (L-PK)-BP1-GFP	
p6083	CMV-tetO ₂₀ /DS-sctetR:CENP ^A	S. Hermann
p6112*	pUC57-GRE ₃	Genscript
p6127	tetO ₂₀ /DS –GRE ₃	
p6128	tetO ₂₀ /DS –GRE ₃ (L-PK)-BP1-HINS	
p6152	tetO ₂₀ /DS –GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP	
p6156	CMV-HA-HINS	
p6157	<i>wt-oriP</i> – GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP	
p6158	<i>wt-oriP</i> – GRE ₃ (L-PK)-BP1-HINS	

Nummer	Plasmid	Kloniert von
p6200	CMV-sctetR:CENP ^A -GRE ₃ (L-PK)-BP1-GFP	
p6201	CMV-sctetR:CENP ^A -GRE ₃ (L-PK)-BP1-HINS	
p6277	Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-L-PK-Insulin	H.H. Dong
p6315*	pJET-XhoI-eGFP-Spel	
p6327	AldolaseB-enhancer-GRE ₄ (ACC)-L-PK-GFP	
p6420	<i>wt-oriP</i> -AldolaseB-enhancer-GRE ₄ (ACC)-L-PK-GFP	
pJET1.2/blunt*	CloneJet-PCR Cloning Kit	Thermo Fisher

3.8 Puffer und Lösungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x

(DMEM no glucose) (Gibco #11966-025)

- [+] L-Glutamin
- [+] 25 mM HEPES
- + 10 mM % β-ME
- + 10 % FCS
- + 1 % Penicillin/Streptomycin

Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x

(DMEM high glucose) (Gibco #11965-092)

- [+] 4,5 g/L D-Glucose
- [+] L-Glutamin
- [+] Pyruvat
- + 10 % FCS
- + 1 % Penicillin/Streptomycin

FACS-Puffer

Gesamtvolumen: 500ml

- 495 ml PBS
- 5 ml FCS (1%)

2x HIRT-Puffer

Gesamtvolumen: 100ml

- 20 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1,2 % SDS

RIPA Puffer

- 150 mM NaCl
- 50 mM 1 M Tris, pH 7,9
- 1 % NP-40
- 0,2 % SDS
- ad 100 ml H₂O

NP-40 Puffer

- 137 mM NaCl
- 20 mM 1 M Tris, pH 8
- 2 mM EDTA
- 10 % Glycerol
- 1 % NP-40

2x SG-Puffer

Gesamtvolumen: 1000ml

0,25 M TRIS-BASE
 0,2 % SDS
 pH 6,8
 ad 1000 ml H₂O

50x TAE-Puffer

Gesamtvolumen: 1000ml

2 M TRIS-BASE
 1 M Eisessig
 0,1 M EDTA
 pH 8,3
 ad 1000 ml H₂O

10x TBS

Gesamtvolumen: 1000ml

80 g NaOH
 24,2 g Tris
 ad 1000 ml H₂O
 pH 7,6

1x TBST

Gesamtvolumen: 1000ml

900 ml H₂O
 10 ml 10xTBS
 1 ml Tween20

TEN-Puffer

Gesamtvolumen: 100ml

1 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 150 mM NaCl

5x TG-Puffer

Gesamtvolumen: 1000ml

1,875 M TRIS-BASE
 0,5 % SDS
 pH 8,8
 ad 1000 ml H₂O

5x Laemmli Puffer

250 mM Tris/HCl, pH6
 500 mM DTT
 10 % SDS
 25 % Glycerol
 0,5 % Bromphenolblau

3.9 Reagenzien

Tab. 3-8 In dieser Arbeit verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Listennummer
10x Cell Lysis Puffer	Cell Signaling	9803
1x 0,25% Trypsin-EDTA	Gibco	25200056

Reagenz	Hersteller	Listennummer
1x NEBuffer 1 .1	New England Biolabs	NEB #B7201S
1x NEBuffer 2.1	New England Biolabs	NEB #B7202S
1x NEBuffer 3.1	New England Biolabs	NEB #B7203S
CutSmart-Puffer	New England Biolabs	NEB #B7204S
1x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs	NEB #B0202S
2-Mercaptoethanol	Roth	4227.1
2-Propanol ≥ 99,5%	Roth	CP41.3
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth	9592
Ampicillin	Sigma	A5354
2-Propanol	Emsure	1.09634.2500
Agar	Invitrogen	30391-023
Agarose	Sigma	A-6877
Ethanol absolut	Panreac	A1613
Fötales Kälberserum (FCS)	Bio&SELL	
FuGENE® 6 Transfektionsreagenz	Promega	E2691
Glukose	Thermo Scientific	A2494001
Insulin	Sigma	I9278
Kanamycin	Roth	T832
LB Agar	Sigma	L2897
L-Glutamin	Gibco	25030-024
Lipofectamin 2000	Invitrogen	11668019
Magermilchpulver	Merck	VL066663
MEM Non-Essential Amino Acids (100X)	Gibco	11140-035
Natrium-L-Laktat	Aldrich	71718-50G
Neomycin G418	Roth	8668
Orange G	Sigma	03756
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience	
Penicillin/ Streptomycin (100x)	Gibco	15140-122
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	32106
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific	46430
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Roth	3029.2
Roti®-Phenol	Roth	0038.2
SDS ultra pure	Roth	2326.2
SYBR-Safe	Invitrogen	S33100

Reagenz	Hersteller	Listennummer
TEMED	Roth	2367.1
Triton X-100	Roth	3052
Trypanblau	Sigma	T8154
Tween20	Sigma	9416

3.10 Software

Tab. 3-9 In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Hersteller
CellF	Olympus
EndNote	Clarivate Analytics
FACS DIVA V6.1.1	BD Biosciences
FileMaker Pro 11	FileMaker, Inc
FlowJo 10.0.8r1	FlowJo
Prism 7	GraphPad Software Inc.
Office 2011 für Mac	Microsoft
Photoshop CS5 12.0.4	Adobe
LightCycler® 480 Software 1.5.1.62 SP2	Roche
MacVector 13.5.5	MacVector, Inc.

3.11 KITs

Tab. 3-10 In dieser Arbeit verwendete KITs

Kit	Hersteller
Human Insulin ELISA Kit	Sigma
JetStar 2.0 Plasmid Purification Kit	Genomed
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
RNeasy Mini Kit	Quiagen
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kits	Invitrogen
Scriptum First (Strand)	Bio&SELL

3.12 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3-11 In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Listennummer
0,45µm Celluloseacetat Sterilfilter	Whatman	10462100
2ml Kyroröhrchen	Nunc	CryoTube 375353
15ml Polypropylen Röhrchen	Greiner bio-one	188 271
20ml Spritzen	BD Discardit II	300296
26G Kanülen BD Microlance	BD	405458
40µm Nylon Cell Strainer	BD Falcon	352340
50ml Polypropylen Röhrchen	Greiner bio-one	227 261
Aufkonzentrationsröhrchen	Sartorius	Vivaspin 15R
Deckgläschen	Marienfeld	10 115 20
Elektroporations-Küvetten	Peqlab	71-2010
FACS Röhrchen 75x12, PS	Sarstedt	55.157
Handschuhe	Meditrade	1283
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham	Protran 10600003
Objektträger	Marienfeld	10 100 00
Parafilm ® M	Brand	
Pipettenspitzen 10µl/ 200µl/ 1ml	Gilson	Diamond Tower Pack DL10/ D200/ D1000
Zellkulturplatten 6 Loch/ 96 Loch	Nunc	146288/ 167008
Zellkulturschalen Ø10cm, Ø15cm	Nunc	153050/ 168381

3.13 Zelllinien

Tab. 3-12 In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Besonderheit
HEK293	Humane Embyronale Nierenepithel-Zelllinie	Durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Tyo 5 transformiert, (Graham, Smiley et al., 1977)
HEK293-EBNA1	#2901	EBNA1 ^{ΔGA} Expression, p3279, von Bill Sudgen
HepG2	Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie	

Zelllinie	Zelltyp	Besonderheit
HepG2-EBNA1*	Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie	EBNA1 ^{ΔGA} Expression, p3279
HepG2-Insulin-EBNA1*	Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie	EBNA1 ^{ΔGA} Expression, p3279 Enhancer(AldoB)-GRE ₄ (ACC)-L-PK Expression, p6277
HUH7	Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie	
HUH7-EBNA1*	Humane Leberzellkarzinom-Zelllinie	EBNA1 ^{ΔGA} Expression, p3279

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert (*). Bei den generierten Zelllinien ist jeweils das zur stabilen Transfektion/ Integration verwendete Expressionsplasmid angegeben.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung und Passagierung

Alle Zellen und Zelllinien wurden bei 37°C unter eine Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert.

HEK293 Zellen:

Die semi-adhärenenten HEK293 Zellen wurden in DMEM mit 7% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten und beim Erreichen einer Konfluenz von 80% verdünnt. Nach dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 10ml 1xPBS gewaschen, anschließend mit 2ml Trypsin versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um das Ablösen vom Boden der Zellkulturschalen zu fördern. Die Trypsinaktivität wurde im Anschluss mit 8ml frischem, FCS-haltigem, Zellkulturmedium geblockt. Die Zellen wurden anschließend abhängig von dem gewünschten Split-Verhältnis (normalerweise 1:10) in eine neue Zellkulturschale, welche anschließend mit Medium aufgefüllt wurde, überführt.

Hepatozyten (HepG2 und HUH7 Zellen):

Die adhärenenten Leberzell-Karzinom-Zelllinien HepG2 und HUH7 wurden in DMEM mit 7%FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% NEAA und 1% Glutamin gehalten. Beim Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen verdünnt. Hierzu wurden nach dem Waschen mit 1xPBS das Ablösen der Zellen durch die Zugabe von 3ml Trypsin und 5-minütiger Inkubation bei 37°C gefördert. Nach Zugabe von frischem Zellkulturmedium wurden die Zellen anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und abhängig vom gewünschten Verdünnungs-Verhältnis (normalerweise 1:6) ausplattiert.

4.1.2 Aufbewahrung von Zellen

Zur unbegrenzten Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff wurden 10⁷ Zellen pro 2ml-Gefäß (NUNC-Cryotube) in einem Gemisch aus 10% DMSO und 90% FCS resuspendiert. Zur schonenden Abkühlung wurden sie in einer Einfrierbox (NUNC) mit Isopropanolummantelung bei -80°C eingefroren und nach 48 Stunden in mit flüssigem Stickstoff gefüllte Kühltanks überführt.

Bei Wiederverwendung der Zellen wurden die Gefäße im 37°C-Wasserbad schnell aufgetaut, in vorgewärmten Zellkulturmedium gewaschen und anschließend in die Zellkulturschalen überführt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben abgelöst, resuspendiert und anschließend bei 1200rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10ml Zellmedium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Direkt im Anschluss wurden 10µl des Zell/Mediumgemisches unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer (0,0025mm²) gezählt. Diese Neubauer-Zählkammer besteht aus 4 Großquadraten mit einem Volumen von je 0,1µl, welche wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Es wurde darauf geachtet, dass Zellen nicht doppelt gezählt wurden. Die Gesamtzellzahl im Ausgangsvolumen wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

Gesamtzellzahl =

$$\frac{\text{Zellzahl}[x]}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}[4]} \times \text{Kammerfaktor}[10.000] \times \text{Ausgangsvolumen}[ml]$$

4.1.4 Ausplattieren der Zellen

Vor dem Ausplattieren wurde die benötigte Zellanzahl und das angemessene Zellmediumvolumen berechnet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gezählt, das Zell/Mediumgemisch ausplattiert und mit der entsprechenden Menge Medium versetzt.

In 10cm-Zellkulturschalen wurden 5x10⁶ Hepatozyten mit 10ml Medium ausgesät.

Für Transfektionen in Löchern einer 6-Loch-Platte wurden je 2 x 10⁵ Hepatozyten mit 2ml Medium ausplattiert.

4.1.5 Transfektion

Das Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) wurde zur Transfektion von HEK293, HepG2 und HUH7 Zellen verwendet. Für Transfektionen in 6-Loch-Zellkulturschalen wurden pro Loch 2µg DNA des jeweiligen Vektors eingesetzt und mit 300µl DMEM^{-FCS} versetzt. Vom Transfektionsreagenz wurden für Hepatozyten 6µg/µg DNA und für HEK293 Zellen 3µg/µg verwendet und ebenfalls in 300µl DMEM^{-FCS} gelöst. Die beiden

Ansätze wurden gemischt und nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch vorsichtig kreisend auf die Zellen gegeben und für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Wechsel zum herkömmlichen Zellkulturmedium.

Tab. 4-1 Ansatz PEI-Transfektion in einer 6-Loch-Zellkulturplatte

<i>Gesamtvolumen:</i>		600µl
2	µg	Vektor
6/ 12	µg	PEI
ad 600	µl	DMEM ^{-FCS}

4.1.6 Generierung stabiler Zelllinien

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit war die stabile Expression bestimmter Proteine nötig. Aus diesem Grund wurden verschiedene Zelllinien etabliert. Hierzu erfolgte zunächst eine Transfektion mit dem linearisierten Expressionsplasmid von Interesse. Nach 14-tägiger Antibiotikums-Selektion konnten Einzelkolonien von positiven Zellklonen isoliert zum Teil vereinzelt in ein neues Kulturgefäß überführt werden. Es erfolgte die weite Kultivierung unter Selektionsbedingungen.

4.1.7 Selektion

Je nach transfiziertem Plasmid wurden die Zellen mit Neomycin/G418 oder Hygromycin selektioniert. Die verwendeten Endkonzentration der Antibiotika für die jeweiligen Zelltypen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Für Neomycin/G418-Selektion wurde zunächst eine Antibiotikum-Stammlösung in PBS hergestellt, diese sterilfiltriert und direkt in die Zellkulturmediumsflaschen gegeben. Hygromycin-Selektion erfolgte durch die direkte Zugabe der kommerziell erworbenen Antibiotikum-Lösung in das Zellkulturmedium.

Tab. 4-2 Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion

<i>Zelllinientyp</i>	<i>Neomycin/ G418</i>	<i>Hygromycin</i>
HEK293	400 µg/ml	
HepG2	800 µg/ml	150 µg/ml
HUH7	500 µg/ml	100 µg/ml

4.2 DNA-Arbeitstechniken

4.2.1 DNA-Präparation (Mini-/Maxi-Prep)

Für die Mini-Prep wurden 2ml Ausgangskultur verwendet, 10 Minuten bei 4000rpm und 4°C herunter zentrifugiert und anschließend in 150µl Puffer E1 (aus dem JetStar 2.0 Plasmid Purification Kit, Genomed) resuspendiert. Die Bakterien wurden dann durch Zugabe von 150µl Puffer E2 lysiert, vorsichtig invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden durch Zugabe von 150µl Puffer E3 Proteine und chromosomale DNA ausgefällt und die Zelltrümmer dann 20 Minuten bei 13200rpm und 4°C herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Eppendorf Tube überführt und eine DNA-Fällung mit 450µl kaltem Isopropanol durchgeführt. Es folgte eine 20minütige Zentrifugation bei 13200rpm und 20°C. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und abermals für 10 Minuten bei 13200rpm und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Probe mit 100% Ethanol versetzt und erneut für 10 Minuten bei 13200rpm und 20°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, die DNA in 50µl 1xTE gelöst und die DNA-Konzentration im NanoDrop gemessen.

Maxi-Preps wurden mit Hilfe des JetStar 2.0 Plasmid Purification Kits der Firma Genomed durchgeführt.

Die über Nacht in 400ml LB-Medium angereicherten Bakterien wurden zunächst für 15 Minuten bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 10ml E1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde dann 10ml E2-Puffer zugegeben, invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Filter-Säule wurde währenddessen mit 30ml E4-Puffer äquilibriert. Zu den lysierten Bakterien wurde dann 10ml E3-Puffer zum Abstoppen der Reaktion gegeben und abermals durch Invertieren gut durchmischt, bevor die Lösung auf die Filter-Säule gegeben werden konnte. Nachdem die Flüssigkeit durch die Säule getropft war, wurde mit 60ml E5-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der DNA wurde 10ml E6-Lösung verwendet. Nach Zugabe von 10,5ml Isopropanol wurde das Eluat für 45 Minuten bei Raumtemperatur und 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend zunächst mit 2ml 70%igem und dann 5ml 100%igem Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet, in 400µl 1xTE eluiert und die DNA-Konzentration im NanoDrop gemessen.

4.2.2 Restriktionsverdau

Für Restriktion mittels Endonukleasen wurden 1-2µg DNA eingesetzt, die erforderliche Menge Restriktionsenzyme und 2µl des adäquaten 10xPuffer (NEBuffer 1.1, 2.1, 3.1, Cutsmart). Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt. Der Verdau wurde im Wasserbad bei 37°C für eine Stunde durchgeführt.

Tab. 4-3 Ansatz Restriktionsverdau

<i>Gesamtvolumen:</i>		<i>20 µl</i>
1-2	µg	DNA
x	µl	Enzym I (2-5 Units)
x	µl	Enzym II (2-5 Units)
2	µl	NEBuffer 1-4
ad 20	µl	H ₂ O

Die Inaktivierung erfolgte nach Angaben des Herstellers durch Inkubation für 20 Minuten bei 65°C oder 80°C im Heizblock.

4.2.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden

Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe von den DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Alkalischen Phosphatase aus dem Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP). Nach beendeter Restriktion wurde 1 Einheit der CIP zur linearisierten DNA gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms war nicht nötig.

4.2.4 Agarose-Gel Analyse

DNA-Proben wurden je nach Größe der erwarteten Fragmente auf 1-1,5%ige Agarose Gele aufgetragen. UltraPure Agarose wurde in 100ml 1xTAE-Puffer erhitzt und vor dem Gießen mit 3µl Ethidiumbromid versetzt. Die Gelkammer wurde mit 1xTAE-Puffer befüllt und das Gel eingelegt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6x Orange-G Ladepuffer versetzt. Zusätzlich wurde ein DNA-Standard (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) aufgetragen.

Kleine Gele liefen mit 90V und 400mA für eine Stunde. Mittlere Gele liefen mit 110V und 400mA für eine Stunde.

Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht (254nm).

4.2.5 Gelextraktion

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel wurde das Nucleo-Spin-Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Zunächst wurden die DNA-Fragmente von Interesse mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten und pro 100µg Gel 200µl NT-Puffer zur Probe gegeben. Zum Schmelzen der Agarose wurde dann für 10 Minuten bei 50°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf die SpinColumn Säule geladen und eine Minute bei 11000rpm zentrifugiert. Danach wurden die Membran durch zweimalige Zugabe 700µl NT3-Puffer auf die Säule gewaschen und jeweils bei 11000rpm eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Membran durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11000rpm getrocknet, bevor 30µl NE-Puffer zum Eluieren der DNA hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur wurde dann abschließend die DNA bei 11000rpm für eine Minute aus der Membran eluiert.

4.2.6 Ligation

Ligationen fanden stets in drei verschiedenen Ansätze mit einem Vektor zur Fragment Verhältnis von 1:3, 1:5 und 1:10 statt. Dieses Verhältnis wurde anhand der DNA Konzentration von Fragment und Vektor, sowie der Länge der DNA Fragmente berechnet. Entsprechend dieser Berechnungen wurden die Volumina von Vektor und Fragment für die Ligation bestimmt. Zu den Ansätzen wurde je 0,5µl T4 DNA Ligase sowie 1,5µl 10xT4 DNA Ligase Puffer gegeben und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt.

Tab. 4-4 Ligationsansatz

<i>Gesamtvolumen:</i>	15 µl
0,5 µl	T4 DNA Ligase
1,5 µl	T4 DNA Ligase Puffer
x µl	Vektor
y µl	Fragment
ad 15 µl	H ₂ O

Nach Durchmischen der Ansätze wurden diese bei Klebeend-Ligationen für 2 Stunden bei Raumtemperatur, bei Glattend-Ligationen für 12 Stunden bei 16°C inkubiert.

4.2.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus gewonnener RNA erfolgte mithilfe des SCRIPTUM First (Strand) Kits von Bio&SELL bzw. mittels dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von Invitrogen. Es wurden 1,5µg RNA und Oligo-(dt)20 Primer eingesetzt und nach Herstellerangaben umgeschrieben. Die gewonnene cDNA konnte anschließend in 1:4, 1:6 und 1:8 Verdünnungen zur Analyse per quantitativer Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt werden.

4.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Mullis, Faloona et al., 1986). Alle PCR-Reaktionen wurden mit der PWO-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50µl mit 100pg/µl Kopiervorlage-DNA nach Angaben des Herstellers angesetzt. Das Standard-Temperaturprofil wurde wie folgt gefahren:

Tab. 4-5 PCR Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	98 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	20 Sek
Anlagerung*	50-60 °C	30 Sek
Verlängerung	68 °C	45 Sek
Verlängerung	68 °C	7 min
Abkühlung	4 °C	-

} 25 Zyklen

Die Anlagerungs-Temperatur (*) wurde anhand der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese wie beschrieben aufgetrennt, isoliert und anschließend aufgereinigt.

4.2.9 HIRT-Extraktion und Plasmid-Wiedergewinnungsversuche („Plasmid rescue“)

Die Extraktion extrachomosomal DNA mit niedrigem Molekulargewicht aus HepG2- und HUH7 Zellen erfolgte nach dem HIRT-Protokoll (Hirt, 1966). Konfluente 15cm-Zellkulturschalen mit etwa 5×10^6 Zellen wurden nach dem Verwerfen des Mediums mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von je 1,5ml TEN-

Puffer und 2x HIRT-Puffer. Die Zellkulturschalen wurden vorsichtig für 1 Minute rotiert und das Lysat anschließend in ein 12ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 750µl 5M NaCl-Lösung wurden die Proteine und genomische DNA über Nacht bei 4°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 20000x g wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Es folgte eine Waschung der DNA mit 70% und 100% Ethanol, bevor sie in 50µl 1xTE aufgenommen wurde.

Die durch die HIRT-Extraktion gewonnene DNA enthält neben dem Hauptteil an gescherter chromosomaler DNA auch niedermolekulare extrachromosomale Plasmid-DNA. Um die in den Zellen episomal-replizierte DNA von der nicht-replizierten transfizierten Ausgangs-DNA zu unterscheiden, wurde die DNA mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* 1 Stunde inkubiert, welches *dam*-Methylierungsspezifisch spaltet. Die zur Transfektion der Zellen eingesetzte Plasmid-DNA wurde in DH5α- *Escherichia coli* Bakterien angereichert und durch deren *dam*-Methylase methyliert. Die in humanen Zellen replizierte Plasmid-DNA ist nicht *dam*-methyliert. Durch die *DpnI*-Spaltung wurden so die primär transfizierte DNA zum Großteil fragmentiert, was eine Differenzierung des Replikationsortes der Plasmid-DNA erlaubt. Im Anschluss an die Spaltung erfolgte eine erneute DNA-Fällung und Transformation durch Elektroporation von 350ng DNA in elektrokompetente *E.coli* DH10B Bakterien. Diese wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Zählung der ausgewachsenen Bakterienkolonien.

