

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, Experimed
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Optimierung und Charakterisierung des lentiviralen Gentransfers in humanen mesenchymalen Stammzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. biol. hum.)
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Oliver Roßmann
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K.-K. Conzelmann
Priv. Doz. Dr. M. Feuring-Buske

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Wolfgang Böcker,
Dr. med. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 02. 2008

Für meine Eltern

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Zusammenfassung

Hintergrund Humane mesenchymale Stammzellen sind ein viel versprechendes Ziel für die *ex vivo* Gentherapie, und Lentiviren sind exzellente Vehikel für den Gentransfer in hMSCs, da sie hohe Transduktionsfrequenzen mit langfristiger Genexpression erreichen. Dennoch könnte die Seneszenz von hMSCs die therapeutische Anwendung, infolge von zeitaufwendiger Zellselektion und Virus Titration, limitieren. Diese Arbeit beschreibt optimierte Protokolle für hoch effizienten *ex vivo* lentiviralen Gentransfer in hMSCs und eine schnelle und verlässliche Methode, um den funktionellen lentiviralen Titer mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zu bestimmen.

Methoden EGFP wurde als Markergen/-protein verwendet, um verschiedene lentivirale Expressionsvektoren herzustellen. Die Produktion von Lentiviren wurde mit verschiedenen Verpackungssystemen getestet. Der Prozentsatz transduzierter Zellen wurde durch Polybrene und Blasticidinselektion erhöht. hMSCs von verschiedenen Spendern wurden mittels PCR und Western Blot analysiert. Regulierte Genexpression wurde durch Herstellung eines Tet-On selbstregulierten Expressionsvektors erreicht. Mit einem p24 ELISA-Test wurden übrig gebliebene virale Partikel im Zellkulturüberstand detektiert. Die Effizienz des lentiviralen Gentransfers wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet und mittels qRT-PCR und FACS-Analyse quantifiziert. Die lentiviralen Titer wurden mit qRT-PCR der exprimierten Transgene bestimmt. Die hMSC Differenzierung wurde histologisch untersucht.

Ergebnisse Selbstinaktivierende lentivirale Vektoren der dritten Generation zeigten hoch effizienten Gentransfer in hMSCs bei der Verwendung von Polybrene. Die Blasticidinselektion hat den Prozentsatz der transgenen Zellen weiter erhöht unter Selektion von Zellen die mehrere Transgenkopien tragen. Die positiven Effekte von Polybrene und der Blasticidinselektion sind nicht von hMSCs eines speziellen Spenders abhängig. Präzise Regulation der Genexpression wurde durch Herstellung eines selbstregulierten Tet-On-Expressionssystems erreicht. Keine viralen Antigene wurden im Zellkulturüberstand nach aufeinander folgenden Medienwechseln detektiert, was auf die Abwesenheit von infektiösen Partikeln nach einigen Tagen hindeutet. In dieser Arbeit wurde ein starker linearer Zusammenhang zwischen der Virusverdünnung und der Stärke der Transgenexpression mittels qPCR Analysen beobachtet, wodurch die Virustitration durch Quantifizierung der Transgenexpression ermöglicht wird. Abschließend wurde durch

Differenzierung in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung gezeigt, dass transduzierte hMSCs ihren Stammzellcharakter beibehalten haben und dass die Transgenexpression durch die Differenzierung nicht beeinflusst wurde.

Schlussfolgerungen Die Quantifizierung der Transgen-Kopienanzahl durch qRT-PCR ist eine schnelle und verlässliche Methode, um den funktionellen lentiviralen Titer nach dem *ex vivo* Gentransfer in hMSCs zu bestimmen. Die in dieser Arbeit optimierte und charakterisierte Methode für die effiziente lentivirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen, in Verbindung mit regulierbarer Transgenexpression, ist ein sicheres, verlässliches und leistungsstarkes Verfahren und bildet eine aussichtsreiche Grundlage für zukünftige Gentherapie und Tissue Engineering Anwendungen in hMSCs.

Abstract

Background Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are a promising target for *ex vivo* gene therapy and lentiviruses are excellent gene transfer vehicles in hMSCs since they achieve high transduction rates with long-term gene expression. Nevertheless, senescence of hMSCs may limit therapeutic applications due to time-consuming cell selection and viral titration. This thesis describes optimized protocols for highly efficient *ex vivo* lentiviral gene transfer in hMSCs and a fast and reliable method to determine functional lentiviral titer by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Methods EGFP was used as a marker gene/protein to create different lentiviral expression vectors. Lentivirus production was tested with different types of packaging systems. The percentage of transduced cells was increased with polybrene and blasticidin selection. HMSCs from different donors were analyzed by PCR and western blotting. Regulated gene expression was achieved with the creation of a Tet-On self-regulating expression vector. Using p24 ELISA, remaining viral particles were detected in the cell culture supernatant. The lentiviral gene transfer efficiency was observed by fluorescence microscopy and quantified by qRT-PCR and FACS analysis. Lentiviral titers were determined by qRT-PCR of expressed transgenes. HMSC differentiation was assayed histological.

Results Third-generation self-inactivating lentiviral vectors showed highly efficient gene transfer in hMSCs with the use of polybrene. Blasticidin selection further increases the percentage of transgenic cells with a selection of cells carrying multiple transgene copies. The positive effects of polybrene and blasticidin selection are not dependant on hMSCs from a specific donor. Tightly regulated gene expression was achieved by creating a self-regulated Tet-On expression system. No viral antigen was detected in the cell culture supernatant after serial media changes, suggesting the absence of infectious particles after a few days. In this thesis a strong linear correlation between virus dilution and level of transgene expression was observed by qPCR analysis, therefore allowing viral titering by quantification of transgene expression. Finally, it could be demonstrated that transduced hMSCs retained their stem cell character by differentiation towards adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages and transgene expression was not affected by differentiation.

Conclusions Quantification of transgene copy numbers by qPCR is a fast and reliable method to determine functional lentiviral titer after *ex vivo* gene transfer in hMSCs. The optimized and characterized method for lentiviral transduction of hMSCs, described in this thesis, together with regulated transgene expression, is a safe, reliable and powerful procedure and provides promising basis for future gene therapy and tissue engineering applications in hMSCs.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Die mesenchymale Stammzelle (MSC)	1
1.1.1 Einleitung	1
1.1.2 Definition	4
1.1.3 Die mesenchymale Stammzellnische	5
1.1.4 Eigenschaften von MSCs	5
1.1.4.1 Potential der Selbsterneuerung	6
1.1.4.2 Differenzierungspotential	6
1.1.4.3 Oberflächenmarker	7
1.1.4.4 Subpopulationen von MSCs	8
1.1.5 Aufgabe und Funktion von mesenchymalen Stammzellen	9
1.1.6 Die Möglichkeiten von hMSCs in der Zell- und Gentherapie	9
1.2 Gentransfer	11
1.2.1 <i>Ex vivo - in vivo</i> Gentransfer	12
1.2.2 Regulierte Transgenexpression (Tet-System)	13
1.2.3 Nicht virale Methoden	15
1.2.4 Virale Methoden	16
1.3 Lentivirale Vektoren zum Gentransfer in Zellen	19
1.3.1 Gentransfer in MSCs mittels lentiviralen Vektoren	20
1.3.2 Humanes Immundefizienzvirus (HIV)	20
1.3.2.1 Morphologie von HIV-1 Virionen	22
1.3.2.2 Molekularbiologie von HIV-1	22
1.3.2.3 Replikationszyklus von HIV-1	33
1.4 Zielsetzung der Arbeit	37
2 Material und Methoden	39
2.1 Material	39
2.1.1 Das ViraPower™ lentivirale Expressionssystem	39

2.1.1.1	Sicherheitskonzept des ViraPower™ lentiviralen Systems	39
2.1.1.2	Komponenten des ViraPower™ lentiviralen Systems	41
2.1.1.3	Herstellung der Lentiviren und Transduktion der Zielzellen	45
2.1.2	Chemikalien	48
2.1.3	Lösungen und Puffer	49
2.1.4	Medien und Zusätze für Bakterienkultur	51
2.1.5	Medien und Zusätze für Zellkultur	52
2.1.6	Kits	54
2.1.7	Enzyme	54
2.1.8	Antikörper	54
2.1.9	Marker und Standards	55
2.1.10	Oligonukleotide	55
2.1.11	Bakterienstämme	56
2.1.12	Eukaryote Zellen und Zelllinien	57
2.1.13	Plasmide	57
2.1.14	Laborgeräte	59
2.1.15	Verbrauchsmaterial	61
2.1.16	Zusätzliches Material	62
2.1.17	Computerprogramme und Web tools	62
2.2	Methoden	62
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	62
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	62
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	63
2.2.2.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	63
2.2.2.2	Isolierung und Reinigung von DNA	63
2.2.2.3	Sequenzanalyse von DNA	66
2.2.2.4	Isolierung und Reinigung von RNA	66
2.2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA	67
2.2.2.6	PCR Methoden	70
2.2.3	Zellkulturmethoden	73
2.2.3.1	Kultivierung von humanen Zellen	74
2.2.3.2	Passagieren von Zellen	75

2.2.3.3	Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer	75
2.2.3.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	76
2.2.3.5	Differenzierung von hMSCs	76
2.2.3.6	Transfektion	77
2.2.4	Virologische Methoden	77
2.2.4.1	Herstellung der lentiviralen Vektoren	78
2.2.4.2	Transduktion der Zielzellen	78
2.2.4.3	Titration	79
2.2.5	Fluoreszenz Durchflußzytometrie (FACS)	79
2.2.6	Immunoassays	80
2.2.7	Proteinchemische Methoden	80
2.2.7.1	Proteinisolation	80
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	81
2.2.7.3	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)	81
2.2.7.4	Gelfärbung nach Fairbanks	81
2.2.7.5	Immunoblotting (Western Blot)	82
2.2.7.6	Ablösen gebundener Antikörper (Stripping)	83
2.2.8	Histologische Methoden	83
2.2.8.1	Anfertigung von Kryoschnitten	83
2.2.8.2	Von Kossa Färbung	83
2.2.8.3	Oil Red O Färbung	83
2.2.8.4	Toluidinblau Färbung	84
2.2.9	Statistik	84
3	Ergebnisse	85
3.1	Herstellung der lentiviralen Expressionsvektoren und pLP1/2	85
3.1.1	Klonierung der Negativkontrolle pLenti6/V5-mock	85
3.1.2	Klonierung des EGFP Expressionsvektor pLenti6/V5+EGFP	87
3.1.3	Klonierung des promotorlosen Zielvektor pLenti6/V5 Δ CMV	88
3.1.4	Klonierung des Tet-On-Expressionsvektors pLenti6V5+rtTA	89
3.1.5	Klonierung des selbstregulierten Tet-ON-EGFP-Expressionsvektor	90
3.1.6	Klonierung von pLP1/2	94
3.2	Vergleich verschiedener Verpackungssysteme	95

3.3	Optimierung der lentiviralen Transduktionseffizienz in hMSCs	97
3.4	Optimierung der Ausbeute transgener hMSCs	99
3.5	Vergleich von hMSCs verschiedener Spender	102
3.6	Tetrazyclin-regulierte Transgenexpression	103
3.7	Nachweis viraler Antigene nach der Transduktion	104
3.8	Virustiterbestimmung durch Quantifizierung der Transgenexpression	105
3.9	Differenzierung lentiviral transduzierter hMSCs	109
4	Diskussion	111
	Anhang	122
	Abbildungsverzeichnis	142
	Tabellenverzeichnis	143
	Abkürzungsverzeichnis	144
	Literaturverzeichnis	148
	Danksagung	163
	Erklärung	164
	Lebenslauf	165

1 Einleitung

1.1 Die mesenchymale Stammzelle (MSC)

1.1.1 Einleitung

Nach dem am 1. Juli 2002 in Kraft getretenen "Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz)" sind Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen für hochrangige Forschungsziele unter strengen Voraussetzungen erlaubt. Einfuhr und Verwendung werden dabei auf Stammzellen beschränkt, die vor dem 1. Januar 2002 gewonnen wurden.

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen werden humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) aus Geweben von Erwachsenen isoliert. Da es sich also um adulte Stammzellen handelt, kann durch ihre Verwendung die ethische Diskussion des Einsatzes embryonaler Stammzellen vermieden werden.

Der Begriff einer Bindegewebsstammzelle wurde von Owen vorgeschlagen (Owen 1985; Owen 1988; Owen und Friedenstein 1988), großteils basierend auf den Pionierarbeiten von Friedenstein (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1974a). Bereits seit 1966 konnte Friedenstein durch Adhärenz an Zellkulturplastik fibroblastoide Zellen aus Nagetier- und Meerschweinchenknochenmark isolieren und diese anschließend osteogen differenzieren (Friedenstein et al. 1966; Friedenstein et al. 1970; Friedenstein et al. 1978). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sie *in vitro*, ausgehend von Einzelzellen, Kolonien bilden können und dafür wurde der Begriff der „colony forming unit fibroblast precursor cells“ (CFU-F) eingeführt (Friedenstein et al. 1974b; Friedenstein et al. 1976). Somit waren die Grundlagen der Isolation und *in vitro* Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen geschaffen, und die Plastikadhärenz ist bis heute ein wichtiges Definitionsmerkmal (Dominici et al. 2006). Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (MSC) wurde dann in den frühen 90er Jahren des letzten Jahrtausends von Caplan bekannt gemacht (Caplan 1991). Später wurden diese Zellen dann auch aus verschiedenen anderen Geweben, wie z.B. dem Fettgewebe (Cowan et al. 2004; Lee et al. 2004b; Zuk et al. 2002), muskulären Bindegewebe (Jiang et al. 2002b; Peng und Huard 2004) und Blut (Kuznetsov et al. 2001) gewonnen (siehe 1.1.3 Die mesenchymale Stammzellnische). Die Isolation von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen erfolgt in der Regel über

Knochenmarkaspirate des Beckenkamms oder Femurkopfes der Spender (Friedenstein et al. 1974a; Haynesworth et al. 1992a; Haynesworth et al. 1992b). Sie werden mesenchymale Stammzellen (*engl.*: mesenchymal stem cells, MSC) oder Knochenmark Bindegewebszellen (*engl.*: bone marrow stromal cells, BMSC) und, in letzter Zeit, auch multipotente mesenchymale Bindegewebszellen (*engl.*: multipotent mesenchymal stromal cells, MMSC) genannt, alle durch das Akronym MSC bezeichnet. Um Klarheit in die Bedeutung dieser Begriffsvielfalt zu bringen, hat sich die Internationale Gemeinschaft für Zelltherapie (ISCT) in einer im Jahr 2005 erschienenen Publikation um die Vereinheitlichung der verwendeten Namen bemüht. Demnach werden die fibroblastoiden plastikadhärenten Zellen, unabhängig aus welchem Gewebe sie stammen, als multipotente mesenchymale Bindegewebszellen bezeichnet, wohingegen nur eine Subpopulation dieser Zellen, welche Stammzellenaktivität aufweisen müssen, als mesenchymale Stammzellen bezeichnet werden. Für beide Namen kann das Akronym MSC verwendet werden, daher ist eine genaue Definition notwendig (Horwitz et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff MSC für die Abkürzung von mesenchymalen Stammzellen verwendet.

Die Entstehung von mesodermalen Geweben wie Knochen, Knorpel, Muskel, Knochenmark, Sehnen, Fett, Haut, Bindegewebe in Embryos oder erwachsenen Organismen wird als Mesogenese bezeichnet. Dieser Prozess ist an der ständigen Erneuerung von jedem mesenchymalen Gewebe beteiligt und bildet die Voraussetzung für die schnelle Reparatur defekter Gewebsareale. Die Isolation und Identifikation von mesenchymalen Stammzellen und ihrer Anzahl sowie Verteilung, erlaubt ein besseres Verständnis des Umsatzes und der Reparaturfunktionen in erwachsenen Organismen. Mesenchymale Stammzellen durchleben proliferative und festlegende Stadien, und ihre Nachkommen treten in einzelne Linien ein, was zu einer endgültigen Differenzierung eines definierten Phänotyps wie Osteoblasten, Chondrozyten oder Myoblasten führt (Caplan 1994). Aus diesen Gründen sind mesenchymale Stammzellen für Zell- und Gentherapie Strategien sowie für die Gewebetechnik (*engl.*: Tissue Engineering) von besonderem Interesse und stellen dafür eine viel versprechende Bezugsquelle von Zellen dar (Caplan und Bruder 2001; Pittenger et al. 2002; Prockop 1998). Dies beruht hauptsächlich auf ihrer immanenten Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in funktionelle Zelltypen, welche das Gewebe bilden, in dem sie existieren (Baksh et al. 2004). Es gibt immer mehr Erfolg versprechende Ansätze, MSCs zu Therapie Zwecken einzusetzen (Franceschi 2005; Giordano et al. 2007; Gregory et al. 2005a; Hamada et al. 2005; Kassem 2004). Das Tissue Engineering bietet innovative Therapiemöglichkeiten, die vor allem bei Knochenersatzmaterialien ein breites

Forschungsfeld eröffnen (Seitz et al. 2007). Hierfür werden derzeit bevorzugt autogene (körpereigene) Transplantate verwendet, die aber naturgemäß nur in begrenztem Umfang vorhanden sind. Als Alternative werden allogene (artgleiche) oder alloplastische (synthetische) Ersatzmaterialien verwendet, bei denen aber Fremdkörperreaktionen auftreten können (Schieker und Mutschler 2006). Trotz intensiver Forschung können die Anforderungen an Knochenersatzmaterialien aus verschiedenen Gründen noch nicht zufrieden stellend erfüllt werden. Die Bildung von künstlichem Knochen aus funktionell aktiven, körpereigenen Zellen, in unterstützenden und Form gebenden Leitschienen, unter Zugabe geeigneter Wachstumsfaktoren (Gerstenfeld et al. 2003; Tischer et al. 2004) und die anschließende Reimplantation in den Patienten, bietet im Rahmen des Tissue Engineering eine attraktive Lösung (Schieker et al. 2004b). Humane mesenchymale Stammzellen können aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten (Aubin 1998) für die Besiedelung solcher Leitschienen verwendet werden (Minguell et al. 2001).

Gentherapie hat sich zu einer viel versprechenden Strategie für die Reparatur und Regeneration von beschädigtem Gewebe des Bewegungsapparates entwickelt (Caplan und Goldberg 1999). Verglichen mit konventionellen Methoden für den Knochenersatz hat die Anwendung dieser Methode zur Knochenheilung eine erhöhte Wirksamkeit in präklinischen Tierversuchen gezeigt (Beyer und da Silva 2006; Phillips et al. 2007a). In klinischen Studien hat die Therapie mit patienteneigenen hMSCs eine Besserung bei verschiedenen Knochenerkrankungen, wie Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit) (Horwitz et al. 2001) und Osteoporose (Caplan 2005) gezeigt. In klinischen Zelltherapie Studien wurden hMSCs als unterstützende Behandlung bei Autoimmunerkrankungen (El Badri et al. 2004; Jones et al. 2004) und Tumorkrankheiten (Studený et al. 2002) eingesetzt.

Obwohl diese Ansätze Erfolg versprechende Therapiemöglichkeiten bieten, besteht die Gefahr, dass hMSCs im Sinne einer malignen Entartung unkontrolliert proliferieren (Docheva et al. 2007). Zum Beispiel konnte an mit MSCs besiedelten, allogenen Transplantaten im Mausmodell eine Migration der Zellen in die Lungen und Extremitäten beobachtet werden. Außerdem zeigte sich eine, den Osteosarkomzellen ähnliche, abnorme genetische Veränderung (Tolar et al. 2007). Bis heute gibt es aber noch keine zugelassenen Therapieverfahren mit hMSCs.

1.1.2 Definition

Aufgrund des Fehlens eines einzelnen spezifischen Markers (Conget und Minguell 1999) und dem mangelnden Wissen über die anatomische Lage, sowie Verteilung von MSCs *in vivo*, beruht die Definition derselben vorwiegend auf retrospektiven Prüfungen. Seit der frühen Arbeiten von Castro-Malaspina und Kollegen (Castro-Malaspina et al. 1980) haben viele Wissenschaftler verschiedene Methoden für die Isolation von MSCs in serumhaltigen und serumlosen Bedingungen durchgeführt und neue Ansätze zur Isolation von reinen MSC Populationen entwickelt. Diese Fortschritte haben unser Verständnis der Biologie von MSCs bereichert, haben aber auch zu unterschiedlichen Terminologien und Maßstäben bei der Beschreibung (betreffend z.B. die Morphologie, den Phänotyp, die Genexpression und Kombinationen daraus) der aus vielen adulten Geweben stammenden fibroblastoiden, adhärennten Zellen geführt (Bianco und Gehron 2000; Caplan 1991; Shi et al. 2002). Immer noch mangelt es an Übereinstimmung die Identität und Charakteristik von MSCs betreffend. Dies drückt sich auch durch die Vielfalt der verwendeten Bezeichnungen aus, wie: multipotente adulte Vorläuferzellen (*engl.*: multipotent adult progenitor cells, MAPCs) (Jiang et al. 2007), mesodermale Vorläuferzellen (*engl.*: mesodermal progenitor cells, MPCs) (Reyes et al. 2001), aus Knochenmark isolierte, adulte, in mehrere Linien induzierbare Zellen (*engl.*: marrow-isolated adult multilineage inducible cells, MIAMI cells) (D'Ippolito et al. 2004) und zirkulierende, regenerative Stammzellen (*engl.*: recycling stem cells, RS-1, RS-2) (Colter et al. 2000). Obwohl keine dieser Bezeichnungen den Entstehungsort und die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen wirklich exakt beschreiben kann, hat sich der Begriff „mesenchymale Stammzelle“ (MSC) durchgesetzt und wird derzeit am häufigsten verwendet (Horwitz et al. 2005). Trotzdem hängt die Definition dieser und der anderen genannten Zelltypen von der Adhärenz einer Population geernteter Zellen an ein Zellkultursubstrat ab, und daher kann keine davon die tatsächlich existierenden Vorläufer in adultem humanem Knochenmark beschreiben. Da es keinen spezifischen Marker für MSCs gibt, besteht eine sinnvolle Möglichkeit zur näheren Charakterisierung der Zellen darin, gleichzeitig mehrere Antigene auf einer einzelnen Zelle mittels Immunofluoreszenz (Schieker et al. 2004a) oder in heterogenen Zellgemischen mittels FACS-Analyse (Mageed et al. 2007) nachzuweisen. Trotz der vorhandenen Beschränkungen hat die Internationale Gemeinschaft für Zelltherapie (ISCT) die folgenden Minimalbedingungen für die Definition von MSC festgelegt (Dominici et al. 2006):

- 1) Adhärenz an Zellkulturkunststoff unter Standard Kulturbedingungen.

2) Expression der Oberflächenmoleküle CD105, CD73 und CD90 und Abwesenheit von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR.

3) *In vitro* Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten

Die in dieser Arbeit verwendeten hMSCs erfüllen alle diese Bedingungen.

1.1.3 Die mesenchymale Stammzellnische

Die genaue Lokalisierung von MSCs *in vivo* ist nach wie vor sehr unzureichend bekannt. Konventionell werden mesenchymale Stammzellen im Menschen aus Knochenmark isoliert (DiGirolamo et al. 1999; Pittenger et al. 1999). Aber innerhalb des Knochenmarks machen MSCs nur etwa 0,001 – 0,1 % der Gesamtheit aller mononukleären Zellen aus (Mageed et al. 2007; Wexler et al. 2003). Damit aus einer sehr begrenzten Menge Knochenmark *ex vivo* genügend frühe Vorläuferzellen für therapeutische Applikationen generiert werden können, ist das MSC Proliferationspotential wichtig (Sekiya et al. 2002). Knochenmark ist eine akzeptierte Quelle für MSCs, aber daneben wurden MSCs auch aus anderen Geweben isoliert, wie z.B. Knochenhaut (Mason et al. 1998; Nakahara et al. 1991), Spongiosa (Noth et al. 2002), Muskel (Asakura et al. 2001), Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Gelenkhaut (De Bari et al. 2001), Haut (Young et al. 2001), Lunge (Sabatini et al. 2005), peripheres Blut (Zvaifler et al. 2000) und Nabelschnurblut (Erices et al. 2000; Kern et al. 2006). Dies legt nahe, dass die MSC Nische nicht nur auf das Knochenmark beschränkt ist. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die MSCs weiter verbreitet sind als früher angenommen wurde und dass MSCs auch in den Wänden von Blutgefäßen angesiedelt sind (da Silva et al. 2006), in oder in unmittelbarer Umgebung der Haarfollikel (Tiede et al. 2007) und in den Darmkrypten (Yen und Wright 2006). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die in Blut und Geweben gefundenen MSCs auch nur eine Population von auswandernden Zellen sein könnte, die lediglich vorübergehend anzutreffen ist. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass MSCs *in vivo* mannigfaltig verteilt sind und als Folge eine eigene universelle Stammzellnische einnehmen könnten.

1.1.4 Eigenschaften von MSCs

Traditionell sind drei grundlegende Eigenschaften von Stammzellen bekannt: die Selbsterneuerung (mitotische Teilung in identische Tochterzellen), Plastizität (Differenzierung in verschiedene Gewebe) und Hierarchie (keine Rückdifferenzierung zur Stammzelle). Diese Charakteristika beruhen hauptsächlich auf den Beobachtungen der klassischen hematopoetischen

Stammzelle, sind aber nicht notwendigerweise anzuwenden für andere Stammzelltypen wie MSCs (Zipori 2005). Die wichtigste Eigenschaft von MSCs ist die Plastizität, wohingegen Selbsterneuerung und Hierarchie nicht essentiell sind (Delorme et al. 2006).

1.1.4.1 Potential der Selbsterneuerung

Eine definierende Eigenschaft von Stammzellen ist ihr Potential zur Selbsterneuerung, d.h. durch mitotische Zellteilungen entstehen identische Kopien der Zelle über einen längeren Zeitraum, sogar während der gesamten Lebenszeit eines Organismus. Das absolute Selbsterneuerungspotential von MSCs ist immer noch nicht endgültig bestimmt. Dies ist hauptsächlich durch die unterschiedlichen Methoden zur Gewinnung der MSCs und die wechselnden Methoden zur Charakterisierung der Zellen und der Selbsterneuerung begründet (Smith et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass MSCs in ihrer Gesamtheit eine signifikante wenn auch sehr veränderliche Fähigkeit zur Selbsterneuerung während der *in vitro* Kultivierung besitzen (Bruder et al. 1997; Colter et al. 2000). Mehrere Studien berichten, dass MSCs und isolierte MSC Klone in Bezug auf ihre Selbsterneuerung sehr heterogen sind (Bianco et al. 2001; Colter et al. 2000). MSCs in Zellkultur weisen replikativ seneszente Phänotypen auf, die abhängig von der Spezies sind aus der sie gewonnen wurden. Zum Beispiel stellen humane MSCs das Wachstum nach ca. 40-50 Populationsverdopplungen ein (Stenderup et al. 2003), wohingegen murine MSCs über mehr als hundert Verdopplungen passagiert werden können (Meirelles und Nardi 2003). *In vitro* geht die Seneszenz der hMSCs mit dem fortschreitenden Verlust der klonalen Multipotenz einher (Fehrer und Lepperdinger 2005).

1.1.4.2 Differenzierungspotential

Eine wichtige und grundlegende Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen ist ihre Fähigkeit in Zellen verschiedener Gewebetypen zu differenzieren. Während aus embryonalen Stammzellen alle Gewebearten entstehen können (Totipotenz), geht diese Eigenschaft im Verlauf der Differenzierung verloren. MSCs sind pluripotent, d.h. sie können in mehrere, aber nicht alle Gewebe differenzieren. Unter bestimmten induzierenden Bedingungen sind sie in der Lage, Merkmale von Zellen aus dem embryonalen Mesoderm anzunehmen. Das Differenzierungspotential von MSC Populationen wurde *in vitro* umfassend untersucht. Mehrere Studien konnten zeigen, dass MSCs *in vivo* und *in vitro* die Fähigkeit besitzen, sich in endgültig ausdifferenzierte mesenchymale Gewebe zu entwickeln (Abbildung 1). Darunter sind Knochen

(Aslan et al. 2006; Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1998b), Knorpel (Kadiyala et al. 1997; Wakitani et al. 1994), Sehne (Awad et al. 1999; Young et al. 1998), Muskel (Ferrari et al. 1998; Galmiche et al. 1993; Kadivar et al. 2006), Fettgewebe (Rogers et al. 1995) und das die Hematopoese unterstützende Stroma (Cheng et al. 2000; Koc und Lazarus 2001). Das enorme Differenzierungspotential wird noch weiter ausgedehnt durch die Erkenntnis, dass MSCs auch keimblattübergreifend in andere als das mesenchymale Gewebe transdifferenzieren können (Abbildung 1). Einige Studien zeigen eine Differenzierung in ektodermales und endodermales Gewebe (Jiang et al. 2002a; Zhao et al. 2002). Darunter sind neurale Zellen (Kopen et al. 1999; Sanchez-Ramos et al. 2000; Temple 2001), Endothelzellen (Reyes et al. 2001), Hautzellen (Deng et al. 2005), Bauchspeicheldrüsen β -Zellen (Chen et al. 2004) und Hepatozyten (Kang et al. 2005; Sato et al. 2005). Diese Plastizität in mesodermale, ektodermale und endodermale Zellen zu differenzieren, charakterisiert MSCs als pluripotente Zellen. Es muss allerdings beachtet werden, dass einige Studien berichten, dass MSC Populationen äußerst heterogen sind was ihr Differenzierungspotential betrifft (Kuznetsov et al. 1997; Majumdar et al. 1998; Muraglia et al. 2000; Pittenger et al. 1999).