Zur Verifizierung der Ergebnisse und Ausschluss möglicher Kontaminationen erfolgte eine Anreicherung der wiedergewonnenen Plasmid-DNA mit anschließender DNA-Isolation, Kontrollverdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und Agarose-Gel Analyse.

4.3 Plasmidanreicherung

4.3.1 Transformation

E.coli-DH5α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 100µl Bakterien wurden anschließend zu der DNA gegeben, gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Auf die Inkubation folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Als letztes wurde 1ml LB-Medium auf den Ansatz gegeben und für 45 Minuten auf dem Schüttlerinkubator bei 37°C inkubiert.

4.3.2 Ausplattieren der Bakterien

Die bei 37°C inkubierten Bakterien wurden 5 Minuten bei 1200rpm herunter zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 200µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden abhängig von dem transformiertem Plasmid auf Kanamycin- (50mg/ml) oder Ampicillin-Agarplatten (100mg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.3 Über-Nacht Bakterienkulturen

Von der Agarplatte mit den transformierten Bakterien wurden 10 Kolonien mit Hilfe einer 20µl Eppendorf Pippettenspitze gepickt und in 3ml LB-Medium + 3µl Kanamycin (50mg/ml) bzw. 3µl Ampicillin (100mg/ml) über Nacht bei 37°C angereichert. Von 2ml dieses Bakterien/Mediumsgemisches wurde eine Mini-Prep durchgeführt. Nach erfolgreichem Kontrollverdau wurde entweder auf einer Retransformation des positiven Klons oder mit 10µl der Über-Nacht-Bakterienkultur in 400ml LB-Medium + 400µl Kanamycin (50mg/ml) bzw. 400µl Ampicillin (100mg/ml) eine Maxi-Prep angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4 Gen- und Proteinexpressionsanalyse

4.4.1 Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung (FACS)

Die Zellen wurden geerntet, in 1ml PBS+1%FCS resuspendiert und 8 Minuten bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 200µl PBS+1%FCS+1:200 To-Pro®3 resuspendiert. Die Proben wurden mit To-Pro®3 gefärbt, um die toten Zellen zu detektieren, und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Unmittelbar vor dem Einmessen am BD FACSCalibur wurden die Proben durchmischt und in ein FACS-Tube überführt. Je nach Gesamtzellzahl wurden 10^5 – 10^6 lebende Zellen eingelesen.

4.4.2 SDS-Page und Western Blot

4.4.2.1 Proteinpräparation

Zur Proteinanalyse wurden Proteine aus 2×10^6 transfizierten HEK293-, HUH7- beziehungsweise HepG2 Zellen gewonnen.

Proteinpräparation für denaturierten Western Blot:

Alle der folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in 400µl RIPA-Puffer + Complete Proteinase-Inhibitor resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 4°C für 20 Minuten auf einem Überkopfschüttler. Anschließend wurden die Zelltrümmer des Lysats für 10 Minuten bei 13200rpm und 4°C abzentrifugiert und der die Proteine enthaltene Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels des Bradford-Tests bei einer OD von 600nm bestimmt. 50ng Protein wurden dann mit 5xLaemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die isolierten Proteine wurden bei -20°C gelagert.

4.4.2.2 Proteindetektion

Die gewonnenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und über Färbungen mit HRP-gekoppelten Antikörpern detektiert.

4.4.2.3 Denaturierte SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese):

Ein 8%iges Polyacrylamid Trenngel wurde zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen und mit 1ml Isopropanol überschichtet.

Tab. 4-6 Ansatz 8%iges Polyacrylamid Trenngel

<i>Gesamtvolumen:</i>	<i>14,978ml</i>
7,85 ml	H ₂ O
4 ml	30% Acrylamid Mix
3 ml	TG-Puffer 5x
125 µl	10% APS
30 µl	TEMED

Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen. Das 4%ige Sammelgel wurde auf das ausgehärtete Trenngel gegossen.

Tab. 4-7 Ansatz 4%iges Sammelgel

<i>Gesamtvolumen:</i>	<i>5,001ml</i>
2,5 ml	SG-Puffer 2x
1,8 ml	H ₂ O
660 µl	30% Acrylamid Mix
50 µl	10% APS
1 µl	TEMED

Das im Probenpuffer enthaltene SDS überlagert mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Aminosäuren und entfaltet die Proteine, sodass eine Auftrennung nach Molekulargewicht möglich wird (denaturierende Methode).

Das ausgehärtete Gel wurde mit 10µl Page Ruler Prestained Plus Proteinstandard und den Proben beladen. Die Proteinauftrennung fand während einer Stunde bei 100V statt.

Western Blot:

Das Gel wurde aus der Glaskammer gelöst und mit einer Polyvinylidenfluorid (PVDF) Trägermembran überdeckt. Von beiden Seiten wurden zwei Whatman-Filterpapiere eingelegt, die Luft zwischen den Schichten mittels eines 15ml-Falcon herausgepresst und die Proteine während einer Stunde bei 15V im Semi-Dry Blotter auf die Membran transferiert.

Proteindetektion:

Filterpapiere und Gel wurden danach verworfen und die PVDF-Membran zur Proteindetektion kurz in Ponceau Red geschwenkt um zu kontrollieren, ob der Proteintransfer erfolgreich war. Ponceau Red wurde anschließend mit H₂O aus der Membran gewaschen. Diese wurde als nächstes eine Stunde bei Raumtemperatur in 5%Milchpulver (MP) in 1xPBST inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

Der Primärantikörper wurde in 20ml 1xPBST über Nacht bei 4°C auf dem Rolleninkubator mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3mal in 1xPBST gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in 2,5% MP in 1xPBST für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben wurde. Im Anschluss wurde erneut drei Mal für 10 Minuten mit 1xPBST gewaschen. 1ml ECL Western

Blotting Substrate (je 0,5ml Reagenz 1 und 2) wurde mit 3µl H₂O₂ versetzt und im Anschluss auf die abgetropfte Membran gegeben, eine Minute inkubiert und diese anschließend in einer Folie verpackt. Die an den Sekundärantikörper konjugierte HRP ermöglichte die Detektion mit Hilfe von ECL Western Blotting Substrate. Durch die Zugabe oxidiert die HRP, das in der ECL-Mischung enthaltene Lumigen PS-3 Acriden Substrat- Das entstandene Produkt luminesziert und belichtet so den aufgelegten Audiographiefilm in einer Röntgenkassette. Die Belichtungszeit variierte zwischen fünf Sekunden und 45 Minuten.

4.4.3 RNA-Gewinnung

Zur Analyse glukose-abhängiger Insulin-mRNA-Expression wurden 5x10⁶ Zellen für 16 Stunden mit Zellkulturmedium unterschiedlichem Glukosegehalts inkubiert und anschließend die RNA mittels des RNEasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Noch in der Probe enthaltene DNA wurde auf der Säule mit der RNase-freien DNaseI (Qiagen) nach Angaben des Herstellers fragmentiert. Die Konzentration der verbleibenden RNA konnte am NanoDrop gemessen und zur Synthese von cDNA verwendet werden.

4.4.4 Quantitative PCR („real-time-PCR“)

Die „real-time“ PCR (RT-PCR) diente der quantitativen Analyse der Insulin-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der im Zellkulturmedium-vorhanden Glukosekonzentration. Hierzu wurde die vorhandene mRNA zunächst wie in 4.2.7 beschrieben, in cDNA umgeschrieben und eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 3.6 aufgelistet. Die Quantifizierung und Analyse der DNA erfolgte mit Hilfe des LightCyclers (Robert, Lin et al.) in Standarteinstellungen nach Empfehlung des Herstellers. Der kommerziell erhältliche „Light Cycler PCR Reaction Mix“ enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, welcher sich während der Amplifikation in die doppelsträngige DNA einlagert. Die ermittelte Fluoreszenz wird von dem Gerät nach jedem Zyklus gemessen und erlaubt eine quantitative Analyse (Higuchi, Fockler et al., 1993). Die LightCycler-480-Software (Version 1.5) kann Standardkurven mit Hilfe von Verdünnungen der zu detektierenden cDNA und den zugehörigen Schmelzkurven berechnen. Anhand dieser Schmelzkurve wird die Kopienzahl der zu quantifizierenden DNA-Probe bestimmt.

Tab. 4-8 Standard-Reaktionsansatz für qPCR*Gesamtvolumen: 10 μ l*

5	μ l	cDNA
1	μ l	Polymerase-Mix (Roche) (enthält dNTP's, DNA-Polymerase, SYBR-Green)
0,5	μ l	Oligonukleotid-Mix (1:1 Gemisch, je 10 μ M)
ad 10	μ l	H ₂ O

Normalisierung auf den DNA-Standard Aktin ermöglichte dann eine quantitative Aussage zur jeweiligen relativen Menge an Insulin-cDNA in den unterschiedlich behandelten Proben. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Der jeweilige Mittelwert der relativen Insulinexpression wurde dann durch den Mittelwert der Kontrolle geteilt.

4.4.5 Mikroskopie

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop auf ihre Morphologie und Konfluenz hin untersucht. Bei transfizierten Zellen war es zum Teil auch möglich, die GFP-Expression unter Fluoreszenzanregung zu beurteilen, um so einen Eindruck von dem Zellstoffwechsel und der Plasmid-Stabilität zu erhalten.

4.5 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Prism Version 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Es wurden Varianzanalysen (ANOVA) und ungepaarte *t*-tests durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung wiedergegeben. *P*-values <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Plasmiderhaltung in EBNA1-exprimierenden Hepatozyten

Hepatozyten eignen sich aufgrund ihrer Stoffwechsel-Eigenschaften und etablierter, sicherer Applikationsmöglichkeiten als potentielles Ziel für eine plasmidbasierte Gentherapie von Diabetes mellitus Typ 1.

Aus diesem Grund erfolgten nun erstmalig Plasmid-Erhaltungsversuche der bereits in EBNA1-positiven HEK293, HeLa und D98/HR1 Zellen erfolgreich getesteten Plasmide *oriP* und pCON^{CENP-A} (Abb. 2-8, Tab. 2-1 und Tab. 2-2, Lara Schneider, unveröffentlichte Daten). Die Plasmiderhaltung wurde in zwei Zelllinien mit Ursprung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) verglichen: HepG2 und HUH7 Zellen.

5.1.1 Generierung von HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 Zelllinien

Grundlegend für therapeutische Genvektoren zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen ist eine langfristige Erhaltung in den Zielzellen. Für die stabile Erhaltung der autonomen *oriP*-Plasmide ist die Kombination von Replikation und Segregation essentiell, beide Funktionen werden von EBNA1 vermittelt. Während die Segregation des pCON^{CENP-A}-Systems durch die Interaktion von *tetO* Elementen und dem scetR:CENP-A Fusionsprotein gewährleistet ist, ist die Replikation derzeit noch EBNA1-abhängig.

Aus diesem Grund war es zunächst nötig, EBNA1-exprimierende Hepatozyten zu generieren, um anschließend Plasmid-Erhaltungsversuche durchführen zu können. Hierzu wurde zunächst das EBNA1^{ΔGA} Expressionsplasmid p3279 (pCMV-EBNA1^{ΔGA}) mit *ScaI* linearisiert und anschließend in HUH7 und HepG2 Zellen transfiziert und mit Neomycin (G418) selektioniert. Es folgte die Isolierung und Kultivierung von Einzelkolonien.

Zur Kontrolle der EBNA1-Expression wurde eine denaturierte SDS-PAGE und Western Blot von Zelllysaten durchgeführt.

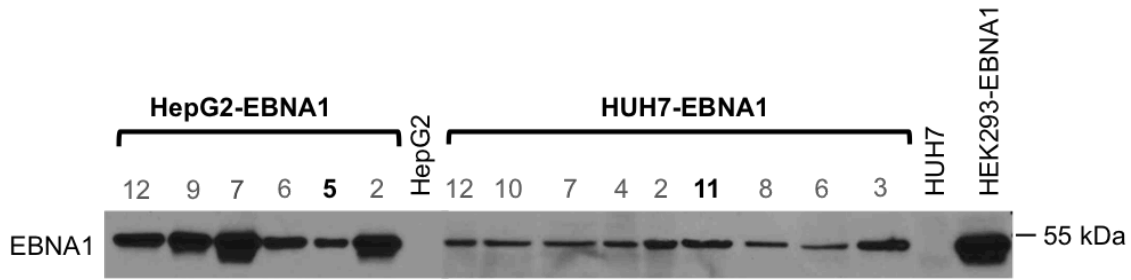


Abb. 5-1 Stabile EBNA-1-Expression in Hepatozyten

Klone unterschiedlich starker EBNA1^{ΔGA}-Expression (ca. 55kDa) in HepG2 und HUH7-EBNA1 Zellen. Als Positivkontrolle wurde eine bereits etablierte HEK293-EBNA1-Zelllinie (1. Bande von rechts) und als Marker der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) genutzt. Als Negativkontrollen wurden die Wildtyp-Ausgangszelllinien HepG2 und HUH7 eingesetzt. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Expressionsniveau des EBNA1^{ΔGA}-Proteins. Fett markierte Klone HepG2-EBNA1 #5 und HUH7-EBNA1 #11 mit vergleichbarem EBNA1-Expressionsniveau wurden im Rahmen der Arbeit weiterverwendet.

Da das integrierte EBNA1-Protein (EBNA1^{ΔGA}) eine Deletion der Glyzin-Alanin-Wiederholungen hat, ist sein Molekulargewicht mit 55 Kilodalton etwas kleiner als das des Wildtyp-EBNA1-Proteins mit 70 Kilodalton. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird EBNA1^{ΔGA} übersichtshalber mit EBNA1 abgekürzt, während bei Erwähnung des Wildtyp-EBNA1-Proteins explizit auf den Wildtyp hingewiesen wird.

Es konnten für beide Zelllinien Klone mit unterschiedlich starken Expressionsniveaus des EBNA1-Proteins generiert werden. Für nachfolgende Versuche wurden aufgrund eines vergleichbaren Expressionsniveaus Klon 5 der HepG2-EBNA1-Zelllinie und Klon 11 der HUH7-EBNA1-Zelllinie verwendet (Abb. 5-1).

5.1.2 Plasmid-Wiedergewinnungsversuche in HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1

Nach der Generierung HepG2-EBNA1⁺ und HUH7-EBNA1⁺ Hepatozyten war die Grundlage geschaffen, Plasmid-Wiedergewinnungsversuche durchzuführen. Hierzu wurden die Zellen in einer 2cm-Zellkulturschale mit 2 µg DNA des zu untersuchenden Plasmid transfiziert und über mehrere Wochen mit dem Antibiotikum Hygromycin selektioniert bis die Zelllinien in 15cm-Zellkulturschalen eine ca. 80%igen Konfluenz erreicht hatten. Diese Etablierungsphase unter Selektionsdruck dauerte im Mittel ca. 4 Wochen, zeigte jedoch eine große Varianz (Tabellen 5-1 und 5-2).

Konfluente Zellen wurden nach der HIRT Methode lysiert und, wie in 4.2.9 beschrieben, die DNA mit niedrigem Molekulargewicht angereichert. Dazu gehört auch die Plasmid-DNA. Die so gewonnene DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* behandelt, um die nicht replizierten *Dam*-methylierten Plasmide bakteriellen Ursprungs zu eliminieren. Die über den Selektionszeitraum extrachromosomal erhaltene und in den Hepatozyten replizierte Plasmid-DNA besitzt kein *Dam*-Methylierungsmuster und ist somit *DpnI* resistent. Die DNA wurde aufgereinigt, 350ng in elektrokompetente *E.coli* Bakterien transfiziert und über Nacht unter Ampicillin Selektionsdruck bei 37°C inkubiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein wiedergewonnenes intaktes Plasmid zur Ausbildung von einer Kolonie führt (Aloys Schepers, persönliche Mitteilung). Die Anzahl resistenter Kolonien dient somit als Maß für die mitotische Stabilität und für die Replikationseffizienz der Plasmide.

Die Plasmid-Wiedergewinnungsversuche wurden als Positivkontrolle mit *oriP*-Plasmiden und mit den zu untersuchenden pCON^{CENP-A}-Plasmiden durchgeführt. Bei letzteren wurde zudem zwischen einer CMV- und einer mini-Ecad-Promotor getriebenen Expression des sc tetR:CENP-A Fusionsproteins differenziert.

5.1.2.1 *oriP*-Plasmid-Wiedergewinnung

Die folgenden Versuche wurden mit dem Wildtyp-*oriP* enthaltenden Plasmid p3230 in HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 durchgeführt. Die Erhaltung des Plasmids soll durch die Interaktion von EBNA1 mit den FR und DS Elementen des *oriP* gewährleistet sein. Unter Selektionsdruck ist eine stabile Erhaltung zu erwarten.

In der folgenden Tabelle ist jeweils die Etablierungsdauer in Wochen und Tagen bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz angegeben:

Tab. 5-1 Die Etablierungsphase von *oriP*-Plasmiden variiert in Hepatozyten

Gezeigt ist die Dauer der Etablierungsphase von *oriP*-Plasmiden der einzelnen Experimente (Abb. 5-2) in den Zelllinien HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 in Wochen, bzw. Tagen. Die abgeschlossene Etablierungsphase wurde als das Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz der Zellen auf 15cm-Zellkulturschalen (ca. 2×10^7 Zellen) definiert.

Zelllinie	HepG2-EBNA1	HUH7-EBNA1
Experiment 1	1,7 (12)	3 (21)
Experiment 2	2,3 (16)	2,3 (16)
Experiment 3	1,7 (12)	3,7 (26)
Experiment 4	2,3 (16)	2,3 (16)
Experiment 5	5,4 (38)	3 (21)
Mittelwert Wochen (Tage)	2,68 (18,8)	2,86 (20)

Insgesamt wurden fünf einzelne Experimente unabhängig voneinander durchgeführt. In HepG2-EBNA1 Zellen konnten nach einer in der Regel zweiwöchigen initialen Etablierungsphase die Plasmid-Wiedergewinnungsversuche durchgeführt werden (Abb. Tab. 5-1). In HUH7-EBNA1 war die Etablierungsphase etwas länger (Tab. 5-1). Wie Abbildungen 5-2 B und D zu entnehmen ist, war die Plasmidanzahl nach der Etablierungsphase in HepG2-EBNA1 Zellen deutlich höher als in HUH7-EBNA1 Zellen. Die Koloniezahl kann mit der Plasmidanzahl in einer definierten Menge isolierter DNA gleichgesetzt werden, da davon ausgegangen werden kann, dass während der Elektroporation ein Plasmid pro kompetentem Bakterium aufgenommen wird und zur Ausbildung einer Kolonie führt.

In HepG2-EBNA1 Zellen waren maximal ca. 10000 replizierte Plasmide nachweisbar, während in HUH7-EBNA1 Zellen maximal ca. 840 replizierte Plasmide detektierbar waren (Abb. 5-2 B, D).

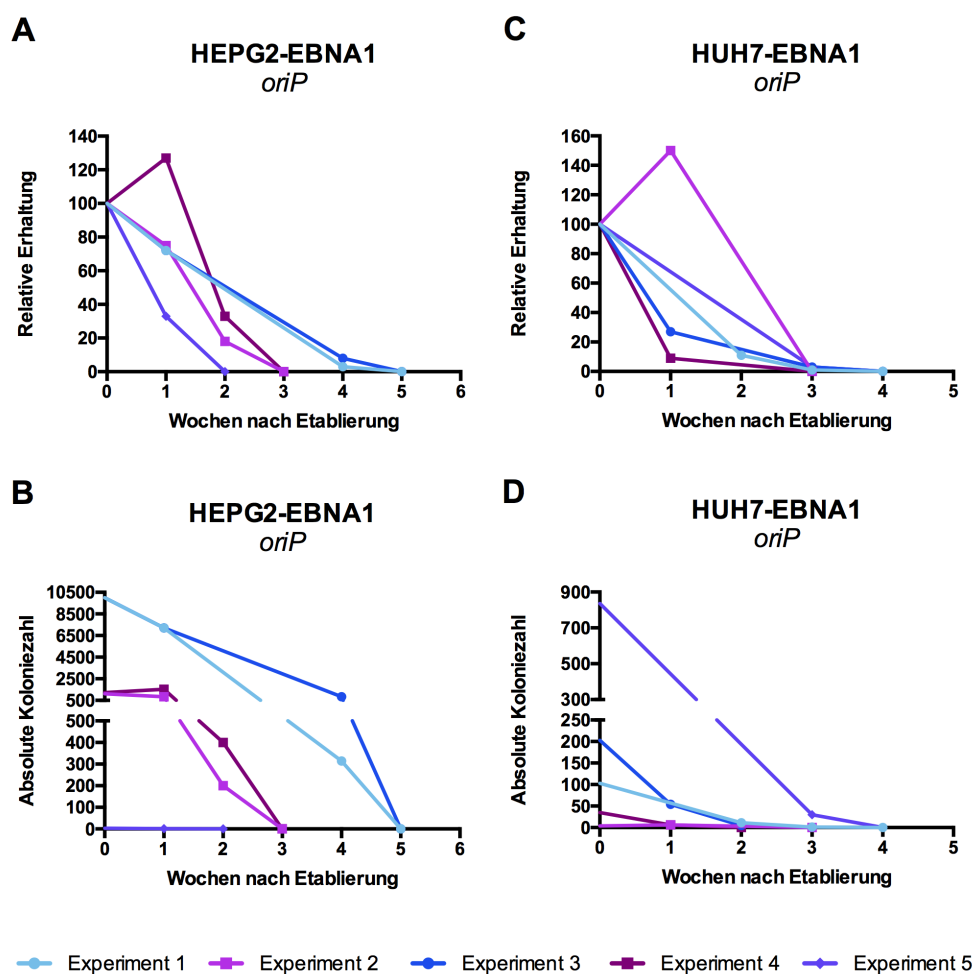


Abb. 5-2 *oriP*-Plasmide können aus Hepatozyten für bis zu 4 Wochen wiedergewonnen werden

Zeitliche Erhaltung der Wildtyp-*oriP*-Plasmide. Der Beginn der Graphen entspricht den ersten durchgeführten Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen am jeweiligen Tag 0 nach der Etablierungsphase. In **A** und **B** ist die Erhaltung in HepG2-EBNA1 Zellen, in **C** und **D** die Erhaltung in HUH7-EBNA1 Zellen zu sehen. Abbildungen der oberen Reihe (**A** und **C**) zeigen die Plasmiderhaltung in Prozent, relativ zum Wert der 1. Auswertung zum Zeitpunkt 0. Untere Abbildungen (**B** und **D**) zeigen den Verlauf der absoluten Koloniezahlen ab dem Zeitpunkt 0. Die Koloniezahl entspricht der Anzahl an episomal replizierten Plasmiden.

Das Maximum an replizierten Plasmiden wurde in HepG2-EBNA1 Zellen in den Experimenten mit der geringsten Etablierungsdauer von 12 Tagen beobachtet (Abb. 5-2 B, Tab. 5-1, Experiment 1 und 3). Das Minimum von 4 wiedergewonnen Plasmiden zum Zeitpunkt 0 wurde in Experiment 5 nach einer Etablierungsphase von 38 Tagen detektiert (Abb. 5-2 A, B, Tab. 5-1). 5,4 Wochen nach Transfektion, war die

Plasmidanzahl in Experiment 2 und 4 bei einer Etablierungsphase von 16 Tagen ebenfalls unterhalb der Detektionsgrenze der Plasmid-Wiedergewinnungsversuche („*plasmid rescue*“) Versuche (Abb. 5-2 A, B, Experimente 2 und 4 in Woche 3). Bei einer Differenz von 4 Tagen bis zur erfolgreichen Etablierung konnte eine um knapp 90% geminderte Plasmid-Wiedergewinnung beobachtet werden (Abb. 5-2 B, Experiment 1-4). Experiment 5 hatte folglich bei einer etwa doppelten Länge der Etablierungsphase eine Reduktion von 99,96 % zur Folge. Aus den HepG2 Experimenten geht hervor, dass die Ausgangskopienzahl mit der Länge der Etablierungsphase korreliert.

In HUH7-EBNA1 wurden in Experiment 5 zum Zeitpunkt 0 mit 838 Kolonien die meisten replizierten Plasmide detektiert (Abb. 5-2 D). Die Etablierungsphase lag hier mit 3 Wochen knapp über dem Durchschnitt von 20 Tagen (Tab. 5-1). Bei einer kürzeren Etablierungsphase von 16 Tagen konnten hingegen lediglich 4 Plasmide in Experiment 2 wiedergewonnen werden, deren Anzahl nach einer weiteren Woche kurzfristig auf 6 anstieg und nach 2 weiteren Wochen nicht mehr nachweisbar war. Da die Plasmidanzahl in diesem Experiment nahe der Detektionsgrenze schwankt, ist hier die Vergleichbarkeit zu den anderen 4 Experimenten schwierig. In diesen Experimenten korreliert die Ausgangskopienzahl nicht mit der Länge der Etablierungsdauer.

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass eine initial hohe Zahl an replizierten Plasmiden positiv mit der Plasmiderhaltungsdauer korreliert. Je mehr Plasmide nach der Etablierungsphase vorhanden waren, desto länger dauerte es, bis sie mit der gewählten Versuchsmethode nicht mehr detektierbar waren (Abb. 5-2 B, D). In den HUH7-Zellen ist die Kopienzahl deutlich geringer als in HepG2-Zellen, ein weiteres Indiz dafür, dass die durchschnittliche Kopienzahl pro Zelle sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheidet (ein Charakteristikum für jede Zelllinie ist).

5.1.2.2 pCON^{CENP-A}-Plasmid-Wiedergewinnung

Um zu untersuchen, ob die Expressionshöhe des *sctetR:CENP-A*-Proteins einen Einfluss auf die Kopienzahl hat, wurde zwei Reporterplasmide mit unterschiedlich starken Promotoren für *sctetR:CENP-A* verwendet: beide Zelllinien wurden unabhängig voneinander mit den beiden Reporterplasmiden pCON^{CENP-A}-Plasmiden p4292 (mini-Ecad-tetO₂₀/DS-*sctetR:CENP-A*) und p6083 (CMV-tetO₂₀/DS-

sctetR:CENP-A) transfiziert (für weitere Informationen zu den Promotoren siehe Kapitel 2.3.1.1.3).

Die mit pCON^{CENP-A} transfizierten Zellen beider Linien wirkten unabhängig vom Promotor morphologisch deutlich gestresster, waren durch ein langsames Wachstum gekennzeichnet als mit *oriP* transfizierte Zellen und konnten dem Selektionsdruck meist nicht standhalten. Aus diesem Grund waren nicht alle der 5 durchgeführten Experimente auswertbar. Die oben genannten Aspekte gehen mit der niedrigen ermittelten Kopienzahl einher.

Nach Transfektion von CMV-getriebenen pCON^{CENP-A}-Plasmiden erfolgte in beiden Zelllinien zweimalig das Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz der Zellen auf 15cm-Zellkulturschalen, welches als abgeschlossene Etablierung gewertet wurde und eine Versuchsanalyse erlaubte. Mit dem mini-Ecad-getriebenen System gelang dies zweimalig in HepG2-EBNA1 Zellen. HUH7-EBNA1 Zellen ließen sich mit dem mini-Ecad-pCON^{CENP-A} nicht unter Selektionsdruck kultivieren.

Der Zeitpunkt 0, also der definierte Etablierungsabschluss, wurde insgesamt später als bei *oriP*-Plasmiden erreicht und schwankte insbesondere beim CMV-pCON^{CENP-A} in HepG2-Zellen zwischen den Experimenten. Zur Verdeutlichung ist in Tab. 5-2 die Dauer der Etablierungsphase der einzelnen Experimente in Wochen und Tagen angegeben.

Tab. 5-2 Die Etablierungsphase von pCON^{CENP-A}-Plasmiden ist promotor- und zelltyp-abhängig

Dauer der Etablierungsphase von pCON^{CENP-A}-Plasmiden der einzelnen Experimente in den Zelllinien HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 in Wochen, bzw. Tagen. Die abgeschlossene Etablierungsphase wurde als das Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz der Zellen auf 15cm-Zellkulturschalen (ca. 2×10^7 Zellen) definiert.

Zelllinie	HepG2-EBNA1		HUH7-EBNA1
Plasmid	CMV-sctetR:CENP-A	mini-Ecad-sctetR:CENP-A	CMV-sctetR:CENP-A
Experiment 1	6,6 (46)	4,9 (34)	4,9 (34)
Experiment 2	4,7 (33)	4,1 (29)	4,7 (33)
Mittelwert Wochen (Tage)	5,64 (39,5)	4,5 (31,5)	4,8 (33,5)

Für beide getesteten Reporterplasmide konnte in HepG2-EBNA1 Zellen in einem Experiment zum Zeitpunkt 0 eine eindeutige Plasmid-Wiedergewinnung erzielt werden (75 Plasmide bei CMV-pCON^{CENP-A}, und 48 Plasmide bei Ecad-pCON^{CENP-A}, vergleiche Abb. 5-3 D und Abb. 5-3 B). In dem jeweils anderen Experiment wurde initial lediglich eine Kolonie detektiert. Bei HUH7-EBNA1 Zellen ist die absolute Koloniezahl zum Zeitpunkt 0 deutlich geringer (3 bzw. 5 Kolonien, Abb. 5-3 F).

In HepG2-EBNA1 ist *oriP* frühestens ab Tag 12 nach Transfektion 80% konfluent auf einer 15cm-Zellkulturschale und bis Tag 46 nachweisbar (Tab. 5-1, Abb. 5-2 A, 5-4 A). Das mini-Ecad-pCON^{CENP-A}-Plasmid ist ab Tag 29 etabliert und bis Tag 46 nach Transfektion detektierbar (Tab. 5-2, Abb. 5-3 A, 5-4 A). CMV-pCON^{CENP-A} etabliert sich frühestens an Tag 33 und ist bis Tag 53 detektierbar (Tab. 5-2, Abb. 5-3 C, 5-4 A). In HUH7-EBNA1 braucht *oriP* mindestens 16 Tage zur Etablierung und wird bis Tag 43 erhalten (Tab. 5-1, Abb. 5-2 C, 5-4 B). Die Wiedergewinnung des CMV-pCON^{CENP-A} war von dem 33. Tag bis zum 40. Tag möglich (Tab. 5-2, Abb. 5-3 E, 5-4 B). Die episodale Erhaltung des mini-Ecad-pCON^{CENP-A} war in HUH7-EBNA1 unterhalb der Detektionsgrenze.

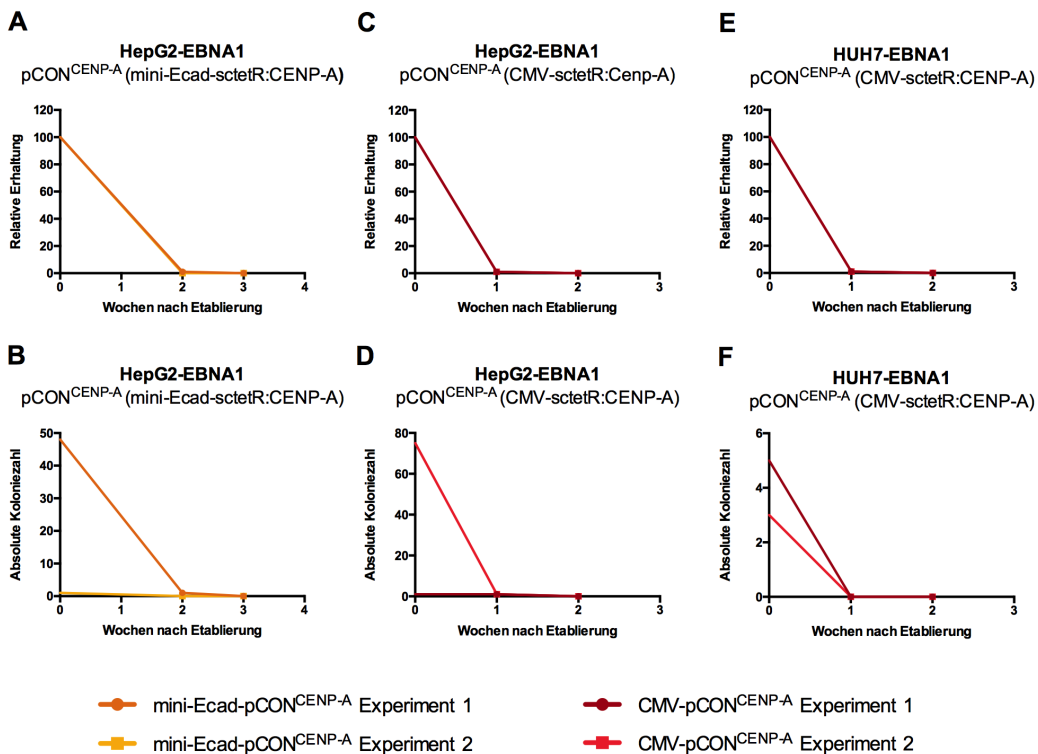


Abb. 5-3 pCON^{CENP-A}-Plasmide können aus Hepatozyten wiedergewonnen werden

Zeitliche Erhaltungsdauer der pCON^{CENP-A}-Plasmide in HepG2-EBNA1 (A, B, C, D) und HUH7-EBNA1 Zellen (E und F). Der Beginn der Graphen entspricht den

ersten durchgeführten Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen am jeweiligen Tag 0 nach der Etablierungsphase. Obere Abbildungen (**A**, **C**, **E**) zeigen die Plasmiderhaltung in Prozent, relativ zum Wert der 1. Auswertung zum Zeitpunkt 0, dem Abschluss der Etablierungsphase. Darunter sind jeweils die absoluten Koloniezahlen ab dem Zeitpunkt 0 dargestellt (**B**, **D**, **F**). Die Koloniezahl kann mit der Zahl an episomal replizierten Plasmiden gleichgesetzt werden. HepG2-EBNA1 Zellen wurden entweder mit mini-Ecad-tetO₂₀/DS-sctetR:CENP-A Plasmiden (p4292 **A**, **B**) oder CMV-tetO₂₀/DS-sctetR:CENP-A Plasmiden (p6083 **C**, **D**) getestet. In HUH7-EBNA1 Zellen konnten CMV-tetO₂₀/DS-sctetR:CENP-A Plasmide wiedergewonnen werden (p6083 **E**, **F**).

In den Experimenten mit dem pCON^{CENP-A} lässt sich unabhängig vom Promotor keine eindeutige Aussage zur Korrelation von Ausgangskopienzahl und Länge der Etablierungsdauer treffen. Dies liegt auch an der geringen Anzahl auswertbarer Experimente. In HepG2-EBNA1 Zellen promotorunabhängig eine höhere Kopienzahl erreicht als in HUH7-EBNA1 Zellen. Allerdings war im CMV-pCON^{CENP-A} Experiment 1 mit der längsten Etablierungsdauer zwar die kleinste initiale Plasmidkopienzahl von 1, jedoch auch der späteste Plasmidnachweis insgesamt möglich (Tab. 5-2, CMV-pCON^{CENP-A} Experiment 1, Nachweis von Tag 46 bis Tag 53, Abb. 5-3 D, Abb. 5-4 A).

Für eine bessere Vergleichbarkeit erfolgt eine graphische Darstellung aller auswertbaren *oriP* und pCON^{CENP-A} Experimente im zeitlichen Verlauf von Tagen nach Transfektion in Abb. 5-4. In der folgenden Abbildung ist der Zeitverlauf der Etablierung und Erhaltung der untersuchten Plasmide ab dem Tag der Transfektion dargestellt.

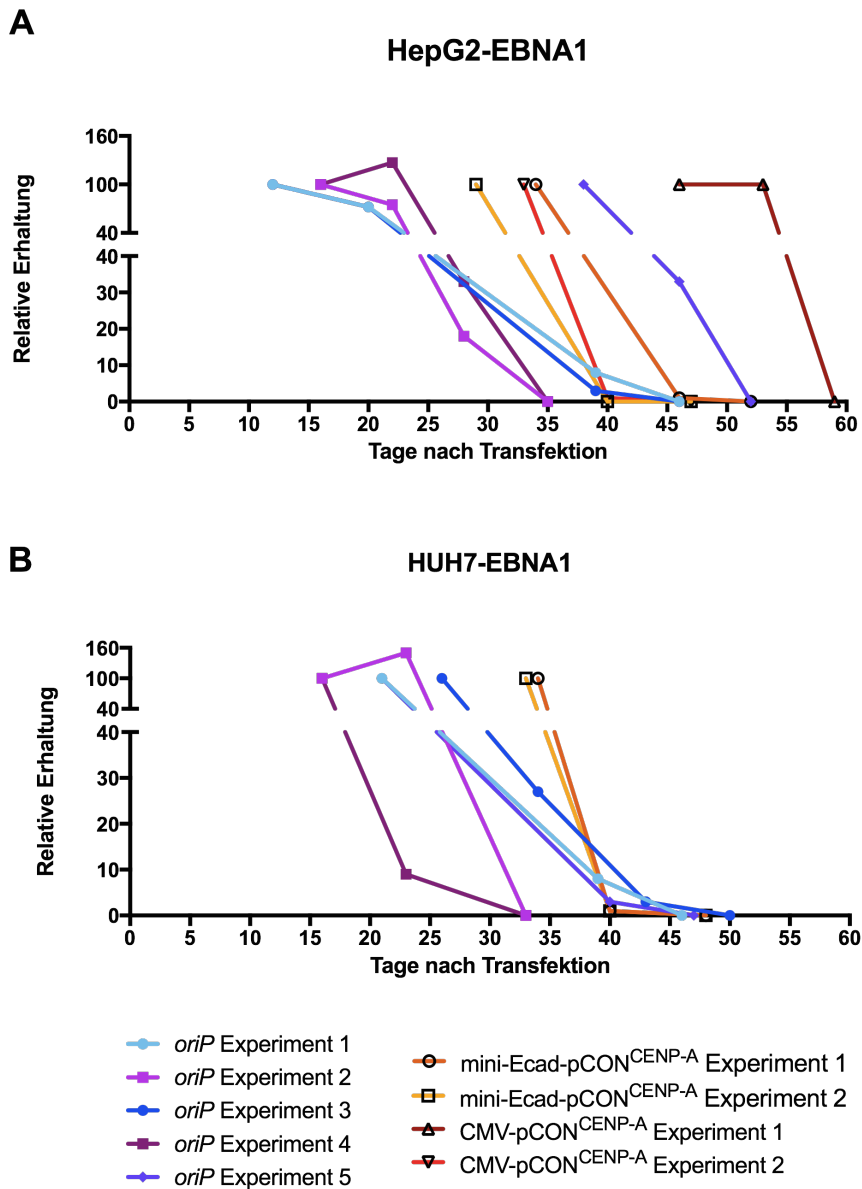


Abb. 5-4 pCON^{CENP-A} werden in Hepatozyten über 40 Tage erhalten

Zusammenfassende Darstellung der relativen Messwerte aus Abb. 5-2 und Abb. 5-3 in HepG2-EBNA1 (A) und HUH7-EBNA1 Zellen (B) im zeitlichen Verlauf von Tagen. Der Zeitpunkt 0 spiegelt jeweils den Tag der Transfektion der Plasmide wieder. Der Beginn der Graphen entspricht den ersten durchgeführten Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen nach der Etablierungsphase.

Neben den graphisch dargestellten Ergebnissen wurden im Rahmen der Experimente weitere Beobachtungen, die im Weiteren kurz erläutert werden, evaluiert. Beide Zelllinien wurden regelmäßig mikroskopisch beurteilt. Humane Hepatomzellen wachsen in der Zellkultur adhärent in einem pflastersteinartigen Wachstumsmuster. Im

Vergleich zu HEK293 Zellen fielen bereits kurz nach der Transfektion deutliche morphologische Anzeichen von Stress, sowie Reduktion der Zellzahl und –viabilität auf. Es wurden 3 verschiedene Transfektionsreagenzien verglichen (Lipofectamin 2000, FuGene und Polyethylenimin (PEI)) verwendet, von denen sich PEI als verträglichstes und effizientestes herausstellte. Auch im Hinblick auf die eingebrachte DNA-Menge erfolgten Untersuchungen. Am geeignetsten stellte sich die Transfektion von 2µg Plasmid-DNA heraus. Trotz der optimierten Transfektionsbedingungen gestaltete sich das Einbringen von Fremd-DNA in diesen Hepatozyten generell schwierig. HUH7-EBNA1 Zellen reagierten dabei noch sensibler als HepG2-EBNA1 Zellen (nicht dargestellte Daten).

Im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen steht auch das in Abbildung 5-3 dargestellte Ergebnis der Erhaltung des pCON^{CENP-A}-Vektorsystems in HUH7-EBNA1 Zellen. Während Zellen mit eingebrachten Ecad-pCON^{CENP-A}-Plasmiden nicht kultivierbar waren, gelang zwei Mal die Wiedergewinnung von CMV-pCON^{CENP-A}-Plasmiden. Die initiale Koloniezahl war mit 3 bzw. 5 Kolonien sehr gering (Abb. 5-3 E, F). Dies entspricht in etwa 3,5 – 6 % der initial im gleichen Zeitraum erhaltenen CMV-pCON^{CENP-A}-Plasmide in HepG2-EBNA1 Zellen (Abb. 5-3 D) und liegt bereits sehr nah an der Detektionsgrenze.

pCON^{CENP-A}-Plasmide, die von dem 270bp langen mini-E-cadherin Promotor (-178/+92 bp, Ecad) getrieben wurden, etablierten sich in HepG2-EBNA1 Zellen im Durchschnitt eine Woche schneller als CMV-getriebene pCON^{CENP-A}-Plasmide (31,5 Tage bzw. 39,5 Tage, Tab. 5-2). Allerdings weicht die Etablierungsphase in Experiment 1 mit 46 Tagen beim CMV-getriebenen System deutlich von den restlichen Werten ab und kann als Ausreißer gedeutet werden. Bei nur 2 erfolgreich durchführbaren Experimenten ist statistisch ein Mittelwert nicht zu bilden und soll über die Zusammenfassung der Experimente hier lediglich eine übersichtlichere Auswertung ermöglichen (Abb. 5-3, Tab. 5-2).

Vergleicht man alle ermittelten Einzelwerte der Etablierungsphase von pCON^{CENP-A}-Plasmiden in den getesteten Hepatozyten, so wird im Weiteren von einer durchschnittlichen Etablierungsdauer von 4-5 Wochen ausgegangen (Tab. 5-2). Abbildung 5-4 verdeutlicht, dass die Etablierungsphase von pCON^{CENP-A} insgesamt langsamer als bei *oriP* abläuft, die Plasmide allerdings – vor allem im HepG2-EBNA1 Zellen – durchschnittlich länger erhalten bleiben.

5.2 Vergleich zweier glukose-abhängiger Promotorelemente

In der Literatur sind mehrere glukoseabhängige Promotorelemente beschrieben (O'Callaghan et al., 2001, Portoís, Virreira et al., 2006, Thule et al., 2000, Zhang & Dong, 2015). Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, gibt es aktuell noch kein für die Dauertherapie geeignetes Transportsystem für die vorgestellten Expressionssysteme. Mit dem pCON^{CENP-A} steht nun potentiell ein Vektorsystem für die Daueranwendung bereit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auf zwei verschiedene publizierte Promotorsysteme zurückgegriffen, die zur glukoseabhängigen Insulinproduktion führen sollen: das im Jahr 2000 von Thulé und Liu vorgestellte GRE₃(L-PK)-BP1 System und das im Jahr 2015 von Zhang publizierte GRE₄(ACC)-L-PK System mit dem vorgeschalteten Aldolase-B-Enhancer. Beide Promotorsysteme treiben die Expression der cDNA eines Furin-spaltbaren Proinsulins.

5.2.1 Das GRE₃(L-PK)-BP1 Promotorsystem

Die folgenden Versuche sollten die von Thulé *et al.* im Jahr 2000 veröffentlichten Ergebnisse bestätigen. Durch die Verwendung eines GRE-Trimers der L-PK (GRE₃(L-PK)) vor dem Insulin-sensitiven, leberspezifischen IGFBP-1 Promotor (BP1) beschreiben die Autoren unter hyperglykämischen Bedingungen von 25 mM Glukose im Medium im Vergleich zur Negativkontrolle eine bis zu 6,4fach erhöhte Transgenexpression. Prof. Peter M. Thulé stellte uns die GRE₃(L-PK)-BP1 Expressionskassette zur Verfügung.

Anstatt der von Thulé *et al.* verwendeten cDNA des furinspaltbaren Proinsulins wurde hier GFP als Reporter gen gewählt. Nach erfolgreicher Klonierung des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Konstrukts (Abb. 5-5) erfolgte die Verifizierung dieses Promotorsystems in HUH7-EBNA1 und HepG2-EBNA1 Zellen. Die Auswertungen erfolgten durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse.

5.2.1.1 Glukose-reagible Induktion des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP

Zunächst sollte die durch Glukose induzierbare GFP-Expression des Promotorsystems verifiziert werden. Es erfolgte eine transiente Transfektion des Plasmids p6157 (GRE₃(L-PK)-BP1-GFP, Abb. 5-5, siehe Abschnitt 2.2.1) in HUH7- sowie HepG2-EBNA1 Zellen und eine Inkubation für 16 Stunden mit Zellkulturmedien steigender

Glukosekonzentrationen zur Detektion der Funktionalität des Systems. Laktat, dass die GRE nicht stimuliert, diene, wie bei Thulé, als alternative Kohlenhydratquelle (Lefrancois-Martinez, Diaz-Guerra et al., 1994). Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid mit gleichem Rückgrat aber CMV-getriebenem GFP verwendet (p3230, Abb. 5-5). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. Analog zu den Ergebnissen von Thulé wurde ein nahezu linearer, mit der steigenden Glukosekonzentration assoziierter, Anstieg der Transgen-Expression erwartet.