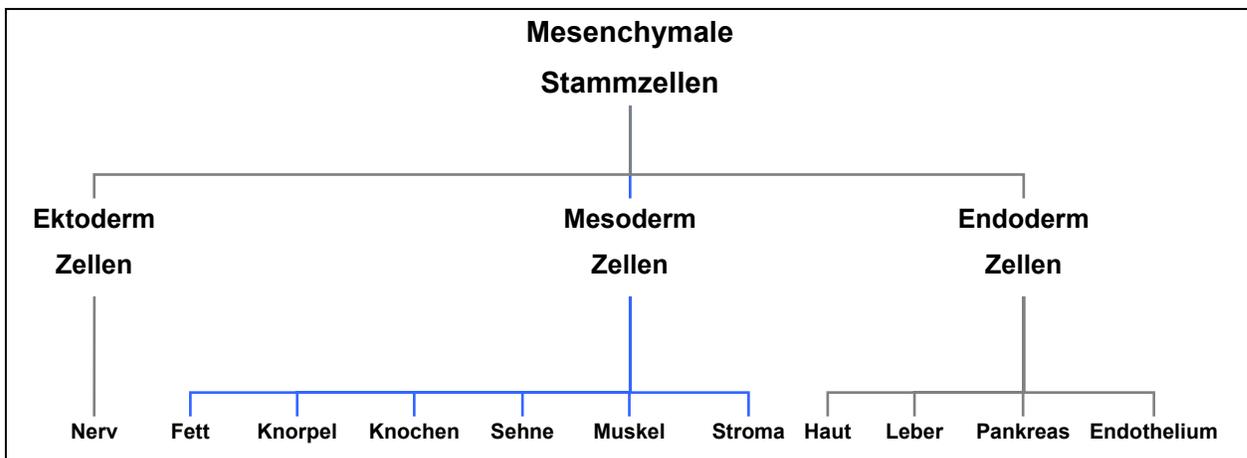


Abbildung 1: Plastizität (Differenzierung) von mesenchymalen Stammzellen.

1.1.4.3 Oberflächenmarker

Mittels Fluoreszenz aktivierter (FACS) und magnetischer Sortiertechnik (MACS) wurde im Bereich der Charakterisierung des Zelloberflächen-Antigenprofils von humanen MSCs aus Knochenmark beachtlicher Fortschritt erreicht. Die Zahl der Oberflächenantigene zum Nachweis von frühen Vorläuferzellen wächst ständig, jedoch ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien schwierig. Die Arbeiten unterscheiden sich von Gruppe zu Gruppe, im Ursprung der Zellen

(Spezies, Entnahmeort), der Methode der Isolierung (Adhärenz, Ficoll/Percoll, FACS), den Kulturbedingungen (verschiedene Zusätze) und den Analysemethoden (DNA-, RNA-, Proteinebene), welche zudem noch heterogene Zellgemische untersuchen. Bis heute fehlt allerdings immer noch der einzelne Marker der definitiv die *in vivo* MSC erkennt, auch auf Grund von mangelnder Übereinstimmung von diversen Dokumentationen des MSCs Phänotyp (Gronthos et al. 1994; Minguell et al. 2001; Pittenger et al. 1999; Tocci und Forte 2003). Trotzdem konnten durch die Verwendung einer Kombination von monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene (z.B. STRO-1, SH2, SH3, SH4) von *in vitro* kultivierten MSCs einige viel versprechende Fortschritte bei der immunologischen Phänotypbestimmung gemacht werden (Gronthos et al. 1994; Haynesworth et al. 1992a). Andererseits macht es die Tatsache, dass MSCs einige Eigenschaften mit Endothel-, Epithel- und Muskelzellen gemeinsam haben und eine sehr große Variabilität in ihrem Oberflächen-Antigenprofil aufweisen (Conget und Minguell 1999; Jiang et al. 2002a; Simmons und Torok-Storb 1991; Vogel et al. 2003) sehr schwierig, den einzelnen universellen Marker für MSCs zu finden. Trotz dieser Schwierigkeiten bei der Definition einer „mesenchymalen Stammzelle“ gibt es die allgemeine Übereinstimmung, dass MSCs keine der typischen hematopoetischen Marker wie CD45, CD34 und CD14 besitzen (Pittenger et al. 1999). Das heißt die Abwesenheit dieser Antigene ist ein weiteres Definitionskriterium für MSCs.

1.1.4.4 Subpopulationen von MSCs

Neuere Untersuchungen (Colter et al. 2000; Colter et al. 2001; Igura et al. 2004; Prockop et al. 2001; Sekiya et al. 2001; Sekiya et al. 2002; Smith et al. 2004) konnten während der *in vitro* Kultivierung verschiedene Untergruppen innerhalb der Population der mesenchymalen Stammzellen nachweisen. Auch in eigenen Beobachtungen konnten auf dem Einzelzellniveau mindestens drei verschiedene morphologische Phänotypen identifiziert werden (Abbildung 2). Neben den bisher für hMSC als typisch angesehenen bipolaren, fibroblastoiden, spindelförmigen (*engl.*: spindle shaped) SS-Zellen (Abbildung 2A) mit hohem Teilungspotential konnten auch kleine sehr schnell teilende (*engl.*: rapidly self-renewing) RS-Zellen (Abbildung 2B) und flache (*engl.*: flat cell), weit ausgedehnte, multipolare FC-Zellen (Abbildung 2C) mit geringer Proliferationskapazität beobachtet werden.

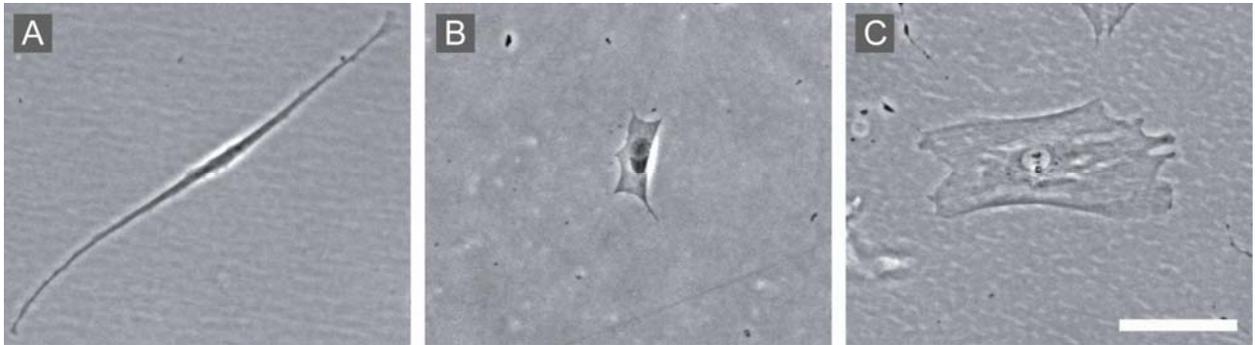


Abbildung 2: Phasenkontrastaufnahmen der Subpopulationen von hMSCs.

(A) SS-Zelle, (B) RS-Zelle, (C) FC-Zelle (Maßstabsbalken: 100 µm).

In den einzelnen Subpopulationen konnten entsprechend ihrer morphologischen Phänotypen unterschiedlich ausgeprägte Differenzierungspotentiale nachgewiesen werden (Colter et al. 2001; Prockop et al. 2001; Sekiya et al. 2001; Sekiya et al. 2002). Die RS-Zellen Subpopulation hat ein hohes Potential in alle drei Linien (osteogen, adipogen, chondrogen) zu differenzieren, bevorzugt aber in die adipogene Richtung. Mit Ausnahme der osteogenen Linie ist bei den FC-Zellen die Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Die SS-Population weist das größte Potential auf in Bindegewebe oder Fett zu differenzieren.

1.1.5 Aufgabe und Funktion von mesenchymalen Stammzellen

Die genaue *in vivo* Funktion von MSCs ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt und ist Bestandteil vieler Untersuchungen. Trotzdem kommen einige dieser Studien zu dem Schluss, dass sie eine essentielle Rolle bei der Hematopoese, der Gewebereparatur und Erhaltung innerhalb des Körpers spielen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass MSCs eine weit reichende Fähigkeit besitzen das Immunsystem zu regulieren (Di Nicola et al. 2002; Krampera et al. 2003). Berücksichtigt man das enorme Potential dieser Zellen und unser mangelndes Verständnis desgleichen, sind sie ein enorm wichtiger Untersuchungsgegenstand im Hinblick auf den aktuellen Stand der Zell- und Gentherapie, sowie der Gewebeherstellung und Reparatur (Tissue Engineering).

1.1.6 Die Möglichkeiten von hMSCs in der Zell- und Gentherapie

Während der letzten zwei Jahrzehnte hat die Möglichkeit des Gentransfers in Stammzellen die Hoffnung, dass Methoden der Gentherapie dauerhafte therapeutische Wirkung erreichen, enorm verstärkt (Bianco und Robey 2001; Kofron und Laurencin 2006; Vollweiler et al. 2003). Es stellt sich immer mehr heraus, dass adulte Stammzellen sehr gut als Werkzeug für die Zell- und

Gentherapie einsetzbar sind, im Speziellen im Bereich des Tissue Engineering (Korbling und Estrov 2003; Prockop et al. 2003). Das endgültige Ziel liegt sowohl in der Verwendung von MSCs in verschiedenen Formen der Therapie, als auch als Hilfsmittel, um die Mechanismen zu verstehen, die zur Reparatur und Regeneration von beschädigtem oder krankem Gewebe und Organen führen. Dieser Ansatz wurde bereits 1991 von Caplan (Caplan 1991) vorgeschlagen und ist vor allem bei der Behandlung von Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder und Gefäßerkrankungen äußerst vielversprechend (Baksh et al. 2004; Beyer und da Silva 2006; Caplan und Bruder 2001; Franceschi 2005; Giordano et al. 2007; Gregory et al. 2005b; Hamada et al. 2005; Kassem 2004; Pittenger et al. 2002). Die lange Lebensdauer und Fähigkeit von MSCs gezielt in Gewebe einzuwandern sind wünschenswerte Eigenschaften in Bezug auf Strategien der Gentherapie, welche gegen infektiöse Krankheiten oder Metastasen bildende Tumore gerichtet sind. Die Verwendung von MSCs in der Immuntherapie, in verschiedenen therapeutischen Ansätzen, einerseits als Immunsystem unterdrückende Substanzen, oder andererseits genetisch modifiziert um therapeutisch wirksame Proteine zu exprimieren, welche gegen autoimmune Prozesse wirken, sind von Jorgensen *et al.* (Jorgensen et al. 2003) zusammengefasst worden. Es gibt immer mehr Hinweise, dass MSCs eine Reihe von Mechanismen einsetzen, welche sie vor Immunantworten des Wirtes schützen. Beobachtungen *in vitro* und *in vivo* lassen vermuten, dass MSCs möglicherweise verwendet werden können, die Toleranz in allogenen oder xenogenen Empfängern zu erhöhen. Dies kann die Transplantation von hematopoetischen Stammzellen vereinfachen und die „graft versus host disease“ minimieren, wodurch die Abstoßung von Organen nach der Transplantation verhindert werden kann.

Wie bereits 1995 von Caplan vorgeschlagen (Caplan 1995) könnten genetisch modifizierte MSCs bei Erkrankungen einerseits direkte *in situ* Einsatzmöglichkeiten in einer Reihe von Zelltypen, in komplexen Mikroumgebungen und unterschiedlichsten Geweben haben, andererseits auch im Bereich des Tissue Engineering, indem sie, auf Leitschienen ausgesät, bestimmte Wachstumsfaktoren oder therapeutisch wirksame Proteine bilden. (Baksh et al. 2004; Ballas et al. 2002; Beyer und da Silva 2006; Caplan und Bruder 2001; Franceschi 2005; Giordano et al. 2007; Gregory et al. 2005a; Hamada et al. 2005; Heyde et al. 2007; Justesen et al. 2001; Kassem 2004; MacKenzie und Flake 2002; Noel et al. 2002; Phillips et al. 2007a; Pittenger et al. 2002; Smogorzewska und Weinberg 2004). Die Möglichkeit mesenchymale Stammzellen genetisch zu verändern, bietet die Möglichkeit der dauerhaften Expression von therapeutisch wirksamen Genen/Proteinen gegen eine große Anzahl Erkrankungen während der gesamten Lebenszeit eines

Patienten. MSCs können derart manipuliert werden, dass sie *in vitro* und *in vivo* eine Vielzahl verschiedener Proteine sezernieren, welche potentiell zur Behandlung vieler Serumprotein-Mangelkrankheiten und anderer genetisch bedingter oder erworbener Erkrankungen oder Gewebdefekte dienen können, z.B. Knochen, Knorpel und Knochenmarkskrankheiten (Bruder et al. 1998a; Caplan et al. 1997; Otto und Rao 2004), oder sogar Krebs (Bazan-Peregrino et al. 2007; Dachs et al. 1997; Dickson et al. 2005; Lo et al. 2005). Fortschritte bei dem Gentransfer in HSCs haben Hinweise auf entscheidende Verbesserungen geliefert, welche notwendig sind, um die therapeutische Wirksamkeit von MSCs bei einer Reihe von Erkrankungen zu erhöhen. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen welche die Proliferation, Differenzierung und Migration von MSCs regulieren, werden letztendlich die erfolgreiche *ex vivo* und *in vivo* Manipulation von MSCs ermöglichen und somit die Regeneration von komplexen Geweben und Organen (Satija et al. 2007). Aus den genannten Gründen ist es unumgänglich eine äußerst schnelle und effiziente Methode des Gentransfers in hMSCs zu entwickeln, und Methoden um die Effizienzen zeitnah und verlässlich in den modifizierten Zellen verifizieren zu können.

1.2 Gentransfer

Unter Gentransfer versteht man den Vorgang, bei dem genetisches Material in Zellen eingeschleust wird, mit dem Ziel, die Expression relevanter Proteine zu beeinflussen. Dies kann entweder *in vitro* in der Zellkultur oder *in vivo* in Organismen geschehen. Die Regulation der Zielgene bzw. Proteine kann positiv oder negativ erfolgen, unter anderem durch:

- Einschleusung einer oder mehrerer Kopien eines Gens,
- Überexpression einer dominant-negativen Mutante,
- Transfer von kurzen regulativen RNA-Fragmenten (siRNA, miRNA) bei der RNAi-Technologie,
- Einbringen von Genen (Transkriptionsfaktoren), welche ihrerseits die endogene Regulation der Zielgene positiv oder negativ beeinflussen.

Die zwei potenziellen Ziele des Gentransfers sind die Untersuchung unbekannter Genfunktionen und die Gentherapie. Die wichtigste Funktion der Gentherapie ist es, eine Methode zu entwickeln, die ein therapeutisch wirksames Gen (Transgen) in ausgewählte Zellen abliefern und dort zur ordnungsgemäßen Genexpression führt. Eine optimale Gentransfer Methode muss drei Hauptbedingungen erfüllen: (1) das Transgen muss vor Degradierung durch Nukleasen in der interzellularen Matrix geschützt werden, (2) das Transgen muss durch die Plasmamembran und in

den Nukleus der Zielzellen transportiert werden, und (3) die Methode darf keinen schädlichen (toxischen) Effekt haben (Gao et al. 2007).

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden für den Gentransfer entwickelt, sowohl virale als auch nicht virale (Lavigne und Gorecki 2006; Miyazaki et al. 2006) für *in vitro* (*ex vivo*) (Menon et al. 2007; Stender et al. 2007) und *in vivo* (Liu et al. 2007; Palizban et al. 2007) Anwendungen ohne und mit Leitschienen (Awad et al. 2007), sowohl reguliert (Brough et al. 2007) als auch unreguliert (Phillips et al. 2007b). Mit wenigen Ausnahmen sind alle Ergebnisse positiv dahingehend, dass sie überhaupt Genexpression zeigen und darauf folgende Effekte auf Gewebewachstum und Umgestaltung. Jede davon hat bestimmte Vor- und Nachteile die abhängig sind von der jeweiligen Fragestellung, für die sie verwendet werden sollen. Einen umfassenden Überblick hierzu haben kürzlich Heyde und Kollegen veröffentlicht (Heyde et al. 2007). Bei der Wahl eines adäquaten Systems für den Gentransfer müssen einige Faktoren sorgfältig abgewägt werden: (1) Dauer der Proteinexpression um eine effiziente Wirkung zu erreichen (transient oder dauerhaft), (2) Zielzellen (leichte Transfizier-/Transduzierbarkeit, Rezeptorexpression, teilende oder ruhende Zellen), (3) Weg des Gentransfers (*ex vivo* oder *in vivo*), (4) maximaler Grenzwert der für den Wirt vertretbaren vektorinduzierten Immunantwort, und (5) gewünschte zeitliche Regulation der Transgenexpression (induzierbar oder konstitutiv). Es ist unwahrscheinlich, dass jemals eine einzige Technologie universell geeignet für alle Szenarien ist, daher muss die gewählte Methode für die spezielle Anwendung optimiert werden (Phillips et al. 2007a).

1.2.1 *Ex vivo* - *in vivo* Gentransfer

Genetisches Material kann entweder durch eine *in vivo* oder aber durch eine *ex vivo* Methode in die Zielzellen des Wirts eingeschleust werden.

In vivo Strategien umfassen das Einbringen des Vektors durch intravenöse Injektion oder direkte lokale Implantation in einen bestimmten anatomischen Bereich. Obwohl diese einfachen, einstufigen Vorgänge vom Operateur relativ leicht durchzuführen sind und notwendig sein könnten, bei Erkrankungen die sofortige Behandlung benötigen, sind auch erhebliche Herausforderungen damit verbunden. Dies sind z.B. die geringere Transfektions-/Transduktionseffizienz im Vergleich zu *in vitro* Methoden, Entzündungs- oder Immunreaktionen, und Schwierigkeiten bei der zielgerichteten Modifikation der gewünschten Zellpopulation. Außerdem sind diese Strategien abhängig von der Anwesenheit und

Empfindlichkeit der Wirtszellen. Bei Patienten mit gestörter Fähigkeit, Zellen am Ort einer Verletzung zu erneuern, z.B. durch Krankheit, Trauma, Strahlungsbehandlung oder altersbedingten Gewebeverfall, können *in vivo* Methoden unter Umständen nicht erfolgreich sein (Heyde et al. 2007; Phillips et al. 2007a).

Ex vivo Ansätze umfassen das Ernten einer bestimmten Zellpopulation des Patienten, gefolgt von genetischer Veränderung dieser Zellen unter *in vitro* Bedingungen und anschließender Implantation an den Ort der Verletzung. Der *ex vivo* Gentransfer ermöglicht die Expansion der Zielzellpopulation vor der genetischen Veränderung und die Selektion von Zellen, welche das Transgen exprimieren. Außerdem könnte der *ex vivo* Gentransfer in einem klinischen Szenario sicherer sein als die direkte Injektion von z.B. Viren *in vivo*. Zudem können die Zellen vor der Implantation in den Wirt auf maligne, krebsauslösende Entartungen überprüft werden. Diese Schritte sind allerdings oft komplex und arbeitsintensiv und können erhebliche Kosten verursachen (Heyde et al. 2007; Phillips et al. 2007a).

1.2.2 Regulierte Transgenexpression (Tet-System)

Die konstitutive Überexpression von osteogenen Transgenen führte erfolgreich zur Stimulation der Osteoblastendifferenzierung und Knochenregeneration (Gysin et al. 2002). Dennoch riskiert man durch die unregulierte Überexpression dieser Proteine anormale Effekte der unkontrollierten Signaltransduktion, einschließlich Tumorinduktion (Ide et al. 1997; Pouliot et al. 2003) und Überproduktion von Knochen (Moutsatsos et al. 2001; Peng et al. 2005), wenn das Knochenwachstum über die Defektgröße hinausgeht. Um diesen Bedenken Beachtung zu schenken, wurden induzierbare Expressionssysteme entwickelt, um die Aktivität der genetisch manipulierten Zellen kontrollieren zu können (Goverdhana et al. 2005). Diese Systeme treiben die Transgenexpression typischerweise von einem induzierbaren Promotor an, welcher von modifizierten und/oder nicht aus Säugetieren stammenden Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wird von exogenen chemischen Substanzen kontrolliert, welche die Transgenexpression zulassen („an“ Zustand) oder unterdrücken („aus“ Zustand). Prinzipiell umfasst die *ex vivo* regulierbare Genterapie Methode die Implantation von modifizierten Zellen z.B. in einen Knochendefekt und die Aufrechterhaltung eines optimalen Niveaus der Expression des Transgens im „an“ Zustand. Wenn eine ausreichende Heilung stattgefunden hat, werden die Zellen in den „aus“ Zustand geschaltet um jeglichen nachteiligen Effekt einer anhaltenden Überexpression des Transgens auszuschließen. Zusätzlich ermöglicht

die Regulation die Analyse von einzelnen Expressionsmustern, inklusive Variationen in der Dauer und Stärke der Expression, zyklische Expression und Koordination der Abfolge mehrerer exogen exprimierter Gene (Phillips et al. 2007a).

Das am besten charakterisierte dieser regulierbaren Systeme ist das Tetrazyklin induzierbare Expressionsystem, das erstmals von Gossen und Bujard beschrieben wurde (Abbildung 3) (Gossen und Bujard 1992). Das Originalsystem verwendet den durch Tetrazyklin kontrollierten Transaktivator (tTA). In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet tTA an das tet Operon und aktiviert die Transkription eines nachgeschalteten Gens von Interesse. In der Anwesenheit eines nichttoxischen Niveaus von Tetrazyklin bindet das Antibiotikum an tTA, blockiert dessen Bindung an das tet Operon und somit die anschließende Transaktivierung in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration (Abbildung 3A) (Baron und Bujard 2000). Das System ist *in vitro* kompatibel durch die Zugabe von Tetrazyklin in das Zellkulturmedium und *in vivo* durch die Verabreichung von Tetrazyklin über das Trinkwasser. Dieses „Tet-Off“ System wurde später zu einem „Tet-On“ System modifiziert, in dem die Transaktivierung mit der Tetrazyklinkonzentration zunimmt (Abbildung 3B) (Gossen et al. 1995).

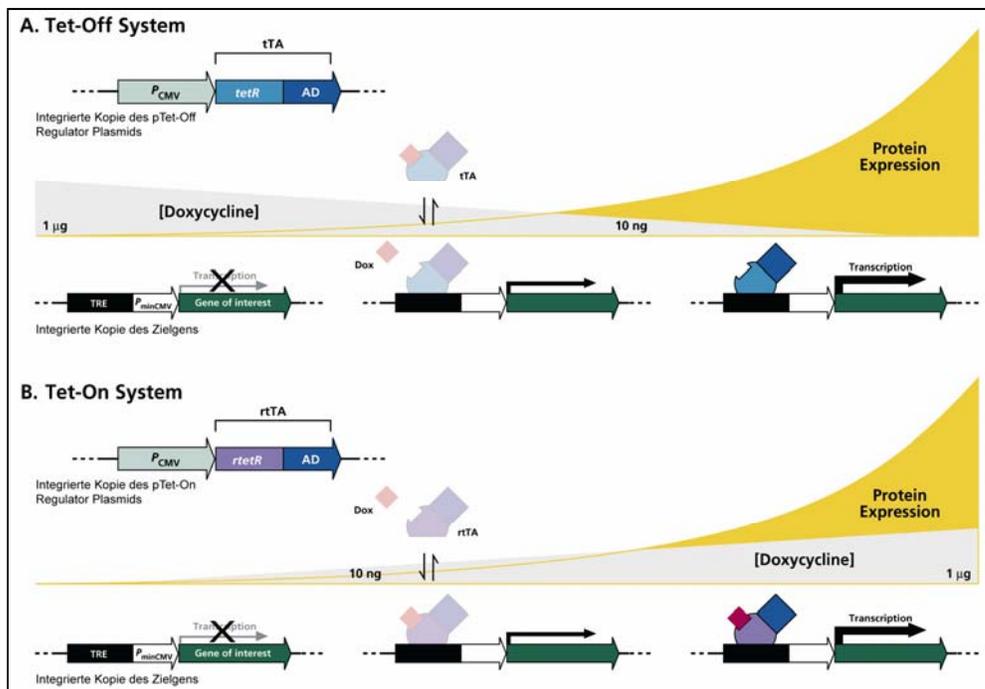


Abbildung 3: Die Tet-Off und Tet-On Systeme.

(A) Tet-Off System. Der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprodukt des wildtyp Tet Repressors (tetR) mit der VP16 Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes Simplex Virus. (B) Tet-On System. Der Austausch von vier Aminosäuren des TetR erzeugt den reversen TetR (rTetR) und verändert die

Bindungseigenschaften des Transaktivators (rtTA), welcher in Anwesenheit von Doxyzyklin an TRE (*engl.*: tetracyclin response element) bindet. Modifiziert nach (BD Biosciences Clontech • www.bdbiosciences.com 2005).

Zwar hat das Tet-On Derivat eine größere Relevanz für klinische Applikationen, aber es wird weit verbreitet berichtet, dass das Tet-Off System ein höheres Maß der Induzierbarkeit hat einschließlich niedrigere Basalexpression im „aus“ Zustand und höhere Expressionspegel im „an“ Zustand (Mizuguchi und Hayakawa 2002). Allerdings haben neue Modifikationen des Tet-On Systems verbesserte Induktionsniveaus und niedrigere Basalaktivitäten im „aus“ Zustand gezeigt (Salucci et al. 2002; Urlinger et al. 2000). In dieser Arbeit wird eines dieser verbesserten Tet-On Systeme verwendet (siehe 2.1.13). Es handelt sich dabei um das pTRE-tight-Plasmid von Clontech welches den P_{tight} (TRE_{tight})-Promotor verwendet. Dieser ist ebenfalls durch eine sehr geringe Basalaktivität sowie hohe Induzierbarkeit gekennzeichnet (BD Biosciences Clontech • www.bdbiosciences.com 2003).

1.2.3 Nicht virale Methoden

Bei den nicht viralen Methoden unterscheidet man zwischen physischen (trägerfreier Gentransfer, außer bei der Genkanone) und chemischen (synthetische oder natürliche Vektoren als Träger der DNA) Ansätzen. Bei den physischen Methoden, zu denen unter anderem die Injektion „nackter“ DNA (Choate und Khavari 1997; Hickman et al. 1994; Wolff et al. 1990), Elektroporation (Heller et al. 2005; Neumann et al. 1982), Genkanone (Yang et al. 1990; Yang und Sun 1995), Ultraschall (Lawrie et al. 2000) und hydrodynamische Aufnahme (Liu et al. 1999; Zhang et al. 1999) gehören, wird physische Kraft eingesetzt, welche die Zellmembran durchdringt und den intrazellulären Gentransfer ermöglicht. Spezifische oder unspezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche DNA binden und einschleusen können, werden als zusätzlicher Mechanismus impliziert, jedoch sind genaue Details unklar (Gao et al. 2007). Die Vorteile des Gentransfers mittels „nackter“ DNA sind die relativ einfache Durchführbarkeit sowie die Abwesenheit von Toxizität. Die chemischen Ansätze nutzen synthetische oder natürlich vorkommende Präparate als Träger, um das Transgen in Zellen einzuschleusen. Die meist verwendete Methoden hierfür ist das Einbringen von DNA in kondensierte Partikel aus kationischen Lipiden (Felgner et al. 1987; Liu et al. 2003), kationischen Polymeren (Neu et al. 2005; Wu und Wu 1988) oder einer Lipid-Polymer Kombination aus Polykationen, entweder umhüllt mit kationischen Liposomen (Gao und Huang 1996; Sorgi et al. 1997), anionischen Liposomen (Lee und Huang 1996) oder amphiphilen Polymeren mit und ohne Helferlipide (Lee

et al. 2006). Am besten sind hierfür Aminosäurepolymere geeignet (McKenzie et al. 2000). Die Peptid-basierten Gentransfermethoden sind bei den nicht viralen Methoden von großer Bedeutung und könnten, wenn einige notwendige Verbesserungen erreicht werden, gerade im Bereich der Gentherapie zum Mittel der Wahl werden (Adami und Rice 1999; Mahato 1999; Martin und Rice 2007; Wadhwa et al. 1997). Die DNA-enthaltenden Partikel werden dann von den Zellen durch Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose in der Form von intrazellulären Vesikeln aufgenommen, von denen ein geringer Teil der DNA in das Zytoplasma abgegeben wird und in den Nukleus gelangt, wo dann die Transgenexpression stattfindet (Gao et al. 2007). Die Nachteile gegenüber den Methoden ohne Trägersubstanzen liegen in der Toxizität mancher Substanzen sowie einer möglichen immunologischen Abwehrreaktion.

Alle nicht viralen Methoden haben außerdem den Nachteil, dass mit den heute zur Verfügung stehenden Vektoren keine dauerhafte Langzeitexpression der Transgene möglich ist. Zwar wurden während der letzten Jahre eine Reihe episomaler nicht viraler Vektoren konstruiert, welche sich extrachromosomal autonom in der Zelle replizieren, allerdings wurde noch keiner in klinischen Versuchen eingesetzt. Aufgrund des mangelnden Wissens über das molekulare Verhalten dieser Vektoren in den Zielzellen, sowie technische Beschränkungen bei der Herstellung und Verwendung künstlicher Chromosomen, bleibt ihr Einsatz in den nächsten Jahren sehr beschränkt (Jackson et al. 2006). Obwohl erheblicher Fortschritt bei dem grundlegenden Wissen und der Anwendung von vielen nicht viralen Gentransfer Methoden gemacht wurde, sind sie immer noch sehr viel weniger effizient als virale Vektoren (Gao et al. 2007; Heyde et al. 2007; Jackson et al. 2006; Kofron und Laurencin 2006; Martin und Rice 2007; Phillips et al. 2007a; Stiehler et al. 2006; Zhang und Godbey 2006). Aus den genannten Gründen wurde für die vorliegende Arbeit ein virales Gentransfer System ausgewählt.