Abb. 5-5 Verwendete GFP-Expressionskassetten

Schematische Darstellung der beiden verwendeten GFP-Expressionskassetten. Als Positivkontrolle wurde p3230 mit einem CMV-getriebenen GFP transfiziert. Die GFP-Expression im 6157 soll reguliert erfolgen. So beinhaltet diese Expressionskassette ein Trimer des Glukose-reagiblen Elements (GRE) des L-PK Promotors, sowie den IGFBP-1 Promotor (BP1) inklusiv Insulin-reagiblem Element.

In allen transfizierten Proben konnte mittels FACS eine GFP-Expression gemessen werden. Die mittlere GFP-Intensität in den mit dem CMV-GFP-Kontrollplasmid transfizierten Zellen erreichte maximal ca. 250 AU (Abb. 5-6 A). Die GFP-Intensität schwankte beim Kontrollplasmid bei niedrig- und hochdosierter Glukose in beiden Zelllinien. Obwohl die Transfektionseffizienz (= % GFP positiver Zellen, Abb. 5-6 B) in HepG2-EBNA1 Zellen geringer war als in HUH7-EBNA1 Zellen (ca. 10% vs. ca. 30-50%), wurde in HepG2-EBNA1 Zellen eine verhältnismäßig höhere GFP-Intensität gemessen (Abb. 5-6 A und B). Dies kann eine höhere Grundaktivität des CMV-Promotors in HepG2-EBNA1 Zellen als Ursache haben. Ein Einfluss von Glukose auf den Promotor wurde wie erwartet nicht beobachtet. Sowohl bei absolutem Glukosemangel, als auch unter hyperglykämischen Bedingungen werden hohe GFP-Intensitäten beobachtet (Abb. 5-6 A)

Die Transfektionseffizienz mit dem GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Plasmids war in allen Proben mit etwa 20-40 % GFP-positiver Zellen vergleichbar (Abb. 5-6 D, F).

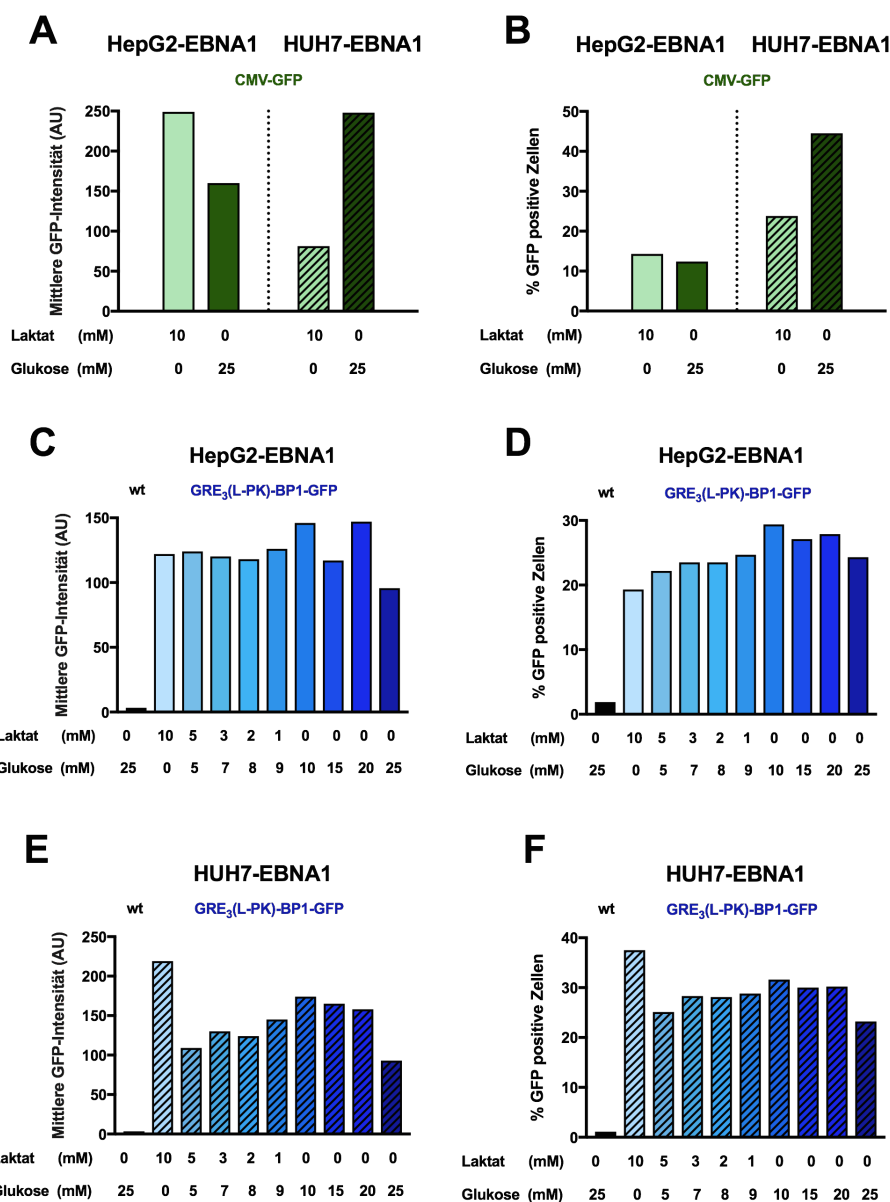


Abb. 5-6 Glukose- abhängige Induktion des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP in Hepatozyten

Durchflusszytometrische Messung (FACS) der GFP-Expression in HepG2-EBNA1 (ungemustert; **A, B, C, D**) und HUH7-EBNA1 (schraffiert; **A, B, E, F**) Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit dem jeweiligen Plasmid transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 16 Stunden Zellkulturmedium mit unterschiedlichem Laktat- und Glukosegehalt ausgesetzt. Die Intensität der Farben spiegelt mit zunehmender Stärke die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium wieder. Grüne Balken symbolisieren das CMV-GFP-Kontrollplasmid (p3230, **A** und **B**), blaue Balken das Plasmid mit der Glukose-induzierbaren GFP-Expressions-kassette (GRE₃(L-PK)-BP1-GFP, p6157, **C-F**). Als Negativkontrolle erfolgte die Messung nicht transfizierter Zellen (wt, schwarze Balken). In **A, C** und **E** ist die mittlere GFP-Intensität von jeweils 10⁵ gemessenen Zellen dargestellt. In **B, D** und **F** ist entsprechend dazu der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen zu sehen. n=1

Während bei den HepG2-EBNA1 Zellen die mittlere GFP-Fluoreszenzintensität bei ca. 120 AU statistisch stabil ist (Abb. 5-6 C), ist bei HUH7-EBNA1 Zellen ein dezenter Anstieg der GFP-Intensität ab einer Glukosekonzentration von 5 mM zu verzeichnen (Abb. 5-6 E). Es wurde erwartet, dass in Abwesenheit von Glukose die Reporterexpression auf ein Minimum reduziert ist. Allerdings wurde in der HUH7-EBNA1 Probe, die nur Laktat als Kohlenhydratquelle enthielt, die größte GFP-Intensität gemessen. Dies kann möglicherweise mit einer höheren Transfektionseffizienz und daraus resultierend größerer Anzahl GFP-positiver Zellen erklärt werden (0mM Glukose, Abb. 5-6 E und F).

Bei HUH7-EBNA1 Zellen folgt der Anstieg der mittleren GFP-Intensität einer ähnlichen Kinetik wie der, der prozentual GFP-positiven Zellen (vergleiche Abb. 5-6 E und F).

Bei HepG2-Zellen sieht man einen Anstieg des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen mit steigender Glukosekonzentration (Abb. 5-6 D). Dieser Anstieg ist im Graphen der GFP-Intensität nicht zu beobachten (Abb. 5-6 C). Bei steigender Anzahl GFP-positiver Zellen und zunehmender Glukosekonzentration im Medium wird eine gleichbleibend bis verminderte mittlere GFP-Intensität ermittelt (Abb. 5-6 C, D). Dies kann für eine geringere Aktivität der Expressionskassette unter extrem hyperglykämischen Bedingungen sprechen. Unter den übersättigten Bedingungen von 25 mM Glukose war zudem in beiden Zellen widererwartend die geringste GFP-Intensität messbar (25 mM Glukose, Abb. 5-6 C und E).

In einem weiteren Versuch wurden HepG2-EBNA1 Zellen deshalb zunächst für 2 Wochen mit 10^{-7} M Insulin konditioniert, um die mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus für Insulin versehene Expressionskassette primär auszuschalten. Durch diesen Mechanismus wurde versucht, die Glukose-reagible Induktion des Reportergens GFP nachzuweisen. Die HepG2-EBNA1 Zelllinie wurde aufgrund ihrer deutlich besseren Verträglichkeit des PEI-Transfektionsreagenz im Vergleich zu HUH7-EBNA1 gewählt. Da die Analyse des Experiments mittels FACS bereits 16 Stunden nach Transfektion erfolgte, sollte ein negativer Einfluss durch ein erhöhtes Stresslevel aufgrund schlechter Reagenzverträglichkeit, wie in HUH7-EBNA1 Zellen beobachtet, und resultierender geringerer GFP-Expression vermieden werden. Zudem hatten sich HepG2-EBNA1 Zellen im Rahmen der pCON^{CENP-A}- Plasmiderhaltung als vorteilhafter herausgestellt.

Nach Konditionierung und Transfektion von CMV-Kontrollplasmid bzw. des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Plasmids folgte die Inkubation der Zellen über Nacht mit Zellkultur-

medium aufsteigender Glukosekonzentration (0 - 25 mM). Laktat wurde den Zellen wie zuvor verhältnismäßig als alternative Kohlenhydratquelle zur Glukose angeboten (10 - 0 mM). Es wurde aufgrund der vorherigen Konditionierung der Zellen mit Insulin ein sensitiverer Anstieg der GFP-Expression auf zunehmende Mengen Glukose erwartet.

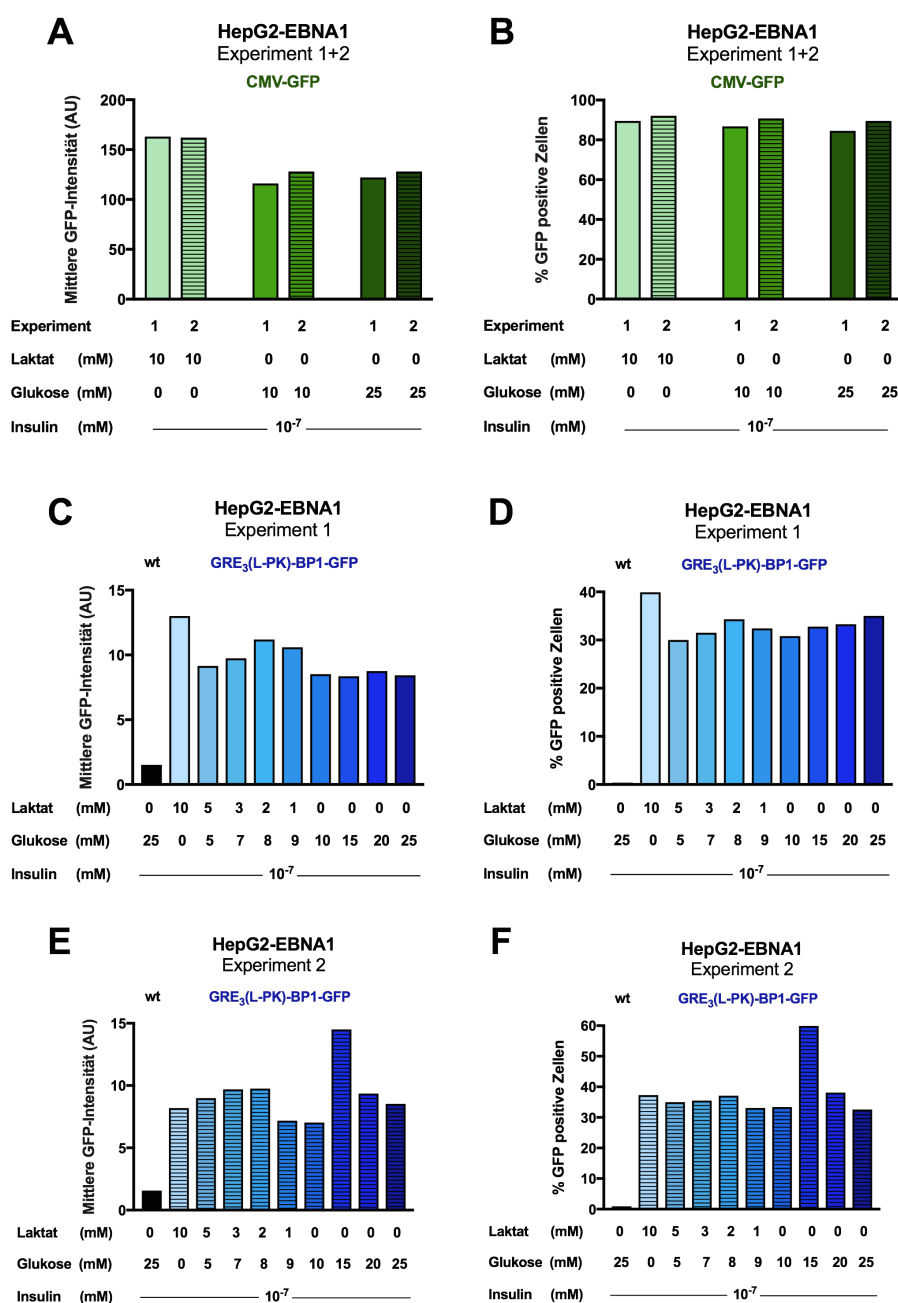


Abb. 5-7 Glukose- und Insulin-Abhängigkeit des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP in HepG2-EBNA1

HepG2-EBNA1 Zellen wurden 14 Tage mit 10⁻⁷ M Insulin im Zellkulturmedium konditioniert, bevor eine Transfektion mit dem jeweiligen Plasmid erfolgte. Nach

16-stündiger Inkubation mit Zellkulturmedium unterschiedlichen Glukose- bzw. Laktatgehalts erfolgte die durchflusszytometrische Messung der GFP-Expression. Als Positivkontrolle wurde ein CMV-getriebenes GFP verwendet (p3230, grüne Balken, **A** und **B**), während der untersuchte GRE₃(L-PK)-BP1-GFP (p6157) blau dargestellt ist (**C** - **F**). Als Negativkontrolle erfolgte die Messung untransfizierter Zellen (wt, schwarze Balken). Die Farbintensität spiegelt die Glukosekonzentration im Zellmedium wieder. Alle Proben wurden Insulin in einer Konzentration von 10⁻⁷ M im Medium ausgesetzt. **C** und **E** zeigen die mittlere GFP-Intensität von zwei unabhängigen Experimenten. **D** und **F** zeigen jeweils den prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen der Gesamtzellzahl.

Die Transfektionseffizienz des CMV-getriebenen GFP-Kontrollplasmids wurde anhand des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen ermittelt und lag mit 85 - 90% deutlich über der des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Plasmids von Interesse (30 - 40%) (Abbildung 5-7 B, D, F). In Abbildung 5-7 B wird deutlich, dass zum einen die Transfektionseffizienz mit dem CMV-GFP Kontrollplasmid in den unabhängigen Experimenten konstant war. Zudem lässt sich erkennen, dass der CMV-Promotor Glukose-unabhängig konstitutiv aktiv ist (Abb. 5-7 A). Die Transfektionseffizienz des untersuchten GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Plasmids mit einer Ausnahme (Experiment 2, 15 mM Glukose, Transfektionseffizienz 60,9 %, Abb. 5-6 F) untereinander nahezu gleichbleibend und somit vergleichbar.

Die mittlere GFP-Intensität des CMV-Kontrollplasmids ist geringer als im vorherigen Versuch (Fluoreszenzintensität 120-160 AU (Abb. 5-7 A) bzw. ca. 250 AU (Abb. 5-5 A)), liegt jedoch deutlich über der des Glukose-induzierbaren GFP-Plasmids (Fluoreszenzintensität 7-15 AU) (Abbildung 5-7 A, C, E). Eine höhere Anzahl GFP-positiver Zellen korreliert mit einer stärkeren GFP-Fluoreszenzintensität.

Die Konditionierung mit 10⁻⁷ M Insulin hatte eine deutliche Repression des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Expressionssystem zur Folge, welches an der über 10-fach verringerten GFP-Intensität im Vergleich zum Vorversuch zu erkennen ist (GFP-Intensität bei HepG2-EBNA1 ca. 120 AU, Abb. 5-6 C). Um die Transgen-Expression zu optimieren wurde daher im folgenden Versuch die Empfindlichkeit der Suppression des Systems durch unterschiedliche Insulinkonzentrationen analysiert.

5.2.1.2 Insulin-reagible Repression des GRE₃(L-PK)-BP1-GFP

Thulé *et al.* demonstrierten unter Zugabe von 10^{-7} M Insulin in das Zellkulturmedium eine Suppression des BP1-Promotors um etwa 60 % und bestätigten somit die Funktionalität dessen Insulin-abhängigen hormonsensitiven Elements. Zudem ermittelten sie die Insulinkonzentration, die mit einer 50 %igen Aktivität des Promotors (IC_{50}) assoziiert ist, als 10^{-9} M (Thule *et al.*, 2000).

Die Zugabe von 10^{-7} M Insulin in das Zellkulturmedium bewirkte in Vorversuchen (Abb. 5-7) zwar eine Suppression des Systems, dennoch war nicht genau definierbar, in welchem Aktivitätszustand sich die Expressionskassette befindet. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem die GFP-Expression durch steigende Insulin-Konzentrationen (10^{-10} - 10^{-6} M) im Zellkulturmedium reprimiert werden sollte. HepG2-EBNA1 und HUH7-EBNA1 Zellen wurden 14 Tage lang entweder mit 10 mM Laktat und Abwesenheit von Glukose oder unter hyperglykämischen Bedingungen mit 25 mM Glukose im Zellkulturmedium konditioniert. Es folgte eine Transfektion des Plasmids p6157 (GRE₃(L-PK)-BP1-GFP) und Inkubation mit unterschiedlicher Insulinkonzentration für 16 Stunden. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen ebenfalls per FACS analysiert. Es wurde erwartet, dass die GFP-Fluoreszenzintensität korrelierend mit einer steigenden Insulinkonzentration sinkt.

Generell war die Anzahl an GFP-positiven Zellen von etwa 30 % in beiden Zelllinien annähernd übereinstimmend (Abb. 5-8 B, D). Damit sind die Ergebnisse der beiden Zelllinien sowohl untereinander als auch mit Vorversuchen vergleichbar (Abb. 5-6 D, F; Abb. 5-7 D, F).

Bei HepG2-EBNA1 Zellen war die mittlere GFP-Fluoreszenzintensität mit Werten von 6,2 - 9,6 AU vergleichbar mit der Intensität der Vorversuche, bei denen einheitlich 10^{-7} M Insulin appliziert wurde (Abb. 5-7 C). Unter zunehmenden Insulinkonzentrationen zeigte sich eine Tendenz zur Steigerung der GFP-Intensität (Abb. 5-8 A). Gegenteiliges wurde erwartet. Die Kinetik in Abbildung 5-8 A (Intensitätssteigerung) verhält sich ähnlich zu der in Abbildung 5-8 B (% GFP-positive Zellen) und kann zum Teil die beobachtete Intensitätszunahme erklären.

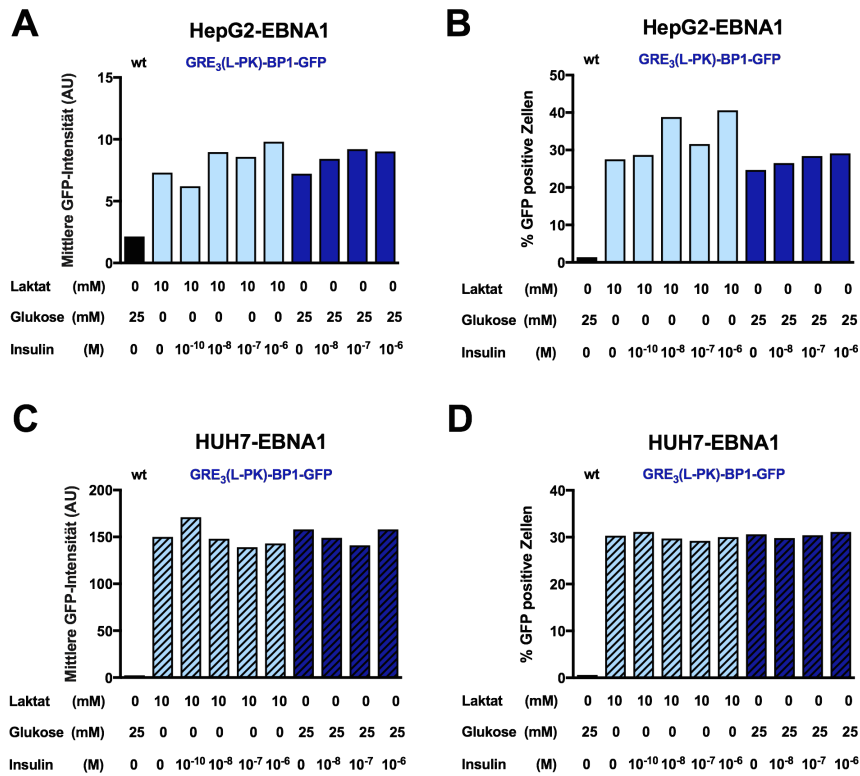


Abb. 5-8 Das GRE₃(L-PK)-BP1-GFP-Promotorsystem lässt sich nicht durch Insulin inhibieren

HepG2-EBNA1 Zellen wurden für 14 Tage mit 10⁻⁷ M Insulin im Zellkulturmedium konditioniert, bevor eine Transfektion mit dem GRE₃(L-PK)-BP1-GFP tragenden Plasmid (p6157, blaue Balken) erfolgte. Nach 16-stündiger Inkubation in Zellkulturmedium mit unterschiedlichem Glukose- und ansteigendem Insulingehalt erfolgte die durchflusszytometrische Messung der GFP-Expression mittels FACS. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen gemessen (wt, schwarzer Balken). Hellblau dargestellte Proben erhielten keine Glukose, aber 10 mM Laktat als Energiequelle. Dunkelblau dargestellte Zellen wurden mit Glukose in einer Konzentration von 25 mM versorgt. Insulin wurde in steigenden Konzentrationen von 10⁻¹⁰ M bis 10⁻⁶ M dem Zellkulturmedium hinzugefügt bzw. als Kontrolle nicht hinzugegeben. **A** zeigt die durchflusszytometrisch gemessene mittlere GFP-Intensität in HepG2-EBNA1, **B** den prozentuellen Anteil GFP-positiver HepG2-EBNA1 der jeweils 10⁶ gemessenen Zellen. In **C** und **D** sind äquivalent dazu die Messwerte der HUH7-EBNA1 (schraffiert) Zellen dargestellt. n=1

In HUH7-EBNA1 Zellen blieb die mittlere GFP-Intensität unabhängig von der Insulin-konzentration bei Werte um 140-170 AU annähernd konstant. Auch Zellen ohne Insulin im Zellkulturmedium exprimierten GFP mit einer nahezu identischen Intensität

(Abb. 5-8 C, jeweils erster farbiger Balken). Ein Einfluss der steigenden Insulinkonzentration wurde hier nicht beobachtet.

Ob die Zellen zuvor ohne Glukose mit 10 mM Laktat (hellblaue Balken) oder unter hyperglykämischen Bedingungen mit 25 mM Glukose (dunkelblaue Balken) konditioniert worden sind, scheint somit keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit des Promotorsystems auf Insulin zu haben. Die GFP-Expression beider Gruppen verfolgt innerhalb der Zelllinie eine ähnliche Kinetik.

Der GRE₃(L-PK)-BP1-GFP Reporter scheint in HepG2-EBNA1 Zellen sehr viel sensitiver auf die Zugabe von Insulin in das Zellkulturmedium zu reagieren als in HUH7-EBNA1 Zellen (Mittlere GFP-Intensität 7 AU bzw. 150 AU). Die erwartete Aktivitätssteigerung des Expressionssystems in einem negativ-proportionalen Zusammenhang zur Insulinkonzentration konnte jedoch in keiner der beiden Hepatozyten-Zelllinien beobachtet werden.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse von Thulé *et al.* weder bezüglich der Glukose-reagiblen Transgen-Induktion, noch der durch Insulin hervorgerufenen Repression des GRE₃(L-PK)-BP1 verifizierbar.

5.2.2 Das Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK Promotorsystem

Nachdem mit dem GRE₃(L-PK)-BP1-Reporter keine Glukose- und Insulin-reagible Transgen-Expression detektiert wurde, verwendeten wir das von Dr. H. Henry Dong entwickelte Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK Promotorsystem (Abb. 5-9, siehe Abschnitt 2.2.1). Dong und Zhang demonstrierten, dass die GRE-Elemente der ACC den von Thulé *et al.* verwendeten GRE-Elementen der L-PK ein höheres Expressionsniveaus erreichen (Zhang & Dong, 2015). Durch Verwendung der GRE(ACC) lässt sich im Vergleich zu den GRE(L-PK) eine 3-4fach stärkere Glukose-induzierte Transgen-Expression messen (Abb. 2-4). Diese wurde durch die Kombination des L-PK Promotorsystems mit einem Tetramer der GRE(ACC) und dem vorgeschaltetem Enhancer-Element der leberspezifischen Aldolase-B weiter verstärkt. Dieses Promotorkonstrukt treibt die Expression der auch von Thulé *et al.* verwendeten cDNA des furinspaltbaren Proinsulins.

p6277



Abb. 5-9 Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-LPK-Insulin

Schematische Darstellung des verwendeten Glukose-reagiblen Insulin-Expressionssystems (nach Zhang & Dong, 2015).

In STZ-induzierten diabetischen Mäusen konnte mit dem Expressionssystem für bis zu 26 Tage eine suffiziente Insulinproduktion nachgewiesen werden, die normoglykämische Bedingungen erzeugte und den Tieren eine Körpergewichtszunahme ermöglichte. Im Vergleich zum niedrigen Expressionsniveau in den GRE₃(L-PK)-BP1 Versuchen sind die Ergebnisse des Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK Promotorsystems ein vielversprechender Ansatz.

5.2.2.1 Generierung einer HepG2-EBNA1-Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin Zelllinie

Dong und Zhang beschrieben die grundsätzliche Funktion ihres Promotorsystems in HepG2 Zellen. Um Varianzen bezüglich der Transfektionseffizienz zu vermeiden und valide, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde zunächst das Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin Expressionskonstrukt stabil in HepG2-EBNA1 Zelllinie integriert. Dazu wurden die Plasmide p3279 (pCMV-EBNA1^{ΔGA}) und p6277 (Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin) zunächst linearisiert und anschließend in HepG2 Zellen transfiziert. Die Selektion über mehrere Wochen erfolgte mit Hygromycin. Nach Etablierung von Einzelzellklonen erfolgte eine EBNA1-Proteinanalyse mittels Western Blot und EBNA1-spezifischem Antikörper zur Erfolgskontrolle (Abb. 5-10).

Zusätzlich erfolgte die Untersuchung eines Teilaspekts des Glukose-Metabolismus der neu generierten Zelllinie. Der durch das Gen SLC2A2 kodierte insulinunabhängige Glukose-Transporter 2 (GLUT2) mit seinem besonders hohem K_m -Wert und niedriger Glukoseaffinität ist im gesunden Lebergewebe dominant und hat durch bidirektionalen Fluss erheblichen Einfluss auf die Regulation des Blutzuckers (Rassow et al., 2016). Es wurde bereits über eine veränderte Expression der einzelnen Mitglieder der Glukose-Transporter-Familie in Karzinomzelllinien berichtet (Karim, Adams et al.,

2012). Zudem ist bekannt, dass es im postprandialen, hyperglykämischen Zustand zu einer Entfernung von GLUT2 auf der hepatozytären Zellmembran kommt (Leturque, Brot-Laroche et al., 2009). Die HepG2 Karzinomzelllinie wurde zuvor unter Kulturbedingungen wiederholt unter deutlich hyperglykämischen Bedingungen in Medium mit 25 mM Glukose gehalten. Aus diesem Grund erfolgte eine Analyse der GLUT2-Expression in den verwendeten HepG2 Zellen, da diese für eine suffiziente Funktion des Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK Promotorsystems nötig ist. Deshalb erfolgte aus Lysaten der neu generierten Zelllinien ebenfalls die GLUT2-Proteindetektion mittels SDS-Page und Western Blot. Eine GLUT2-Expression sollte in allen verwendeten HepG2 Zellen nachweisbar sein, wohingegen sie in der Nierenzellkarzinomlinie HEK293 sehr viel geringer ausfallen sollte.

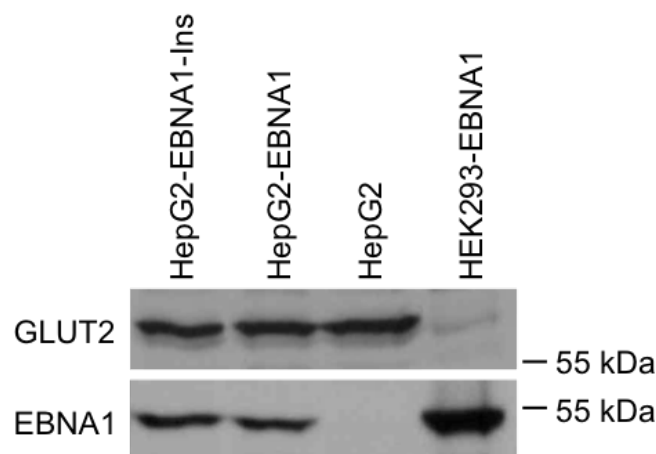


Abb. 5-10 GLUT2-Nachweis in HepG2-EBNA1-Ins Zellen

Nachweis der Expression des EBNA1^{ΔGA}-Protein (ca. 55kDa) und des GLUT2 (57 kDa). Von rechts nach links ist als EBNA1-Positiv- und GLUT2-Vergleichskontrolle zunächst eine zuvor generierte HEK293-EBNA1 Zelllinie zu sehen. Als nächstes ist das Zelllysate des HepG2-Wildtyps und der in 5.1.1 generierte HepG2-EBNA1 Klon 5 aufgetragen. Links ist der neu generierte EBNA1- und GLUT2-positive HepG2-EBNA1-Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK (HepG2-EBNA1-Ins) zu sehen.

Wie erwartet waren alle mit dem Plasmid p3279 transfizierten Zellen EBNA1 positiv. Die GLUT2-Expression war bei HEK293-EBNA1 Zellen erwartungsgemäß sehr gering. Mit der Detektion von GLUT2 in den verwendeten HepG2-EBNA1 Zellen konnte das Vorhandensein des essentiellen Glukose-Transporters nachgewiesen werden. Dies ist

Grundvoraussetzung für eine glukoseabhängige Genregulation. Die neu generierte Zelllinie HepG2-EBNA1-Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK wird im weiteren Verlauf übersichtshalber HepG2-EBNA1-Ins abgekürzt. „Ins“ beschreibt in diesem Zusammenhang das Vorhandensein der von Dong und Zhang generierten Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK Insulin-Expressionskassette.

5.2.2.2 Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK getriebene Insulin-mRNA Expression

Nach erfolgreich generierter HepG2-EBNA1-Ins Zelllinie erfolgte die Insulin-Expressions-Analyse. Dazu wurden die konditionierten Zellen für 16 Stunden mit Zellkulturmedien mit einer Glukosekonzentration von 0 - 25 mM inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, die mRNA mittels QIAGENs RNeasy Mini Kit extrahiert und unter Verwendung des SCRIPTUM First (Strand) Kits in cDNA umgeschrieben. Die Menge der cDNA kann so der jeweiligen Menge der entsprechenden mRNA gleichgesetzt werden. Mit einer quantitativen PCR wurde die relative Menge der Insulin mRNA quantifiziert, ein sehr viel sensitiveres Verfahren als die GFP-Fluoreszenzmessung mittels FACS oder eines Insulin Western blots. Die quantitative Messung der Insulin cDNA erfolgte unter Normalisierung gegen das ubiquitär vorkommende Protein Aktin. Es wurde ein proportionaler Anstieg der cDNA-Menge zu steigenden Glukosekonzentrationen in Medium erwartet. Als Negativkontrolle erfolgte die Messung nicht transfizierter HepG2-EBNA1 Zellen. Abbildung 5-11 zeigt die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten nach statistischer Auswertung der Daten mittels Prism (GraphPad, Inc).

Im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle konnte in der neu generierten HepG2-EBNA1-Ins Zelllinie auch in Abwesenheit von Glukose eine signifikante Insulin-mRNA Expression detektiert werden. Die hohe Grundaktivität des Promotors wird beim Vergleich der untransfizierten Kontrolle zur Basalkondition bei 0 mM Glukose deutlich. Die Insulin mRNA-Expression ist hier im Mittel um 1880% gesteigert (Abb. 5-11 A).

Trotz dieser hohen Grundaktivität war unter hyperglykämischen Bedingungen (12,5 - 25 mM) im Vergleich zu den Basalbedingungen eine signifikante Steigerung der Insulin-mRNA Expression messbar (Abb. 5-11 B). Auch unter normoglykämischen (5,5 mM) Bedingungen war eine deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante, Expressionssteigerung zu den Basalbedingungen erkennbar.

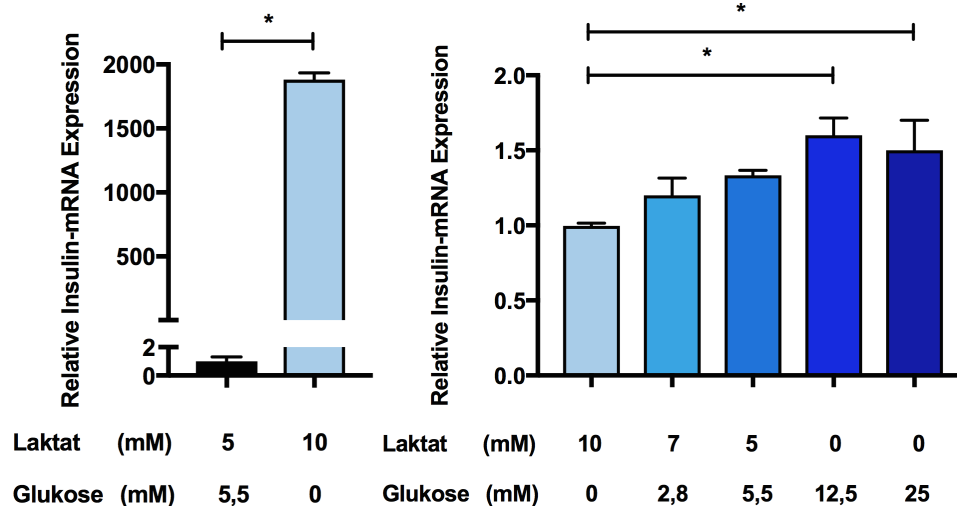


Abb. 5-11 Der Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK erlaubt eine glukose-abhängige Insulin-mRNA-Expression

Quantitative PCR („real-time“ PCR) von cDNA aus HepG2-EBNA1-Ins (blaue Balken) bzw. der Negativkontrolle (nicht transfizierte Zellen, Kontrolle, schwarzer Balken). Die Zellen wurden zuvor 16 Stunden Zellkulturmedien mit unterschiedlichem und Glukosegehalt ausgesetzt. Die Intensität der Blautöne spiegelt mit zunehmender Stärke die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium wieder. Die Messwerte der Insulin cDNA wurden gegen die jeweiligen Aktin-Messwerte normalisiert. **A** zeigt die Grundaktivität des Promotors relativ zur Kontrolle. In **B** ist die Glukose-Induzierbarkeit des Promotors dargestellt. n=3, * = p<0.05

Unter Zugabe von Glukose lässt sich die Promotoraktivität auf das über 1,5-fache seiner Grundaktivität steigern (Abb. 5-11 B). Insgesamt verläuft die Kinetik des Graphen in Abbildung 5-11 B entsprechend der Erwartungen. Anhand der abgebildeten Versuche kann die Glukose-regulierte Insulin-Expression der Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin Expressionskassette im Grundsatz bestätigt werden.

Dieses Ergebnis verifiziert auch das Ergebnis aus 5.2.2.1, das Vorhandensein der Enhancer(AldoB)-GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin Expressionskassette in den neu generierten HepG2-EBNA1-Ins Zellen.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war zum einen die Verwendbarkeit des pCON^{CENP-A} in zwei Hepatozyten-Zelllinien zu prüfen (etablieren) und zum anderen in diesen Zelllinien mittels eines speziellen, glukoseabhängigen Expressionssystems eine Insulinexpression als Beispiel für eine therapeutische Anwendung anzuregen. Die Ergebnisse dieser Teilaspekte werden im Folgenden separat diskutiert.

6.1 Episomale Plasmiderhaltung in Hepatozyten

In den folgenden Abschnitten werden die Beobachtungen und Betrachtungen der durchgeführten Plasmidstudien wiedergegeben. Des Weiteren werden Ansatzpunkte potentieller Optimierungsmöglichkeiten des pCON^{CENP-A} diskutiert. Dies geschieht auch im Vergleich zum anderen episomalen Vektor pEPito.

6.1.1 Beobachtungen zur Plasmiderhaltung in Hepatozyten

Die Generierung EBNA1⁺ HepG2 und HUH7 Zellen war erfolgreich und ermöglichte die Durchführung von Plasmid-Erhaltungsversuchen. Hierzu wurden Zellklone mit vergleichbarem EBNA1-Expressionsniveau gewählt (Abb. 5-1, HepG2-EBNA1 #5 und HUH7-EBNA1 #11). Anhand von Vorversuchen in anderen EBNA1-exprimierenden Zelllinien wurde erwartet, dass *oriP*- und pCON^{CENP-A}-Plasmide unter Selektionsdruck auch in den neu generierten HUH7-EBNA1 und HepG2-EBNA1 Zelllinien stabil erhalten bleiben. Beide Zelllinien etablierten nach Plasmid-Transfektion zunächst eine Selektionsresistenz. Mit der gewählten Detektionsmethode konnten *oriP*-Plasmide in HepG2-EBNA1 Zellen für bis zu 4 Wochen, in HUH7-EBNA1 Zellen für bis zu 3 Wochen nach der Etablierungsphase nachgewiesen werden (Abb. 5-2). Dies entspricht maximal 46 Tage nach Transfektion für HepG2-EBNA1 bzw. 43 Tage für HUH7-EBNA1 (Abb. 5-4).

Promotorabhängig wurden episodale pCON^{CENP-A}-Plasmide in beiden Zelllinien für 1 - 2 Wochen nach der Etablierungsphase, also 40 Tage nach Transfektion in HUH7-EBNA1 und 53 Tage nach Transfektion in HepG2-EBNA1, detektiert (Abb. 5-3 und 5-4). Die initiale absolute Zahl an wiedergewonnenen Plasmiden war insgesamt für pCON^{CENP-A} bei einer Anzahl von unter 100 pro 350 µg elektroporierter DNA gering (Abb. 5-3 B, D, F). Vergleichbare Koloniezahlen wurden jedoch bei *oriP*-Plasmiden

nach einer ähnlichen Zeit (2 - 4 Wochen nach Etablierung, Abb. 5-2 B, D) beobachtet. Nach insgesamt ca. 4 - 5 Wochen nach Transfektion waren die gemessenen Werte auch bei *oriP*-Plasmiden bereits deutlich reduziert und nahe oder unterhalb der Detektionsgrenze.

1994 beobachteten Middleton und Sugden eine bis zu 300fache Reduktion der Plasmid-Kopienzahl in der Frühphase nach Transfektion in humanen Osteosarkomzellen 143. Die Autoren postulieren, dass diese initiale Reduktion durch Degradation der Plasmide innerhalb der Zellen oder ein Export nach Außen zustande kommt (Middleton & Sugden, 1994). Die Plasmide etablieren sich mit einer zelltypspezifischen Kopienzahl, die nach Etablierung im Durchschnitt konstant bleibt. Aus pragmatischen Gründen wurde das Ende der Etablierungsphase als das Erreichen einer 80%igen Konfluenz auf 15cm-Zellkulturschalen definiert. Dies entspricht für die gewählten Hepatozyten-Zelllinien in etwa 2×10^7 Zellen und gleicht der Anzahl benötigter Zellen für die Durchführung von Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen. Im Verlauf wurde eine weitere Reduktion sowohl der *oriP*- als auch $pCON^{CENP-A}$ -Kopienzahl beobachtet (Abb. 5-2, 5-3, 5-4). Die Nachweisgrenze der $pCON^{CENP-A}$ -Plasmide war mit 1-2 Wochen nach der definierten Etablierungsphase im Vergleich zu den *oriP*-Plasmiden deutlich früher erreicht. Aufgrund der fortschreitenden Reduktion der Plasmidanzahl im experimentellen Verlauf, kann davon ausgegangen werden, dass die Etablierung im Sinne einer Langzeiterhaltung noch nicht vollständig abgeschlossen war und die Anzahl der langfristig erhaltenen Plasmide deutlich unterhalb der initialen Messwerte liegt.

In dieser Arbeit nicht abgebildete Experimente zur Transgen-Expression weisen ebenfalls auf eine sehr geringe Kopienzahl innerhalb der einzelnen Zellen hin. Alle im Zusammenhang mit Plasmiderhaltung untersuchten Vektorsysteme tragen aus Detektionsgründen eine CMV-gesteuerte Expressionskassette für das grün-fluoreszierende Protein (GFP). Innerhalb der ersten Tage nach Transfektion war eine deutliche GFP-Expression mittels Fluoreszenz-Mikroskopie in ca. 80% der *oriP*-transfizierten und in ca. 30 - 40% der $pCON^{CENP-A}$ -transfizierten Zellen nachweisbar (in dieser Arbeit nicht abgebildete Beobachtungen). Im Verlauf der Experimente nahm der prozentuelle Anteil GFP⁺ Zellen, sowie die Intensität der GFP-Fluoreszenz kontinuierlich ab und war zum Teil mikroskopisch nicht mehr nachweisbar. Die relativ niedrige Sensitivität eines Fluoreszenz-Mikroskops erschwert den Nachweis von lediglich geringer GFP-Expression. Es ist denkbar, dass wenige oder sogar nur ein einzelnes Plasmid pro Zelle nicht zu einer mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

detektierbaren Expression von GFP befähigt war. Als sensitiveres Verfahren zum Nachweis der GFP-Expression wäre eine FACS-Analyse denkbar gewesen. Um einen schnellen und einfachen Überblick über den GFP-Expressionszustand der Zellen zu gewinnen, war die Methode der Fluoreszenz-Mikroskopie jedoch ausreichend.

Rückschlüsse auf die Kopienzahl der Plasmide können auch über die Dauer der Etablierungsphase erfolgen. Eine längere Etablierungsphase deutet auf ein verlangsamtes Zellwachstum hin. Mit pCON^{CENP-A} behandelte Zellen brauchten deutlich länger sich von der Transfektion zu erholen und unter Selektionsdruck ein konfluentes Wachstum zu erreichen, als *oriP* transfizierte Zellen (Tab. 5-1, 5-2, Abb. 5-4). Es wurde zuvor für beide Zelllinien mittels Titrationskurven eine empfindliche Dosis des zur Selektion eingesetzten Hygromycins detektiert. In HepG2 Zellen wurde Hygromycin in einer Konzentration von 150 µg/ml, in HUH7 Zellen von 100 µg/ml eingesetzt (Tab. 4-2). Dennoch war in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide ein Unterschied in Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie zu beobachten, sodass sich *oriP*-Plasmide deutlich früher etablierten als pCON^{CENP-A}-Plasmide. Ein Grund dafür kann eine anfänglich deutlich höhere Kopienzahl von *oriP*-Plasmiden sein, welches zu einer stärkeren Selektionsresistenz führt und ein kontinuierliches Wachstum erlaubt. Mit pCON^{CENP-A} transfizierte Zellen schwankten am Resistenzniveau, möglicherweise in Abhängigkeit von der Anzahl an resistenztragenden Plasmiden.

Das pCON^{CENP-A}-Vektorsystem wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmalig in Hepatozyten getestet. Neben der Zelllinien-tauglichkeit spielt auch die Promotortauglichkeit eine essentielle Rolle. Da das Expressionsniveau des sc tetR:CENP-A die Kopienzahl beeinflussen könnte, wurden verschieden starke Promotorelemente getestet (Abb. 5-3, Tab. 5-2). Während sich die Erhaltung der mini-Ecad-pCON^{CENP-A} nicht in HUH7-EBNA1 Zellen nachweisen ließ, konnte er in HepG2-EBNA1 Zellen in zwei Experimenten noch 7 Wochen nach Transfektion detektiert werden. CMV-pCON^{CENP-A} konnte in beiden Zelllinien 6-7 Wochen nach Transfektion wiedergewonnen werden (Abb. 5-3, Abb. 5-4, Tab. 5-2). Die Expressionshöhe des CENP-A Fusionsproteins scheint dementsprechend einen Einfluss auf die Höhe der Kopien zu haben. Eine niedrigere sc tetR:CENP-A Expression unter dem 270bp langen mini-Ecadherin Promotor (-178/+92 bp) scheint in HUH7 Zellen nicht ausreichend zu sein. Eine starke, CMV-vermittelte Expression erlaubt hingegen den Nachweis in beiden Zelllinien für mehrere Wochen. In HepG2-EBNA1 Zellen zeigte sich zudem auch der CMV-pCON^{CENP-A} bei einer Detektion 53 Tage nach Transfektion im Vergleich zum

mini-Ecad-pCON^{CENP-A} maximal 40 Tage nach Transfektion überlegener (Abb. 5-4). Promotorabhängige Unterschiede der Kopienzahl konnten bereits in D98/H1, HeLa und HEK293 Zellen (Tab. 2-1, 2-2) beobachtet werden. Die niedrig gemessenen Kopienzahlen werden vermutlich demnach nicht nur eine intrinsische Eigenschaft der HUH7 und HepG2 Zelllinien sein und könnten durch die Wahl weiterer Promotorsysteme optimiert werden.