1.2.4 Virale Methoden

Mit der Entwicklung der ersten viralen Vektorsysteme vor 20 Jahren (Mann et al. 1983; Watanabe und Temin 1983; Wei et al. 1981) ist die Gentherapie in die vorderste Reihe bei der Erschließung neuer Therapiemethoden gerückt (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Ein besseres Verständnis der Vektorbiologie und den molekularen Mechanismen bestimmter Krankheiten, zusammen mit enormen Fortschritten bei der Vektortechnologie, haben zu bedeutenden Fortschritten im Bereich der humanen Gentherapie geführt (Bartosch und Cosset 2004). Typischerweise werden die Viren vermehrungsunfähig gemacht durch die Entfernung eines

erheblichen Bereichs der genetischen Sequenz, die für die Fortpflanzung der Viren notwendig sind. An dessen Stelle wird eine Expressionskassette für das jeweilige Transgen gesetzt (siehe auch: 1.3). Zahlreiche virale Vektoren mit verschiedenen Eigenschaften wurden zu Zwecken der Gentherapie studiert, zu den häufigsten gehören Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren (AAV) (Kofron und Laurencin 2006; Oligino et al. 2000; Phillips et al. 2007a). Jedes System hat eigene Stärken und Schwächen und es ist vom jeweiligen Verwendungszweck abhängig welcher Vektor am besten geeignet ist (Abdellatif et al. 2006; Stiehler et al. 2006). Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden werden im Folgenden dargestellt und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Retroviren wurde die meiste Beachtung geschenkt und die Biologie dieses Systems ist wohlverstanden (siehe auch: 1.3). Der Hauptvorteil von Retroviren ist die effiziente Integration von neuem genetischem Material in das Wirtsgenom, um eine dauerhafte Expression des Transgens zu erreichen. Ein gravierender Nachteil von Retroviren im Allgemeinen ist die Unfähigkeit, Zellen zu infizieren, die sich nicht teilen. Zudem gibt es erhebliche Sicherheitsbedenken wie die Bildung vermehrungsfähiger Retroviren und das Auftreten von Insertionsmutagenese (Zhang und Godbey 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren basieren auf dem HIV Typ I und sind eine spezialisierte Klasse von Retroviren. Auf ihre Vor- und Nachteile wird in Kapitel 1.3 näher eingegangen.

Adenovirale Vektoren können einen Großteil humaner Zellen infizieren, sowohl teilende als auch Zellen, die sich nicht teilen. Adenoviren liegen nur episomal vor, integrieren nicht ins Wirtsgenom und rufen daher auch keine Insertionsmutagenese hervor. Da das Virusgenom nicht auf alle Tochterzellen übertragen wird, geht es im Laufe fortschreitender Zellteilungen verloren, daher ist die Transgenexpression nur transient und nicht dauerhaft. Adenoviren können eine heftige Immunantwort auslösen. Nach der Entwicklung von adenoviralen Vektorsystemen der dritten Generation („gutless“) ist die Wahrscheinlichkeit, dass vermehrungsfähige Viren gebildet werden, sehr gering (Zhang und Godbey 2006).

Adeno-assoziierte Viren können für eine stabile langfristige Transgenexpression verwendet werden. Wie Adenoviren können sie ebenfalls eine Vielzahl von Zellen transduzieren. Sie sind vermehrungsunfähig, nicht pathogen und lösen keine Immunantwort aus. Beschränkungen dieser Vektoren liegen in der verhältnismäßig kleinen Größe des Transgens die sie tragen können und der Notwendigkeit für Helferviren zur Aktivierung der AAV (Zhang und Godbey 2006).

Vor etwa 10 Jahren wurden Herpes Viren (Herpes Simplex Virus, HSV) etabliert, welche aber aufgrund ihrer neurotropischen Eigenschaften hauptsächlich für die Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems geeignet sind (Jenkins und Turner 1996; Lilley et al. 2001). Herpesviren können sehr große Transgene tragen (Oligino et al. 2000).

Erst in neuerer Zeit werden auch Baculoviren und Derivate für den Gentransfer verwendet. Die Abwesenheit von Toxizität in Säugetierzellen, die Unfähigkeit sich in diesen zu vermehren, die Fähigkeit Zellen zu infizieren, die sich nicht teilen (Bilello et al. 2001) und die verhältnismäßig große Transgenlänge, die sie tragen können, macht sie für die Gentherapie sehr geeignet (Zhang und Godbey 2006). Durch Modifikationen sind sie sowohl für die transiente als auch die konstitutive Genexpression geeignet (Zeng et al. 2007). Die ersten *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse (Grassi et al. 2006; Ho et al. 2004; Li et al. 2005b; Pieroni et al. 2001) sind äußerst viel versprechend, allerdings sind die Erfahrungen noch sehr begrenzt. In Zukunft könnten diese Viren sehr zum Erfolg der Gentherapie und des Tissue Engineering beitragen. Derzeit sind noch keine Studien veröffentlicht, welche die baculovirale Transduktion von hMSCs untersuchen. Zudem wird auch noch kein kommerzielles Transduktionssystem mit Baculoviren angeboten.

Retrovirale und adenovirale Vektoren sind die am besten untersuchten und am meisten verwendeten Werkzeuge für den Gentransfer beim Tissue Engineering. Weit seltener werden adeno-assoziierte Viren, Herpes Viren und Baculoviren verwendet (Zhang und Godbey 2006).

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften viraler Vektoren für die Gentherapie.

Virus Charakteristik	Retrovirus ^a	Lentivirus ^a	Adenovirus ^a	„Gutless“ Adenovirus ^a	AAV ^a	HSV ^b
Insertgröße	7-11 kb	~10k b	7-8 kb	30 kb	~5 kb	~ 40kb
Virales Genom	RNA	RNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA	dsDNA
Integration in Wirtsgenom	Stabil	Stabil	Episomal	Episomal	Stabil/episomal	Episomal
Vektorkonstruktion ^b	Einfach	Moderat	Moderat	Moderat	Einfach	Schwierig
Produktion in großem Maßstab	Einfach	Komplex	Einfach	Komplex	Moderat	Moderat
Transduktionseffizienz ^b	Gering	Moderat	Hoch	Hoch	Moderat	Sehr hoch
Stärke der Transgenexpression ^b	Hoch	Moderat	Sehr hoch	Moderat/variabel	Moderat	Sehr hoch
Expression viraler Proteine	Nein	Ja/Nein	Ja	Nein	Nein	Ja
Immunantwort	Gering	Gering	Hoch	Moderat	Moderat	Gering
Transgenexpression	Konstitutiv	Konstitutiv	Transient	Transient	Konstitutiv/transient	Transient
Infiziert Zellen, die sich nicht teilen	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Immunogenität	Gering	Gering	Hoch	Moderat	Moderat	Gering
Potentielle Pathogenität	Gering	Hoch	Gering	Gering	Keine	Gering
Risiko der Insertionsmutagenese	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja/Nein	Nein

^a(Phillips et al. 2007a), ^b(Oligino et al. 2000)

1.3 Lentivirale Vektoren zum Gentransfer in Zellen

Das Interesse an und die Verwendung von Lentiviren steigt seit 1996 an, als gezeigt wurde, dass Vektoren, die auf dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) Typ I basieren, in der Lage sind, Zellen, die sich nicht teilen, effizient und stabil zu transduzieren (Cohen 1996; Naldini et al. 1996a; Naldini et al. 1996b), wodurch einer der größten Nachteile der herkömmlichen retroviralen Vektoren überwunden wurde (Miller et al. 1990; Roe et al. 1993). Die folgenden Eigenschaften machen lentivirale besonders geeignet für die Gentherapie (Kofron und Laurencin 2006; Trono 2000): (1) Lentivirale Vektoren können große Transgene aufnehmen (8-10 kb), (2) teilende und Zellen, die sich nicht teilen, werden effizient transduziert, (3) Lentiviren lösen, wenn überhaupt, nur eine geringe Entzündungs- und Immunantwort aus, und (4) sie integrieren als Provirus in das Genom der Zielzellen und führen somit zu einer stabilen Langzeitexpression. Darin liegt allerdings auch das größte Risiko bei der Verwendung dieser Vektoren. Durch die Integration in regulativen oder kodierenden Bereichen des Wirtsgenoms kann es zu Insertionsmutagenese und im Fall von Proto-Oncogenen zu maligner Entartung in den Zielzellen kommen (Beard et al. 2007a). Einige Studien berichten allerdings, dass dieses Risiko für konventionelle Retroviren höher ist als bei Lentiviren (Montini et al. 2006), da Lentiviren im Allgemeinen weiter distal entfernt von kodierenden Sequenzen und weniger häufig in oder in der Nähe von Proto-Oncogenen integrieren (Beard et al. 2007b; Laufs et al. 2006). Durch die Verwendung selbstinaktivierender Vektoren in Verbindung mit schwächeren bzw. regulierten Promotoren und durch das Fehlen von transkriptionell aktiven langen terminalen Repetitionen (LTRs) kann das Risiko weiter reduziert werden (Beard et al. 2007b).

Derzeit sollte bei dem Einsatz von lentiviralen Vektoren für klinische Gentherapie Anwendungen, die Erstellung von Integrationsprofilen oder zumindest die Analyse der Zellen auf maligne Entartungen, unbedingt in Betracht gezogen werden. In Zukunft kann im Idealfall ein lentivirales Vektorsystem entwickelt werden, das die zielgerichtete Insertion in sichere Bereiche des Genoms ermöglicht (Beard et al. 2007a; Beard et al. 2007b).

Dennoch werden selbstinaktivierende Lentiviren als eine sichere Methode zur langfristigen Transgenexpression in MSCs angesehen und sind daher für Gentherapie- und Tissue-Engineering-Strategien, bei denen längere Transgenexpressionen benötigt werden, besonders interessant (Montini et al. 2006). Der bis jetzt einzige Gentherapie Versuch unter Verwendung von lentiviralen Vektoren der dritten Generation begann im Juli 2003 für die Behandlung von

HIV Patienten. Bis heute ist bei keinem der Patienten ein nachteiliger Effekt aufgrund der Behandlung aufgetreten (Levine et al. 2006).

1.3.1 Gentransfer in MSCs mittels lentiviralen Vektoren

Neuere Ergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass HIV-1-basierte Vektoren MSCs sehr effizient transduzieren und Transgene in diesen exprimieren können (Davis et al. 2004a; Lee et al. 2004a; Totsugawa et al. 2002; Zhang et al. 2002; Zhang et al. 2004b). Durch einmalige Transduktion unter Verwendung unkonzentrierter lentiviraler Vektoren kann die effiziente Transduktion von humanen MSCs und anhaltende Transgenexpression für mindestens 5 Monate erreicht werden (Zhang et al. 2002). Ein Vorteil der Lentiviren gegenüber herkömmlichen Retroviren ist, dass sie in der Lage sind, ruhende Zellen zu transduzieren (Mochizuki et al. 1998; Reiser et al. 1996). Dies ist eine äußerst wichtige Eigenschaft im Hinblick darauf, dass ein verhältnismäßig großer Anteil (20%) der MSCs als quieszent (ruhend) beschrieben wird (Conget und Minguell 1999). Untersuchungen konnten zeigen, dass lentiviral transduzierte MSCs *in vitro* ihre Fähigkeit behalten, in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten (vgl. Abbildung 30), sowie in Myozyten- und Astrozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren. Somit können lentivirale Vektoren MSCs transduzieren, ohne ihr Differenzierungspotential zu beeinflussen (Anjos-Afonso et al. 2004; Zhang et al. 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass lentivirale Vektoren ein vielseitiges und effektives Mittel für den Transfer und die dauerhafte Expression eines Transgens in MSCs sind. Es traten bis jetzt keine erkennbaren immunologischen oder pathologischen Folgen auf, die auf den Vektor zurückzuführen sind und die Gefahr der Integrationsmutagenese ist gering (Montini et al. 2006).

Um das verwendete, auf HIV Typ I basierende, lentivirale Vektorsystem (vgl. 2.1.1) darstellen zu können, ist das grundlegende Verständnis der lentiviralen Virionstruktur, des Genoms, und des Replikationszyklus notwendig (Buchschacher, Jr. und Wong-Staal 2000; Coffin et al. 1997; Freed und Mouland 2006; Gelderblom et al. 1987). Dies soll am Beispiel von HIV näher gebracht werden.

1.3.2 Humanes Immundefizienzvirus (HIV)

Das HIV gehört zur Gattung der Lentiviren, ein Genus exogener Viren mit einem komplexen Genomaufbau (Oligino et al. 2000), welches zusammen mit den α -, β -, γ -, δ -, und ε -Retroviren sowie den Spumaviren die sieben Genera der Familie der Retroviren bildet. Die taxonomische

Einteilung basiert auf Unterschieden in der Morphologie, der Genomsequenz, den antigenen Eigenschaften, der Wirtsspezifität und der Pathogenese (ICTV 2000). Retroviren wurden erstmals 1908 und 1911 beschrieben, als es sowohl der Arbeitsgruppe um Ellermann und Bang (Ellermann und Bang 1908), als auch Rous (Rous 1911) gelang, Leukämien bzw. Tumore bei Geflügel mittels Ultrafiltraten zu übertragen. Bittner beschrieb 1936 das MMTV (*engl.*: murine mammary tumor virus) als Erreger der malignen Milchdrüsenerkrankung bei Mäusen, ein weiterer Beweis für die Assoziation von Viren mit Tumorerkrankungen (Bittner 1936). Mühlbock fand 1955, heraus dass das durch MMTV induzierte Milchdrüsenkarzinom in Mäusen sowohl viral übertragen (horizontale Transmission) als auch vererbt (vertikale Transmission) werden kann (Mühlbock 1955). 1970 entdeckte man, dass die Besonderheit dieser RNA-Viren auf die Funktion der Reversen Transkriptase zurückzuführen ist, ein damals unbekanntes Enzym, das RNA in DNA umschreibt, welche der Gruppe der Retroviren schließlich ihren Namen gab (Baltimore 1970; Temin und Mizutani 1970). Das erste für den Menschen pathogene Retrovirus wurde 1980 entdeckt, in Zusammenhang mit epidemiologischen Studien über die in Japan endemische adulte T-Zellleukämie (Miyoshi et al. 1980) und T-Zell-Neoplasien in der Karibik und den USA (Poiesz et al. 1980).

Visna, eine neurologische Erkrankung bei Schafen wurde 1957 beschrieben. Sie wird von einem Lentivirus ausgelöst und hat zu dem Konzept und der Namensgebung der langsamen (*lat.*: lentus, langsam) viralen Infektion geführt (Poiesz et al. 1980). Zu den wohl bekanntesten und am besten untersuchten humanen Retroviren zählt das humane Immundefizienzvirus (HIV), welches im Jahr 1983 von Luc Montagnier und Robert Gallo als Lentivirus und als Ursache von AIDS identifiziert wurde (Barre-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1983). HIV wird aufgrund unterschiedlicher phylogenetischer und biologischer Eigenschaften in zwei Typen, HIV-1 (HIV-I) und HIV-2 (HIV-II) und zahlreiche Gruppen (M, N und O für HIV-1 und A bis H für HIV-2) eingeteilt (Butler et al. 2007). Viele Subtypen, Sub-Subtypen und in Umlauf befindliche rekombinante Formen (*engl.*: circulating recombinant forms, CRF) sind in den letzten 50 Jahren entstanden, und noch immer werden neue Varianten entdeckt (Sierra et al. 2007; Tee et al. 2006; van der Hoek et al. 2007). Die größte Hürde bei der Kontrolle der Ausbreitung von AIDS liegt in der Vielfalt von HIV und seinem enormen evolutiven Potential (Lemey et al. 2006; Mullins und Jensen 2006). Beide HIV Typen haben eine ähnliche Struktur und lösen AIDS aus, dennoch ist HIV-1 weltweit dominierend (Butler et al. 2007; Requejo 2006). Das in dieser Arbeit verwendete

lentivirale Expressionssystem basiert ebenfalls auf HIV-1, weshalb im Folgenden nur auf diesen Typ eingegangen wird.

1.3.2.1 Morphologie von HIV-1 Virionen

In früherer Zeit erfolgte die Benennung der retroviralen Proteine durch den Buchstaben „p“ gefolgt von dem ungefähren Molekulargewicht, welches mittels SDS-Gelelektrophorese oder Gelfiltration geschätzt wurde (August et al. 1974). Da diese Nomenklatur aus mehreren Gründen ungeeignet und ungenau erschien, werden retrovirale Proteine heutzutage üblicherweise gemäß ihrer Funktion und Lokalisation innerhalb des Virions durch eine präzisere 2-Buchstaben Abkürzung benannt (Leis et al. 1988), oftmals in Kombination mit der älteren „p“ Bezeichnung. Die infektiösen Partikel (Virionen) aller Lentiviren zeichnen sich durch eine charakteristische Morphologie aus (Abbildung 4A). Die runden Viruspartikel haben einen Durchmesser von 80 bis 100 nm und sind von einer Doppelmembran umhüllt, die zellulären Ursprungs ist. Darin eingebettet liegen externe und transmembrane Glykoproteine, die bei HIV-1 als gp120 (*engl.*: surface, SU) und gp41 (*engl.*: transmembrane, TM) bezeichnet werden. Die Innenseite der Membran wird von einer Schicht aus Matrixproteinen (MA, p17) ausgekleidet. Im Partikelinneren befindet sich das virale Capsid (*lat.*: capsula, kleine Kapsel, CA, p24) oder Core (*engl.*: core, Kern), das bei den Lentiviren charakteristisch konisch geformt ist. Ein Verbindungsprotein (*engl.*: link, LI, p6) verknüpft das Capsid mit der Hülle. Im Capsid eingeschlossen liegt das virale Genom in Form zweier identischer, linearer, nicht segmentierter, einzelsträngiger aber dimerisierter RNA-Moleküle (ssRNA). Während der Dimerisierung, Einkapselung und dem Zusammenbau interagiert das Nukleocapsid (NC, p7) mit der RNA. Weitere wichtige virale Komponenten des Viruspartikels sind die essentiellen Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p66), Integrase (IN, p32/p31) und Protease (PR, p12) (Gelderblom et al. 1987; Gelderblom 1997; Nermut und Hockley 1996).

1.3.2.2 Molekularbiologie von HIV-1

In den Jahren unmittelbar nach der Identifizierung des HI Virus konnten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das Virusgenom entschlüsseln (Ratner et al. 1985; Sanchez-Pescador et al. 1985; Wain-Hobson et al. 1985). Aufgrund der hohen Mutationsrate des HIV konnten bis heute enorm viele genetische Variationen und Polymorphismen identifiziert werden (Gale et al. 2006; Sucupira et al. 2007; Vidal et al. 2007). Trotzdem sind die grundlegende Struktur und der

Aufbau des Virusgenoms bei allen Typ-1 Viren ähnlich. Das Genom der Retroviren hat eine Länge von 7 bis 12 Kilobasen. Wie bei allen Lentiviren ist das Genom von HIV-1 komplexer aufgebaut als das anderer Retroviren und hat eine Länge von etwa 9 kb (Coffin et al. 1997). Das Genom von HIV besteht aus zwei im Capsid verpackten einzelsträngigen RNA-Transkripten, die am 5' Ende mit einer Cap Gruppe modifiziert und am 3' Ende polyadenyliert sind und dadurch die typischen Merkmale einer eukaryotischen mRNA tragen. Diese RNA kodiert für alle viralen Gene, die zur Vermehrung notwendig sind. Die Organisation 5'LTR-*gag-pol-vif-vpr-tat-rev-vpu-env-nef*-3'LTR, in der mehrere virale Gene überlappend angeordnet sind, ermöglicht es HIV-1, eine Vielzahl von Proteinen auf einem relativ kleinen Genom zu kodieren (Abbildung 4B) (Buchsacher, Jr. und Wong-Staal 2000; Zhang und Godbey 2006). Das Genom des HI Virus umfasst die drei großen für alle Retroviren üblichen Leserahmen (*engl.*: open reading frame, ORF) *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (Polymeraseaktivitäten) und *env* (*engl.*: envelope, Hülle), welche für die Capsidproteine (*gag*), die viralen Enzyme (*pol*) und die Hüllenglykoproteine (*env*) kodieren (Lever et al. 2004). Daneben enthält das HIV-1 Genom weitere Gene für die essentiellen regulatorischen Proteine Tat und Rev und die vier nicht essentiellen, akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu. Diese werden gewöhnlich nicht in das Virion verpackt, sind jedoch in infizierten Zellen nachweisbar. Die Gene *tat* und *rev* bestehen aus jeweils zwei Exons, deren Expression, im Gegensatz zu den Strukturgenen, durch die Translation von mehrfach gespleißter mRNA erfolgt (Cohen et al. 1996; Cullen und Greene 1990; Subbramanian und Cohen 1994).

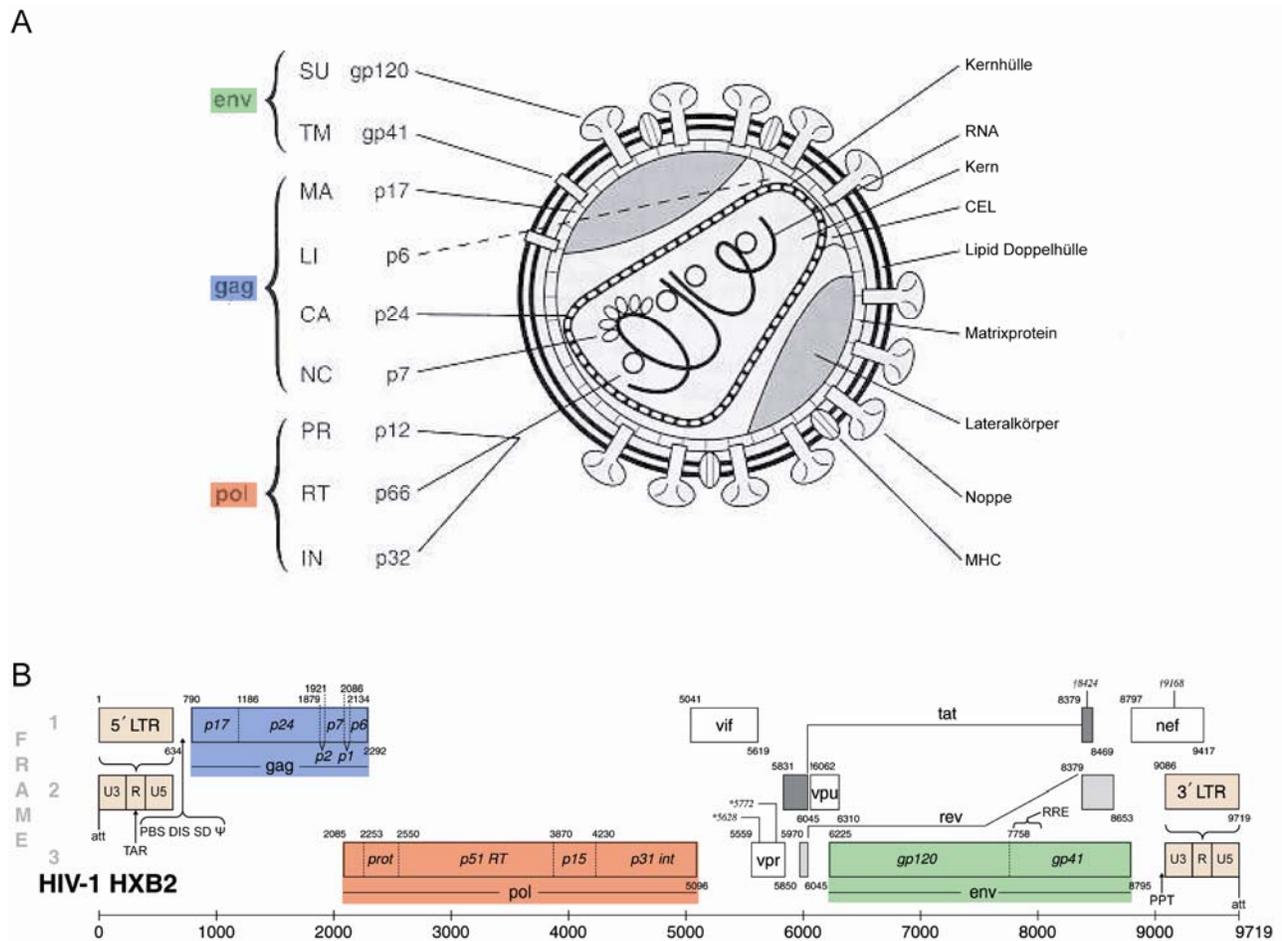


Abbildung 4: Morphologie und Genomstruktur von HIV-1.

(A) Schematische Darstellung des Viruspartikels und (B) Genomkarte. Die Leserahmen (gag, pol, env) sind mit farbigen Kästchen hervorgehoben (Abbildung 4B) deren Farbe und Beschriftung mit den hiervon exprimierten Genprodukten (Abbildung 4A) korrespondiert. Die Exons der Proteine Tat und Rev sind jeweils durch Striche miteinander verbunden. Die akzessorischen und regulatorischen Genprodukte sind in Abbildung 4A nicht dargestellt. Erläuterungen siehe Text. att: Anschlussstelle, CA, p24: Capsidprotein, CEL: Kern-Hülle Verbindung, DIS: Dimer Initiationsstelle, env: Leserahmen für Hüllenglykoproteine, gag: Leserahmen für Strukturproteine, IN, p32/p31, int: Integrase, LI, p6: Verbindungsprotein, LTR: lange terminale Repetition, MA, p17: Matrixprotein, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, NC, p7: Nukleocapsidprotein, p2, p1: Spacerpeptid, PBS: Primerbindungsstelle, pol: Leserahmen für virale Enzyme, PPT: Polypurinbereich, PR, p12, prot: Protease, Ψ: Verpackungssignal, R: Sequenz die an beiden Enden von RNA wiederholt ist, rev: Regulator der Expression viraler Proteine, RNA: Virales RNA-Genom, RRE: Rev Bindungsstelle. RT, p66, (p51+p15): Reverse Transkriptase, SD: Spleissdonor, SU, gp120: externes Glykoprotein, TAR: Tat-Bindungsstelle, tat: Transaktivator der Transkription, TM, gp41: transmembranes Glykoprotein, U3: einzigartige Sequenz typisch für das 3' Ende von RNA, U5: einzigartige Sequenzen typisch für das 5' Ende von RNA, vif: Virion Infektiositätsfaktor, vpr: virales Protein R, vpu: virales Protein U, nef: negativer Faktor, (A) Modifiziert nach (Gelderblom et al. 1987; Gelderblom 1997), (B) Modifiziert nach (Bette T.M.Korber et al. 2005; Coffin et al. 1997).

Die LTR und UTR regulativen Bereiche der proviralen DNA

Die virale RNA wird am 5' nicht kodierenden Bereich (*engl.*: untranslated region, UTR) und am 3'UTR von regulatorischen Kontrollsequenzen (*engl.*: long terminal repeat, lange endständige Wiederholungen, LTR) flankiert (Abbildung 4). Die Sequenz der 5'LTR ist die gleiche wie die der 3'LTR in gleicher Orientierung. An den Enden der LTRs sind kurze Sequenzen, die wichtig für die Integration in das Wirtsgenom sind und Bindungsstellen (*engl.*: attachment sites, *att*) genannt werden. Die Integration erfolgt über Wechselwirkungen mit dem Integrase (IN) Enzym (Kulkosky und Skalka 1994; Vink und Plasterk 1993). Die LTR Sequenz kann weiter unterteilt werden in U3 (*engl.*: unique, einzigartige Sequenz typisch für das 3'Ende von RNA), R (*engl.*: repeated, Sequenz die an beiden Enden von RNA wiederholt wird) und U5 (einzigartige Sequenz typisch für das 5'Ende von RNA). Die LTRs spielen auch bei der viralen Transkription eine essentielle Rolle. U3 enthält die meisten der transkriptionellen Kontrollelemente des Provirus und trägt den viralen Promotor und Transkriptionsverstärker (*engl.*: enhancer). Die R Region ist notwendig für die reverse Transkription und Replikation. U5 enthält das poly-A Signal und legt zusammen mit der R Region die Addition des poly-A Schwanzes an die virale RNA fest. Beide LTRs sind zwar funktionale, induzierbare Promotoren, die 3'LTR erreicht jedoch nur etwa 10% der Transkriptionsaktivität der 5'LTR *in vitro* (Klaver und Berkhout 1994). In der infizierten Zelle kontrolliert die 5'LTR die Transkription der viralen Gene und fungiert somit als Transkriptionspromotor des integrierten Provirus. Die 3'LTR dagegen dient als Polyadenylierungssignal und kontrolliert die Prozessierung und Polyadenylierung der viralen Transkripte.