6.1.2 Kritische Evaluierung der pCON^{CENP-A}-Experimente

In den Plasmiderhaltungs-Experimenten wurde eine durchschnittlich längere Etablierungszeit von pCON^{CENP-A} im Vergleich zu *oriP* ermittelt. In HepG2-EBNA1 etablierte sich *oriP* durchschnittlich nach 18,8 Tagen, in HUH7-EBNA1 nach 20 Tagen (Tab. 5-1). pCON^{CENP-A} hingegen benötigte in HepG2-EBNA1 promotorabhängig im Durchschnitt zwischen 31,5 Tagen (CMV-pCON^{CENP-A}) und 39,5 Tagen (mini-Ecad-pCON^{CENP-A}) bis zur Etablierung (Tab. 5-2). In HUH7-EBNA1 Zellen war die Zeitspanne im Durchschnitt 33,5 Tage (CMV-pCON^{CENP-A}). Ein Aspekt für die langsamere und schwierigere Etablierung von pCON^{CENP-A} ist die fehlende direkte Assoziation zur endogenen DNA, wie es bei *oriP* der Fall ist. Über die Bindung von EBNA1 an die 20 Bindungsstellen des FR-Elements wird *oriP* zeitnah nach Transfektion an die endogene Wirts-DNA geheftet, wo es repliziert und passiv segregiert wird (Sears et al., 2004). Der aktive Segregationsmechanismus von pCON^{CENP-A} hingegen bedarf zuvor einer Expression des sc tetR:CENP-A Fusionsprotein und der Kinetochoranlagerung (Abb. 2-6, Abb. 2-7). pCON^{CENP-A} assoziieren nach Transfektion nicht direkt mit der endogenen DNA, was die Erhaltung in dieser ersten Phase nach Transfektion erschwert, die Transfektionseffizienz mindert und die Etablierungsphase insgesamt verlängert. Leight und Sugden konnten zeigen, dass insbesondere jedoch eine effiziente Etablierung episomaler Vektoren in den ersten Tagen und Wochen nach Verabreichung für eine Langzeitstabilität entscheidend sind (Leight & Sugden, 2001). Das Phänomen des initialen Plasmidverlustes bei autonomen Vektoren muss daher separat untersucht und weiterentwickelt werden.

Extrachromosomale Plasmiderhaltung bedarf grundsätzlich der Kombination aus Plasmid-Replikation und einer gleichmäßigen Verteilung auf die Tochterzellen. Während die Replikation in unserem pCON^{CENP-A}-Vektorsystemen über die Interaktion von EBNA1 und dem *oriP*-Element DS gewährleistet ist, liegt der Augenmerk auf dem Segregationsmechanismus.

Mit Hilfe von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) konnte gezeigt werden, dass sich EBV-abgeleitete Vektoren mit Metaphase-Chromosomen der Wirtszelle assoziieren und so passiv auf die Tochterzellen verteilt werden (Nanbo, Sugden et al., 2007). Die episomale Kopienzahl variierte jedoch stark zwischen unterschiedlichen Zelllinien. In B-Lymphozyten wurde beispielsweise eine Varianz von 5 bis 100 Kopien pro Zelle beschrieben (Van Craenenbroeck, Vanhoenacker et al., 2000). Dies legt nahe, dass die Aufteilung der Vektoren auf die Tochterzellen nicht so exakt wie die Aufteilung der endogenen eukaryotischen Chromosomen abläuft. Letztendlich ist der *oriP*- und EBNA1-vermittelte Mechanismus des EBV dennoch so effektiv, dass eine langfristige Erhaltung auch unter kultivierten Bedingungen möglich ist (Marechal, Dehee et al., 1999, Teo & Griffin, 1987). Die genaue Bestimmung der Plasmid-Kopienzahl ist mittels FISH und Live Cell Imaging möglich (Nanbo et al., 2007). Gerade letztere Methode ist extrem aufwendig und nicht zur einfachen Kontrolle neben den durchgeführten Promotorstudien geeignet.

Es ist bekannt, dass sich sowohl *oriP* als auch pCON^{CENP-A}-Plasmide in verschiedenen Zelllinien mit einer unterschiedlichen Kopienzahl etablieren (Aloys Schepers, persönliche Mitteilung). Eine genaue Detektionsgrenze des gewählten Analyseverfahrens, den Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen („*plasmid rescue assay*“) ist derzeit jedoch nicht bekannt. Möglicherweise ist die sich etablierende Kopienzahl in den gewählten Hepatozyten-Zelllinien HUH7 und HepG2 sehr gering und nahe an der methodischen Detektionsgrenze. Im Folgenden ist beispielhaft eine Rechnung unter optimalen Bedingungen beschrieben.

Eine 80%ige Konfluenz der gewählten Hepatozyten auf 15cm-Zellkulturschalen entspricht in etwa 2×10^7 Zellen. Bei einer minimalen etablierten Kopienzahl von einem Plasmid pro Zelle sollten dementsprechend minimal 2×10^7 Plasmide erhaltenen werden. Bei den Plasmid-Wiedergewinnungsversuchen wurden im Durchschnitt 2000 ng DNA aus den Zellen gewonnen. Diese enthält neben dem Hauptteil an gescherter chromosomaler DNA auch niedermolekulare extra-chromosomale Plasmid-DNA. Zur Elektroporation in ultrakompetente Bakterien wurden 350 ng DNA eingesetzt, was einfachheitshalber als $\frac{1}{6}$ der Gesamt-DNA-Menge berechnet wird:

$$\frac{350ngDNA}{2000ngDNA} = 0,175 \approx 0,16 = \frac{1}{6}$$

Dementsprechend können auch nur ca. $\frac{1}{6}$ der wiedergewonnen Plasmide detektiert werden:

$$2 \times 10^7 \text{ Plasmide} \times \frac{1}{6} \approx 3,3 \times 10^6 \text{ Plasmide}$$

Dies bedeutet, dass bei der Auslese des Experiments mit der eingesetzten DNA Menge unter Idealbedingungen $3,3 \times 10^6$ Plasmide bzw. Kolonien nachweisbar sein sollten. Diese Zahl weicht massiv von den gemessenen Werten ab.

Es ist davon auszugehen, dass auch unter idealen Versuchsbedingungen nicht die volle Anzahl der Plasmide nachweisbar sind und teilweise im Experimentverlauf verloren gehen. Möglicherweise haben auch einige der analysierten Zellen das Plasmid eliminiert und anderweitig eine Antibiotika-Resistenz, zum Beispiel durch Kontamination mit einem Fremdplasmid, entwickelt, die weiteres Wachstum unter Selektionsdruck ermöglichte. Auch wenn EBV-basierte *oriP*-Vektoren für ihren episomalen Erhalt bekannt sind, ist in Einzelfällen über eine Integration dieser Plasmide in das Wirtsgenom berichtet worden (Heller, Song et al., 1990). Eine Integration von *oriP* und pCON^{CENP-A} in das Wirtsgenom unter konstantem Selektionsdruck kann nicht ausgeschlossen werden. Denkbar wäre eine Detektion einer möglichen Integration mittels Sequenzierung oder Southern-Blot. Die oben genannten Mechanismen sind jeweils nicht allein-verantwortlich, können jedoch zusammengenommen zur Erklärung der großen Spanne an errechneten und experimentell-ermittelten Kopienzahlen beitragen.

Es ist zu erwähnen, dass die Kopienzahl, mit der sich *oriP*- und pCON^{CENP-A}-Plasmide mittels „*plasmid rescue*“ Experimenten langfristig in HEK293, HeLa und D98/H1 Zellen nachweisen ließen, ebenfalls deutlich von den oben berechneten Werten abweichen (Abb. 2-8, Tab. 2-2). Gegebenenfalls bedarf es generell zur Plasmid-Detektion sensitivere Verfahren. Ein denkbarer Ansatz wäre, erhaltene und wiedergewonnene Plasmide zunächst mittels PCR zu quantifizieren und nach Elektrophorese darzustellen. Ebenfalls denkbar wäre die Durchführung einer quantitativen PCR („*real time PCR*“) mit softwaregesteuerter Auslese. In unserer Arbeitsgruppe laufen aktuell auch vielversprechende Experimente zur mikroskopischen Darstellung der Plasmide in lebenden Zellen.

6.1.3 Das EBNA1-Expressionsniveau als möglicher Ansatz zur Optimierung der Plasmiderhaltung

Neben den bereits genannten ist als weitere Optimierungsmöglichkeit der durchgeführten Plasmiderhaltungs-Experimente das Expressionsniveau von EBNA1 denkbar. Sivachandran *et al.* konnten 2011 zeigen, dass eine längere Glyzin-Alanin-Wiederholung, wie es beim EBNA1-Wildtyp-Protein der Fall ist, zu keiner Verbesserung der Erhaltung von *oriP*-Plasmiden führt (Sivachandran, Thawe et al., 2011). Da die Effizienz der Plasmidaufnahme auch mit einer geringeren Plasmidgröße korreliert, bedarf die verwendete EBNA1^{ΔGA}-Version bezüglich der Glyzin-Alanin-Wiederholung keiner weiteren Optimierung.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass in nasopharyngealen Karzinomzellen mit bereits niedriger intrinsischer EBNA1-Expression *oriP*-Plasmide ohne zusätzliche EBNA1-Expressionskassette deutlich länger erhalten wurden, als Plasmide, die zu einer deutlichen Überexpression von EBNA1 führten. Die höheren EBNA1-Level hatten zwar eine Steigerung der Replikationseffizienz zur Folge, die Ergebnisse legen jedoch insgesamt eine nachteilige Auswirkung auf die Plasmidsegregation nahe. Dies hat eine verminderte *oriP*-Plasmiderhaltung zur Folge (Sivachandran et al., 2011). Diese Ergebnisse lassen sich gegebenenfalls auch auf die verwendeten HUH7-EBNA1 und HepG2-EBNA1 Zellen übertragen. Bei der Wahl der verwendeten Klone wurde auf ein vergleichbares mittleres Expressionsniveau von EBNA1 geachtet. Möglicherweise wäre im Zusammenhang mit den *oriP*-Erhaltungsversuchen der HUH7-EBNA1 Klon #6 (Abb. 5-1) und ein HepG2-EBNA1 Klon mit einer noch geringeren EBNA1-Expression eine geeignetere Wahl gewesen.

Beim pCON^{CENP-A} ist im Bezug auf die endogene EBNA1-Expression der Zellen eine gegenteilige Annahme möglich. Da die Replikation von pCON^{CENP-A}-Plasmiden aktuell ebenfalls noch EBNA1-abhängig ist, ist auch hier das EBNA1-Expressionsniveau entscheidend. Während die Segregation hier durch das Einbringen von 20 *tetO* Elementen in das Plasmid gewährleistet ist, wird für die Replikation das Binden von EBNA1 über das DS-Element auf dem Plasmid benötigt. Für die pCON^{CENP-A}-Erhaltung ist demnach eine suffiziente EBNA1-Expression nötig. Da eine EBNA1-Überexpression die Replikationseffizienz steigern kann (Sivachandran et al., 2011), wäre eine bessere Gesamterhaltung des Systems durch höhere EBNA1-Level denkbar. Potentielle Zellkandidaten wurden mit den HepG2-EBNA1 Klonen #3 und #7, sowie HUH7-EBNA1 Klon #3 (Abb. 5-1) im Rahmen dieser Arbeit bereits generiert. Aus

zeitlichen Gründen konnte die Durchführung dieser Experimente jedoch nicht mehr erfolgen.

Anhand der genannten Aspekte wird deutlich, dass das EBNA1-Expressionsniveau ein sensibles Kriterium in Abhängigkeit von verwendeten Zelllinien und zu untersuchenden Vektorsystemen ist, das individueller Optimierung bedarf. Im Hinblick auf die effizienteste Segregation und Replikation unter Einbeziehung oben genannter Aspekte ist plasmidabhängig ein ausbalanciertes EBNA1-Expressionsniveau zu detektieren.

6.1.4 Vergleich vorteilhafter Aspekte der beiden episomalen Vektoren pEPito und pCON^{CENP-A}

Der wesentliche Vorteil des pCON^{CENP-A} gegenüber dem pEPI-1/ pEPito System ist der aktive Segregationsmechanismus, durch den sich der pCON^{CENP-A} bei der Zellteilung autonom wie die Wirtschromosome verhält. Ein Huckepackmechanismus mit passiver Interaktion mit den Metaphase-Chromosomen wie beim pEPI-1/ pEPito ist nicht erforderlich. Nichtsdestotrotz verfügt auch der pEPito über einige positive Eigenschaften, die mitunter zur Optimierung des pCON^{CENP-A} beitragen können.

Die Depletion des Großteils der CpG-Inseln des pEPI-1 Vektors hat den optimierten episomalen Vektor pEPito hervorgebracht. Dadurch wurde die Etablierungseffizienz des Vektors deutlich erhöht, aber auch das Expressionsniveau von Reportergenen deutlich stabilisiert (Haase et al., 2010). CpG-Inseln werden zum einen mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Verbindung gebracht, zum anderen sollen sie auch eine Rolle bei der Gen-Stillegung durch Inaktivierung von Promotoren haben (Hodges, Taylor et al., 2004, Hyde, Pringle et al., 2008, Yew, Zhao et al., 2002). Durch Reduzierung der in etwa 500 CpG Paare im pCON^{CENP-A} auf ein Minimum wird, ähnlich wie beim pEPI-1/ pEPito System, eine 2 - 3 fache Effizienzsteigerung erwartet. Die Firma PlasmidFactory GmbH & Co. KG könnte dabei hilfreich sein.

In Abschnitt 6.1.1. wird die verlängerte und erschwerte Etablierungsphase des pCON^{CENP-A} im Vergleich zu *oriP* erläutert. Auch bei dem episomalen Vektorsystem pEPI-1 gestaltet sich die anfängliche Etablierung schwierig. Nur 0,5 - 5 % der initial transfizierten Zellen entwickeln stabile Zellklone, auch wenn pEPI-1 Plasmide aus etablierten Zellklonen isoliert und in andere Zellen wiedereingeführt wurden oder wenn pEPI-1 Episome mit Hilfe von HPV16-basierten pseudoviralen Partikeln transduziert wurden (Eisenberger, 2005)(Haase, Magnusson et al., 2013, Stehle et al., 2007). Anhand der Untersuchungen zu beiden episomalen Plasmiden wird deutlich, dass der

jeweilige Mechanismus und die Kopienzahl, mit dem sich die Plasmide in den einzelnen Zelllinien etablieren, noch weitergehend untersucht und wenn möglich verbessert werden müssen.

Eine negative Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und Plasmidgröße ist bekannt und konnte auch bei *oriP* und pCON^{CENP-A} beobachtet werden. Das *oriP*-Plasmid ist mit 8819 Basenpaaren deutlich kleiner als die zusätzlich mit der scetR:CENP-A-Sequenz bestückten pCON^{CENP-A}, was zu einer initial schlechteren Transfektionseffizienz führte (vgl. initiale GFP-Expression (mini-Ecad-pCON^{CENP-A}: 10638 bp, CMV-pCON^{CENP-A}: 11221 bp)). Ähnliches wurde auch in Untersuchungen des episomalen Vektors pEPito beschrieben. Plasmide ohne SMAR-Sequenz wurden zwar nicht stabil erhalten, hatten aufgrund ihrer kleineren Größe jedoch eine deutlich höhere Transfektionseffizienz (Haase et al., 2010). Möglicherweise ist zur Verbesserung der Transfektionseffizienz die Reduktion des pCON^{CENP-A}-Vektor-Rückgrats auf ein benötigtes Minimum hilfreich. Maßnahmen zur Verkleinerung des pCON^{CENP-A} Grundgerüsts wurden bereits unternommen. Hierzu haben wir ein Multi-Expressionssystem kloniert. Bei diesem haben wir auf das Vorhandensein multipler Promotoren verzichtet und die Expression unterschiedlicher Transgene, wie scetR:CENP-A, EBNA1 und Resistenz- und Reporter genen, an einen singulären Promotor gekoppelt. Dies hat eine deutliche Verkleinerung des Vektor-Grundgerüsts zur Folge und kann ggf. durch das Entfernen nicht-funktioneller Regionen noch weiter forciert werden. Plasmid-Erhaltungsversuche mit diesem neuen Vektor-Konstrukt stehen noch aus.

Bei pEPI-1 wird die Kopienzahl mit durchschnittlich 5 - 10 Vektormolekülen in Säugetierzelllinien beschrieben (Baiker et al., 2000, Piechaczek et al., 1999). Eine deutlich geringere Anzahl von 0,5 - 6 Vektormoleküle pro Zelle konnten *in vivo* in murinen Leberzellen mittels qPCR detektiert werden (Haase et al., 2010). Mit welcher Kopienzahl sich pCON^{CENP-A} in primären Zellen bzw. im Tiermodell etablieren wird, bleibt abzuwarten.

Für eine gezielte Gentherapie ist neben der Langzeiterhaltung des Systems auch eine gewebsspezifische Transgen-Expression wünschenswert. Letzteres kann zum Beispiel über gewebespezifische Promotorelemente erreicht werden. Für Leberzellen eignen sich beispielsweise die Promotoren des Alpha-1-Fetoproteins (AFP), des Haptoglobins (HPGL) oder des Apolipoproteins E (ApoE). AFP wird während der Embryo- und Fetogenese in hoher Konzentration im Dottersack und der Leber exprimiert. Nach der Geburt des Kindes sinkt der AFP-Wert binnen 4 Wochen unter die Nachweisgrenze. Aus noch unbekanntem Gründen kommt es beim hepatozellulären Karzinom zum

Wiederanstieg von AFP (Willhauck, Sharif Samani et al., 2008). Durch das Nutzen des AFP-Promotors konnten Haase *et al.* eine Gewebsspezifität des episomalen Vektorsystems pEPito erreichen (Haase et al., 2013). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Aktivität gewebespezifischer Promotoren war jedoch das zusätzliche Einbringen des humanisierten CMV-Enhancers (hCMV) erforderlich (pEPito-hCMV/AFP). In 13 getesteten humanen und murinen Krebszelllinien erfolgte die Transgen-Expression durch pEPito-hCMV/AFP überwiegend in den AFP-positiven HCC-Zelllinien HUH7 und HepG2. Die Ergebnisse wurden in immundefizienten Nacktmäusen *in vivo* verifiziert. 24 Stunden nach der Applikation von pEPito-hCMV/AFP nach vorheriger HUH7-Tumorinduktion zeigte sich in den Tieren eine hauptsächliche Transgen-Expression in Tumorzellen und nur zum Teil im endogenen Lebergewebe (Haase et al., 2013). Dies indiziert eine generelle Verwendbarkeit von episomalen Vektoren für eine gewebespezifische Expression und ggf. im Zusammenhang mit einer HCC-Therapie. Der AFP-Promotor ist für eine Gentherapie von Stoffwechselerkrankungen (wie Diabetes mellitus Typ 1) bei nicht-onkologischen Patienten ohne AFP-Synthese hingegen nicht geeignet.

Mit pEPito konnte allerdings kürzlich auch eine tumorunabhängige gewebespezifische Expression, wie sie auch bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ 1 wünschenswert wäre, erreicht werden. In der aus Muskelzellen abgeleiteten Zelllinie TE-671 wurde unter Verwendung des muskelspezifischen Transgelin-Promotors (SM22) eine gezielte GFP Expression durch pEPito-hCMV/SM22 erreicht. Allerdings wurde eine deutlich reduzierte Transgen-Expression im Vergleich zum nicht-gewebespezifischen, konstitutiv aktiven Elongationsfaktor 1-Promotors gemessen (Haase et al., 2013). Die Verwendung gewebespezifischer Promotorelemente ist demnach auch für episomale Vektoren grundsätzlich möglich, muss jedoch noch verbessert werden. Es ist denkbar, die komplette Transgen-Expression des neu klonierten pCON^{CENP-A}-Multi-Expressionssystems durch die gezielte Promotorwahl gewebespezifisch erfolgen zu lassen.

Die Verwendbarkeit episomaler Vektorsysteme für die Therapie von Diabetes mellitus-assoziierten Erkrankungen konnte kürzlich mit Hilfe des pEPito Vektors bestätigt werden. So gelang ein wichtiger Durchbruch bei der gentherapeutischen Behandlung der diabetischen Retinopathie (DR). Die diabetische Retinopathie, die etwa 90 % der Typ 1 und 60 % der Typ 2 Diabetiker betrifft, beschreibt eine mikrovaskuläre Dysfunktion mit konsekutiver Neovaskularisation. Diese ist durch ein Ungleichgewicht zwischen dem pro-angiogenetischen Faktor VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor) und dem anti-angiogenetischen Pigmentepithel assoziierten Faktor (engl.

Pigment epithelium-derived factor, PEDF) bedingt. Der pEPito-hCMV-PEDF Vektor zeigte für 3 Monate eine Überexpression des mitotisch aktiven retinalen Pigmentepithelzellen *in vitro* und *in vivo*. Letzteres gelang nach intravitrealer Injektion in der Retina von Ins2^{Aktia} diabetischen Mäusen. Gleichzeitig kam es im Tiermodell zu einer Reduktion von VEGF und weiteren mit der DR assoziierten Proteinen (Calado, Diaz-Corrales et al., 2016).

Eine episomale Erhaltung des pCON^{CENP-A} kann aktuell promotorabhängig für bis zu 7 Wochen nach Transfektion in den beiden hepatozellulären Karzinomlinien HUH7-EBNA1 und HepG2-EBNA1 nachgewiesen werden. In HEK293-, D98/H1- und HeLa-Zellen ist dies sogar bis zu 22 Wochen möglich (Abb. 2-8, unveröffentlichte Daten von Lara Schneider). Die genannten Optimierungsmöglichkeiten können die Erhaltung des pCON^{CENP-A} Episoms, bzw. dessen Detektion, noch weiter verbessern. Nach der bisherigen Etablierung in Krebszelllinien ist als nächster Schritt die Erhaltung des pCON^{CENP-A}-Systems in primären Zellen geplant.

6.2 Metabolismus gesteuerte Gen-Induktion in Hepatozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die glukose-abhängige Gen-Induktion in Hepatozyten durch zwei verschiedene Expressionskassetten getestet. Während für die GRE₃(L-PK)-BP1 sowohl eine Glukose- als auch eine Insulinsensitivität beschrieben ist, beinhaltet das GRE₄(ACC)-L-PK System nur Glukose-reagible Elemente (Thule et al., 2000, Zhang & Dong, 2015). In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der beiden verwendeten Glukose-reagiblen Expressionssysteme diskutiert. Im Weiteren erfolgt eine kritische Auseinandersetzung mit der Gentherapie bei Diabetes mellitus Typ 1.

6.2.1 Untersuchung der Glukose- und Insulin-Sensitivität des GRE₃(L-PK)-BP1

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst die Funktionsüberprüfung des GRE₃(L-PK)-BP1 in den beiden hepatozellulären Karzinomlinien HepG2 und HUH7. Eine erwartete und auch von Thulé beschriebene Zunahme der Transgen-Expression (GFP-Intensität) bei steigender Glukosekonzentration konnte nicht bestätigt werden (Abb. 5-6).

Die Transfektionseffizienz (=GFP-positiver Anteil) mit GRE₃(L-PK)-BP1-GFP transfizierter Zellen war bei allen Proben mit 25 - 30 % ähnlich. Sowohl bei HepG2- als auch bei HUH7-EBNA1 Zellen korrelierte die jeweilige Anzahl GFP⁺ Zellen mit der GFP-Intensität. Die beiden Graphen folgten einer ähnlichen Kinetik. Ein größerer Anteil GFP exprimierender Zellen führte zu einer verstärkten Intensität, wie bei HUH7-EBNA1 Zellen beispielsweise unter Basalbedingungen (0 mM Glukose, 10 mM Laktat; Abb. 5-6 E, F) deutlich wird.

Bei HepG2-EBNA1 ist eine dezente Steigerung des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen zu beobachten (Abb. 5-6 D, 9 - 20 mM Glukose). Die mittlere GFP-Intensität bleibt jedoch im Vergleich zu den Proben mit niedrigerem Glukosegehalt nahezu konstant (Abb. 5-6 C). Wäre die Expressionskassette unter hyperglykämischen Bedingungen verstärkt aktiv, so wäre eine messbare Intensitätssteigerung bei ohnehin höherer Anzahl GFP-exprimierenden Zellen erst recht zu erwarten.

Versuche, durch Zugabe von 10⁻⁷ M Insulin und vorheriger Konditionierung die Glukose-Sensitivität des Promotors zu steigern, erbrachte in HepG2-EBNA1 eine Intensitätsminderung von 120 AU (Abb. 5-6 C) auf Werte um 10 AU (Abb. 5-7 C E), hatte aber keinen Effekt auf die Induktionssteigerung durch Glukose.

Thulé *et al.* beschrieben eine 50 %ige Aktivität des BP1-Promotors unter 10^{-9} M Insulin und verwendeten in ihren Versuchsreihen in Hepatozyten 10^{-7} M Insulin (Thulé *et al.*, 2000). Denkbar war eine mögliche Zelltypspezifität für die Insulin-Sensitivität des BP1-Promotors. Aus diesem Grund war fraglich, ob 10^{-7} M Insulin in den verwendeten HUH7- und HepG2-EBNA1 Zellen zu einer zu starken Suppression führt, die durch die glukose-reagiblen Elemente im Promotor nicht zu überwinden sind. Es folgte ein Insulin-Titrationsversuch um die Sensitivität des BP1-Promotors in der verwendeten Zelllinien zu ermitteln (Abb. 5-8). Zwischen Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-6} M Insulin war in beiden Zelllinien kein Unterschied in der Promotoraktivität detektierbar (Abb. 5-8 A, C), der nicht durch Schwankungen im prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen erklärbar ist (Abb. 5-8 B, D). Bei gleichbleibendem Anteil GFP-positiver Zellen (ca. 30 % in beiden Zelllinien) war zudem die mittlere GFP-Intensitätsmessung per FACS bei Glukose-Übersättigung (25 mM) und in Abwesenheit von Glukose (0 mM) konstant.

Im Rahmen der Experimente wurde ein Optimierungsbedarf der Transfektionseffizienz deutlich, der bei $GRE_3(L-PK)$ -BP1 im Durchschnitt in beiden Zelllinien bei ca. 30 % lag (% GFP-positive Zellen in Abb. 5-6, 5-7, 5-8). Größere Varianz wurde unter Verwendung des deutlich stärkeren, konsekutiv aktiven CMV-Kontrollpromotors beobachtet. Trotz identischem Plasmidrückgrat war der Anteil GFP-positiver HepG2-EBNA1 Zellen von 90 % in zwei unabhängigen Experimenten im Vergleich beinahe verdreifacht (Abb. 5-7 B, D). In Abb. 5-6 D waren in HepG2-EBNA1 Zellen hingegen nur 10-15 % der CMV-GFP transfizierten Zellen GFP-positiv. Um die Varianz in der Effizienz der Transfektion besser in die Intensitätsmessung einzubeziehen, wäre möglicherweise die Ko-Transfektion eines weiteren, unabhängigen Fluoreszenzfarbstoffs wie beispielsweise Allophycocyanin (APC) zur Normalisierung hilfreich gewesen.

Zusammenfassend waren die Ergebnisse mit dem $GRE_3(L-PK)$ -BP1-Vektorsystem von Thulé *et al.* weder bezüglich einer Induktionssteigerung durch Glukose, noch einer Suppression des Promotorsystems durch Insulin reproduzierbar (Abb. 5-6, 5-7, 5-8). Die abgebildeten Ergebnisse sind wegen der kleinen Versuchszahl im Einzelnen statistisch nicht valide. Durch nicht dargestellte mikroskopische Beobachtungen, Abweichungen in der Sequenzanalyse und in der Zusammenschau der Experimente wurde jedoch eine mangelnde Funktionalität des $GRE_3(L-PK)$ -BP1-Promotorsystems in den verwendeten HepG2- und HUH7-EBNA1 Zellen festgestellt, so dass dieses System nicht weiter verfolgt wurde.

6.2.2 Untersuchung der Glukose-Reagibilität des GRE₄(ACC)-L-PK

Das GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin Expressionssystem ist im Vergleich zum GRE₃(L-PK)-BP1 ein neueres System zur Glukose-reagiblen Transgenexpression (Thule et al., 2000, Zhang & Dong, 2015). Es wurde gezeigt, dass das ACC-GRE zu einer 3-4-fach erhöhten glukoseabhängigen Transgen Expression führt, als das von Thulé *et al.* verwendete L-PK-GRE (Abb. 2-4), ohne jedoch *in vivo* Hypoglykämien zu erzeugen (Zhang & Dong, 2015). Aus diesem Grund wurde das GRE₄(ACC)-L-PK-Insulin System für weitere Studien zur Glukose-regulierten Insulin-Expression gewählt.

Um einen Einfluss der in 6.2.1 beschriebenen Abweichungen in der Transfektions-effizienz in den Experimenten zum GRE₄(ACC)-L-PK System zu vermeiden, wurde zunächst eine stabile HepG2-EBNA1 Zelllinie durch Integration des Promotorsystem-tragenden Plasmids generiert (HepG2-EBNA1-Ins, Abb. 5-10). Durch den Nachweis des essentiellen GLUT2 konnte eine prinzipielle Anwendbarkeit der Zelllinie für Experimente zur Glukose-reagiblen Expression bestätigt werden.

Die von Zhang *et al.* 2015 publizierten Daten zur Glukose-responsiven Insulinproduktion in primären Mäuse-Hepatozyten konnten auf HepG2 Zellen übertragen werden. Mit Hilfe von RT-PCR wurde eine glukoseabhängige Insulin-mRNA Expression verifiziert. HepG2 Zellen wurden hierzu zunächst unter normoglykämischen Bedingungen (5,5 mM Glukose) konditioniert und dann mit dem Vektor stabil transfiziert, der die Glukose-sensitive Insulinreporterkassette enthält (GRE₄(ACC)-L-PK-Ins). Die Insulin-Expression wurde durch Titration von Glukose im Nährmedium induziert. In drei unabhängigen Experimenten wurde eine signifikante Expressionssteigerung zwischen hypo- und hyperglykämischen Bedingungen verifiziert (Abb. 5-11).

Eine dezente Minderung der Insulin-Expression unter stark hyperglykämischen Bedingungen (25 mM) im Vergleich zur mäßigen Hyperglykämie (12,5 mM) ist in mehreren Untersuchungen zur Glukose-reagiblen Insulin-Expression dokumentiert und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden (Abb. 5-11) (Thule et al., 2000, Zhang & Dong, 2015). Ein möglicher Grund hierfür kann eine verringerte Expression von GLUT2 auf der hepatozytären HepG2-Zellmembran unter stark hyperglykämischen Bedingungen sein (Leturque et al., 2009). GLUT2 ist für den Großteil der Glukoseaufnahme in Hepatozyten verantwortlich. Bei GLUT2-Reduktion ist somit eine verminderte Glukoseaufnahme mit folglich geringerer GRE-vermittelter Promotoraktivierung denkbar.

Im Gegensatz zu den primären Hepatozyten wurde eine um etwa 1900 % erhöhte Grundaktivität des Promotors auch in Abwesenheit von Glukose gemessen, sodass die Induktionsrate nur ca. 1,5fach war (Abb. 5-11 A und B). In primären Hepatozyten wurde, bei sehr geringer Aktivität bei 2,8 mM Glukose, eine etwa 10-fache Induktionssteigerung unter 20 mM beobachtet. Allerdings wurde in den Experimenten von Zhang und Dong reifes Insulin im Zellüberstand gemessen (Zhang & Dong, 2015). Denkbar wäre, dass die Insulin-mRNA, deren Menge in dieser Arbeit gemessen wurde, mehrfach translatiert wurde und dementsprechend eine größere Varianz zwischen hypo- und hyperglykämischen Bedingungen beobachtet wurde. Die Messwerte zur Grundaktivität in primären Hepatozyten bei 0 mM Glukose sind leider nicht dokumentiert, werden sich jedoch wahrscheinlich nicht wesentlich von denen unter 2,8 mM Glukose unterscheiden (Zhang & Dong, 2015). Die Stärke der Expressionskassette ist daher auch abhängig von der verwendeten HepG2 Hepatozyten-Zelllinie. Deshalb muss der Promoter und mögliche Enhancer-Elemente in jeder Zelllinie optimiert werden.

Das Umklonieren beziehungsweise Optimieren des Promotorsystems für HepG2 Zellen, wie zum Beispiel der Wahl eines für HepG2 Zellen geeigneteren Enhancer-Elements, war einerseits aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Andererseits erschien es mir als nicht sinnvoll, da anhand der Ergebnisse von Zhang *et al.* bereits gezeigt werden konnte, dass die Anwendung des System sowohl in primären Hepatozyten, als auch in STZ-induzierten diabetischen Mäusen für 26 Tage zur suffizienten Insulinsekretion und Remission der Erkrankung führt (Zhang & Dong, 2015). Als Krebszelllinie sind HepG2 Zellen ohnehin nicht für die gentherapeutische Anwendung nutzbar. Eine optimale Funktionalität soll in den gentherapeutisch verwendeten Zielzellen etabliert werden.

6.2.3 Kritische Auseinandersetzung mit Diabetes mellitus Typ 1-Gentherapie

Auch wenn die Gentherapie eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Diabetes mellitus Typ 1 ist, bedarf sie kritischer Auseinandersetzung.

Ein wichtiger Sicherheitsaspekt Glukose-reagibler Promotorelemente zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 muss das Vermeiden von Hypoglykämien aufgrund inadäquater Insulinproduktion sein. Zunächst schien der Mechanismus der negativen Rückkopplung durch das Insulin-abhängige hormonsensitive Element im BP1 in Thulés GRE₃(L-PK)-BP1 sinnvoll und notwendig. Bei hohen Blutzuckerwerten *in vivo*

soll initial eine vermehrte Synthese von Insulin erfolgen, die sich selbst limitiert und eine überschießende Senkung des Blutzuckers verhindern soll. Zum Ausschluss einer Selbstinaktivierung *in vitro* wurde für die durchgeführten Versuche GFP anstatt Insulin als Reporter gen ausgelesen (Abb. 5-6, 5-7, 5-8).

Das GRE₄(ACC)-L-PK System von Dong und Zhang beinhaltet kein Insulin-abhängiges hormonsensitives Element. *In vivo* Experimente in STZ-induzierten diabetischen Mäusen zeigten jedoch kein Auftreten von Hypoglykämie-Episoden 5 Stunden postprandial oder nach Über-Nacht-Fasten. Zum einen ist dies vermutlich auf die kurze Halbwertszeit von Insulin *in vivo* von ca. acht Minuten zurückzuführen (Poy, Yang et al., 2002). Zum anderen spielt jedoch auch die Regulation durch ChREBP eine Rolle, dass unter normoglykämischen Bedingungen (ca. 5,5 mM Glukose) nicht aus dem Zytosol in den Zellkern transloziert und somit eine weitere Steigerung der GRE-vermittelten Expression verhindert (Uyeda & Repa, 2006) (Abb. 2-3). Die Basalrate des L-PK Promotors führt so vermutlich zu einer physiologischen, kontinuierlichen Insulinproduktion, die folglich normoglykämische Blutzuckerwerte erlaubt, jedoch erfreulicherweise auch in Fastenperioden nicht imstande ist, Hypoglykämien zu erzeugen.

Die Idee der gentherapeutischen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1, bei der die Insulinproduktion durch den eigenen Metabolismus induziert werden soll, besteht bereits seit über 20 Jahren. Experimentell sind verschiedenste Zelltypen auf ihre Verwendbarkeit geprüft worden. Die Spanne reicht von Zellen ohne β -Zell-ähnliche molekulare Glukose-Erkennung und ohne regulierbaren Sekretionsmechanismen wie Muskelzellen und Fibroblasten (Barry, Ramesh et al., 2001, Riu, Mas et al., 2002), bis hin zu enteroendokrinen und hypophysären Zellen, die zur metabolisch-reagiblen vesikulären Sekretion von transgenem Insulin befähigt sind (Cheung, Dayanandan et al., 2000, Lipes, Cooper et al., 1996, Lu, Sternini et al., 2005, Tang & Sambanis, 2003, Wu, Nicholson et al., 2003). Dazwischen liegend wurden Adipozyten mit vesikulärer, jedoch glukoseunabhängiger, Transgen-Sekretion und Hepatozyten untersucht, die wie β -Zellen GLUT2 und Glukokinase exprimieren, aber auch durch ein konstitutives Sekretionssystem limitiert sind.

Enteroendokrine Zellen erlauben eine sehr schnelle Blutzuckerkorrektur nach den Mahlzeiten, ähnlich der postprandialen 1. Phase der β -Zell-Insulinsekretion (Cheung et al., 2000). Allerdings sind diese Zellen aktuell noch nicht für Manipulationen zugänglich. Durch die Verwendung von Hepatozyten würde die Blutzuckerregulation in einem ähnlichen Zeitrahmen wie der 2. Phase der postprandialen β -Zell-Insulin-

sekretion, bzw. ähnlich zur aktuell klinisch verwendeten subkutanen Basalinsulin-Injektion, erfolgen. Anders als enteroendokrine Zellen bietet die Leber aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit verschiedene DNA-Applikationsmöglichkeiten. Intrahepatische Zugangswege gibt es neben der klinisch häufig durchgeführten perkutanen Punktion auch über portalvenöse und arterielle Injektionen, sowie Injektionen in die untere Hohlvene. Über diese Methoden kann eine große Zellzahl erreicht werden. Die Gentransfereffizienz nicht-viraler DNA in die Leber kann zum Beispiel über chemische Methoden wie der Komplexbildung mit Polyethylenimin (PEI) oder durch physikalische Methoden wie der hydrodynamischen Injektion zudem deutlich gesteigert werden (Boussif, Lezoualc'h et al., 1995, Liu, Song et al., 1999, Sawyer, Grehan et al., 2008). Bei der hydrodynamischen Injektion wurde ursprünglich Plasmid-DNA in einem großen Volumen (ca. 10% des Körpergewichts) in sehr kurzer Zeit injiziert. Der entstehende hydrodynamische Druck führt zur erheblichen Streckung kleiner Gefäße, die dadurch durchlässig werden. Darüber hinaus kommt es in umliegenden Zellen der Blutgefäße zur Porenbildung in der Zellmembran, die das Eindringen der Vektoren in die Zellen ermöglicht (Suda & Liu, 2007). Die Transfektionseffizienz in der Leber nach hydrodynamischer Injektion wird mit ca. 40 % beschrieben (Liu et al., 1999). Nach Modifikation der Methode ist das Verfahren heute mit einem erheblich reduzierten Injektionsvolumen von unter 2 % des Körpergewichts möglich, welches die negativen Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und die Mortalität deutlich senkt (Alino, Herrero et al., 2007, Eastman, Baskin et al., 2002, Inoue, Hakamata et al., 2004). Auch wenn gerade die Ergebnisse in Hepatozyten erfolgversprechend sind, bedarf ihre gentherapeutische Anwendung auch kritischer Auseinandersetzung. So muss beispielsweise das Potential maligner Transformation und die Stabilität von Proliferation und Sekretionseigenschaften noch genauer untersucht werden. Auch eine durch Gentherapie induzierte Transdifferenzierung muss Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die Leber und das Pankreas entspringen gemeinsamer Vorläuferzellen und die Transdifferenzierung ist durch nur wenige Transkriptionsfaktoren kontrolliert, allen voran PDX1 (engl. pancreatic and duodenal homebox 1). Die lentiviral vermittelte Transduktion von Furin-spaltbarem Insulin in die Leber induzierte die Expression zahlreicher β -Zell-Transkriptionsfaktoren wie PDX1, was zu einer hepatozytären Differenzierung in Richtung pankreatischem Gewebe führte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in konstitutiv normales Insulin exprimierenden HUH7 Zellen gemacht. Nach Gentransfer entwickelten sich sekretorische Granula, die eine Proinsulin-Vorstufe speicherten und sich glukoseabhängig entleerten (Tuch, Szymanska et al.,

2003). Allerdings war die pankreatische Transdifferenzierung nicht vollständig, so dass in Abwesenheit der spezifischen Peptidasen kein vollständig prozessiertes Insulin detektierbar war. Die genauen Mechanismen, durch den es nach Insulin-Gentransfer in Hepatozyten zur Expression von β -Zell-Transkriptionsfaktoren kommt und die daraus resultierenden Konsequenzen müssen noch weiter untersucht werden. Da die Expression vor allem in geschädigtem und umliegenden Gewebearealen nachweisbar war, ist als Ursache eine Zellschädigung nach lentiviraler Transduktion denkbar (Shanmukhappa, Mourya et al., 2005). Dies könnte gemeinsame Vorläuferzellen zu einer Entwicklungsverschiebung zu pankreatischem Gewebe befähigen. Im Zuge einer langfristigen Insulin-Gentherapie in Hepatozyten zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Mutagenese zu β -Zellen zu vermeiden, um mögliche Immunreaktionen durch die Krankheit vermittelnde Autoantikörper zu verhindern. Dieses Feld bedarf weiterer Forschung, auch weil bisher genutzte STZ-induzierte diabetische Tiermodelle sich bezüglich des Pathomechanismus gravierend von anderen Entwicklungsarten der Erkrankung unterscheiden. Die Insulinbedarf bei STZ-induzierten Tieren ähnelt zwar dem bei Erkrankten, die dauerhafte Verwendbarkeit von Glukose-regulierten Insulin-Expressionssystemen in erkrankten Organismen ist jedoch noch nicht geklärt. Neben dem geeigneteren Modell fehlen auch Langzeitstudien.

Wie bereits erwähnt, mangelt es allen bisher entwickelten Metabolismus-gesteuerten Insulin-Expressionssystemen an sicheren Applikationsmöglichkeiten. Bisher fanden neben lentiviralen hauptsächlich adenovirale und adeno-assoziierte Systeme Anwendung. Lentiviren sind aufgrund ihrer teils ungerichteten Integration ins Wirtsgenom mit potentieller Mutagenese bzw. Onkogenaktivierung für die Langzeit-Gentherapie von Stoffwechselerkrankungen generell ungeeignet. Eine adenovirale Infektion ist *in vivo* transient und limitiert aufgrund der starken Immunantwort die Re-Infektion und somit die Dauer der Transgen-Expression (Kozlowski, Olson et al., 2007). Mögliche Langzeitfolgen der Insulin-Gentherapie in Hepatozyten sind somit nicht zu beurteilen. Adeno-assoziierte Viren, die keine viralen Gene exprimieren, sind aufgrund einer mildereren Immunantwort weniger pathogen. Allerdings ist die Transgen-Expression in Hepatozyten nach alleiniger AAV Infektion auf etwa 5 % der Zellen begrenzt (McCarty, Fu et al., 2003, Miao, Nakai et al., 2000). Durch eine adenovirale Ko-Infektion kann die Expression 100 - 1000-fach gesteigert werden (Ferrari, Samulski et al., 1996). Hierdurch wird wiederum die Dauer der Transgen-Expression reduziert. Der Adeno-assoziierte Virus vom Serotyp 2 (AAV2) fand bereits Anwendung in humanen Gentherapie-Studien für Hämophilie. Die Expression in der Leber dauerte

allerdings nur 8 Wochen, bevor durch eine ausgeprägte Immunantwort die therapeutische Wirksamkeit abnahm (Manno, Pierce et al., 2006).

Möglicherweise kann durch den episomalen pCON^{CENP-A} die verstärkte Immunantwort verhindert werden. Dies könnte zum einen die Vulnerabilität der Zellen zur Mutagenese reduzieren, zum anderen aber auch Langzeitstudien und eine klinische Anwendung von Metabolismus-gesteuerten Insulin-Expressionssystemen erlauben. Bis dato vorhandene Daten zur Glukose-regulierten Insulinsynthese *in vitro* und *in vivo* sind vielversprechend und die Hürde der geeigneten Applikationsform könnte nach zelltypspezifischer Optimierung durch den pCON^{CENP-A} behoben worden sein.

7 Ausblick

Die Frage, ob das pCON^{CENP-A}-Vektorsystem für die Langzeittherapie von Diabetes mellitus Typ 1 Anwendung finden kann, kann im Rahmen dieser Arbeit noch nicht abschließend beantwortet werden.

Das System soll im Langzeitziel zur gentherapeutischen Anwendung zum Beispiel in primären Hepatozyten zur Insulintherapie verwendet werden. Um die klinische Anwendbarkeit zu prüfen, gilt es zunächst die Kopienzahl, mit dem sich der Vektor in diesen Zellen etabliert, zu ermitteln und den zugrunde liegenden Mechanismus gegebenenfalls zu optimieren. Eine prinzipielle Funktionalität des pCON^{CENP-A}-Systems in Hepatozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

Gleiches gilt für die Verwendung der Insulin-Expressionskassette. Für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 muss mit dem Einsatz dieses Konstrukts ein physiologisches Glukoseniveau erreicht werden, ohne Hypo- oder Hyperglykämien zu generieren. Zuvor konnte die Anwendbarkeit bereits *in vivo* gezeigt werden und wurde nun in HepG2 Zellen in unserem Labor etabliert. Durch die Wahl geeigneter zelltypspezifischer Promotoren kann ggf. die Expression des therapeutischen Gens in den jeweiligen Zielzellen optimiert werden.

pCON^{CENP-A}-Vektoren, welche die GRE-basierten Insulin-Expressionskassetten enthalten, wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit generiert. Aus zeitlichen Gründen konnte eine Untersuchung dieser Vektoren in primären Hepatozyten jedoch nicht mehr erfolgen.

Es soll nun überprüft werden, ob das pCON^{CENP-A}-Vektorsystem auch zu einer langfristigen, glukoseabhängigen Insulinproduktion in Hepatozyten führt. Gelingt dies, könnte im weiteren Verlauf eine hydrodynamische Injektion des pCON^{CENP-A}-Insulin-Expressionsvektorsystems in die Portalvene erkrankter Tiere und Menschen eine geeignete Applikationsmöglichkeit darstellen, die zur langfristigen Therapie der Stoffwechselerkrankung führen kann.