Zwischen dem 5'LTR und dem *gag* Leserahmen folgt eine Reihe wichtiger regulativer Elemente. Unmittelbar nach der U5 Region im 5'UTR befindet sich eine Primerbindungsstelle (PBS) mit einer Sequenz, die zu einem Teil von zellulärer tRNA komplementär ist, welche als Primer für die reverse Transkription fungiert (Zhang und Godbey 2006). Unmittelbar danach folgt die Dimer-Initiations-Stelle (DIS) an der die Verknüpfung der beiden RNA-Moleküle stattfindet (Paillart et al. 2004), gefolgt von einer Spleissdonor (SD) Stelle, die neben weiteren Spleissdonor und -akzeptor (SA) Stellen, für das Spleissen der viralen RNA essentiell ist (Lutzberger et al. 2006; Stoltzfus und Madsen 2006). Abgeschlossen wird dieser regulative Bereich schließlich von dem Verpackungssignal Ψ . Dies interagiert mit viralen Proteinen um die Verpackung der dimerisierten, viralen RNA in die Virionen zu erreichen (Rein 1994). Die Position von Ψ ist für HIV-1 nicht so eindeutig bestimmt wie für das murine Leukämie Virus, aber das zentrale

Element umfasst sicherlich den 5'UTR, sowie den 5' Anteil des *gag* Leserahmens (Hu und Pathak 2000). Alle diese regulativen Elemente (PBS, DIS, SD, Ψ) liegen in unmittelbarer Nähe zueinander und bilden, zusammen mit dem Startcodon von *gag*, durch die Basenpaarung der selbstkomplementären Sequenzen eine Haarnadelstruktur mit vier Schleifen, welche essentiell für die Dimerisierung der viralen RNA ist (Greathouse und Lever 1998). Es wird angenommen, dass RNA-Interaktionen die in dem Dimer stattfinden, einige Schlüsselschritte im Lebenszyklus der Retroviren spielen: (1) Translation und Verpackung: das Beenden der *gag* Translation durch das komplex strukturierte DLS (*engl.*: dimer linkage site, Dimer Verbindungsstelle) Verpackungssignal macht das RNA-Genom zugänglich für die Verpackungsmaschinerie und (2) Rekombination während der reversen Transkription: Die Anwesenheit von zwei RNA-Molekülen in Virionen ist notwendig für die Variabilität und Entwicklungsfähigkeit der Viren bei der Vermehrung und die geordnete Struktur, die auf der DLS, beruht ist notwendig für eine effiziente Transkription (Paillart et al. 1996).

Ein Polypurin Bereich (PPT, *engl.*: polypurine tract) liegt zwischen *env* und dem 3'LTR im 3'UTR. Es ist eine kurze (~10) Serie von A/G Basen, die den RNA-Primer für die Initialisierung der (+) Strang DNA-Synthese während der reversen Transkription bindet (Zhang und Godbey 2006).

Gruppenspezifische Antigene (*gag* Genprodukte)

Von der integrierten proviralen DNA werden mRNA Transkripte über die volle Länge (*engl.*: full-length) synthetisiert. Da das *gag*-Gen überlappend mit dem *pol*-Gen angeordnet ist, werden von diesen Transkripten sowohl die Gag (Pr55) als auch die Gag/Pol (Pr155) Vorläufer Polyproteine translatiert. Da *gag* und *pol* in unterschiedlichen Leserahmen liegen, muss es für die Translation des Gag/Pol Fusionsproteins in dem Überlappungsbereich zu einem ribosomalen Leserahmenwechsel (*engl.*: frameshift) kommen (Jacks et al. 1988). Nach der Knospung (*engl.*: budding) (siehe 1.3.2.3) von der Zellmembran wird das Gag Polyprotein durch die virale Protease in die Strukturproteine Matrixprotein (MA, p17), Capsidprotein (CA, p24), Nukleocapsid (NC, p7) und Linkprotein (LI, p6) gespalten. Erst durch diesen Reifungsschritt entstehen die einzelnen funktionalen Proteine (Henderson et al. 1992).

Die Gag-Proteine üben unterschiedliche Funktionen aus, die zum Zusammenbau und zur Infektiosität der Viren beitragen. Durch Interaktionen der Matrix- und Capsid-Proteinanteile sammeln sich die Gag (Pr55) und Gag/Pol (Pr155) Polyproteine etwa in einem 20 zu 1 Verhältnis

an der Zelloberfläche und oligomerisieren. Sie schnüren sich in Form von Lipid-Proteinpartikeln mit Membrananteilen ab und sind somit für den Zusammenbau und die Freisetzung der Viren essentiell (Jowett et al. 1992; Nermut et al. 1994; Zhang et al. 1996b). Die Funktionen von Pr55 Gag sind notwendig für die Einlagerung von Pr155 Gag/Pol in die wachsende Ribonukleoprotein (RNP) Hülle (Smith et al. 1993).

Zwei Faktoren, co-translationale Myristoylierung und eine äußerst basische Region im N-terminalen Bereich des Matrixprotein (MA), welcher an Phospholipide bindet, sind essentiell für die stabile Assoziation von MA mit der Plasmamembran und die Bildung infektiöser HI Viren (Bryant und Ratner 1990; Gottlinger et al. 1989; Zhou et al. 1994). Andere Bereiche von MA bedingen das gezielte Binden von Pr55 Gag an die Plasmamembran, welches der regulierende Schritt des Viruszusammenbaus ist (Facke et al. 1993; Yuan et al. 1993). Die Funktion von MA ist notwendig, einerseits für die Selbstanordnung der Gag und Gag/Pol Polyproteine und andererseits, die Integration der viralen Env-Proteine in die zukünftige Hülle (Dorfman et al. 1994; Yu et al. 1992). Bedeutsamerweise ist MA Teil des viralen Präintegrationskomplexes und wirkt dabei, diesen Komplex in den Nukleus von ruhenden (*engl.*: quiescent) Zellen zu bringen, dem Prozess, der die Infektion von Zellen, die sich nicht teilen, ermöglicht (Bukrinsky et al. 1993).

Das Capsid ist aus p24 (CA)-Proteinen aufgebaut (Chrystie und Almeida 1989; Gelderblom et al. 1987). Domänen die hauptsächlich am C-terminus von CA lokalisiert sind, sind essentiell für den richtigen Zusammenbau der RNP Hülle (Zhang et al. 1996b), wohingegen N-terminale Bereiche für die Bildung des gereiften konisch geformten Kerns notwendig sind. Die mittlere Region von CA, die das „Haupthomologie Motiv“ enthält, ist zwischen verschiedenen Retroviren beträchtlich konserviert und wichtig für die Bildung infektiöser Virionen (Mammano et al. 1994).

Für eine effektive Einkapselung des viralen Genoms interagiert NC (p7), während des Zusammenbaus mit der viralen RNA, über zwei Zink-Finger ähnliche Motive (Bess, Jr. et al. 1997; Clavel und Orenstein 1990; Gorelick et al. 1990). Außerdem ist ein funktionelles NC notwendig für erfolgreiche Virusherstellung (Jowett et al. 1992).

Der C-terminale Bereich des Pr55-Polyproteins bildet p6 (LI), welches notwendig für den letzten Schritt der viralen Knospung ist (Gottlinger et al. 1991). Deletionen in p6 verhindern einerseits die Schließung der runden RNP Hülle und andererseits die Abgabe der Viruspartikel. Aus Strukturanalysen schließt man, dass p6 auch die Verbindung zwischen Kern (Capsid) und Hülle bildet (*engl.*: core-envelope link, CEL) (Hoglund et al. 1992; Nilsson et al. 1992).

Zwischen CA (p24) und NC (p7) liegt ein Abstandshalter (*engl.*: spacer) mit einer Länge von 14 Aminosäuren (p2) und ein weiterer Abstandshalter (p1) liegt zwischen NC (p7) und LI (p6) (Henderson et al. 1992). Der C-terminale Bereich von CA, der einen Teil von p2 enthält, ist wichtig für die HIV Morphogenese. Der Spacer ist notwendig für den geordneten Zusammenbau der runden Ribonukleoproteinhülle (RNP). Das Entfernen von p2 vom C-Terminus von CA (p25) passiert spät, während der pr55 und pr155 Reifung und ist notwendig für den Übergang der runden RNP in den konisch geformten Kern, während der Virusreifung (Gottlinger et al. 1989; Krausslich et al. 1995; Pettit et al. 1994).

Nur wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Spacerpeptid p1 und demnach sind funktionelle Daten nur begrenzt vorhanden. Allerdings ist bekannt, dass die richtige Faltung, welche durch die Prolinreste in p1 gewährleistet wird, wichtig für die Ansteckungsfähigkeit, Proteinverarbeitung und Stabilität des genomischen RNA Dimers ist (Hill et al. 2002; Hill et al. 2007).

Enzyme (*pol* Genprodukte)

Da die *gag* und *pol* Gene überlappen, werden die *pol* Genprodukte als Gag/Pol-Vorläuferproteine von Vollängentranskripten translatiert, wobei es sich um Fusionsproteine zwischen Gag- und Pol-Proteinen handelt. Voraussetzung für die Synthese der Gag/Pol-Fusionsproteine ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters der Vollängen mRNA Transkripte. Verantwortlich hierfür ist eine spezielle Heptanukleotidsequenz (Reil et al. 1993). Eine abwärts der Verschiebungsstelle gelegene Haarnadelstruktur ist für diese Verschiebung als positiver Modulator wichtig, aber nicht essentiell (Parkin et al. 1992; Reil et al. 1993). Trotzdem passiert der Wechsel des Leserahmens jedoch nur selten, so dass nur etwa 2% bis 5% der Vollängen RNA im *pol* Leserahmen translatiert werden (Reil et al. 1993). Dieser Leserahmen enthält die Gene für die drei viralen Enzyme Protease (PR, p12), Reverse Transkriptase (RT, p66) und Integrase (IN, p31/p32) (Craven et al. 1991; Katz und Skalka 1994).

Die Protease (PR) ist als Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 12 kD (p12) aktiv (Lapatto et al. 1989). Während der Reifung schneidet sich die Protease zunächst autokatalytisch aus dem Vorläufer-Polyprotein aus, um anschließend die Gag- und Pol-Vorläuferproteine in funktionale Proteine zu prozessieren (Wan et al. 1996).

Die Reverse Transkriptase (RT) von HIV-1 ist ein Heterodimer aus zwei unterschiedlich prozessierten Proteineinheiten mit Molekulargewichten von 66 kD (p51+p15) und 51 kD (p51)

(Le Grice et al. 1991). Drei verschiedene enzymatische Aktivitäten sind mit der retroviralen RT assoziiert: (1) Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität für die Synthese des (-) Stranges der proviralen DNA, (2) Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität welche die Synthese des (+) DNA-Stranges katalysiert und (3) einer RNaseH Aktivität (Jacob-Molina und Arnold 1991). Die Polymerasedomänen liegen im aminoterminalen Bereich der großen Untereinheit und auf der kleinen Untereinheit. Sie besitzen keine Fehlerkorrektur Funktion. Der karboxyterminale Bereich der 66 kD Einheit ist mit seiner RNaseH Domäne (RH, p15) für den Abbau des RNA-Anteils in den RNA/DNA-Hybridmolekülen verantwortlich, die bei der reversen Transkription als intermediäres Produkt auftreten und bewahrt am Polypurin Bereich (PPT) den RNA-Primer, der für die Synthese des (+) DNA-Stranges notwendig ist (Tanese und Goff 1988). Außerdem ist die RNaseH Aktivität beteiligt an der endgültigen Entfernung des tRNA Primers, der für die Initiation der Erststrangsynthese verwendet wird (Tarrago-Litvak et al. 1994). Während der reversen Transkription werden auch die verkürzten LTR Bereiche der viralen RNA wieder aufgefüllt (Coffin et al. 1997). Durch die hohe Fehlerrate bei der reversen Transkription und durch Rekombinationsereignisse entsteht die hohe genetische Variabilität der HI Viren. Dies führt in Verbindung mit dem hohen Selektionsdruck zur kontinuierlichen Bildung neuer HIV Varianten (Preston et al. 1988).

Am 3'Ende des *pol* Gens liegt der Leserahmen für die Integrase (IN). Sie besitzt Endonuklease- und Ligaseaktivität und bindet an die Enden (*att*) der doppelsträngigen DNA und integriert diese in das Wirtsgenom der Zelle (Panganiban und Temin 1984). Die HIV-1 Integrase besteht aus drei Domänen. Die zentrale katalytische Domäne muss mindestens ein Tetramer bilden um katalytisch aktiv zu sein. In ihr erfolgt die Bindung an die Ziel DNA und Integration der proviralen DNA. Die Funktionen der N- und C-terminalen Domänen sind nicht so eindeutig bekannt. Die N-terminale Domäne ist wie die zentrale Domäne gut konserviert und bindet unspezifisch an DNA, möglicherweise an nicht terminale Bereiche gerade innerhalb der Enden der viralen DNA. Die C-terminale Domäne ist weniger stark konserviert, ihre Funktion ist weitgehend unbekannt. Der Integrationsmechanismus erfolgt schrittweise. In einem ersten Schritt werden von jedem 3'Ende der viralen DNA zwei Nukleotide entfernt. Durch diese so genannte 3'Ende Bearbeitung (*engl.*: 3'end processing) wird eine 3' Hydroxylgruppe zugänglich, die im nächsten Schritt mit der durch die Endonukleasaktivität aufgeschnittenen Ziel-DNA verbunden werden kann (Craigie 2001).

Glykoproteine der Virushülle (*env* Genprodukte)

Die HIV-1 Hüllenglykoproteine werden von einer bicistronischen mRNA kodiert, die den *env* Leserahmen unmittelbar nach dem *vpu* Leseraster enthält (Schwartz et al. 1990). Das Überspringen der Ribosomen und Initiation an einem abwärts gelegenen *env* Startcodon tritt als Folge davon ein, dass die schwache Initiationssequenz des *vpu* nur unzureichend erkannt wird (Schwartz et al. 1992). Bei der Translation wird ein etwa 90 kD großes Polyprotein gebildet, welches im endoplasmatischen Reticulum (ER), durch das Anhängen von etwa 31 Oligosacchariden, glycosyliert wird, wodurch das gp160 Vorläufer-Polyprotein generiert wird (Allan et al. 1985). Die weitere Entwicklung des Proteins erfolgt dann im Golgi Apparat, wo zunächst die Oligosaccharidketten getrimmt werden (Dewar et al. 1989; Stein und Engleman 1990). Dieses gp160 Vorläuferprotein wird dann im Golgi Apparat von endogenen zelleigenen Proteasen endoproteolytisch geschnitten (Hallenberger et al. 1992; Kido et al. 1993; Ohnishi et al. 1994) um die Hüllenglykoproteine gp120 (SU) und gp41 (TM) zu bilden (Robey et al. 1985; Veronese et al. 1985). Bereits im ER findet die Zusammenlagerung der gp160 Vorläufer zu Homodimeren, Trimeren und Tetrameren statt (Earl et al. 1991). Diese multimere Struktur wird auch von der Proteolyse nicht beeinflusst, so dass auch die fertigen Hüllenglykoproteinen gp120 (SU) und gp41 (TM) auf der Virusoberfläche als Oligomere angeordnet sind (Weiss et al. 1990). Nach der Bearbeitung im ER und Golgi Apparat erfolgt der Transport zur Zellmembran. Die richtige Faltung, Glykosylierung, Oligosaccharidtrimmung und Oligomerisierung von gp160 sind essentiell für die Proteolyse und Herstellung von SU und TM (Bour et al. 1995). Das externe SU-Protein ist verantwortlich für die Bindung an den CD4 Rezeptor der Wirtszelle (McDougal et al. 1986), während das TM-Protein SU durch nicht kovalente Verbindung verankert und für die Membranfusion mit der Wirtszelle sorgt (Gallaher 1987; Gallaher et al. 1989; Kowalski et al. 1987; Sodroski et al. 1986).

Die regulatorischen Proteine (*tat* und *rev* Genprodukte)

Das Genom von HIV kodiert für zwei Regulationsproteine Tat und Rev, die früh im Infektionszyklus von mehrfach gespleissten mRNAs synthetisiert werden (Wang et al. 2000). Beide sind *in vitro* und *in vivo* essentiell für die Vermehrung von HIV (Steffy und Wong-Staal 1991). Als sie erstmals identifiziert wurden, bildeten sie die Prototypen einer neuen Gruppe von eukaryotischen RNA-Transkriptionsfaktoren (Haseltine 1991).

Das Tat-Protein (*engl.*: transactivator of transcription) ist der wichtigste Regulator der viralen Transkription (Arya et al. 1985). Es wird durch zwei Exons kodiert, die in unterschiedlichen Leserahmen liegen. Wie Rev wird Tat früh nach der Infektion gebildet und in den Nukleus transportiert, wo es die Promotoraktivität stark transaktiviert. Es bindet an die Haarnadelstruktur des TAR-Element (*engl.*: transactivation response) in der R Region des viralen LTR (Berkhout et al. 1989; Berkhout und Jeang 1989; Marciniak et al. 1990a). Einige zelluläre Proteine binden ebenfalls an das TAR-Element und/oder das Tat-Protein und modulieren den viralen LTR (Gatignol et al. 1989; Gatignol et al. 1991; Marciniak et al. 1990b). Eine Bindung an die frühen Transkripte führt bei der RNA-Polymerase II zu einer erhöhten Initiationsfrequenz und effizienten Leseaktivität über die volle Länge der RNA und somit zu einer mehr als hundert (Wang et al. 2000) bis tausendfachen (Zhang und Godbey 2006) Steigerung der allgemeinen Genexpression (Feng und Holland 1988; Laspia et al. 1990; Rosen et al. 1986).

Das Rev-Protein (*engl.*: regulator of expression of virion proteins) wird von zwei Exons in unterschiedlichen Leserahmen kodiert, die mit denen des Tat-Proteins überlappen. Wie das Tat-Protein wird Rev früh im Infektionszyklus gebildet und reichert sich ebenfalls im Zellkern an (Cochrane et al. 1989), wo es an das strukturiert gefaltete RRE-Element (*engl.*: rev responsive element) bindet, welches sich innerhalb des kodierenden Bereiches des Env-Proteins befindet (Cullen 1998; Le et al. 1990; Malim et al. 1989). Die Bindung von Rev an RRE verhindert die Interaktion mit zellulären Spleißfaktoren und somit das Spleißen der genomischen Vollängen RNA. Die Rev-Expression bewirkt daher den Export einfach oder ungespleisster mRNAs in das Zytoplasma, wo diese translatiert oder als genomische RNA in das Virion verpackt werden (Felber et al. 1989; Steffy und Wong-Staal 1991; Venkatesh et al. 1990). Rev ist ein zeitlicher Regulator der viralen Genexpression. Bald nach der Infektion dominieren kleine (mehrfach gespleisste) mRNAs im Zytoplasma die Tat, Rev, und Nef kodieren. Später werden genomische (ungespleisste) und einfach gespleisste RNAs (Vpu, Env, Vif, Vpr) die Hauptformen im Zytoplasma (Stoltzfus und Madsen 2006). Rev ist ein Schlüsselfaktor, der diesen Übergang kontrolliert (Jeang et al. 1999; Wang et al. 2000). Die Expression von Rev ist notwendig für die Produktion der viralen Strukturgene *gag*, *pol*, und *env*, aber nicht für die Expression der regulatorischen Gene selbst.

Der genaue Mechanismus der Tat und Rev Transaktivierung ist äußerst komplex und für das grundlegende Verständnis der Funktionsweise von Lentiviren nicht notwendig. Da es über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen würde, wird hier auf eine umfassende Darstellung

verzichtet. Einige detaillierte Zusammenfassungen hierzu wurden von (Coffin et al. 1997; Cullen 1991; Haseltine 1991; Steffy und Wong-Staal 1991; Wang et al. 2000; Wong-Staal 1991) publiziert.

Akzessorische Proteine (*vif*, *vpr*, *vpu* und *nef* Genprodukte)

Im Gegensatz zu Tat und Rev sind die Proteine Vif, Vpr, Vpu, und Nef für die Virusvermehrung *in vitro* nicht essentiell, beeinflussen jedoch die Funktion anderer viraler Proteine, und die Pathogenese des Virus *in vivo*, sowohl positiv als auch negativ und fungieren als Helferproteine. Sie werden deshalb als akzessorische oder Helferproteine bezeichnet. Dennoch gibt es immer mehr Hinweise, dass diese Proteine eine wichtige Rolle im viralen Lebenszyklus spielen und *in vivo* nicht entbehrlich, sondern essentiell sind. Ihre Leserahmen sind unter HIV Stämmen und auch unter weiter entfernten lentiviralen Verwandten hoch konserviert. (Cohen et al. 1996; Subbramanian und Cohen 1994).

Vif (*engl.*: viral infectivity factor) ist ein Polypeptid, das notwendig ist für die Replikation und Infektiosität von HIV-1 in bestimmten, vor allem primären, Zelltypen (Fan und Peden 1992; Gabuzda et al. 1992; Sakai et al. 1993; von Schwedler et al. 1993). Allerdings wird Vif in den meisten Zelllinien nicht benötigt, was dafür spricht, dass diese Zellen Proteine exprimieren die eine ähnliche Funktion wie Vif haben (Strebel et al. 1987). Es wird angenommen, dass Vif eine wichtige Rolle während des Zusammenbaus oder der Reifung der Virionen spielt (Gabuzda et al. 1992).

Vpr (*engl.*: viral protein R) ist im Präintegrationskomplex (PIC) vorhanden und vermittelt durch die Erleichterung der Lokalisation des PIC in den Nukleus die HIV Infektion von ruhenden Zellen (Heinzinger et al. 1994)

Vpu (*engl.*: viral protein U) wird von derselben RNA exprimiert, die für Env kodiert, aber auf einem viel niedrigeren Niveau. Vpu hat zwei wesentliche Funktionen. Zum einen induziert es die Degradierung von CD4 im endoplasmatischen Reticulum. CD4 bindet die viralen Hüllproteinvorläufer im ER. Durch den CD4 Abbau können diese effizienter zur Zellmembran transportiert werden. Die zweite Funktion von Vpu ist die Steigerung der Abgabe von Viruspartikeln von der Zelloberfläche. Beide biologische Aktivitäten von Vpu arbeiten mit zwei unterschiedlichen molekularen Mechanismen und umfassen zwei unterschiedliche strukturelle Domänen des Vpu-Proteins (Schubert et al. 1996).

Nef (*engl.*: negative Factor) ist das erste virale Protein, das sich nach der HIV Infektion in der Wirtszelle auf ein nachweisbares Niveau anreichert. Es hat mehrere Aufgaben, z.B. die Herunterregulation von CD4 auf der Zelloberfläche und Klasse I MHC Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.*: major histocompatibility complex, MHC) (Garcia und Miller 1992; Schwartz et al. 1996), die Störung der T-Zell Aktivierung (Skowronski et al. 1993), und die Stimulation der HIV Replikation und Infektiosität (Miller et al. 1994).

1.3.2.3 Replikationszyklus von HIV-1

Der detaillierte Mechanismus des Replikationszyklus von HIV-1, im Speziellen die Regulation desselben ist äußerst komplex. Er soll hier nur in einer vereinfachten Form dargestellt werden, soweit es zum Verständnis der Funktion des in der Arbeit verwendeten lentiviralen Expressionssystems notwendig ist (Abbildung 5).

Die Replikation von HIV-1 ist sowohl vom Zelltyp als auch vom Proliferationsstadium der infizierten Zelle abhängig. HIV-1 kann proliferierende und ruhende CD4⁺ Zellen infizieren. Es handelt sich dabei *in vivo* in erster Linie um T-Lymphozyten, aber auch um Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Mikrogliazellen.

Die Infektion beginnt mit der Bindung der Viruspartikel an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Es kommt dabei zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem viralen Hüllglykoprotein SU (gp120) und dem CD4 Rezeptor der Wirtszelle (Clapham et al. 1991; Dalglish et al. 1984; McDougal et al. 1986). Unter Beteiligung des Hüllglykoprotein TM (gp41) kommt es zur Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle (Gallagher 1987; Gallagher et al. 1989; Kowalski et al. 1987; Sodroski et al. 1986). Zusätzlich zum CD4 Rezeptor sind bestimmte Chemokin-Rezeptoren der Familie der CC bzw. CXCR Rezeptoren essentielle Co-Rezeptoren für HIV (Alkhatib et al. 1996; Feng et al. 1996). Die Verwendung unterschiedlicher Co-Rezeptoren bestimmt den Tropismus der unterschiedlichen HIV Stämme. Insbesondere in der kritischen frühen Phase der Infektion existieren vorwiegend R5-Virusstämme (ehemals als Makrophagen-trophe Stämme bezeichnet) die an den CCR5 Rezeptor binden, wohingegen in der späteren Phase mehr X4-Viren (ehemals als T-Zell-troph bezeichnet) den CXCR4 Rezeptor (Fusin) binden (Gartner et al. 1986). Es werden dann bevorzugt Zielzellen infiziert, die den Co-Rezeptor CXCR4 exprimieren (Feng et al. 1996; Koyanagi et al. 1987). Dieser Wechsel der Co-Rezeptor Affinität tritt in der Regel nur bei etwa 30% bis 40% der Infektionen durch HIV-1 Subtyp B auf und konnte bei Subtyp C nicht nachgewiesen werden. Es gibt allerdings auch

dualtrope X4R5-Viren (Doranz et al. 1996). Die physiologischen Liganden des CCR5 Rezeptors sind die β -Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β (D'Souza und Harden 1996). Diese Chemokine werden von CD8-Zellen sezerniert und sind *in vitro* in der Lage, die Expression von HIV zu inhibieren (Cocchi et al. 1995). Weitere, dem CCR5 Rezeptor ähnliche Rezeptoren wie CCR2b und CCR3 wurden bislang identifiziert (Choe et al. 1996; Doranz et al. 1996).

Durch die rezeptorvermittelte Infektion gelangt das Capsid in das Zytoplasma der Wirtszelle und wird dort entpackt. Die partikuläre Struktur des Capsids bleibt dabei erhalten, seine Konformation ändert sich jedoch (Präintegrationskomplex, PIC). Die beiden Moleküle virale RNA werden unter Verwendung einer als Primer dienenden tRNA von der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben (vgl. 1.3.2.2) (Morrow et al. 1994). Da die reverse Transkriptase keine Fehlerkorrektur anwendet, ist die Transkription sehr fehlerhaft und trägt somit zur genomischen Variabilität von HIV bei (Preston et al. 1988). Nach dem aktiven Transport der viralen DNA im Komplex mit den Capsid Komponenten in den Nukleus der Wirtszelle erfolgt mittels der viralen Integrase die Integration in das Wirtsgenom (Morrow et al. 1994). Der Virus wird daraufhin als Provirus bezeichnet. Je nach der Stelle der Integration können zelluläre Gene zerstört werden oder unter der Kontrolle des viralen Promotors aktiviert werden, wodurch eine Insertionsmutagenese verursacht und Tumore induziert werden können (Sourvinos et al. 2000). Die provirale DNA wird dann bei jeder Zellteilung mitotisch geteilt und an die Tochterzellen weitergegeben. Ob das Provirus transkribiert oder latent vorliegt, hängt vom Aktivierungszustand der Zelle ab (Stevenson et al. 1990). Im Falle einer Aktivierung kommt es zur Bindung zellulärer Faktoren an die *cis*-regulatorischen Elemente der Enhancer/Promotor Region des LTR und Transkription der integrierten DNA durch die zelluläre DNA-Polymerase und nachfolgend zur Translation der viralen RNA (Rosen et al. 1985). Hierbei werden aus dem einzelnen, primären, viralen RNA-Transkript durch alternatives Spleissen über 40 verschiedene RNA-Spezies hergestellt (Stoltzfus und Madsen 2006). Dabei entstehen kurz nach der Infektion auf niedrigem Niveau (basale Expression) erst die kurzen mehrfach gespleissten mRNA Moleküle, welche für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren, wohingegen die einfach oder ungespleissten (genomischen) RNAs erst im weiteren Verlauf der Infektion hergestellt werden. Tat verstärkt daraufhin die RNA-Produktion und Rev reguliert die Bildung von mehrfach, einfach und ungespleisster RNA (vgl. 1.3.2.2) (Jones und Peterlin 1994; Luukkonen et al. 1995). Die Vollängen RNA kann als genomische RNA zum Verpacken in neue Viruspartikel oder als mRNA zur Translation der Gag und Gag/Pol-

Vorläuferproteine dienen. Für die Env-Polyproteine sowie vif, vpr und vpu dient die einfach gespleisste RNA als Template. Die Env-Proteine werden über das endoplasmatische Reticulum und den Golgi Apparat weiterverarbeitet, wo die Glykosylierung und Spaltung in SU und TM durch zelluläre Enzyme erfolgt. Sie werden anschließend zur Zellmembran transportiert (vgl. 1.3.2.2). Die Selbstaggregation der viralen Vorläuferproteine Gag und Gag/Pol zu neuen Viruspartikeln erfolgt an der Zellmembran. Als Erbinformation für einen neuen Infektionszyklus werden zwei Moleküle ungespleisste RNA in das unreife Capsid verpackt. Zusätzlich werden die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine mitverpackt. Das Capsid nimmt in einem als Knospung bezeichneten Prozess einen Teil der Zellmembran als Hülle auf, in welche die Hüllenglykoproteine SU und TM eingelagert sind. Bei dem Verlassen der Wirtszelle beginnt der Reifungsprozess der Virionen. Die Proteasedomäne (PR) spaltet sich in einem autokatalytischen Schritt aus dem Gag/Pol-Vorläufer-Polyprotein heraus, um die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine anschließend in die Matrix- (MA), Capsid- (CA), Nukleocapsid- (NC) und Verbindungsproteine (LI) sowie die Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) zu spalten (vgl. 1.3.2.2) (Kaplan et al. 1994b). Erst bei diesem Schritt erhält das Capsid seine typische konische Form und die Virionen ihre Infektiosität (Kaplan et al. 1994a).

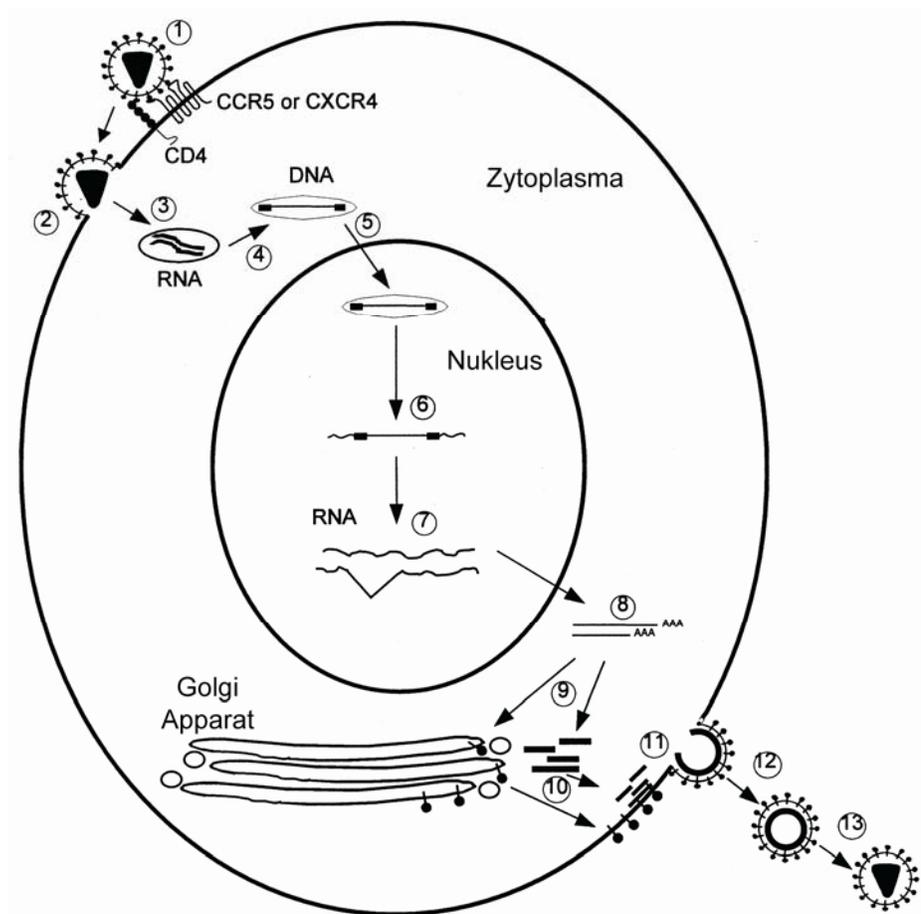


Abbildung 5: Replikationszyklus von HIV-1.

(1) Bindung; (2) Fusion; (3) Aufnahme; (4) Reverse Transkription; (5) Transport in den Nukleus; (6) Chromosomale Integration der proviralen DNA; (7) Transkription und Spleißen der RNA; (8) Export aus dem Nukleus; (9) Translation und Weiterverarbeitung; (10) Transport zur Zellmembran; (11) Zusammenbau; (12) Knospung; (13) Reifung. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach (Weiss 2000).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung, Optimierung und Charakterisierung eines hocheffizienten lentiviralen Transduktionssystems für den Gentransfer in humanen mesenchymalen Stammzellen mit dem langfristigen Ziel der Gentherapie und des Tissue Engineerings unter Verwendung von hMSCs. Allerdings ist die Verwendung großer MOIs (*engl.*: multiplicity of infection, Virusmenge pro Zelle) nicht kompatibel mit der Anwendung in klinischen Versuchen für die Gentherapie (Rouas et al. 2002). Daher soll in dieser Arbeit, für klinische Anwendungen, unter Verwendung unkonzentrierter Viruspräparationen, eine Methode entwickelt werden, um die Transduktionseffizienz der Lentiviren in hMSCs und die Ausbeute der transgenen hMSCs zu erhöhen. Hierfür müssen die Protokolle für die Herstellung der Lentiviren sowie für die Transduktion der Zielzellen, mit dem Ziel die Ausbeute der transduzierten hMSCs zu erhöhen, optimiert werden.

Um das lentivirale Expressionssystem optimieren und charakterisieren zu können, ist eine genaue Beobachtung und Messung der Transgenexpression notwendig. Zu diesem Zweck sollen in dieser Arbeit lentivirale Expressionsvektoren hergestellt werden, die ein geeignetes Markergen/-protein exprimieren. Für viele Anwendungen in der Gentherapie oder dem Tissue Engineering ist eine regulierbare Transgenexpression wünschenswert, um die Sicherheit und Wirksamkeit des therapeutischen Gentransfers zu erhöhen. Daher soll auch ein zuverlässiges System für die regulierte Genexpression mittels lentiviralem Gentransfers entwickelt werden. In Gentherapie- und Tissue-Engineering-Anwendungen ist es unbedingt notwendig, die Effekte der Transgenexpression von Effekten, die durch die lentivirale Transduktion an sich entstehen, unterscheiden zu können und negative Effekte, die durch die Transduktion an sich ausgelöst werden, ausschließen zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, soll in dieser Arbeit als Negativkontrolle eine Attrappe (*engl.*: *mock*) des lentiviralen Expressionsvektors hergestellt und deren Funktionsfähigkeit getestet werden.

Als weiterer Schritt in die Richtung der gentherapeutischen Anwendung und für das Tissue Engineering muss die biologische Sicherheit der transduzierten hMSCs gewährleistet werden. Hierfür soll ein geeignetes System etabliert werden.

Für Anwendungen im Bereich der Gentherapie und des Tissue Engineering mit MSCs ist die präzise Bestimmung des lentiviralen Titers essentielle Voraussetzung. Daher muss eine zuverlässige und schnelle Methode entwickelt werden um den funktionellen Virustiter und damit die Transduktionseffizienz direkt in den transduzierten hMSCs zu bestimmen.

Außerdem soll gezeigt werden, dass die lentiviral transduzierten hMSCs ihre Differenzierungsfähigkeit nicht verlieren und die Transgenexpression durch die Differenzierung nicht beeinträchtigt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Das ViraPower™ lentivirale Expressionssystem

Das ViraPower lentivirale Expressionssystem von Invitrogen ermöglicht die Herstellung von selbstinaktivierenden (SIN) vermehrungsunfähigen Lentiviren, die verwendet werden, um ein Gen von Interesse, entweder in teilende oder nicht teilende Zellen zu transportieren und zu exprimieren. Das System basiert auf dem lentikat™ System, das von Cell Genesys entwickelt wurde (Dull et al. 1998). Die Hauptkomponenten des Systems umfassen:

- Ein Expressionsplasmid, welches das Gen von Interesse enthält unter der Kontrolle eines Promotors und Elemente, die die Verpackung des Konstrukts in Virionen, ermöglichen.
- Eine optimierte Mischung der drei Verpackungsplasmide (pLP1, pLP2, und pLP/VSVG, *engl.*: packaging mix, PM), welche die Struktur- und Replikationsproteine, die zur Produktion der Lentiviren notwendig sind, *in trans* zur Verfügung stellen.
- Die 293FT Zelllinie, welche nach der Co-Transfektion des Expressionsplasmids und der Verpackungsplasmide im „Verpackungsmix“ (*engl.*: packaging mix, PM) die Produktion der Lentiviren ermöglicht.

Die Verwendung des ViraPower lentiviralen Expressionssystems für die lentivirale Expression des Gens von Interesse bietet folgende Vorteile (vgl. 1.3):

- Es erzeugt Lentiviren, welche auf HIV-1 basieren, die effizient sowohl teilende als auch nicht teilende humane und Säugetierzellen transduzieren, wodurch die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten über die auf traditionellen Moloney Leukämie Viren (MoMLV) basierten retroviralen Systemen hinaus erweitert werden (Naldini 1998).
- Das Gen von Interesse wird effizient in humanen und Säugetierzellen transportiert, sowohl in Zellkultur (*in vitro*) als auch *in vivo* (Dull et al. 1998).
- Die stabile Langzeitexpression des Zielgens wird ermöglicht, hinausgehend über die Möglichkeiten von traditionellen auf Adenoviren basierten Systemen (Dull et al. 1998; Naldini et al. 1996a)
- Ein pseudotypisierter Virus wird gebildet, welcher ein vergrößertes Wirtsspektrum hat (Yee et al. 1994).
- Die gebildeten Lentiviren rufen keine Immunantwort hervor (Teschemacher et al. 2005).
- Enthält mehrere besondere Merkmale, welche die biologische Sicherheit des Systems erhöhen.

2.1.1.1 Sicherheitskonzept des ViraPower™ lentiviralen Systems

Die Vektoren sind Derivate von HIV-1 Lentiviren, welche so verändert wurden, dass sie ein fremdes Gen von Interesse in eine Zielzelle einschleusen. Die Vektoren sind selbstinaktivierend (SIN) und vermehrungsunfähig und können nur einen einzelnen Vermehrungszyklus durchlaufen (Miyoshi et al. 1998). Aufgrund der Gestaltung der vermehrungsunfähigen Vektoren können Viruspartikel hergestellt und für die Infektion der Zielzellen verwendet

werden. Das Vektorgenom wird revers transkribiert und in das Zellgenom integriert, wo das fremde Gen exprimiert wird, ist aber nicht in der Lage sich weiter zu vermehren und auf andere Zellen auszubreiten.

Die Verwendung selbstinaktivierender Vektoren ist eine notwendige Sicherheitsmassnahme. Ein SIN Vektor reduziert außerdem das Problem der Onkogenese durch Promotorinsertion und Insertionsmutagenese, und es vermindert signifikant das Risiko der Vektormobilisierung und Rekombination mit dem Wildtyp HIV und somit das Risiko, der Entstehung von vermehrungsfähigen Rekombinanten (Beard et al. 2007b).

Für die Herstellung eines selbstinaktivierenden vermehrungsunfähigen Vektors sind die LTRs modifiziert und die *cis* und *trans* tätigen Sequenzen des viralen Genoms getrennt. Dazu sind die in *trans* tätigen *gag*, *pol* und *env* Gene aus dem Virusgenom entfernt (und durch das fremde Transgen ersetzt). Nur die *cis* regulierenden Regionen die nötig sind für reverse Transkription, Integration, Transkription und Einkapselung verbleiben im Genom. Folgende Sicherheitsfaktoren wurden in das System integriert:

- Der pLenti-Expressionsvektor enthält eine Deletion im 3'LTR ($\Delta U3$), welche die Herstellung des viralen Genoms in der Produzentenzelle nicht beeinflusst, aber die Selbstinaktivierung des Lentivirus nach der Transduktion der Zielzelle zur Folge hat (Yee et al. 1987; Yu et al. 1986; Zufferey et al. 1998). Einmal integriert in die transduzierte Zielzelle ist das lentivirale Genom nicht mehr in der Lage verpackungsfähige virale Genome herzustellen.
- Die Anzahl der Gene von HIV-1, die im System verwendet werden, wurde auf drei reduziert (*gag*, *pol* und *rev*).
- Das VSV-G-Gen des Vesicular Stomatitis Virus wird anstelle des HIV-1 *env* verwendet (Burns et al. 1993; Emi et al. 1991; Yee et al. 1994).
- Gene, die für strukturelle und andere Komponenten kodieren, die für die Verpackung des viralen Genoms notwendig sind, sind auf vier Plasmide verteilt. Alle vier Plasmide wurden so bearbeitet, dass sie keine homologen Bereiche zueinander haben um ungewünschte Rekombinationsereignisse zu vermeiden, welche zur Bildung eines vermehrungsfähigen Virus führen könnten (Dull et al. 1998).
- Keines der drei Verpackungsplasmide enthält LTRs oder das Ψ Verpackungssignal. Das bedeutet, dass keines der viralen Strukturgene in den verpackten viralen Genomen vorhanden ist und somit auch nicht in den transduzierten Zellen exprimiert wird. Kein neuer vermehrungsfähiger Virus kann gebildet werden.
- Die lentiviralen Partikel, die mit diesem System gebildet werden, sind nicht vermehrungsfähig und tragen nur das Gen von Interesse. Keine andere Virusspezies wird gebildet.
- Die Expression der *gag*- und *pol*-Gene von pLP1 wurde durch das HIV-1 RRE im *gag/pol* mRNA Transkript Rev abhängig gemacht. Die Addition von RRE verhindert *gag*- und *pol*-Expression in Abwesenheit von Rev (Dull et al. 1998).
- Die U3 Promotorregion des 5'LTR wurde entfernt. Ein starker konstitutiver Promotor (Rous Sarkom Virus-Promotor, P_{RSV}) (Gorman et al. 1982) wurde oberhalb des 5'LTR in den pLenti-Expressionsvektor eingefügt um die effiziente Produktion der viralen RNA unabhängig von Tat zu machen (Dull et al. 1998).

2.1.1.2 Komponenten des ViraPower™ lentiviralen Systems

Der virale pLenti-Expressionsvektor (vgl. 1.3.2.2)

Der Bereich zwischen den LTRs des Vektors ist das einzige genetische Material, das in die Zielzellen übertragen wird. Er enthält sowohl alle *cis* regulativen Sequenzen, die für die Verpackung (Ψ), reverse Transkription (PBS, LTRs), Integration (*att*), und Transkription (5'LTR und heterologer Promotor) nötig sind, als auch das Transgen selbst. Ein besonderes Merkmal ist die Integration von RRE, wodurch die Bildung von ungespleisster Vektor-RNA in den Produzentenzellen gefördert wird. Dadurch können auch komplexe Transgene mit Introns und Spleissignalen in den Vektor integriert werden (Dull et al. 1998).

In dieser Arbeit wurde der Gateway® kompatible pLenti6/V5-DEST-Vektor von Invitrogen für die Transgenexpression in hMSCs verwendet (Abbildung 6, Tabelle 2). Er enthält den Promotor eines frühen Gens des humanen Cytomegalievirus (CMV-Promotor, P_{CMV}) der die konstitutive Expression des Gens von Interesse auf hohem Niveau in humanen und Säugetierzellen ermöglicht (Andersson et al. 1989; Boshart et al. 1985; Nelson et al. 1987).

Er enthält zusätzlich das Blastocidin-Resistenzgen für Blastocidin-S-Deaminase (*bsd*) (Kimura et al. 1994), welches die Blastocidinselektion (TAKEUCHI et al. 1958; Yamaguchi et al. 1965) der Zellen ermöglicht, die stabil mit dem lentiviralen Konstrukt transduziert wurden. Das *bsd*-Gen steht unter Kontrolle des simianen Virus 40 Promotors (SV40-Promotor, P_{SV40}).

Die verwendeten viralen Promotoren (P_{RSV} , P_{CMV} , P_{SV40}) sind zwar in den meisten Zelltypen sehr aktiv, dennoch können aktive virale Promotoren in bestimmten Zelllinien die Gendämpfung (*engl.*: gene silencing) des integrierten Provirus, durch Methylierung (Curradi et al. 2002), Histon-Deacetylierung (Rietveld et al. 2002) oder beides, auslösen. Dies trifft auch für P_{RSV} , P_{CMV} , und P_{SV40} zu und muss, je nach der zu transduzierenden Zelllinie, berücksichtigt werden.

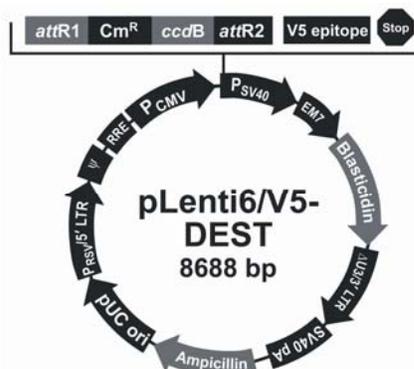


Abbildung 6: Plasmidkarte von pLenti6/V5-DEST (Invitrogen 2006a).

Nach der Clonase Reaktion ersetzt DNA aus dem ENTR Klon den Bereich zwischen attR1 und attR2.

Tabelle 2: Merkmale von pLenti6V5-DEST.

Merkmal	Leistung
Rous Sarkom Virus (RSV) Enhancer/Promotor	Ermöglicht Tat unabhängige Produktion der viralen mRNA (Dull et al. 1998).
Verkürzter HIV-1 5'LTR	Ermöglicht Virusverpackung und reverse Transkription der viralen mRNA (Coffin et al. 1997).

Merkmal	Leistung
5' Spleissdonor und 3' Spleissakzeptor	Erhöht die biologische Sicherheit des Vektors durch das Entfernen des Ψ Verpackungssignal und des RRE so dass die Expression des Transgens in der transduzierten Wirtszelle nicht länger Rev abhängig ist (Dull et al. 1998).
HIV-1 psi (Ψ) Verpackungssignal	Ermöglicht die Virusverpackung (Coffin et al. 1997).
HIV-1 Rev-reagierendes Element (RRE)	Ermöglicht ungespleisster viraler mRNA den Rev abhängigen Export aus dem Nukleus (Kjems et al. 1991; Malim et al. 1989).
Humaner Cytomegalievirus Promotor (P_{CMV})	Ermöglicht konstitutive Expression des Transgens auf hohem Niveau (Andersson et al. 1989; Boshart et al. 1985; Nelson et al. 1987).
<i>attR1</i> und <i>attR2</i>	Aus Bakteriophagen stammende DNA-Rekombinationssequenz die rekombinierende Klonierung des Transgens aus einem Gateway® Eingangsklon (ENTR) ermöglicht (Landy 1989).
Chloramphenicol-Resistenzgen (CM^R)	Ermöglicht Kontraselektion des Plasmids.
<i>ccdB</i> -Gen	Erlaubt negative Selektion des Plasmids.
V5 Epitop	Ermöglicht die Detektion von rekombinanten Fusionsproteinen mittels des Anti-V5 Antikörpers (Southern et al. 1991).
SV40 früher Promotor und Ursprung	Ermöglicht die Expression des Selektionsmarkers auf hohem Niveau und episomale Replikation in Zellen die das SV40 große T-Antigen exprimieren.
EM7-Promotor	Synthetischer prokaryotischer Promotor für die Expression des Selektionsmarkers in <i>E.coli</i> .
Blasticidin-Resistenzgen (<i>bsd</i>)	Erlaubt die Selektion von stabil transduzierten humanen und Säugetierzellen (Kimura et al. 1994).
$\Delta U3/HIV-1$ verkürzter 3' LTR	Ermöglicht Virusverpackung, aber führt zur Selbstinaktivierung des 5' LTR aus Gründen der biologischen Sicherheit (Dull et al. 1998). Das Element enthält auch ein Polyadenylierungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA in transduzierten Zellen.
SV40 Polyadenylierungssignal (pA)	Erlaubt die Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA.
<i>bla</i> -Promotor	Erlaubt Expression des Ampicillin-Resistenzgens.
Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase, <i>bla</i>)	Ermöglicht Selektion des Plasmids in <i>E.coli</i> .
pUC Ursprung (<i>ori</i>)	Ermöglicht Replikation auf hohem Niveau und Erhaltung des Plasmids in <i>E.coli</i> .

Modifiziert nach (Invitrogen 2006a).

Das Verpackungssystem (PM) (vgl. 1.3.2.2)

Die letzte, dritte Generation der Verpackungssysteme enthalten nur drei der neun HIV-1 Gene: *gag*, *pol* und *rev* (Dull et al. 1998). Der Ursprüngliche HI Virus kann aus diesem extrem defizienten Verpackungssystem nicht wieder hergestellt werden, da etwa 60% seines Genoms komplett entfernt wurde (Trono 1998; Zufferey et al. 1997). Um die Möglichkeit der Entstehung eines vermehrungsfähigen Virus weiter zu vermindern, liegen die drei Gene auf zwei getrennten Plasmiden vor.

Ein weiteres Plasmid trägt die Hüllenglykoproteine. Das native Env-Protein ist in lentiviralen Verpackungssystem üblicherweise durch heterologe Hüllenglykoproteine ersetzt. Dieser Vorgang, der auch Pseudotypisierung genannt wird, kann den Tropismus gegenüber Wirtszellen und Geweben enorm vergrößern (Sanders 2002). Das Glykoprotein vom Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) wird sehr häufig zu diesem Zweck verwendet (Akkina et al. 1996; McClure et al. 1988). Die Taktik der Pseudotypisierung wurde weithin übernommen und hat den zusätzlichen Vorteil, dass ein Viruspartikel gebildet wird, der sehr viel stabiler als der native Virus ist (Burns et al. 1993; Hopkins 1993). Diese Vektoren können mittels Ultrazentrifugation konzentriert werden und überleben das Einfrieren und Auftauen. Pseudotypisierung mit VSV-G hat auch das Wirtsspektrum der Viren vergrößert, da VSV pantropisch ist. Ein weiterer offensichtlicher Vorteil ist die Reduktion der essentiellen lentiviralen Gensequenzen, was zu einer

Erhöhung der Sicherheit führt, durch Reduktion der Gefahr einer rekombinatorischen Wiederherstellung eines Wildtyp Lentivirus (Lever et al. 2004).

In dieser Arbeit wurde der ViraPower Packaging-Mix von Invitrogen für die Produktion der Lentiviren verwendet. Er enthält eine optimierte Mischung der drei Verpackungsplasmide pLP1 (Abbildung 7, Tabelle 3), pLP2 (Abbildung 8, Tabelle 4), und pLP/VSVG (Abbildung 9, Tabelle 5).

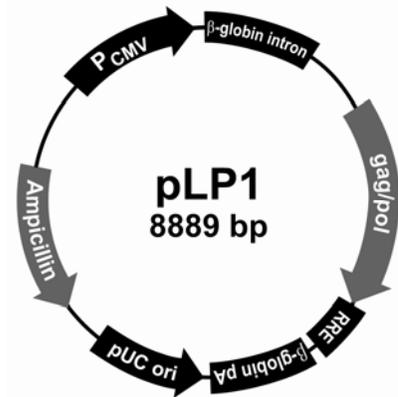


Abbildung 7: Plasmidkarte von pLP1 (Invitrogen 2006b).

Tabelle 3: Merkmale von pLP1.

Merkmal	Leistung
Humaner Cytomegalievirus Promotor (P _{CMV})	Ermöglicht konstitutive Expression der HIV-1 <i>gag</i> und <i>pol</i> Gene in humanen und Säugetierzellen auf hohem Niveau (Andersson et al. 1989; Boshart et al. 1985; Nelson et al. 1987)
Humanes β -Globin Intron	Verstärkt die Expression der <i>gag</i> und <i>pol</i> gene in humanen und Säugetierzellen.
HIV-1 <i>gag</i> kodierende Sequenz	Kodiert die viralen Capsid-Proteine die für die Strukturbildung der Lentiviren nötig sind (Coffin et al. 1997).
HIV-1 <i>pol</i> kodierende Sequenz	Kodiert die viralen Replikationsenzyme die für die Replikation und Integration der Lentiviren nötig sind (Coffin et al. 1997).
HIV-1 Rev reagierendes Element (RRE)	Ermöglicht Rev-abhängige Expression der <i>gag</i> und <i>pol</i> gene.
Humanes β -Globin Polyadenylierungssignal (pA)	Erlaubt effiziente Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA.
pUC Ursprung (<i>ori</i>)	Ermöglicht Replikation auf hohem Niveau und Erhaltung des Plasmids in <i>E.coli</i> .
Ampicillin-Resistenzgen (<i>bla</i>)	Ermöglicht Selektion des Plasmids in <i>E.coli</i>

Modifiziert nach (Invitrogen 2006b).

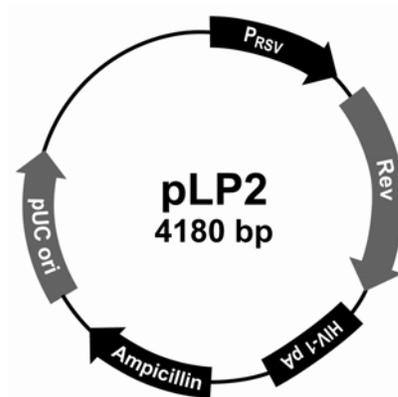
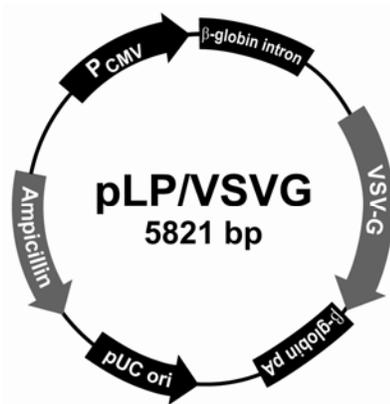


Abbildung 8: Plasmidkarte von pLP2 (Invitrogen 2006b).

Tabelle 4: Merkmale von pLP2.

Merkmal	Leistung
RSV Enhancer/Promotor (P_{RSV})	Ermöglicht Expression des rev Gens auf hohem Niveau (Gorman et al. 1982).
HIV-1 Rev Leserahmen	Kodiert das Rev-Protein das mit dem RRE in pLP1 interagiert um die Gag- und Pol-Expression zu induzieren und in pLenti6/V5 um der ungespleissten viralen mRNA den Export aus dem Nukleus und die Verpackung in virale Partikel zu ermöglichen.
HIV-1 LTR Polyadenylierungssignal (pA)	Erlaubt effiziente Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA
pUC Ursprung	Ermöglicht Replikation auf hohem Niveau und Erhaltung des Plasmids in <i>E.coli</i> .
Ampicillin-Resistenzgen (<i>bla</i>)	Ermöglicht Selektion des Plasmids in <i>E.coli</i>

Modifiziert nach (Invitrogen 2006b).

**Abbildung 9:** Plasmidkarte von pLP/VSVG (Invitrogen 2006b).**Tabelle 5:** Merkmale von pLP/VSVG.

Merkmal	Leistung
Humaner Cytomegalievirus Promotor (P_{CMV})	Ermöglicht konstitutive Expression des VSV-G Gens in humanen und Säugetierzellen auf hohem Niveau (Andersson et al. 1989; Boshart et al. 1985; Nelson et al. 1987).
Humanes β -Globin Intron	Verstärkt die Expression des VSV-G Gens in humanen und Säugetierzellen.
VSV-G-Glykoprotein (VSV-G)	Kodiert das Hüllen-G-Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus um die Produktion eines pseudotypisierten Retrovirus mit einem breiten Wirtsspektrum zu ermöglichen (Burns et al. 1993; Emi et al. 1991; Yee et al. 1994).
Humanes β -Globin Polyadenylierungssignal (pA)	Erlaubt effiziente Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA.
pUC Ursprung	Ermöglicht Replikation auf hohem Niveau und Erhaltung des Plasmids in <i>E.coli</i> .
Ampicillin-Resistenzgen (<i>bla</i>)	Ermöglicht Selektion des Plasmids in <i>E.coli</i>

Modifiziert nach (Invitrogen 2006b).

Die Produzenten Zelllinie

Die große Mehrheit der retroviralen und lentiviralen Vektoren wird bis jetzt mittels transientscher Transfektion der viralen und Verpackungsplasmide in humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) hergestellt (Amar et al. 2006; Evans et al. 2004; Li et al. 2005a; Metharom et al. 2005). Diese Zellen exprimieren konstitutiv stabil das große T-Antigen von SV40. Das große T-Antigen ermöglicht die optimale Virusproduktion und die episomale Replikation von Plasmiden, die den frühen SV40-Promotor (P_{SV40}) und Replikationsursprung enthalten. Die 293FT-Zellen sind

ein schnell wachsendes Derivat der 293T-Zellen und besonders leicht zu transfizieren. Sie exprimieren konstitutiv stabil das große T-Antigen von SV40 aus pCMVSPORT6Tag.neo unter Kontrolle des CMV-Promotors. Studien konnten zeigen, dass die 293FT Zelllinie eine besonders gut geeignete Zelllinie für die Produktion von Lentiviren ist (Naldini et al. 1996a). Sie werden in dieser Arbeit als Teil des ViraPower Systems als Produzentenzelllinie verwendet.

2.1.1.3 Herstellung der Lentiviren und Transduktion der Zielzellen

Das ViraPower System verwendet getrennte Komponenten, die in ihrer jeweiligen Funktion so unvollständig sind, dass infektiöse Partikel nur von der Produzentenzelle hergestellt werden können, wenn alle Bestandteile in dieser zusammenkommen und nicht von dem fertigen Vektor. Typischerweise wird eine Produzenten-Zelllinie co-transfiziert mit (1) dem viralen Vektorplasmid, welches das Gen von Interesse, die lentiviralen LTRs, das Rev empfindliche Element (RRE) und das Verpackungssignal (Ψ) enthält; (2) ein Plasmid welches die viralen *gag* und *pol* Gene enthält; (3) ein Plasmid welches die Gene für die Hüllglykoproteine trägt und (4) ein Plasmid das nur das *rev*-Gen beinhaltet. Keines dieser Plasmide ist alleine in der Lage als autonomer Virus zu funktionieren oder Viren zu bilden. Zusätzlich sind die meisten der HIV-1 akzessorischen Gene (*vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*, vgl. 1.3.2.2) entfernt, ohne dass dies einen negativen Effekt auf den effizienten Gentransfer hat. Nur das virale Vektorplasmid enthält das Verpackungssignal (Ψ), so dass infektiöse Partikel nur die vorgesehene RNA mit dem gewünschten Transgen aufnehmen (Dull et al. 1998; Zufferey et al. 1997).

Abbildung 10 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der Vektorherstellung und Transduktion am Beispiel von EGFP als Transgen. Die Nummerierung entspricht den jeweiligen Textabschnitten.

Zunächst wird das lentivirale Expressionsplasmid zusammen mit den drei Plasmiden (pLP1, pLP2, pLP/VSVG) in einem speziell für die Transfektion optimiertem serumfreien Medium (OptiMEM I, Invitrogen) verdünnt (1).

In einem separaten Reaktionsgefäß wird das Transfektionsreagens ebenfalls in OptiMEM I verdünnt. Als Transfektionsreagens wird in dieser Arbeit Lipofectamine 2000 von Invitrogen verwendet. Es handelt sich dabei um ein kationisches Lipid, bestehend aus einem unpolaren lipophilen Schwanz aus Kohlenwasserstoffketten, einem Lipidanker und einer polaren positiven Kopfgruppe. Durch ihre charakteristische Struktur sind die kationischen Lipide in der Lage in wässrigem Milieu Liposomen zu bilden. Die hydrophilen Köpfe ragen hierbei nach außen, während nach innen die lipophilen Schwänze der beiden Teilschichten aneinander grenzen. Im Innenraum des Liposoms befindet sich wieder wässriges Milieu mit den polaren Kopfgruppen (2).

Nach dem Mischen der Plasmide mit dem Transfektionsreagens können die auf der Oberfläche des kationischen Liposoms befindlichen positiv geladenen Kopfgruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückrats interagieren. Das führt zur Bildung von DNA-Lipid-Komplexen, so genannten Lipoplexen (Felgner et al. 1987; Felgner et al. 1997). Auf diesen beruht das Prinzip der Lipofektion (3).

Anschließend werden die Lipoplexe direkt zu den Produzentenzellen gegeben, wo diese von der Zelle aufgenommen werden können (4).

Der genaue Mechanismus der Aufnahme von Lipoplexen in die Zielzelle steht noch zur Diskussion. Obwohl viele Studien einen endozytotischen Aufnahmemechanismus der Lipoplexe favorisieren, schließen sie aufgrund der teilweise uneinheitlichen Daten Fusionsprozesse nicht kategorisch aus (de Lima et al. 1999; Friend et al. 1996; Pires

et al. 1999; Stegmann und Legendre 1997; Zhou und Huang 1994). Besonders bei den anschließenden intrazellulären Vorgängen, wie der Verschmelzung mit der Endosomenmembran, wird oft eine Fusion diskutiert (5) (Friend et al. 1996; Stegmann und Legendre 1997; Wrobel und Collins 1995; Xu und Szoka, Jr. 1996).

Die mit der Auflösung der Endosomen (6) (El Ouahabi et al. 1997; Wattiaux et al. 1997) verknüpfte DNA-Freisetzung aus dem Lipoplex bildet wiederum die Basis für die Aufnahme der intakten Ziel-DNA in den Zellkern (Escriou et al. 1998; Friend et al. 1996). Es wird diskutiert, ob eine Zellteilung für den Eintritt von Plasmid-DNA in den Kern erforderlich ist (Fasbender et al. 1997). In direktem Zusammenhang dazu steht auch die Zellzyklusphase: Wie mehrfach gezeigt wurde, erzielen in der Mitose befindliche Zellen höhere Transfektionseffizienzen als Zellen in der G1- oder gar G0-Phase (Fasbender et al. 1997; Mortimer et al. 1999; Wilke et al. 1996). Dies wirkt sich dementsprechend auf die Transfizierbarkeit verschiedener Zelltypen aus, in Abhängigkeit von deren Teilungsrate und Differenzierungsgrad (7).

Die Schritte der Virusproduktion entsprechen im Wesentlichen denen der Wildtyp HIV Produktion (vgl. 1.3.2.3): Im Nukleus werden die Plasmide transkribiert. Die mRNA wird in das endoplasmatische Reticulum transportiert, wo die mRNA translatiert wird und die viralen Proteine anschließend in das Zytosol transportiert werden. An der Zellmembran assemblieren die Viren und werden durch Knospung aus der Zelle abgegeben. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer morphologischen Veränderung der 293FT-Zellen: Durch die Expression des VSV-G-Glykoproteins kommt es zwischen einzelnen Produzentenzellen zur Bildung von Syncytien (8).

Die Vektoren werden von den Produzentenzellen in das Zellkulturmedium abgegeben und können geerntet werden. Nach der Ernte kann der virushaltige Zellkulturüberstand direkt zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt werden, oder die Viren mittels Ultrazentrifugation oder Filtration aufkonzentriert werden (9).

Die Schritte der Infektion entsprechen im Wesentlichen denen der Wildtyp HIV Infektion (vgl. 1.3.2.3): Aufnahme, Reverse Transkription, Import der viralen DNA in den Nukleus (10) und Integration in das Wirtsgenom (11). Als Teil des Wirtsgenoms wird der Provirus transkribiert, und die mRNA des Transgens (z.B. EGFP) in der üblichen Weise von der Proteinbiosynthese Maschinerie der Zellen weiterverarbeitet (12).

Durch die zufällige Integration des Provirus in verschiedenen aktiven und/oder inaktiven Bereichen des Wirtsgenoms, sowie unterschiedlicher integrierter Kopienanzahl, kommt es zur Bildung einer heterogenen Zellpopulation, in der einzelne Zellen eine niedrige bis hohe Transgenexpression haben. Andere Zellen, welche gar keinen Virus aufgenommen haben und somit untransduziert sind, exprimieren das Transgen gar nicht. Diese heterogene Zellpopulation kann nun mittels Blasticidin selektioniert werden (13).

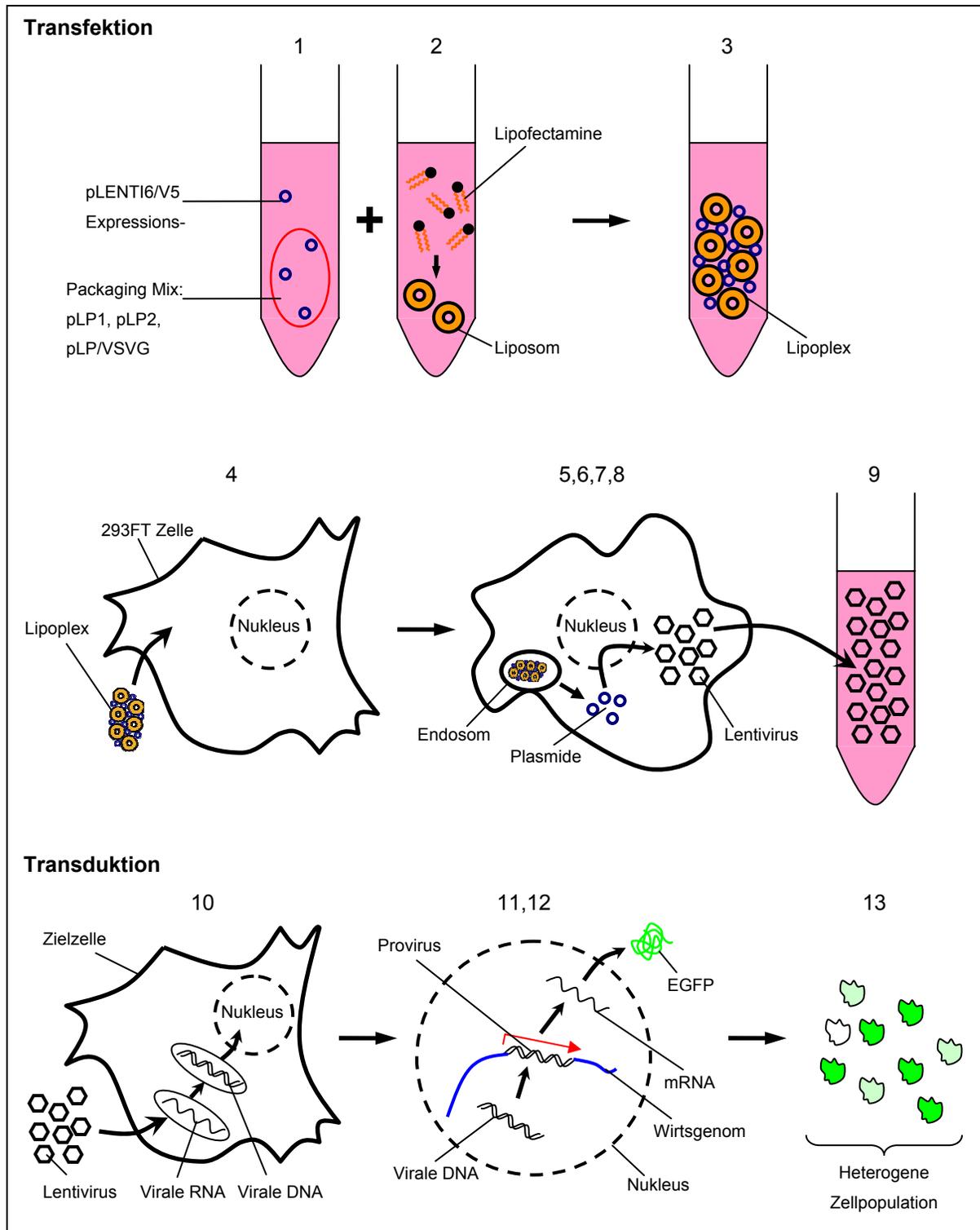


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Virusproduktion und der Transduktion.

(1) Verdünnen der Plasmide und (2) des Transfektionsreagens; (3) Mischen von Plasmid und Transfektionsreagens; (4) Beimengung zu den Produzentenzellen; (5) Aufnahme der Lipoplexe; (6) Auflösung der Endosomen; (7) Aufnahme der DNA in den Zellkern; (8) Transkription, Translation, Assemblierung der Viren, Knospung; (9) Ernte; (10) Aufnahme, Reverse Transkription, Import der viralen DNA in den Nukleus; (11) Integration in das Wirtsgenom; (12) Proteinbiosynthese; (13) Erzeugung einer heterogenen Zellpopulation. Erläuterungen siehe Text.

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „A.C.S.“ oder „p.A.“ verwendet.

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck, Darmstadt
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose, LE	Biozym, Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau R-250	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP Mix (10 mM)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Doxycyclin HCl	Merck, Darmstadt
DPX Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (D-PBS)	PAA, Pasching, A
Ethanol, absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung (1%)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure, Eisessig	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelladepuffer, 6x Orange Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Gelladepuffer, 10x Blue Juice	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticinlösung (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycogen, UltraPure	Invitrogen, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hexadimethrine Bromid (Polybrene)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Insulin-Transferin-Selenit Mix (ITS, 100x)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Jung Einbettmedium	Leica Microsystems, Nussloch
Kalium Hydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Kanamycin Sulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin Lösung (200mM)	PAA, Pasching, A

L-Prolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Grenzach-Wyhlen
Linolsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
MEM Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrium Acetat	Merck, Darmstadt
Natrium Chlorid	Merck, Darmstadt
Natrium Deoxycholate	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrium Fluorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrium Tetraborat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin Lösung (100x)	PAA, Pasching, A
Tween 20	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor, Complete, Mini, EDTA-frei	Roche, Grenzach-Wyhlen
Pyrogallollösung (1%)	Klinikapotheke, M-Innenstadt
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	
Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
TGF- β 3, rekombinant human	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau, Färbelösung 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x) Lösung	PAA, Pasching, A
Waroklar	Waldeck, Münster
Zellkulturmedium, AlphaMEM +GlutaMAX	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturmedium, D-MEM, high Glucose +L-Glutamin, +Pyruvat	PAA, Pasching, A
Zellkulturmedium, McCoy's 5A (verändert) +GlutaMAX	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturmedium, RPMI1640 +L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Zellkulturmedium, OptiMEM I	Invitrogen, Karlsruhe
ViraPower lentiviraler Packaging-Mix	Invitrogen, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien stammen, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder Carl Roth.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Standardlösungen und Puffer wurden in Übereinstimmung mit Sambrook et al. vorbereitet (Sambrook und Russel 2001). Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit quartzbidestiliertem Wasser (H_2O_{dd}) hergestellt und durch Autoklavieren für 20 Minuten bei einem Druck von 15 psi sterilisiert. Lösungen mit temperatursensitiven Komponenten wurden sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde mittels einer pH-Elektrode bei entsprechender Temperatur eingestellt.

APS (10%)	10% (w/v) APS Aliquots für einmalige Verwendung bei -20°C aufbewahren
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver ad Waschpuffer
Blotting-Puffer (10x)	250 mM Tris-base 1.92 M Glycin
Blotting-Puffer (1x)	10% (v/v) Blotting Puffer (10x) 20% (v/v) Methanol
Cracking-Puffer (2x)	0,2 M NaOH 0,5 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Glucose 0,4 % (w/v) Bromphenolblau pH 5,2
Coomassie-Blau-Färbelösung	7% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blau
DEPC-Wasser	0,1% (v/v) DEPC inkubieren 12 h, 37°C autoklavieren
DTT-Lösung	1 M DTT Aliquots bei -20°C
EDTA-Stammlösung	500 mM EDTA pH 8,0
Entfärbelösung	7% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol
FA-Gelpuffer (10x)	200 mM MOPS 50 mM Natrium Acetat 10 mM EDTA pH 7,0 (NaOH) ad DEPC-Wasser
FA-Gellaufpuffer(1x)	10% (v/v) FA Gelpuffer (10x) 2% (v/v) Formaldehyd (37%) ad DEPC-Wasser
FACS-Puffer	1% FBS ad D-PBS
Isopropanol-Fixierlösung	10 % (v/v) Essigsäure 25 % (v/v) Isopropanol
Kristallviolett-Färbelösung	1% (w/v) Kristallviolett ad Ethanol (10%)
Laemmli-Auftragspuffer (5x)	225 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5% (w/v) SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin ad H ₂ O → Aliquots bei -20°C aufbewahren 250 mM DTT, (DTT Lösung 1:4 frisch zugeben)
Natriumacetatlösung (NaAc)	3 M Natriumacetat pH 5,2
Oil-Red-O-Stammlösung (0,3%)	3 mg/ml Oil Red O ad Isopropanol filtrieren → 4 Wochen haltbar

Oil-Red-O-Arbeitslösung (0,2%)	60% (v/v) Oil Red O Stammlösung ad H ₂ O _(dd) filtrieren → 3 Stunden haltbar
RIPA-Puffer	0,1% (w/v) SDS 1% (w/v) NaDOC 1% (v/v) Triton X-100 50 mM Tris Base (pH 8,2) 150 mM NaCl 10 mM EDTA (pH8,0) 20 mM NaF → bei 4°C max. 6 Monate haltbar 1 Tablette/10 ml Protease Inhibitor, immer frisch zugeben
RNA-Gelladepuffer	16 µl gesättigte, wässrige Bromphenolblau Lösung 80 µl EDTA (500mM, pH 8,0) 720 µl Formaldehyd (37%) 2 ml Glycerin (100%) 3,084 ml Formamid 4 ml FA Gelpuffer (10x) ad 10 ml DEPC-Wasser
SDS (10%)	10% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 M Tris-Base (pH 8,3) 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Silbernitratlösung (5%)	5% (w/v) Silbernitrat → vor Licht schützen
Stripping-Puffer:	100 mM β-Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 62,5 mM Tris HCl (pH 6,8)
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
TAE-Puffer (50x)	242 g/l Tris-Base 57,1 ml/l Eisessig 100 ml/l EDTA (500mM, pH 8,0)
Toluidinblau-Lösung (1%)	10 mg/ml Toluidinblau 10 mg/ml Natrium Tetraborat
Tris-Base (pH 7,4)	1 M Tris Base pH 7,4 (HCl)
Tris-Base (pH 8,8)	1 M Tris Base pH 8,8 (HCl)
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M Tris HCl pH 6,8 (HCl)
Waschpuffer	10 mM Tris-Base (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20

2.1.4 Medien und Zusätze für Bakterienkultur

Medien für die Kultivierung von Bakterien wurden in Übereinstimmung mit Sambrook et al. (Sambrook und Russel 2001) mit quarzbidestiliertem Wasser (H₂O_{dd}) vorbereitet und durch Autoklavieren für 20 Minuten bei einem Druck

von 15 psi sterilisiert. Temperatursensitive Komponenten wie z.B. Antibiotika wurden in getrennten Stammlösungen sterilfiltriert und dem Medium nach Abkühlung auf weniger als 50 °C zugegeben.

Medien für Bakterienkultur

LB ₀ -Medium (für <i>E. coli</i>): (Luria Bertani)	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Hefe Extrakt 10 g/l NaCl ad H ₂ O _{dd} pH 7,0 (NaOH)
für LB ₀ -Platten:	15 g/l Bacto Agar

Antibiotika Stammlösungen

Ampicillin Stammlösung (Amp):	100 mg/ml in 70 % EtOH
Chloramphenicol Stammlösung (Cm):	34 mg/ml in 70 % EtOH
Kanamycin Stammlösung (Kan):	50 mg/ml in H ₂ O _{dd}

Alle Antibiotika-Lösungen wurden sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert und bei Bedarf dem LB₀-Medium bei einer Temperatur von 50 °C oder weniger im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Agarplatten und Flüssigmedien wurden bei 4 °C gelagert.

2.1.5 Medien und Zusätze für Zellkultur

Medienzusätze für Zellkulturmedien wurden in getrennten Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert. D-PBS, FBS, Penicillin-Streptomycin Lösung und Trypsin wurden bereits steril, für Zellkulturanwendungen geeignet, bezogen. Die verwendete FBS Lot.Nr. wurde vor Verwendung auf gutes Zellwachstum und Proliferation getestet, für alle Arbeiten wurde die gleiche Lot.Nr. verwendet.

Medien für 293FT

Kulturmedium ohne Geneticin:	10% (v/v) FBS 1% Penicillin-Streptomycin Lösung 0,1 mM MEM-NEAA ad D-MEM
Kulturmedium mit Geneticin:	500 µg/ml Geneticin ad Kulturmedium
Einfriermedium:	10% (v/v) DMSO ad Kulturmedium → sterilfiltrieren

Medien für hMSCs

Kulturmedium:	10% (v/v) FBS 1% Penicillin-Streptomycin Lösung ad AlphaMEM
Einfriermedium:	5% (w/v) BSA 10% (v/v) DMSO ad Kulturmedium → sterilfiltrieren

Differenzierungsmedien für hMSCs

Basalmedium	10% (v/v) FBS 1% (v/v) Pen/Strep Lösung ad D-MEM
Adipogenes Induktionsmedium:	10% (v/v) FBS 1% (v/v) Pen/Strep Lösung 1 μ M Dexamethason 200 μ M Indomethacin 0,1 mg/ml Insulin 1 mM IBMX ad D-MEM → sterilfiltrieren
Adipogenes Erhaltungsmedium:	10% (v/v) FBS 1% (v/v) Pen/Strep Lösung 0,1 mg/ml Insulin ad D-MEM → sterilfiltrieren
Chondrogenes Differenzierungsmedium:	1% (v/v) Pen/Strep Lösung 100 nM Dexamethason 1 mM Natriumpyruvat 195 μ M L – Ascorbinsäure-2-Phosphat 350 μ M L - Prolin 1,25 % (v/v) ITS (100x) 5,35 μ g/ml Linolsäure 1,25 mg/ml BSA ad D-MEM → sterilfiltrieren 10 ng/ml TGF- β 3, immer frisch zugeben
Osteogenes Differenzierungsmedium:	10% (v/v) FBS 1% (v/v) Pen/Strep Lösung 100 nM Dexamethason 10 mM β – Glycerophosphat 50 μ M L – Ascorbinsäure-2-Phosphat ad D-MEM → sterilfiltrieren

Medien für HT1080

Kulturmedium:	10% (v/v) FBS 1% Penicillin-Streptomycin Lösung ad RPMI1640
Einfrriermedium:	10% (v/v) DMSO ad Kulturmedium → sterilfiltrieren

Medien für U2OS

Kulturmedium:	10% (v/v) FBS 1% Penicillin-Streptomycin Lösung ad McCoy's 5a Medium
Einfrriermedium:	10% (v/v) DMSO ad Kulturmedium → sterilfiltrieren

Weitere Zellkulturlösungen und Medienzusätze

Trypsin (1x)	10% (v/v) Trypsin (10x)
--------------	-------------------------

	ad D-PBS
Blasticidin-Stammlösung	10 mg/ml Blasticidin S HCl ad D-PBS → sterilfiltrieren
Doxycyclin-Stammlösung	1 mg/ml Doxycyclin ad D-PBS → sterilfiltrieren
Polybrene-Stammlösung	8 mg/ml Polybrene ad D-PBS → sterilfiltrieren

Alle Kulturmedien wurden bis zu 8 Wochen bei 4°C aufbewahrt, Differenzierungsmedien bis zu 4 Wochen. Die Medien für Kryokonservierung wurden immer frisch zubereitet. Zellkulturösungen und Medienzusätze wurden in kleinen Aliquots für bis zu 12 Monate, Blasticidin für 8 Wochen bei -20°C aufbewahrt. Die Aliquots wurden maximal dreimal aufgetaut und eingefroren, danach verworfen. Für die Blasticidinselektion und die Doxycyclin-Stimulation der Zellen wurden die Stammlösungen im Verhältnis 1:1000 in Kulturmedium verdünnt. Während der Transduktion der Zellen wurde die Polybrene-Stammlösung der Medium-Virus-Mischung im Verhältnis 1:1000 (8 µg/ml) bis 1:1333 (6 µg/ml) zugesetzt.

2.1.6 Kits

Bei der Verwendung von Kits wurden die jeweils von der Herstellerfirma empfohlenen und mitgelieferten Lösungen und Puffer eingesetzt.

Alliance HIV-1 P24 ANTIGEN ELISA Kit	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Cloned AMV First Strand cDNA Synthese Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DryEase Mini-Geltrocknungs Kit	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Plus Western Blot Detektions Kit	Amersham, Little Chalfont, UK
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNeasy Mini Kit mit QiaShredder	Qiagen, Hilden
ViraPower Lentiviral Expression System	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA

2.1.7 Enzyme

Bei der Verwendung von Enzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Lösungen und Puffer eingesetzt.

Alkalische Phosphatase, aus Kälberdarm (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
DNA-Polymerase I, Großes (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Gateway LR Clonase II Enzymmix	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum Taq DNA-Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNase freies DNase Set	Qiagen, Hilden
Taq DNA-Polymerase, Rekombinant	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Antikörper

Anti-GAPDH (IgM) aus Maus	Biotrend, Köln
---------------------------	----------------

Anti-GFP (IgG) aus Maus
 Anti-Maus IgM aus Ziege, HRP konjugiert
 Anti-Maus IgG aus Rind, HRP konjugiert

Invitrogen, Karlsruhe
 Santa Cruz Biotech., Heidelberg
 Santa Cruz Biotech., Heidelberg

2.1.9 Marker und Standards

100 bp DNA-Marker
 250 bp DNA-Marker
 1kb DNA-Marker
 Seeblue Plus2 Protein-Marker

Invitrogen, Karlsruhe
 Invitrogen, Karlsruhe
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Oligonukleotide

PCR Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zum Entwerfen der Primer und Ausrechnen der Schmelztemperatur (T_m) wurde das Programm Clone Manager zu Hilfe genommen. Die berechneten Annealing-Temperaturen der Primer liegen zwischen 50 °C und 60 °C. Es wurden, soweit möglich, die üblichen Regeln des Primerdesigns berücksichtigt: Zusammengehörende Primerpaare sollten in etwa die gleiche Schmelztemperatur über 50 °C haben, wobei für die Berechnung die überhängenden Enden nicht berücksichtigt werden. Mindestens 18 Basen sollten komplementär sein und der GC Gehalt sollte über 50 % liegen. Primer sollten mit G oder C enden und möglichst keine Sekundärstruktur ausbilden. Soweit nicht anders vermerkt, wurde die Konzentration sämtlicher Primer mit aqua ad iniectionabilia auf 10 pmol/μl eingestellt. Primer für die Klonierung der gewünschten DNA-Fragmente aus den Template Vektoren wurden in Abhängigkeit von den Zielvektoren entworfen, wobei die Restriktionsschnittstelle im nicht-komplementären Bereich, also im 5' überhängenden Ende des Primers liegt. Vor den eingebauten Restriktionsschnittstellen liegen 4-10 zufällig gewählte Basen, damit Restriktionsendonukleasen binden können. Die Position der Klonierungsprimer wurde durch die Lage der Anfangs und Endsequenzen der gewünschten DNA-Bereiche festgelegt.

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen, die für die PCR verwendete Annealingtemperatur (Bindungstemperatur), sowie die Größe des amplifizierten Produkts zusammengefasst:

Tabelle 6: Primer für PCR.

Template	Primersequenz	Annealing-temperatur (°C)	PCR-Zyklen	Produktgröße (bp)	Quelle
GAPDH	Vorwärts: 5'- CAACTACATGGTTTACATGTTTC-3' Rückwärts: 5'-GCCAGTGGACTCCACGAC-3'	50	30	181	(Takahashi et al. 2003)
EGFP	Vorwärts: 5'- CAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC -3' Rückwärts: 5'- CACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGG -3'	55	30	409	(Liu et al. 2004)
pLP2	Vorwärts: 5'-GACTGACCTGAGGTTGTACGCGGTTAGGAG-3' Rückwärts: 5'-GACTGACCTGAGGGCTGCAAGGCGATTAAG-3'	50	35	1099	Clone Manager

Kursiv gedruckte Nukleotide kennzeichnen die zufällig gewählten Basen und **rot** gedruckte Nukleotide die Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym (Bsu361).

Sequenzierprimer

Als Sequenzierprimer wurden die Primer für die Standardbindungsstellen in den jeweiligen Plasmiden ausgewählt. Sequenzierprimer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

LightCycler Primer Sets

Für die quantitative PCR in der LightCycler II Maschine wurden speziell entwickelte und optimierte Primersets von der Firma Search-LC (Heidelberg) erworben. Diese enthalten das jeweilige Primerpaar in einer optimalen $MgCl_2$ Konzentration, einen quantifizierten Standard, eine Standard Stabilisierungslösung zur Verdünnung des Standards, hochreines PCR Wasser und eine cDNA Mischung aus mehreren humanen Zelllinien und 20 unterschiedlichen Geweben. Die Primer sind gebrauchsfertig für die Verwendung mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I. In dieser Arbeit wurden folgende Primersets verwendet:

- Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
- Enhanced green fluorescent protein (EGFP)
- Blastocidin-S-deaminase (BSD)

2.1.11 Bakterienstämme

Die kompetenten Zellen wurden nach einer patentierten Modifikation der Methode von Hanahan hergestellt (Hanahan 1983).

One Shot TOP10 chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG
 Beschreibung: TOP10 *E.coli*-Zellen sind ideal für hocheffiziente Klonierung und Plasmid Vermehrung und ermöglichen stabile Replikation von Plasmiden mit einer hohen Kopienzahl.

RapidTrans TAM1 chemisch kompetente *E.coli* (Active Motif, Rixensart, B)

Genotyp: mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
 Beschreibung: RapidTrans TAM1-Zellen sind hocheffiziente kompetente *E. coli* die die stabile Replikation von Plasmiden mit einer hohen Kopienzahl erlauben.

Library efficiency DB3.1 kompetente *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^- , m_B^-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^R) xyl-5 λ^- leu mtl1
 Beschreibung: Diese Zellen enthalten das gyrA462 Allel welches den Stamm resistent gegen die toxischen Effekte des *ccdB* Gens macht. Sie können verwendet werden für die Vermehrung von Plasmiden die das *ccdB*-Gen enthalten, wie die Gateway Plasmide von Invitrogen.

One Shot Stbl3 chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F- mcrB mrr hsdS20(r_B^- , m_B^-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ^- leu mtl-1 endA1+
 Beschreibung: Der Stbl3 *E.coli* Stamm wurde entwickelt für die Klonierung von DNA mit direkten Wiederholungen wie in lentiviralen Expressionsvektoren. Anders als TOP10 *E.coli* reduzieren diese Zellen die Häufigkeit von ungewollten homologen Rekombinationen von langen

endständigen Wiederholungen (LTRs) wie sie in ViraPower lentiviralen und anderen retroviralen Vektoren vorkommen.

2.1.12 Eukaryote Zellen und Zelllinien

293FT (Invitrogen, Karlsruhe)

Zelltyp: Genetisch modifizierte humane embryonale Nierenzellen
Quelle: Gewonnen aus der humanen 293F primären embryonalen Nierenzelllinie.
Beschreibung: Epitheliale, adhärenente Zelllinie. Die 293FT Zelllinie ist besonders gut geeignet für die Produktion von lentiviralen Vektoren. Sie exprimieren konstitutiv das große T-Antigen von SV40 aus pCMVSPORT6Tag.neo unter Kontrolle des CMV-Promotors (vgl. 2.1.1.2).

hMSC (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA)

Zelltyp: humane mesenchymale Stammzellen
Quelle: Gewonnen und kultiviert aus humanem Knochenmark.
Beschreibung: Der Reinheitsgrad der Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie getestet. Die Fähigkeit der Zellen in die osteogene, chondrogene und adipogene Linie zu differenzieren wurde überprüft. Die Zellen sind positiv für CD105, CD166, CD29 und CD44, negativ für CD14, CD34 und CD45. In dieser Arbeit wurden Zellen zwei verschiedener Spender verwendet (Lot. Nr.: 2F1656, 4F0760).

HT1080 (LGC Promochem, Wesel)

Zelltyp: Fibrosarkom Zelllinie
Quelle: Gewonnen aus einem Bindegewebstumour eines 35 jährigen Kaukasiers.
Beschreibung: Epitheliale, adhärenente Zelllinie etabliert aus einem Fibrosarkom. Die Zellen bilden in immunsuppremierten Mäusen Tumore aus. Die Zellen enthalten ein aktiviertes *N-ras* Onkogen. Pseudodiploidität wurde häufig beobachtet. Etwa 40% der Zellen haben neu angeordnete Karyotypen mit einem extra Gruppe E Chromosom und ein fehlendes Gruppe C Chromosom. Die Zellen zeichnen sich durch eine hohe Transduktionseffizienz aus und werden als Kontrollzellen für Transduktionsstudien empfohlen.

U2OS (LGC Promochem, Wesel)

Zelltyp: Osteosarkom Zelllinie
Quelle: Gewonnen aus einem Knochentumor in der Tibia eines 15 jährigen kaukasischen Mädchens.
Beschreibung: Epitheliale, adhärenente Zelllinie etabliert aus einem Osteosarkom. Die U2OS Zelllinie ist chromosomal stark verändert, mit Chromosomen-zahlen im hypertriploiden Bereich. Sehr wenige normale Chromosomen sind vorhanden, aber unter den Veränderten gibt es einige stabile Markerchromosomen. Die Zellen lassen sich leicht transfizieren.

2.1.13 Plasmide

pUC19, Länge 2,7 kb (Invitrogen, Karlsruhe)

Das pUC19-Plasmid enthält eine flexible Klonierungsstelle (Polylinker, MCS) und ein Ampicillin-Resistenzgen. Zusätzlich enthält es das β -Galactosidase-Gen für die Identifizierung von rekombinanten Klonierungsprodukten. Das pUC19-Plasmid wird in dieser Arbeit als Positivkontrolle für die Transformation kompetenter *E.coli* verwendet.

pTRE-tight, Länge 2,6 kb (Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, F)

In dieser Arbeit wird eines der verbesserten Tet-On Systeme verwendet (vgl. 1.2.2). Es handelt sich dabei um das pTRE-tight-Plasmid von Clontech, welches den P_{tight} -Promotor (TRE_{tight}) verwendet, der aus einem optimierten Tetrazyklin reaktivem Element (TRE_{mod}), sowie einem minimalen CMV-Promotor (P_{minCMV}) besteht. Dieser ist im Vergleich zu den traditionellen Tet-ON Systemen durch eine extrem geringe Basalaktivität sowie hohe maximale Induzierbarkeit gekennzeichnet. Das Plasmid trägt außerdem ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter *E.coli*, sowie den Col E1 ori Replikationsursprung.

pTet-On, Länge 7,4 kb (Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, F)

Das pTet-On-Plasmid exprimiert den reversen Tetrazyklin empfindlichen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des starken CMV-Promotors. tTA ist eine Fusion der Aminosäuren 1-207 des tet Repressors (TetR) und der negativ geladenen C-terminalen Aktivierungsdomäne (130 Aminosäuren) des VP16-Protein des Herpes Simplex Virus. pTet-On ist identisch zu pTet-Off, außer für vier Aminosäure Substitutionen, die den TetR in den rTetR und somit tTA in rtTA ändern (pTet-Off enthält außerdem einige stille Mutationen). pTet-On wurde ursprünglich als pUHD17-1neo von Gossen et al. beschrieben (Gossen et al. 1995). pTet-On kann mittels HindIII Restriktionsverdau von pTet-Off unterschieden werden.

Der pTet-On-Vektor wird verwendet um stabile Tet-On Zelllinien zu generieren. Nachdem ein Vektor, welcher ein Gen unter Kontrolle eines Tetrazyklin empfindlichen Elements (TRE) trägt, in eine Tet-On Zelllinie transfiziert wird, bindet rtTA an TRE und aktiviert dadurch die Transkription in der Anwesenheit von Doxycyclin (Dox). Wenn Dox aus dem Kulturmedium entfernt wird, wird die Transkription von TRE in einer stark konzentrationsabhängigen Weise abgestellt.

pEGFP-N3, Länge 4,7 kb (Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, F)

pEGFP-N3 kodiert eine in das rote Spektrum verschobene Variante des wildtyp GFP (Prasher et al. 1992), welche für hellere Fluoreszenz und stärkere Expression in humanen und Säugetierzellen optimiert ist (Anregungsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm). pEGFP-N3 kodiert für die GFPmut1 Variante (Cormack et al. 1996), die einen doppelten Aminosäureaustausch enthält: F64L und S65T. Die kodierende Sequenz des *egfp* Gens enthält mehr als 190 stille Mutationen, die der bevorzugten humanen Codonverwendung entsprechen. Die flankierenden Sequenzen wurden in eine Kozak Sequenz geändert (Kozak 1987), um die Translationseffizienz in eukaryoten Zellen noch weiter zu erhöhen.

pENTR11, Länge 2,7 kb (Invitrogen, Karlsruhe)

Das pENTR11-Plasmid erlaubt die Klonierung eines Gens von Interesse mittels Restriktionsendonukleasen in einen Vektor, als Zugang in das Gateway-System von Invitrogen (Eingangsvektor).

Das Plasmid enthält die *rrnB* T1 und T2 Transkriptions-Terminations-Sequenzen, um die Basalexpression des klonierten Gens in *E.coli* zu verhindern (Orosz et al. 1991), um mögliche Toxizität zu reduzieren. Die *attL1* und *attL2* Bereiche ermöglichen die gerichtete Rekombination des Eingangsvektors mit einem Gateway Zielvektor (Landy 1989). Eine Kozak-Sequenz ermöglicht effiziente Initiation der Translation in eukaryoten Systemen (Kozak 1987). Das *ccdB*-Gen, welches zwischen den beiden *attL* Bereichen liegt, macht eine negative Selektion der

Expressionsklone möglich. Ein Kanamycin-Resistenzgen ermöglicht ebenfalls die Selektion des Plasmids in *E.coli*. Der Vektor enthält einen pUC Replikationsursprung, der die Replikation in hoher Kopienzahl in *E.coli* ermöglicht. Um den pENTR11-Vektor erhalten und vermehren zu können, müssen DB3.1 kompetente Zellen für die Transformation verwendet werden, da dieser spezielle *E.coli* Stamm resistent gegen die toxischen Effekte des *ccdB* Gens ist. Für die Gateway Klonierung muss das klonierte Gen das *ccdB*-Gen zwischen den beiden attL Stellen ersetzen.

pLenti6/V5-DEST, Länge 8,7 kb (Invitrogen, Karlsruhe)

Der pLenti6/V5-DEST-Vektor ist ein Zielvektor, geeignet für die Verwendung mit der Gateway Technologie von Invitrogen. Er ist so entworfen, dass bei der Verwendung von Invitrogen's ViraPower lentiviralem Expressionssystem eine Expression von rekombinanten Fusionsproteinen auf hohem Niveau in humanen und Säugetierzellen möglich ist. Die für das virale System relevanten Merkmale wurden bereits ausführlich dargestellt (vgl. 2.1.1.2). Deshalb werden hier nur die für die Klonierung relevanten Merkmale erläutert.

Um die Rekombination des Gens von Interesse aus einem Eingangsklon zu ermöglichen befinden sich unterhalb des CMV-Promotors die zwei Rekombinationsbereiche *attR1* und *attR2*. Zwischen diesen befindet sich ein Chloramphenicol-Resistenzgen (Cm^R), welches die Kontra-Identifizierung von Klonen ohne Transgen ermöglicht. Das *ccdB*-Gen, welches sich ebenfalls zwischen den *attR* Bereichen befindet, erlaubt die negative Selektion von Klonen ohne Insert, und das C-terminale V5 Epitop kann verwendet, werden um Fusionsproteine mittels eines anti-V5 Antikörpers zu detektieren (Southern et al. 1991). Die Expression des Blastocidin-Resistenzgen wird neben dem eukaryotischen Promotor auch von dem prokaryotischen EM7-Promotor angetrieben. Da Blastocidin die Proteinbiosynthese sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten inhibiert, ist die Blastocidinselektion ebenfalls in *E.coli* möglich. Der Vektor enthält außerdem ein Ampicillin-Resistenzgen und einen pUC Replikationsursprung für die Selektion und Replikation in hoher Kopienzahl in *E.coli*.

Um den pLenti6V5-DEST-Vektor erhalten und vermehren zu können, müssen DB3.1 kompetente Zellen für die Transformation verwendet werden, da dieser spezielle *E.coli* Stamm resistent gegen die toxischen Effekte des *ccdB* Gens ist. Nach der Gateway Klonierung ersetzt das klonierte Gen das *ccdB*-Gen und das Cm^R -Gen zwischen den beiden attR Bereichen.

Für diesen Vektor wird der Stbl3 *E.coli* Stamm für die Transformation empfohlen, da dieser Stamm besonders gut geeignet ist für die Klonierung von DNA, welche direkte Wiederholungen enthält, wie die LTRs der viralen DNA.

Packaging-Mix Plasmide pLP1, pLP2 und pLP/VSVG

Die Eigenschaften der Packaging-Mix Plasmide pLP1, pLP2 und pLP/VSVG wurden bereits ausführlich dargelegt (vgl. 2.1.1.2). Die isolierten Plasmide wurden freundlicherweise von Georg Malterer, Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München, Pettenkofer Straße 9a, 80336 München zur Verfügung gestellt.

2.1.14 Laborgeräte

-80°C Gefrierschrank, Typ 6485
Analysenwaage, Typ 770-12
Analysenwaage, Typ GJ4100-2M
Analysenwaage, LC621P

GFL, Burgwedel
Kern, Balingen
Kern, Balingen
Sartorius, Göttingen

Dampfsterilisator, Typ Varioklav 300E
 Digitalkamera, Typ DSC-S75
 Durchflußzytometer, Typ BD FACSCanto
 Einfrierbox für Kryoröhrchen, Typ "Mr. Frosty"
 Eismaschine, Typ TC401-C
 Elektrophoresekammer, Typ A5, B1, B2
 Elektrophoresekammer, Typ 40-0708
 Elektrophoresekammer, Typ Mini Protean 3
 Elektrophorese Spannungsquelle, Typ E 802
 Elektrophorese Spannungsquelle, Typ E 132
 Filmentwickler
 Geldokumentationssystem, Typ Gel iX Imager
 Glassküvetten für Objektträger
 Hybridisierungsöfen, Typ HB-1000
 Inkubator, Typ BE 40
 Kryostat, Typ Vacutome HM 200 OM
 Kühlblock, Typ Labtop Cooler (-20°C)
 Kühl-Gefrier-Kombination, Typ 561284
 Kühlzentrifuge, Typ BR4i, Rotor AB2.14
 Kühlzentrifuge, Typ CT422
 Kühlzentrifuge, Typ Megafuge 1.0R, Rotor 2704
 LightCycler II
 LightCycler Zentrifugenadapter
 Magnetrührer, Typ RCT-B
 Mikroskop, Typ Axiovert S100
 mit AxioCam, Typ MR
 Mikrotiterplatten-Photometer,
 Typ Digiscan 400
 Mikrowellenherd, Typ HZ86 B000
 Mikrozentrifuge, Typ GMC-060
 Mini Trans-Blot Zelle
 Minizentrifuge, Typ MCF-2360
 Mischer Vortex-Genie 2, Typ G-560E
 Mischer, Typ REAX 1R
 Neubauer Zählkammer
 Ofen, Typ EU53 Poupinel
 PCR Thermocycler, Typ PTC-200
 mit Alpha Unit Block 1 x 96 und 2 x 48
 PCR Werkbank, Typ Captair Bio
 pH-Meter, Typ pH525
 Pipette, Typ DISTRIMAN
 Pipette, Typ Mehrkanal 300 µl
 Pipette, Typ Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000 µl,
 10 ml
 Pipettierhilfe, Typ Pipetus-akku
 Pipettierhilfe, Typ Pipetting Aid
 Röntgenfilmkassette, Typ Hypercassette
 Duran Glassware (Flaschen, Trichter, etc.)
 Schüttelinkubator, Typ Inkubator 1000
 mit Unimax 1010
 Schüttelinkubator, Typ Certomat HK
 mit Certomat R
 Schüttler, Typ Rotamax 120
 Sicherheitswerkbank, steril, Typ HS12/2
 Spektrophotometer, Typ Biophotometer
 mit Thermodrucker DPU414
 H+P Labortechnik, Oberschleißheim
 Sony, Berlin, Germany
 BD Biosciences, San Jose, CA, USA
 Nunc, Wiesbaden
 Tritec, Hannover
 Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
 Peqlab, Erlangen
 Bio-Rad, Mannheim
 Consort, Turnhout, B
 Consort, Turnhout, B
 Kodak, Stuttgart
 Intas SII, Göttingen
 VWR, Darmstadt
 UVP, Cambridge, UK
 Memmert, Schwabach
 Microm, Walldorf
 Nunc, Wiesbaden
 Liebherr, Ochsenhausen
 Jouan, Unterhaching
 Jouan, Unterhaching
 Heraeus, Hanau
 Roche, Grenzach-Wyhlen
 Roche, Grenzach-Wyhlen
 IKA, Staufen

 Carl Zeiss, Berlin

 ASYS Hitech, Eugendorf, A
 Siemens, München
 Daihan Labtech, Namyangju, KR
 Bio-Rad, Mannheim
 LMS, Tokyo, J
 Scientific Industries, New York, NY, USA
 Heidolph, Schwabach
 Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
 Jouan, Unterhaching

 Bio-Rad, Mannheim
 Erlab, Köln
 WTW, Weilheim
 Gilson, Middleton, WI, USA
 Eppendorf, Hamburg

 Gilson, Middleton, WI, USA
 Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
 Gilson, Middleton, WI, USA
 Amersham, Little Chalfont, UK
 Schott Duran, Mainz

 Heidolph, Schwabach

 B. Braun, Melsungen
 Heidolph, Schwabach
 Heraeus, Hanau
 Eppendorf, Hamburg
 Seiko Instruments, Neu-Isenburg

Stickstoff Aufbewahrungstank,
 Typ Thermolyne Locator JR
 Stickstoff Vorratstank, Typ XL-120
 Stoppuhr, Typ Labtimer
 Thermomixer, Typ comfort mit Thermoblock für
 1,5 ml, 15 ml, 50 ml
 Tischzentrifuge, Typ 5415D
 Tischzentrifuge, Typ Biofuge pico
 Ultraschall-Generator, Typ Branson sonifier
 UV Leuchttisch, Typ TFX-35.M 312 nm
 Vakuumkonzentrator, Typ RC10-10 mit
 Vakuum Pumpe, Typ AEPF63BL-4-SO
 Wasserbad, Typ 1012
 Zellkultur-Inkubator, Typ IG150
 Zellkultur-Mikroskop, Typ Diavert
 Zellkultur-Sicherheitswerkbank, steril,
 Typ Antares 72
 Zellkultur-Vakuum Pumpe, Typ VDE0530
 Zellkultur-Zentrifuge, Typ Univ. 16R, Rotor 1624

Barnstead Int., Dubuque, IA, USA
 Taylor-Wharton Harsco, Mildstedt
 Oregon Scientific, Neu-Isenburg

Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
 Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, F
 Jouan, Unterhaching
 ATMA, Schwarzenbach/Saale
 GFL, Burgwedel
 Jouan, Unterhaching
 Leitz, Wetzlar

Heraeus, Hanau
 Neuberger, Freiburg
 Hettich, Tuttlingen

2.1.15 Verbrauchsmaterial

Alufolie, Typ Universal 30
 Deckgläser 24 x 50 mm
 Faltenfilter, div. Typen
 Filterpapier, Typ Mini Trans-Blot
 Glasobjektträger, Typ SuperFrost Plus
 Handschuhe, Typ Sempercare edition
 Handschuhe, Typ Sempercare nitrile
 Kanülen, Typ Microlane 3
 Kryoröhrchen ,1,0, 1,8 ml
 LightCycler Kapillaren, Typ 20µl
 Mikrotiterplatten, Typ 96-well
 Mikroliter Spritze, Typ Hamilton 1705 RN
 Parafilm, Typ M
 Paraflex Einbettwannen
 Pasteurpipetten, Typ Glass, lang
 PCR Reaktionsgefäße, 0,2 ml
 Petrischalen Ø10 cm
 Photometer Polystyrol Küvetten, 1,5ml
 Photometer Küvetten, Typ UVette
 Pipettenspitzen, 10 µl kurz, lang
 Pipettenspitzen, 10 ml
 Pipettenspitzen, 200, 1000 µl
 Pipettenspitzen, 300 µl
 Pipettenspitzen mit Filter, 10, 20, 200, 1000 µl
 Pipettenspitzen, Typ DistriTips 125 µl,
 1250 µl, 12,5 ml
 Plastikspritzen, Typ BD DiscarditII 2, 5, 10, 20 ml
 Plastikspritzen, Typ BD Plastipak, 50 ml
 Polycarbonat Membranfilter, Porengröße 8 µm
 Polystyrol Petrischalen, Ø 94 mm
 Polystyrol Rundboden Röhrchen, 5 ml
 PVDF-Membran
 Reagensgefäße, Kunststoff 15, 50 ml
 Reaktionsgefäße, Kunststoff 0,5, 1,5, 2,0 ml
 Röntgenfilme, Typ Lumi-Film

VWR, Darmstadt
 Menzel, Braunschweig
 Schleicher & Schuell, Dassel
 Bio-Rad, Mannheim
 Menzel, Braunschweig
 Semperit Techn. Prod., Wien
 Semperit Techn. Prod., Wien
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Nunc, Wiesbaden
 Roche, Grenzach-Wyhlen
 Nunc, Wiesbaden
 Hamilton, Bonaduz, CH
 Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
 IMEB, Chicago, IL, USA
 Brand, Wertheim
 Biozym, Oldendorf
 Greiner Bio-one, Frickenhausen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Eppendorf, Hamburg
 Gilson, Middleton, WI, USA
 Gilson, Middleton, WI, USA
 Sarstedt, Nümbrecht
 Eppendorf, Hamburg
 VWR international, Darmstadt

Gilson, Middleton, WI, USA
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Costar, Pleasant, CA, USA
 Greiner, Solingen
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Roche, Grenzach-Wyhlen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Roche, Grenzach-Wyhlen

Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml
 Skalpelle, #11
 Spritzenaufsatzfilter, Typ Millex GP 0,22, 0,45 µm
 Zellkulturflaschen, 25, 75, 150, 225 cm²
 Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48-, 96-well
 Zellkulturschalen, Ø 6, 10cm
 Zellschaber

Sarstedt, Nümbrecht
 Feather Safety Razor, Osaka, Japan
 Millipore, Eschborn
 Nunc, Wiesbaden
 Nunc, Wiesbaden
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht

2.1.16 Zusätzliches Material

Bacillol AF
 Biocidal
 DNA Remover
 Kohlendioxid Gas
 Mycoplasma Off

Bode-Chemie, Hamburg
 WAK Chemie, Steinbach Ts.
 Minerva Biolabs, Berlin
 Linde, Pullach
 Minerva Biolabs, Berlin

2.1.17 Computerprogramme und Web tools

Adobe Illustrator CS
 Adobe Photoshop CS
 AxioVision, Version 4 SP1
 BD FACSDiva, Version 4
 Chromas Lite, Version 2
 Clone Manager, Version 7
 LightCycler Software, Version 3
 MikroWin 2000
 MS Office 2003
 Sigmaplot, Version 8
 Vector NTI Advance, Version 10

Adobe Systems, München
 Adobe Systems, München
 Carl Zeiss, Berlin
 BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<http://www.technelysium.com.au/>
 Sci Ed Software, Cary, NC, USA
 Roche, Grenzach-Wyhlen
 Mikrotek, Overath
 Microsoft, Unterschleißheim
 SPSS, München
 Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Bei allen mikrobiologischen Arbeiten und zur Anzucht wurden sterile Geräte und Lösungen verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur in einer sterilen Sicherheitswerkbank gearbeitet. Die Arbeiten wurden in Anlehnung an Sambrook (Sambrook und Russel 2001) durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Plattenkulturen

Agarplatten wurden je nach Bedarf vor dem Giessen mit Antibiotikum versetzt. Die Anzucht der *E. coli* Stämme erfolgte durch Animpfen mittels eines sterilen Zahnstochers oder einer Impföse aus einer kryokonservierten Glycerinkultur, einer Einzelkolonie oder direkt durch ausplattieren von 20 - 200 µl eines Transformationsansatzes mit einem sterilen Drygalski-Spatel. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C oder für zwei Tage bei 25 °C im Brutschrank mit dem Boden nach oben inkubiert.

Flüssigkulturen

Flüssiges LB₀ Medium wurde bei Bedarf mit Antibiotikum versetzt. Kleine Volumina (≤ 5ml) wurden mit einer Einzelkolonie von Plattenkulturen mittels Impföse oder sterilem Zahnstocher angeimpft, größere Volumina aus

stationären Übernachtskulturen in einer 1:500 bis 1:1000 Verdünnung und bis zur gewünschten Zelldichte (12 – 24h) bei 37 °C inkubiert. Kleinere Ansätze (bis 5 ml) wurden in Reagenzgläsern im Schüttelinkubator (bei 200 – 300 U/min), größere Volumina in Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator (mit 150 - 250 U/min) inkubiert. Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine E_{600} (Extinktion bei 600 nm) mit dem Wert 1 entspricht ca. 8×10^8 *E. coli*-Zellen pro ml Kultur.

Aufbewahrung der Bakterienkulturen

Agarplatten und Flüssigkulturen wurden, mit Parafilm versiegelt, für begrenzte Zeit bei 4°C gelagert. Für die Langzeitaufbewahrung wurden Bakterienkulturen in entsprechendem LB-Selektionsmedium als Glycerinkulturen bei -80°C gelagert. Hierzu wurden aus einer frischen, stationären Übernachtskultur 600 µl entnommen, in Kryoröhrchen mit 300 µl sterilem Glycerin (50% v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Bei allen molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Geräte und Lösungen verwendet. Die Arbeiten wurden in Anlehnung an Sambrook (Sambrook und Russel 2001) durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Das verwendete Wasser zum Eluieren und Lösen von DNA, sowie in Enzymansätzen war in der Regel Aqua ad iniectionabilia.

2.2.2.1 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Transformation der Zellen erfolgte mittels Hitzeschock nach einer vereinfachten Vorschrift von Hanahan (Hanahan 1983). Nach Auftauen auf Eis wurden zu je 50 µl Zellsuspension 0,5 - 5 µl gereinigtes Plasmid bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben und vermischt. Bei jeder Transformation wurden 10 pg pUC19-Plasmid als Positivkontrolle in einem separaten Ansatz mit transformiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad unterzogen, wieder für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC Medium bei 37°C unter leichtem Schütteln (250 Upm) in einem Thermomixer für 60 Minuten inkubiert. Dann wurden 20 - 200 µl des Ansatzes mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf Selektionsplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C mit dem Boden nach oben über Nacht inkubiert.

2.2.2.2 Isolierung und Reinigung von DNA

Plasmid-Cracking

Mit dem „Plasmid-Cracking“ können Plasmid tragende Bakterienkolonien schnell und in großer Anzahl identifiziert werden. Hierbei dient die Plasmidgröße als Merkmal, um Plasmide mit inseriertem Genfragment, d. h. die gesuchten Transformanten, zu erkennen. Die Qualität und Reinheit der erhaltenen Plasmid-DNA ist nicht ausreichend für weitergehende Anwendungen und muss mittels Gelextraktion verbessert werden.

Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher oder Impföse von der Agarplatte gepickt und direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestrichen, oder eine 1,5 ml Flüssigkultur nach 3-6 h Inkubation bei 13.000 Upm für 1 min zentrifugiert und in 50 µl EDTA-Lösung (10mM) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 2x Cracking-Puffer wurden

die Ansätze gemischt, 10 min bei 70 °C im Thermomixer inkubiert und nach Abkühlen auf RT 2-3 min gründlich gevortext. 20 µl der erhaltenen Lösung wurden auf ein 1 % Agarose Gel aufgetragen. Als negative Kontrolle wurde das entsprechende leere Plasmid aufgetragen, das sich durch sein Laufverhalten im Agarose Gel von den Plasmiden mit inserierten Fragmenten unterscheiden lässt. Die Größe der Fragmente muss hierfür mehr als 500 Basenpaare betragen.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Protokolle für die Plasmid-Isolierung basieren auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979; Le Gouill et al. 1994), gefolgt von einer Aufreinigung mittels einer Anionen-Tauscher Säule. Zur Gewinnung von reiner Plasmid-DNA wurde eine Präparation mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) aus 2 - 5 ml *E. coli* ÜN-Kulturen durchgeführt. Zur Präparation größerer Mengen Endotoxin freier Plasmid-DNA für die Transfektion aus 200 – 300 ml Bakterienkultur kam der EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden) zum Einsatz. Alle Kits wurden mit Lösungen und Protokoll des jeweiligen Herstellers verwendet. Die Elution bei der Mini-Präparation erfolgte in Regel in 50 µl H₂O (ad iniectionabilia), wobei das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt verwendet wurde um die Ausbeute zu erhöhen. Die Resuspension bei der Maxi-Präparation erfolgte in der Regel in 500 µl Endotoxin freiem TE Puffer Die DNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfüllt analytische, sowie präparative Aufgaben. Sie dient der Analyse von PCR Reaktionen, Qualitätskontrolle, Konzentrationsabschätzung, der Suche nach Transformanten mit korrekten Vektoren und zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten, durch eine Auftrennung nach ihrer Form und Größe. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 0,7 – 2%ige Agarosegele verwendet, wobei sich die Agarosemenge nach der Größe der gesuchten Fragmente richtet. Bei Fragmentgrößen zwischen 5 kb und mehr wurden 0,7%, bei 0,5 kb bis 5 kb 0,7% bis 1,5% und bei weniger als 0,5 kb 1,5% bis 2% verwendet. Für die Gelherstellung wurde TAE Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf 60°C mit 2 µl/100 ml Ethidiumbromidlösung (1%) versetzt. Für analytische Gele wurden bis zu 500 ng, für präparative Gele, soweit vorhanden, mehr als 500 ng DNA verwendet. Zu den DNA-Proben wurden 10 % (v/v) 10x BlueJuice DNA-Auftragspuffer oder, bei Fragmenten mit einer Länge von weniger als 200 bp 17% (v/v) 6x Orange Loading Dye DNA-Auftragspuffer gegeben. Die Ansätze wurden je nach Größe der erwarteten Fragmente zusammen mit den 100bp, 250 bp oder 1kb DNA-Größenstandards auf das erstarrte Gel aufgetragen und mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 5 - 7 V/cm für 30 - 60 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus dem Gel wurde es anschließend auf einem UV-Leuchttisch (302 nm) betrachtet, die Dokumentation erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems.

Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um linearisierte Plasmide, DNA-Fragmente oder PCR Produkte zu reinigen, wurden diese in präparativen Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Banden wurden unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Prinzip der Gelextraktion

beruht auf dem Auflösen der Agarose und der Bindung der enthaltenen DNA an Glassoberflächen (Vogelstein und Gillespie 1979). In dieser Arbeit erfolgt die Aufreinigung der DNA aus den Gelstücken mittels Siliziumgel Säulen aus dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel (Düren) mit Lösungen und nach dem Protokoll des Herstellers. Die finale Elution wurde mit 30 µl H₂O (ad iniectionabilia) durchgeführt, wobei das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt verwendet wurde, um die Ausbeute zu erhöhen. Die DNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

Reinigung von DNA mit dem NucleoSpin Extract II Kit

Wenn keine Gelelektrophorese erfolgte, wurde zur Entfernung von Primern und Enzymen und zur Entsalzung nach PCR, Restriktions- und Enzymansätzen eine Reinigung der DNA mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Elution erfolgte in 50 µl H₂O (ad iniectionabilia), wobei das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt verwendet wurde, um die Ausbeute zu erhöhen. Die DNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Fällung von DNA

Wenn keine Gelelektrophorese oder Säulchenreinigung erfolgte, wurde zur Entfernung von Primern und Enzymen und zur Entsalzung nach PCR, Restriktions- und Enzymansätzen eine Reinigung der DNA, DNA-Fragmente oder PCR Produkte mittels Ethanol-fällung durchgeführt. Dies wurde auch durchgeführt, um gegebenenfalls die Konzentration von besonders schwachen Proben zu erhöhen. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 10% Natriumacetatlösung (3 M, pH 5,2) versetzt und 2,5 Volumen eiskalter (-20 °C) Ethanol zugegeben. Bei DNA-Fragmenten mit einer Länge von weniger als 1 kb wurde zur Erhöhung der Ausbeute zusätzlich Glycogen als Trägersubstanz in einer Endkonzentration von 0,2 – 0,4 µg/µl zugegeben. Die Proben wurden gut gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert, gefolgt von einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4°C mit 14.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in dem 5-fachen Volumen der ursprünglichen Probe mit 70% Ethanol gewaschen, um verbleibende Salzreste zu lösen. Nach einer Zentrifugation für weitere 10 Minuten bei 14.000 Upm und 4°C wurde der Überstand vollständig entfernt und das DNA-Pellet in einem Vakuum Konzentratoren für 10 – 20 Minuten getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in einem geeigneten Volumen H₂O (ad iniectionabilia) oder TE Puffer gelöst.

Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrad von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration kann mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgen. Eine OD₂₆₀ mit dem Wert 1 entspricht ca. 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Probe. Das Verhältnis zwischen der Messung bei 260 nm und 280 nm ermöglicht eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäuren. Reine DNA sollte ein E₂₆₀/E₂₈₀ Verhältnis von etwa 1,8 haben. Protein Verunreinigung reduziert diesen Wert (Manchester 1995; Wilfinger et al. 1997). Die Absorption bei 230 nm zeigt Verunreinigungen von z.B. Kohlenwasserstoffen, Peptiden, Phenolen oder aromatischen Verbindungen. Das E₂₆₀/E₂₃₀ Verhältnis sollte in reinen Proben größer als 2,0 sein. Eine eventuelle Trübung der Lösung kann korrigiert werden, durch die Verwendung der Hintergrundkorrektur des E₃₂₀ Wertes, der für reine Proben null sein sollte. Besonders unreine oder sehr schwach konzentrierte Proben wurden nochmals mittels des NucleoSpin Extract II Kits oder Ethanol-fällung gereinigt bzw. konzentriert.

2.2.2.3 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierung von gereinigter Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) unter Standardbedingungen nach dem Prinzip der Dideoxynukleotid-Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzieransätze erfolgte in einem automatisierten ABI Prism 3730 Kapillarsequencer. Die Analyse der von Sequiserve erhaltenen Chromatogramme erfolgte mittels der kostenlosen Software Chromas Version 2.

2.2.2.4 Isolierung und Reinigung von RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden in einer hochreinen RNase freien Umgebung durchgeführt. Bei allen Arbeiten mit RNA wurde soweit möglich zertifizierte, RNase freie Plastikware und Lösungen verwendet. Zum Pipettieren wurden Filterspitzen verwendet. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation. Für die Herstellung von RNase freiem Wasser und Lösungen (außer Tris Puffer, für die DEPC behandeltes Wasser verwendet wurde) wurden diese mit 0,1% DEPC versetzt und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert, danach autoklaviert, wobei das DEPC zerfällt. Wieder verwendbare Plastikware, sowie Elektrophoresewannen, wurden nacheinander mit 0,1 M NaOH, 1mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS gewaschen, dann mit DEPC-Wasser und Ethanol gespült und luftgetrocknet. Glass- und Porzellanmaterial wurde mit 0,5% (w/v) SDS gewaschen, gespült mit DEPC-Wasser und über Nacht bei 240°C im Ofen gebacken. Soweit möglich wurde immer auf Eis bzw. gekühlt gearbeitet.

Isolierung und Reinigung der gesamt-RNA aus kultivierten eukaryoten Zellen.

Die Isolierung und Reinigung von RNA aus Zellen erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Präparation-Kit von Qiagen, laut Anweisungen des Herstellers. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Lyse der adhärenen Zellen direkt in den Zellkulturgefäßen. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit dem gleichen Kulturvolumen D-PBS gewaschen. Nach der Zugabe des Lysepuffers (RLT) wurde das Lysat mittels eines Zellschabers gesammelt und zum homogenisieren auf eine QiaShredder Säule pipettiert. Zum Entfernen von Spuren genomischer DNA wurde der optionale DNase Verdau mit dem RNase freien DNase Set von Qiagen durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 µl RNase freiem Wasser, wobei das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt verwendet wurde um die Ausbeute zu erhöhen. Die RNA wurde anschließend direkt verwendet oder für kurze Zeit (bis 4 Wochen) bei -20°C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese der RNA dient dem Überprüfen der Integrität und der Auftrennung entsprechend der Größe der enthaltenen RNA-Fragmente. Die einzelnen ribosomalen RNA-Fragmente sollten hierbei als deutliche, scharfe Banden zu erkennen sein. Das sichtbare Verhältnis der 28S rRNA zu der 18S rRNA sollte etwa 2:1 betragen. Wenn die ribosomalen Banden nicht scharf, sondern in die Richtung der kleineren RNAs verschmiert sind, ist es in der entsprechenden RNA-Probe zu Degradierung gekommen. Für RNA wurde eine modifizierte Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Für ein 1,2% RNA-Gel wurden 1,2 g Agarose eingewogen, 10 ml FA Gelpuffer (10x) zugegeben und dann mit RNase freiem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Gelmischung wurde in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlung auf 60°C, 1,8 ml Formaldehyd (37%) und 2 µl/100 ml Ethidiumbromidlösung (1%) zugegeben. Vor dem

Lauf wurde das Gel für mindestens 30 min in 1x FA Gellaufpuffer inkubiert, um ein Gleichgewicht zwischen Gel und Laufpuffer herzustellen. Die RNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5x RNA-Gelladepuffer versetzt und gemischt. Danach wurde 3 bis 5 Minuten bei 65°C im Thermomixer inkubiert und auf Eis abgekühlt, bevor die Proben auf das Gel geladen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 – 7 V/cm in 1x Gellaufpuffer für 30 – 60 Minuten. Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Leuchttisch (302 nm) betrachtet, die Dokumentation erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems.

Fällung von RNA

Zur Reinigung von RNA oder um gegebenenfalls die Konzentration von besonders schwachen Proben zu erhöhen, wurde ein Isopropanolfällung durchgeführt. Hierzu wurde die RNA-Lösung mit 10% Natriumacetatlösung (3 M, pH 5,2) versetzt und 2,5 Volumen eiskalter (-20 °C) Isopropanol, sowie Glycogen als Trägersubstanz, in einer Endkonzentration von 0,2 – 0,4 µg/µl zugegeben. Die Proben wurden gut gemischt und für mindestens 60 Minuten bei -20°C inkubiert, gefolgt von einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4°C mit 14.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in dem 5-fachen Volumen der ursprünglichen Probe mit 75% Ethanol gewaschen um verbleibende Salzreste zu lösen. Nach einer Zentrifugation für weitere 30 Minuten bei 14.000 Upm, 4°C wurde der Überstand vollständig entfernt und das RNA-Pellet in einem Vakuum Konzentratoren für 10 – 20 Minuten getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in einem geeigneten Volumen RNase freiem DEPC-Wasser, unter Erhitzung auf 55°C für 10 Minuten in einem Thermomixer, gelöst.

Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrad von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration kann mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgen. Eine OD_{260} mit dem Wert 1 entspricht ca. 40 µg RNA pro ml Probe. Das Verhältnis zwischen der Messung bei 260 nm und 280 nm ermöglicht eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäuren. Reine, gut gelöste RNA sollte ein E_{260}/E_{280} Verhältnis von etwa 1,9 – 2,1 haben. Protein Verunreinigung und schlecht gelöste RNA reduzieren diesen Wert (Manchester 1995; Wilfinger et al. 1997). Die Absorption bei 230 nm zeigt Verunreinigungen von z.B. Kohlenwasserstoffen, Peptiden, Phenolen oder aromatischen Verbindungen. Das E_{260}/E_{230} Verhältnis sollte in reinen Proben größer als 2,0 sein. Eine eventuelle Trübung der Lösung kann korrigiert werden, durch die Verwendung der Hintergrundkorrektur des E_{320} Wertes, der für reine Proben null sein sollte. Besonders unreine oder sehr schwach konzentrierte Proben wurden nochmals mittels des RNeasy Mini Kits oder Isopropanolfällung gereinigt bzw. konzentriert.

2.2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage spezifische Abschnitte einer DNA-Sequenz zu erkennen, daran zu binden und zu hydrolysieren (spalten) (Arber 1965; Danna und Nathans 1971; Smith und Wilcox 1970). Durch Verwendung eines Enzyms, das zwei verschiedene Stellen schneidet oder einen Doppelverdau (zwei Enzyme gleichzeitig oder hintereinander) können Bereiche gezielt ausgeschnitten und ersetzt werden („Klonierung“). Schnittstellen, die überlappende Enden (*engl.*: sticky ends) generieren, sind erwünscht, weil sie eine

enzymvermittelte Verbindung (Ligation) wesentlich leichter gestalten als stumpfe Enden (*engl.*: blunt ends). Die enzymatische Aktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 U der Enzymmenge entspricht, die nötig ist um 1 Mikrogramm DNA in einer Stunde komplett zu schneiden. Generell wurden Restriktionsansätze in dieser Arbeit mit einem leichten Enzymüberschuss durchgeführt. Die Gesamtmenge an Enzymlösung sollte dabei 10% des Ansatzvolumens nicht übersteigen, da Glycerin, ein Hauptbestandteil der Enzymlösung, die Enzymaktivität inhibiert. Für analytische Verdaue wurden Restriktionsansätze in 20 µl Reaktionsvolumen mit ca. 100 - 500 ng Plasmid-DNA oder PCR Produkt und jeweils 2 U der jeweiligen Restriktionsenzyme hergestellt. Die mitgelieferten Puffer und BSA wurden laut Angaben des Enzymherstellers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1,5 - 3 Stunden bei den empfohlenen Temperaturen.

Präparative Ansätze für die Klonierung wurden in 50 µl Endvolumen unter Einsatz von bis zu 10 µg DNA mit bis zu 20 U der jeweiligen Enzyme unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen für mindestens 2 h durchgeführt.

Alle Ansätze wurden mit Wasser (*ad iniectionem*) auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

In einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen, die gleiche Reaktionsbedingungen erfordern, wurden beide Enzyme simultan verwendet. Bei unterschiedlichen Pufferbedingungen wurde das Enzym mit Niedrigsalz-Puffer zuerst verwendet und nach der Inkubationszeit, durch Zugabe von höher konzentriertem Puffer und dem entsprechenden Enzym, die zweite Hydrolyse gestartet. Bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur wurde zunächst der Ansatz bei niedriger Temperatur inkubiert, dann das zweite Restriktionsenzym zugegeben und bei höherer Temperatur inkubiert. War dies nicht möglich, wurde eine DNA-Reinigung oder Gelextraktion durchgeführt, bevor der zweite Restriktionsverdau angesetzt wurde.

Nach der Reaktion wurden die Restriktionsansätze auf Agarosegelen analysiert und bei präparativen Ansätzen eine Gelextraktion durchgeführt

Herstellung stumpfer DNA Enden

Aufgrund der im Plasmid vorhandenen Schnittstellen ist es nicht bei allen Klonierungen möglich geeignete Endonukleasen zu verwenden, welche komplementäre überhängende Enden generieren. Daher ist es in solchen Fällen notwendig Enzyme zu verwenden, welche stumpfe Enden generieren oder eines oder sogar beide der überhängenden Enden nachträglich in stumpfe Enden zu modifizieren. Dies kann durch die Verwendung des großen (Klenow) Fragments der DNA-Polymerase I erreicht werden. Dieses Enzym ist ein proteolytisches Produkt der DNA-Polymerase I aus *E.coli*, welches seine Polymerisations- und 3'→5' Exonuklease Aktivität behalten, aber die 5'→3' Exonuklease Aktivität verloren hat (Jacobsen et al. 1974). Es ermöglicht das Auffüllen von 5' Überhängen und Entfernen von 3' Überhängen, um stumpfe DNA-Enden zu generieren.

Klenow-Ansätze wurden mit 1- 2 Mikrogramm in 50µl Gesamtvolumen durchgeführt. Der Ansatz enthielt 10% (v/v) 10x NEBuffer 2 ergänzt mit 8% (v/v) dNTP Mix (10mM) und 5 U Klenow-Enzym. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 10 mM) und Erhitzen auf 75°C für 20 Minuten in einem Thermomixer gestoppt. Die DNA wurde anschließend mittels Gelextraktion, Säulchenreinigung oder Ethanol-fällung gereinigt.

Dephosphorylierung von DNA Enden

Bei Bedarf wurde der gereinigte linearisierte Vektor mit alkalischer Phosphatase (CIP) (Mossner et al. 1980) behandelt, was zu einer Dephosphorylierung des Vektors führt, um zu verhindern, dass einfach geschnittener oder „blunt-end“ Vektor im Ligationsansatz religiert.

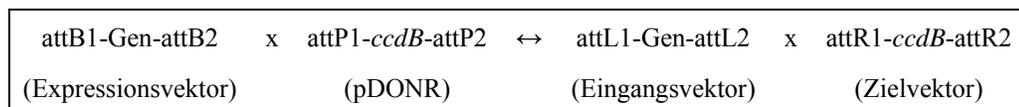
Hierfür werden pro Mikrogramm Plasmid-DNA (0,5 µg/10 µl), 0,5 U alkalische Phosphatase und 10% (v/v) 10x NEBuffer 3 des Herstellers zugegeben. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die DNA mittels Gelextraktion, Säulchenreinigung oder Ethanol-fällung gereinigt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms Quick T4 DNA-Ligase aus dem Quick Ligation Kit. Ligationen wurden in der Regel mit 50 ng Vektor und dem 2 bis 6-fachen Überschuss an Insertionskonstrukt durchgeführt. Um die Ligationseffizienz überprüfen zu können, wurden für jede Ligation verschiedene Vektor/Insert Verhältnisse benutzt und eine zusätzliche Reaktion mit H₂O statt Insert angesetzt, um die Menge an religiertem Vektor, ohne Insert, abschätzen zu können. Das Volumen der Mischung wurde auf 10 µl mit Wasser (ad iniectionem) aufgefüllt und 10 µl Quick Ligation Puffer (2x) zugegeben und gemischt. Nach Zugabe von 1 µl Quick T4 DNA-Ligase wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und für 5 – 15 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde entweder bei -20°C aufbewahrt oder 5 µl wurden direkt für die Transformation von 50µl kompetenter *E.coli* verwendet.

Gateway LR Klonierung

Die Gateway-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die den Vorteil der sequenzspezifischen Rekombinationsfähigkeit des Bacteriophagen Lambda ausnutzt (Landy 1989), um eine schnelle und hocheffiziente Möglichkeit zu bieten DNA-Sequenzen in mehrere Vektorsysteme einzubringen. Im Folgenden und in Abbildung 11 wird die Gateway-Technologie schematisch gezeigt:



Die attB x attP Reaktion wird von dem Gateway BP Clonase II Enzymmix; die attL x attR Reaktion von dem Gateway LR Clonase II Enzymmix katalysiert. Das *ccdB*-Gen wird durch das F-Plasmid kodiert und verhindert das Wachstum von *E.coli* (Bernard und Couturier 1992; Miki et al. 1992). „Gen“ bezeichnet eine beliebige DNA-Sequenz von Interesse (z.B. PCR Produkt, cDNA, genomische DNA).

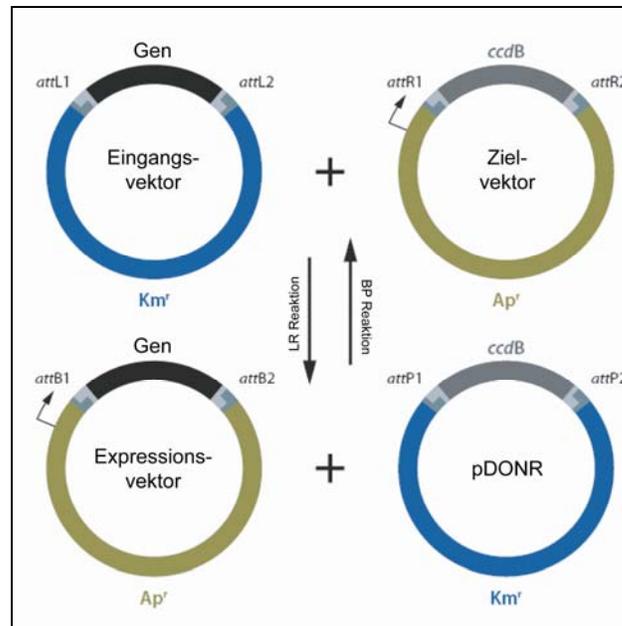


Abbildung 11: Die Gateway LR Klonierung.

Ein Eingangsvektor, der das gewünschte Gen flankiert von den Rekombinationsstellen enthält, wird mittels LR Clonase mit dem Zielvektor, welcher das *ccdB*-Gen enthält rekombiniert, um den Expressionsvektor mit dem Gen und ein Nebenprodukt (pDONR) mit dem *ccdB*-Gen zu erhalten. Durch Selektion der *E.coli* mit Ampicillin können von den vier Möglichen Transformanten nur diejenigen wachsen, die den korrekten Expressionsvektor aufgenommen haben (Bei Verwendung zu großer Plasmidmengen, können Transformanten mit mehr als einem Plasmidmolekül entstehen). Ap^r: Ampicillin Resistenz; Km^r: Kanamycin Resistenz. Modifiziert nach (Invitrogen 2007).

Pro Reaktion wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 150 ng des Eingangsvektors (ENTR) und 150 ng Zielvektor (DEST) eingesetzt und das Volumen mit TE Puffer auf 8 µl aufgefüllt. Der LR Clonase II Enzymmix wurde auf Eis aufgetaut (ca. 2 Minuten), zweimal kurz (2 Sekunden) gevortext, 2 µl zu den Proben zugegeben und durch auf- und abpipettieren gut gemischt. Als Negativkontrolle wurde für jeden Ansatz eine parallele Reaktion angesetzt in der die LR Clonase II weggelassen wurde. Die Reaktionen wurden für 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach wurde zum Stoppen der Reaktion 1 µl Proteinase K Lösung zugegeben, kurz gevortext und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 bis 3 µl des Ansatzes direkt für die Transformation von Stbl3 kompetenten *E.coli* verwendet. Der Rest der LR Ansätze wurde für eine eventuell notwendige weitere Transformation bei -20°C für bis zu einer Woche aufgehoben.

2.2.2.6 PCR Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (*engl.*: polymerase chain reaction, PCR) von Mullis (Mullis und Faloona 1987) ist eine Methode zur schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie kann präparative als auch analytische Funktion haben. Als präparativ amplifizierendes Enzym wurde in dieser Arbeit die Platinum Taq DNA-Polymerase High Fidelity mit Korrekturlesefunktion (*engl.*: proof-reading) verwendet. Für die analytische PCR von kurzen DNA-Fragmenten wurde die Taq Polymerase ohne Fehlerkorrektur eingesetzt.

RNA kann nicht direkt als Template für die PCR eingesetzt werden und muss erst in DNA zurück geschrieben werden (*engl.*: reverse transcription). Der als RT-PCR benannte Prozess ist eine kombinierte Methode in der die reverse Transkription mit der PCR Amplifikation der resultierenden cDNA (*engl.*: complementary DNA) verbunden

ist (Lee et al. 1989). Die RT-PCR kann entweder direkt mit Genspezifischen Primern in einem Ansatz (*engl.*: one-step RT-PCR) ablaufen oder die reverse Transkription wird mit universellen Primern durchgeführt, um die gesamte RNA umzuschreiben und erst danach wird, getrennt davon, die PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt (*engl.*: two-step RT-PCR). Die Gefahr bei der einstufigen RT-PCR besteht in der Inhibition der PCR durch die Komponenten der RT Reaktion, im Speziellen die Reverse Transkriptase (Fehlmann et al. 1993; Liss 2002; Sellner et al. 1992). Daher wurde in dieser Arbeit die zweite Methode der getrennten cDNA Synthese verwendet, mit einer verdünnten cDNA als Template für die anschließende PCR, um inhibitorische Effekte der RT Komponenten auszuschließen.

Alle PCR Arbeiten wurden in einer sterilen PCR Werkbank durchgeführt. Es wurden Filterspitzen verwendet. Zum Ansetzen der Lösungen und Reaktionen wurde Wasser ad iniectionem bzw. das in den Kits enthaltene DEPC-Wasser oder hochreines PCR Wasser verwendet. Alle Komponenten wurden in einem Kühlblock aufgetaut und alle Reaktionen im Kühlblock angesetzt.

Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit der reversen Transkriptase des aviären Myeloblastosis Virus (AMV) (Monahan et al. 1976; Rougeon und Mach 1976) durchgeführt. Im Speziellen wurde das Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit von Invitrogen verwendet. Für die cDNA Synthese wurde, wenn vorhanden, 1 Mikrogramm RNA eingesetzt, ansonsten die gesamte vorhandene Menge. Bei Bedarf wurde die RNA in einem Vakuumkonzentrator eingedampft. Etwaige Mengenunterschiede wurden durch die entsprechende Verdünnung der cDNA für die PCR wieder ausgeglichen. Als Primer wurden die im Kit enthaltenen Random Hexamer Primer verwendet. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls in einem PCR Thermocycler durchgeführt, die Synthesephase betrug 50 Minuten bei 50°C. Die Lagerung der nicht sofort für die PCR verwendeten cDNA erfolgte bei -20°C.

PCR Amplifikation von DNA

Für die analytische PCR von kurzen DNA-Fragmenten wurde die rekombinante Taq Polymerase von Invitrogen eingesetzt. Wenn 1 Mikrogramm RNA für die cDNA Synthese eingesetzt wurde, wurde die Template cDNA vor der PCR um den Faktor 1:10 in Wasser verdünnt, bei weniger RNA wurde der Verdünnungsfaktor entsprechend angepasst (z.B. 1:5 bei 0,5 µg). Für die präparative PCR wurde die Platinum Taq DNA-Polymerase High Fidelity mit Korrekturlesefunktion verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung der vom Hersteller der Polymerasen mitgelieferten Reaktionspuffer und Magnesium Lösungen in dünnwandigen 0,2 ml PCR Gefäßen, in folgenden Standardansätzen, durchgeführt:

Tabelle 7: PCR-Ansätze.

Komponente	Analytisch	Präparativ
Template DNA	1 -5 µl verdünnte cDNA	50 ng Plasmid-DNA
10× PCR Reaktionspuffer	2 µl	5 µl
10 mM dNTP Mix	0,4 µl	1 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 µl	-
50 mM MgSO ₄	-	2 µl
Vorwärts Primer (10µM)	0,5 µl	1 µl
Rückwärts Primer (10µM)	0,5 µl	1 µl
Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl (Taq)	0,2 µl (Platinum Taq)
Aqua ad iniectionabilia	ad 20 µl	ad 50 µl

Wenn möglich wurde ein Mastermix für mehrere Reaktionen mit den gleichen Primern hergestellt, um die Handhabung der kleinen Volumina zu erleichtern. Bei allen PCR Reaktionen wurde pro Primerpaar eine Negativkontrolle, in der das Template durch Wasser ersetzt wurde, mit angesetzt. Bei allen PCR Reaktionen wurde eine vereinfachte „hot start“ Methode verwendet. Hierzu wurden die PCR Ansätze erst aus dem Kühlblock in den Thermocycler gestellt, nachdem dieser bereits auf 95 °C erhitzt wurde. Dadurch wird die Template-DNA quantitativ denaturiert, die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte vermindert und die Ausbeute an PCR-Produkten erhöht. Die eigentliche Amplifikation wurde in 25 - 35 Wiederholungen von (1) DNA-Denaturierung, (2) Primer-Bindung (engl. *Annealing*) und (3) Primer-Extension im PCR Thermocycler bei beheiztem Deckel durchgeführt. Die Einstellungen des Thermocyclers wurden je nach Primerpaar (vgl. Tabelle 6), Template-Länge, Template-Konzentration und verwendeter DNA-Polymerase variiert. In der Regel wurden folgende Standardbedingungen verwendet:

Tabelle 8: Programmierung des PCR Thermocyclers.

Anzahl	Schritt	Analytisch		Präparativ	
		Dauer	Temp.	Dauer	Temp.
1x	Anfangsdenaturierung	5 min	95°C	2 min	94°C
25-35x	1) Denaturierung	30 sek	95°C	30 sek	94 °C
	2) Annealing	30 sek	50 - 60°C	30 sek	50 - 60°C
	3) Extension	1 min	72°C	1,5 min	68 °C
1x	Finale Extension	5 min	72°C	10 min	68 °C
1x	Kühlung	∞	4°C	∞	4°C

Zum Abschluss wurden eventuell unvollständige Amplifikate in einer verlängerten Extensionsphase komplettiert. Die Lagerung der PCR Produkte erfolgte bei 4 °C über Nacht oder für längere Zeit bei -20 °C.

Klonierung von PCR-Produkten

Nach einer Gelextraktion der PCR Produkte mit dem NucleoSpin Extract II Kit wurden diese zur gerichteten Klonierung durch Restriktionsenzyme an ihren Enden geschnitten und in entsprechend vorbereitete Vektoren ligiert. Die Restriktionsschnittstellen wurden direkt in der PCR-Reaktion durch entsprechend gewählte Primer eingebaut (vgl. Tabelle 6).

Quantitative PCR Analyse in Echtzeit

Durch die quantitative PCR Analyse in Echtzeit (*engl.*: real-time quantitative polymerase chain reaction, rtqPCR) konnten die Beschränkungen der konventionellen, zeitaufwendigen quantitativen PCR (qPCR) Methoden überwunden werden. Sie hat sich als eine Standardmethode zur Quantifizierung von Gen-Expressionsstärken, nach der reversen Transkription (RT) von mRNA in komplementäre DNA (cDNA), etabliert (Liss 2002). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wird während der PCR der Farbstoff SYBR Green, ähnlich wie Ethidiumbromid, in die entstehenden PCR Produkte eingelagert und fluoresziert. Die Intensität der Fluoreszenz wird in jedem Zyklus der PCR gemessen und ist proportional zur Menge des gebildeten PCR Produktes. Durch Vergleich mit der Standardkurve wird eine absolute Quantifizierung der ursprünglich in der Probe enthaltenen Kopienanzahl des Templates ermöglicht.

Die cDNA wurde verdünnt und normiert in Bezug auf die eingesetzte RNA-Menge. Wenn 1 Mikrogramm RNA verwendet wurde, wurde die cDNA um den Faktor 1:100 in hochreinem PCR Wasser verdünnt. 10 µl wurden als Template für die rtqPCR in der LightCycler II Maschine eingesetzt. Optimierte Primersets für die Detektion von GAPDH, EGFP und BSD mit den zugehörigen Protokollen wurden in Verbindung mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Mix verwendet. Für jedes Primerpaar wurde ein Mastermix hergestellt, welcher 6 µl hochreines PCR Wasser, 2 µl Primermix and 2 µl SYBR Green Mix pro Reaktion enthielt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl pro LightCycler Glasskapillare bestehend aus 10 µl verdünnter cDNA und 10 µl Mastermix. Für jeden Primer und jeden LightCycler-Lauf wurde eine Standardkurve generiert, die aus einer 10-fachen Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1000 des im Primerset enthaltenen Standards bestand. Der periodische Durchlauf bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 10 Sekunden, Primer Anlagerung für 10 Sekunden bei anfänglich 68°C mit einem Wechsel auf 58°C in Schritten von 0,5°C pro Zyklus. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 16 Sekunden, während dessen die Datenerhebung im Einzelmodus erfolgte. Die Geschwindigkeit des Temperaturwechsels zwischen den Schritten betrug 20°C pro Sekunde.

Im Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des Signals zu bestätigen. Dafür wurden die Proben nach den 45 Zyklen erneut bei 95°C denaturiert, sofort auf 58°C für 10 Sekunden abgekühlt und mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C pro Sekunde auf 95°C aufgeheizt. Die Schmelzkurve wurde durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung während des Aufheizens generiert. Jeder LightCycler-Lauf wurde durch Abkühlen der Maschine auf 40°C für 30 Sekunden abgeschlossen.

Die ausgegebenen Absolutwerte der Expressionsstärke von EGFP und BSD von jeder Probe wurden mit dem korrespondierenden GAPDH-Gehalt normalisiert und die Werte als Relativwerte gezeigt.

2.2.3 Zellkulturmethoden

Alle Zelltypen wurden bei 37°C in befeuchteten Zellkultur-Inkubatoren in einer 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Für die Kultivierung adhärenter Zellen wurden Zellkulturgefäße mit Nunclon Oberfläche verwendet. Alle verwendeten Materialien, Lösungen und Medien wurden sterilisiert und die Arbeiten in einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.2.3.1 Kultivierung von humanen Zellen

Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen wurden in Kulturmedium inkubiert. Die folgende Übersicht zeigt die verwendeten Kulturvolumina:

Gefäß	Volumen
T-225 Flasche	30 ml
T-150 Flasche	20 ml
T-75 Flasche	10 ml
T-25 Flasche	5 ml
Schale Ø10cm	7 ml
Schale Ø6cm	5 ml
6-Well Platte	2 ml
12-Well Platte	1 ml
24-Well Platte	500 µl
48-Well Platte	250 µl
96-Well Platte	150 µl

Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Hierzu wurde das alte Medium komplett entfernt und durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden bis zu einer maximalen Konfluenz von 70% kultiviert und danach passagiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer Zelldichte, so dass die Konfluenz am nächsten Tag ca. 20% - 50% betrug (2.500 – 6.500 Z/cm²). Für alle Transduktionen und Differenzierungsexperimente wurden Zellen, die nicht älter als 10 Passagen waren, verwendet.

293FT-Zellen

Die Zellen wurden nach dem Protokoll des Herstellers kultiviert. Außer während der Virusherstellung, wurden die Zellen immer in Geneticin-haltigem Kulturmedium inkubiert. Da die Zellen aktiver sind und eine höhere Stoffwechselrate haben als hMSCs, betragen die Volumina des Kulturmediums in der Regel das 1,5-fache der für hMSCs verwendeten Mengen. Medienwechsel wurden 2- bis 3-mal wöchentlich durchgeführt. Die Zellen wurden passagiert, bevor sie 90% Konfluenz erreichten. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht überwuchsen, da dies die Transfektionseffizienz beeinflusst. Die Zellen wurden in einer Zelldichte ausgesät, die einer Konfluenz von 20% - 30% (25.000 – 40.000 Z/cm²) am nächsten Tag entspricht.

HT1080-Zellen

Die Zellen wurden nach dem Protokoll des Herstellers kultiviert, aber ein RPMI1640-Medium verwendet. Da es sich um eine Krebszelllinie handelt und diese Zellen sehr viel aktiver sind und eine sehr viel höhere Stoffwechselrate haben als hMSCs, betragen die Volumina des Kulturmediums in der Regel das Doppelte der für hMSCs verwendeten Mengen. Medienwechsel wurden 2- bis 3-mal wöchentlich durchgeführt. Die Zellen wurden passagiert, bevor sie 90% Konfluenz erreichten und es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht überwuchsen. Die Zellen wurden in einer Zelldichte ausgesät, die einer Konfluenz von 20% - 30% (25.000 – 40.000 Z/cm²) am nächsten Tag entspricht.

U2OS-Zellen

Die Zellen wurden nach dem Protokoll des Herstellers kultiviert. Da es sich ebenfalls um eine Krebszelllinie handelt, betragen die Volumina des Kulturmediums in der Regel das Doppelte der für hMSCs verwendeten Mengen. Medienwechsel wurden 2- bis 3-mal wöchentlich durchgeführt. Die Zellen wurden passagiert, bevor sie 90% Konfluenz erreichten und es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht überwachsen. Die Zellen wurden in einer Zelldichte ausgesät, die einer Konfluenz von 20% - 30% (25.000 – 40.000 Z/cm²) am nächsten Tag entspricht.

2.2.3.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden zu den oben genannten Zeitpunkten passagiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Trypsinierung. Trypsin gehört zu den sog. Endopeptidasen, die Eiweißmoleküle an bestimmten Stellen innerhalb der Eiweißkette spalten. Trypsin ist eine Serinprotease. In Zellkulturlabors wird Trypsin verwendet, um adhärenente Zellen vom Boden der Kulturschalen zu lösen bzw. um Zellen zu vereinzeln. Solange man die Zellen nicht zu lange mit Trypsin behandelt, werden sie nicht geschädigt und nur die extrazellulären Proteine werden gespalten.

Zum Trypsinieren wurde das Zellkulturmedium vollständig entfernt, und die Zellen vorsichtig im gleichen Volumen D-PBS gewaschen um Mediumreste zu entfernen. Dann wurde je nach verwendetem Zellkulturgefäß 1/5 des ursprünglichen für hMSC angegebenen Volumens (z.B. 2 ml bei T-75) 1x Trypsin zugegeben und 5 – 10 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Oberfläche abgelöst haben. Der Fortschritt wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Wenn alle Zellen abgelöst waren, wurde zu dem Trypsin die doppelte Menge (z.B. 