III. Literaturverzeichnis

Aiyar A, Tyree C, Sugden B (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J* 17: 6394-403

Alino SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasi F, Sanchez M (2007) Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism. *Gene Ther* 14: 334-43

Allshire RC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 9: 923-37

Atanasiu C, Deng Z, Wiedmer A, Norseen J, Lieberman PM (2006) ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep* 7: 716-21

Baiker A, Maercker C, Piechaczek C, Schmidt SB, Bode J, Benham C, Lipps HJ (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol* 2: 182-4

Banting FG, Best CH (2007) The internal secretion of the pancreas. 1922. *Indian J Med Res* 125: 251-66

Barry SC, Ramesh N, Lejnieks D, Simonson WT, Kemper L, Lernmark A, Osborne WR (2001) Glucose-regulated insulin expression in diabetic rats. *Hum Gene Ther* 12: 131-9

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9237-42

Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, Benvenisti-Zarum L, Meivar-Levy I, Ferber S (2003) Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278: 31950-7

Bergmann JH, Martins NM, Larionov V, Masumoto H, Earnshaw WC (2012) HACKing the centromere chromatin code: insights from human artificial chromosomes. *Chromosome Res* 20: 505-19

Bergot MO, Diaz-Guerra MJ, Puzenat N, Raymondjean M, Kahn A (1992) Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res* 20: 1871-7

Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Coutelle C (2001) An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 276: 23018-27

Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R (1992) Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ* 304: 1020-2

Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C (2000) Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10: 73-90

Bortesi L, Rademacher T, Schiermeyer A, Schuster F, Pezzotti M, Schillberg S (2012) Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells. *BMC Biotechnol* 12: 40

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7297-301

Boyes J, Bird A (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 11: 327-33

Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A, Rothe M, Modlich U, Beier R, Gohring G, Steinemann D, Fronza R, Ball CR, Haemmerle R, Naundorf S, Kuhlcke K, Rose M, Fraser C, Mathias L, Ferrari R, Abboud MR et al. (2014) Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* 6: 227ra33

Butler JE, Kadonaga JT (2001) Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev* 15: 2515-9

Calado SM, Diaz-Corrales F, Silva GA (2016) pEPito-driven PEDF Expression Ameliorates Diabetic Retinopathy Hallmarks. *Hum Gene Ther Methods* 27: 79-86

Callejas D, Mann CJ, Ayuso E, Lage R, Grifoll I, Roca C, Andaluz A, Ruiz-de Gopegui R, Montane J, Munoz S, Ferre T, Haurigot V, Zhou S, Ruberte J, Mingozi F, High KA, Garcia F, Bosch F (2013) Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* 62: 1718-29

Calos MP (1998) Stability without a centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4084-5

Chakravorty A, Sugden B (2015) The AT-hook DNA binding ability of the Epstein Barr virus EBNA1 protein is necessary for the maintenance of viral genomes in latently infected cells. *Virology* 484: 251-8

Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfe MM, Kieffer TJ (2000) Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290: 1959-62

Conese M, Auriche C, Ascenzioni F (2004) Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther* 11: 1735-41

Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, Garrigue A, Brugman MH, Hu J, Glimm H, Gyapay G, Prum B, Fraser CC, Fischer N, Schwarzwaelder K, Siegler ML, de Ridder D, Pike-Overzet K, Howe SJ, Thrasher AJ, Wagemaker G, Abel U, Staal FJ et al. (2007) Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* 117: 2225-32

Delecluse HJ, Hammerschmidt W (2000) The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. *Mol Pathol* 53: 270-9

Delovitch TL, Singh B (1997) The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7: 727-38

Diaz Guerra MJ, Bergot MO, Martinez A, Cuif MH, Kahn A, Raymondjean M (1993) Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex. *Mol Cell Biol* 13: 7725-33

Drinnenberg IA, Henikoff S, Malik HS (2016) Evolutionary Turnover of Kinetochore Proteins: A Ship of Theseus? *Trends Cell Biol*

Earnshaw WC, Rothfield N (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91: 313-21

Eastman SJ, Baskin KM, Hodges BL, Chu Q, Gates A, Dreusicke R, Anderson S, Scheule RK (2002) Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 13: 2065-77

Ehrhardt A, Haase R, Schepers A, Deutsch MJ, Lipps HJ, Baiker A (2008) Episomal vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther* 8: 147-61

Fang J, Liu M, Zhang X, Sakamoto T, Taatjes DJ, Jena BP, Sun F, Woods J, Bryson T, Kowluru A, Zhang K, Chen X (2015) COPII-Dependent ER Export: A Critical Component of Insulin Biogenesis and beta-Cell ER Homeostasis. *Mol Endocrinol* 29: 1156-69

Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A (2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6: 568-72

Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ (1996) Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70: 3227-34

Filippi CM, von Herrath MG (2008) Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 57: 2863-71

Gefen-Halevi S, Rachmut IH, Molakandov K, Berneman D, Mor E, Meivar-Levy I, Ferber S (2010) NKX6.1 promotes PDX-1-induced liver to pancreatic beta-cells reprogramming. *Cell Reprogram* 12: 655-64

Gerhardt J, Jafar S, Spindler MP, Ott E, Schepers A (2006) Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay. *Mol Cell Biol* 26: 7731-46

Geyer PK, Green MM, Corces VG (1990) Tissue-specific transcriptional enhancers may act in trans on the gene located in the homologous chromosome: the molecular basis of transvection in *Drosophila*. *EMBO J* 9: 2247-56

Gill DR, Pringle IA, Hyde SC (2009) Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther* 16: 165-71

Gold G, Grodsky GM (1984) Kinetic aspects of compartmental storage and secretion of insulin and zinc. *Experientia* 40: 1105-14

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74

Groskreutz DJ, Sliwowski MX, Gorman CM (1994) Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* 269: 6241-5

Haase R, Argyros O, Wong SP, Harbottle RP, Lipps HJ, Ogris M, Magnusson T, Vizoso Pinto MG, Haas J, Baiker A (2010) pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells. *BMC Biotechnol* 10: 20

Haase R, Magnusson T, Su B, Kopp F, Wagner E, Lipps H, Baiker A, Ogris M (2013) Generation of a tumor- and tissue-specific episomal non-viral vector system. *BMC Biotechnol* 13: 49

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH et al. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118: 3132-42

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348: 255-6

Heller RA, Song K, Villaret D, Margolskee R, Dunne J, Hayakawa H, Ringold GM (1990) Amplified expression of tumor necrosis factor receptor in cells transfected with Epstein-Barr virus shuttle vector cDNA libraries. *J Biol Chem* 265: 5708-17

Herold G (2017) Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2017 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Gerd Herold, Köln

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11: 1026-30

Himsworth HP (1940) Insulin Deficiency and Insulin Inefficiency. *Br Med J* 1: 719-22

Hirt B (1966) Evidence for semiconservative replication of circular polyoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55: 997-1004

Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK (2004) Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 10: 269-78

Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, Nunez-Alonso G, Green AM, Bazzani RP, Sumner-Jones SG, Chan M, Li H, Yew NS, Cheng SH, Boyd AC, Davies JC, Griesenbach U, Porteous DJ, Sheppard DN, Munkonge FM et al. (2008) CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol* 26: 549-51

Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E (2004) Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver. *Transplantation* 77: 997-1003

Jenke AC, Eisenberger T, Baiker A, Stehle IM, Wirth S, Lipps HJ (2005) The nonviral episomal replicating vector pEPI-1 allows long-term inhibition of bcr-abl expression by shRNA. *Hum Gene Ther* 16: 533-9

Johnson SR, Cooper MN, Jones TW, Davis EA (2013) Long-term outcome of insulin pump therapy in children with type 1 diabetes assessed in a large population-based case-control study. *Diabetologia* 56: 2392-400

Kamradt T, Goggel R, Erb KJ (2005) Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol* 26: 260-7

Kleinschmidt C, Tovar K, Hillen W, Porschke D (1988) Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control. *Biochemistry* 27: 1094-104

Kondrashova A, Seiskari T, Ilonen J, Knip M, Hyoty H (2013) The 'Hygiene hypothesis' and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS* 121: 478-93

Kozlowski M, Olson DE, Rubin J, Lyszkowicz D, Campbell A, Thule PM (2007) Adeno-associated viral delivery of a metabolically regulated insulin transgene to hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 273: 6-15

Larsson PG, Lakshmikanth T, Laitinen OH, Utorova R, Jacobson S, Oikarinen M, Domsgen E, Koivunen MR, Chau P, Devard N, Lecouturier V, Almond J, Knip M, Hyoty H, Flodstrom-Tullberg M (2015) A preclinical study on the efficacy and safety of a new vaccine against Coxsackievirus B1 reveals no risk for accelerated diabetes development in mouse models. *Diabetologia* 58: 346-54

Leight ER, Sugden B (2001) Establishment of an oriP replicon is dependent upon an infrequent, epigenetic event. *Mol Cell Biol* 21: 4149-61

Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-26

Li YV (2014) Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine* 45: 178-89

Lieberman SM, DiLorenzo TP (2003) A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62: 359-77

Lipes MA, Cooper EM, Skelly R, Rhodes CJ, Boschetti E, Weir GC, Davalli AM (1996) Insulin-secreting non-islet cells are resistant to autoimmune destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8595-600

Liu F, Song Y, Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6: 1258-66

Lu YC, Sternini C, Rozengurt E, Zhukova E (2005) Release of transgenic human insulin from gastric g cells: a novel approach for the amelioration of diabetes. *Endocrinology* 146: 2610-9

Lufino MM, Edser PA, Wade-Martins R (2008) Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Mol Ther* 16: 1525-38

Maeda E, Akahane M, Kiryu S, Kato N, Yoshikawa T, Hayashi N, Aoki S, Minami M, Uozaki H, Fukayama M, Ohtomo K (2009) Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol* 27: 4-19

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF et al. (2006) Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342-7

Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, Nicolas JC (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* 73: 4385-92

McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10: 2112-8

Mendiburo MJ, Padeken J, Fulop S, Schepers A, Heun P (2011) Drosophila CENH3 is sufficient for centromere formation. *Science* 334: 686-90

Miao CH, Nakai H, Thompson AR, Storm TA, Chiu W, Snyder RO, Kay MA (2000) Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol* 74: 3793-803

Middleton T, Sugden B (1994) Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J Virol* 68: 4067-71

Morissette G, Flamand L (2010) Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol* 84: 12100-9

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73

Nanbo A, Sugden A, Sugden B (2007) The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J* 26: 4252-62

Norseen J, Johnson FB, Lieberman PM (2009) Role for G-quadruplex RNA binding by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in DNA replication and metaphase chromosome attachment. *J Virol* 83: 10336-46

Norseen J, Thomae A, Sridharan V, Aiyar A, Schepers A, Lieberman PM (2008) RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. *EMBO J* 27: 3024-35

O'Callaghan BL, Koo SH, Wu Y, Freake HC, Towle HC (2001) Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 276: 16033-9

Olson DE, Paveglio SA, Huey PU, Porter MH, Thule PM (2003) Glucose-responsive hepatic insulin gene therapy of spontaneously diabetic BB/Wor rats. *Hum Gene Ther* 14: 1401-13

Olszak AM, van Essen D, Pereira AJ, Diehl S, Manke T, Maiato H, Sacconi S, Heun P (2011) Heterochromatin boundaries are hotspots for de novo kinetochore formation. *Nat Cell Biol* 13: 799-808

Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG et al. (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12: 401-9

Pich D, Humme S, Spindler MP, Schepers A, Hammerschmidt W (2008) Conditional gene vectors regulated in cis. *Nucleic Acids Res* 36: e83

Piechaczek C, Fetzer C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 27: 426-8

Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS, Nerup J (2010) Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 59: 1561-71

Portois L, Virreira M, Tastenoy M, Svoboda M (2006) Glucose activation of the glucagon receptor gene: functional dissimilarity with several other glucose response elements. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 491-9

Poy MN, Yang Y, Rezaei K, Fernstrom MA, Lee AD, Kido Y, Erickson SK, Najjar SM (2002) CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet* 30: 270-6

Prisco F, Picardi A, Iafusco D, Lorini R, Minicucci L, Martinucci ME, Toni S, Cerutti F, Rabbone I, Buzzetti R, Crino A, Pozzilli P (2006) Blood ketone bodies in patients with recent-onset type 1 diabetes (a multicenter study). *Pediatr Diabetes* 7: 223-8

Prud'homme GJ, Draghia-Akli R, Wang Q (2007) Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther* 14: 553-64

Przewlaka MR, Zhang W, Costa P, Archambault V, D'Avino PP, Lilley KS, Laue ED, McAinsh AD, Glover DM (2007) Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2: e478

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016) *Biochemie*. Thieme, Stuttgart

Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T (2008) Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 359: 2849-50

Regnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, Trouche D, Earnshaw W, Brown W (2005) CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol* 25: 3967-81

Ren B, Tao C, Swan MA, Joachim N, Martiniello-Wilks R, Nassif NT, O'Brien BA, Simpson AM (2016) Pancreatic Transdifferentiation and Glucose-Regulated Production of Human Insulin in the H4IIE Rat Liver Cell Line. *Int J Mol Sci* 17

Riu E, Mas A, Ferre T, Pujol A, Gros L, Otaegui P, Montoliu L, Bosch F (2002) Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes* 51: 704-11

Robert MA, Lin Y, Bendjelloul M, Zeng Y, Dessolin S, Broussau S, Larochelle N, Nalbantoglu J, Massie B, Gilbert R (2012) Strength and muscle specificity of a compact promoter derived from the slow troponin I gene in the context of episomal (gutless adenovirus) and integrating (lentiviral) vectors. *J Gene Med* 14: 746-60

Rufo C, Teran-Garcia M, Nakamura MT, Koo SH, Towle HC, Clarke SD (2001) Involvement of a unique carbohydrate-responsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. *J Biol Chem* 276: 21969-75

Santamaria P (2010) The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* 32: 437-45

Sawyer GJ, Grehan A, Dong X, Whitehorne M, Seddon M, Shah AM, Zhang X, Salehi S, Fabre JW (2008) Low-volume hydrodynamic gene delivery to the rat liver via an isolated segment of the inferior vena cava: efficiency, cardiovascular response and intrahepatic vascular dynamics. *J Gene Med* 10: 540-50

Schepers A, Ritzi M, Bousset K, Kremmer E, Yates JL, Harwood J, Diffley JF, Hammerschmidt W (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 20: 4588-602

Sears J, Ujihara M, Wong S, Ott C, Middeldorp J, Aiyar A (2004) The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. *J Virol* 78: 11487-505

Shanmukhappa K, Mourya R, Sabla GE, Degen JL, Bezerra JA (2005) Hepatic to pancreatic switch defines a role for hemostatic factors in cellular plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10182-7

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-8

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T et al. (2006) International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355: 1318-30

Shih H, Towle HC (1994) Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J Biol Chem* 269: 9380-7

Short DK, Okada S, Yamauchi K, Pessin JE (1998) Adenovirus-mediated transfer of a modified human proinsulin gene reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Am J Physiol* 275: E748-56

Sivachandran N, Thawe NN, Frappier L (2011) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 replication and segregation functions in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *J Virol* 85: 10425-30

Stehle IM, Postberg J, Rupprecht S, Cremer T, Jackson DA, Lipps HJ (2007) Establishment and mitotic stability of an extra-chromosomal mammalian replicon. *BMC Cell Biol* 8: 33

- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-60
- Suda T, Liu D (2007) Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 15: 2063-9
- Sugden B, Leight ER (2001) EBV's plasmid replicon: an enigma in cis and trans. *Curr Top Microbiol Immunol* 258: 3-11
- Tang SC, Sambanis A (2003) Development of genetically engineered human intestinal cells for regulated insulin secretion using rAAV-mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 645-52
- Teo CG, Griffin BE (1987) Epstein-Barr virus genomes in lymphoid cells: activation in mitosis and chromosomal location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8473-7
- Thompson KS, Towle HC (1991) Localization of the carbohydrate response element of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J Biol Chem* 266: 8679-82
- Thule PM, Liu J, Phillips LS (2000) Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. *Gene Ther* 7: 205-14
- Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F (2003) Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res* 63: 3511-6
- Tsai S, Shameli A, Santamaria P (2008) CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol* 100: 79-124
- Tuch BE, Szymanska B, Yao M, Tabiin MT, Gross DJ, Holman S, Swan MA, Humphrey RK, Marshall GM, Simpson AM (2003) Function of a genetically modified human liver cell line that stores, processes and secretes insulin. *Gene Ther* 10: 490-503
- Uyeda K, Repa JJ (2006) Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4: 107-10
- Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Haegeman G (2000) Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *Eur J Biochem* 267: 5665-78
- Vrochides D, Paraskevas S, Papanikolaou V (2009) Transplantation for type 1 diabetes mellitus. Whole organ or islets? *Hippokratia* 13: 6-8
- Wang Q, Greenburg G, Bunch D, Farson D, Finer MH (1997) Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther* 4: 393-400

- White RE, Wade-Martins R, James MR (2002) Infectious delivery of 120-kilobase genomic DNA by an Epstein-Barr virus amplicon vector. *Mol Ther* 5: 427-35
- Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Klutz K, Cengic N, Wolf I, Mohr L, Geissler M, Senekowitsch-Schmidtke R, Goke B, Morris JC, Spitzweg C (2008) Alpha-fetoprotein promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther* 15: 214-23
- Wong SP, Argyros O, Coutelle C, Harbottle RP (2011) Non-viral S/MAR vectors replicate episomally in vivo when provided with a selective advantage. *Gene Ther* 18: 82-7
- Wu L, Nicholson W, Wu CY, Xu M, McGaha A, Shiota M, Powers AC (2003) Engineering physiologically regulated insulin secretion in non-beta cells by expressing glucagon-like peptide 1 receptor. *Gene Ther* 10: 1712-20
- Yamada K, Tanaka T, Noguchi T (1999) Characterization and purification of carbohydrate response element-binding protein of the rat L-type pyruvate kinase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 44-9
- Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9116-21
- Yates JL, Camiolo SM, Bashaw JM (2000) The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol* 74: 4512-22
- Yates JL, Guan N (1991) Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* 65: 483-8
- Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH (2002) CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 5: 731-8
- Zhang JA, Jia D, Olson DE, Campbell AG, Thule PM (2009) Hepatic insulin gene therapy diminishes liver glycogen despite insulin responsive transcriptional effects in diabetic CD-1 mice. *J Gene Med* 11: 588-97
- Zhang T, Dong HH (2015) Glucose-regulated insulin production in the liver improves glycemic control in type 1 diabetic mice. *Mol Metab* 4: 70-6

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	→	Abbildung
ACC	→	Acetyl-CoA-Carboxylase
AldoB	→	Aldolase B
AU	→	Arbitrary units
bp	→	Basenpaare
BSA	→	Bovines Serum-Albumin
cDNA	→	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CENP-A	→	Zentromer-Protein A (engl. centromer protein A)
ChRE	→	Kohlenhydrat-reagibles Element (engl. Carbohydrate responsive element)
ChREBP	→	Kohlenhydrat-reagibles Element Bindeprotein (engl. Carbohydrate responsive element binding protein)
CIP	→	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (engl. Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
CMV	→	Cytomegalovirus
DMEM	→	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	→	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
DS	→	Dyad symmetry element
EBNA1	→	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 1
EBV	→	Epstein-Barr Virus
EDTA	→	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	→	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FACS	→	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (engl. Fluorescence activated cell sorting)
FCS	→	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FR	→	Family of repeats
GFP	→	Grün fluoreszierendes Protein (engl. Green fluorescent protein)
GRE	→	Glukose-reagibles Element

Abkürzungsverzeichnis

HEK293	→	Menschliche embryonale Nierenzelle (engl. Human Embryonal Kidney Cells)
HIGT	→	Hepatozyten Insulin Gen Therapie
HRP	→	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase)
kbp	→	Kilobasenpaar
kDa	→	kilo Dalton
L-PK	→	L-Typ Pyruvatkinase
mM	→	Millimolar
MFI	→	Durchschnittsfluoreszenz (engl. Mean fluorescence intensity)
NEB	→	New England Biolabs
NOD-Mäuse	→	nicht-adipösen diabetischen Mäuse (engl. non-obese diabetic mice)
nt	→	Nukleotide
ORC	→	Replikationsursprungs-Erkennungskomplex (engl. origin recognition complex)
PBS	→	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffer saline)
PCR	→	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
pre-RC	→	prä-Replikationskomplexes (engl. pre-replication complex)
RNA	→	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
RT-PCR	→	„Real-time PCR“ (quantitative PCR)
<i>S/MAR</i>	→	Kerngerüst-/ Kernmatrixanheftungsregion (engl. scaffold/matrix attachment region)
V	→	Volt
β-ME	→	β-Mercaptoethano

V. Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn PD Dr. Aloys Schepers für die Ermöglichung dieser Dissertation in seiner großartigen Arbeitsgruppe. Außerdem danke ich ihm für seine konstruktive Kritik, der Art mich zu Fordern und das bereitwillige Beantworten meiner vielen Fragen. Dank ihm war das Anfertigen dieser Dissertation besonders lehrreich.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Genvektoren des Helmholtz Zentrum Münchens möchte ich für die stets freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt hier dem „Schepers Racing Team“, das sich unermesslich viel Zeit für Erklärungen und Kritik genommen und mir stets motivierend, humor- und verständnisvoll zur Seite gestanden hat. Stefanie, die sich außerordentlich viel Mühe machte, mich in das Thema einzuarbeiten und im Labor stets eine verlässliche Unterstützung war. Nina, die mir zahlreiche Denkanstöße gab und jederzeit zur Stelle war, wenn sich mein Kopf mal wieder verknotete. Julia, die Witz in den Arbeitsalltag streute und mir nicht nur dadurch beim Gelingen dieser Dissertation half. Ohne euch hätte die Arbeit nicht so viel Spaß gemacht!

Der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München, bzw. dessen Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) möchte ich danken. Dieses hat mich im Rahmen des Stipendiums finanziell und im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin“ intellektuell unterstützt.

Meinen Freunden, die mich während der teilweise stressigen Zeit ertragen und alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben gilt großer Dank. Felix, dir danke ich für die großen Portionen Geduld und Zuneigung, mit denen du mich während dieser Arbeit unterstützt hast!

Vor allem aber gilt mein Dank den lieben Menschen, denen diese Dissertation gewidmet ist: meinen Eltern! Ihr habt mich neben meinen beiden Studiengängen auch bei dieser Arbeit sowohl finanziell als auch mit dem Herzen unterstützt.

DANKE dafür, dass ihr mir den ganzen Weg so einfach wie möglich gemacht habt!

Abschließend danke ich meinem Geschwistern Karim, Hannah und Mayada, die mich immer haben Wissen lassen, dass ich mich stets auf sie verlassen kann.

VI. Eidesstattliche Versicherung

Koudaimi, Sarah-Miriam

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der pCON^{CENP-A}-Vektor: Anwendbarkeit für Diabetes mellitus Typ 1?

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Essen, 05.01.2019

Sarah-Miriam Koudaimi

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin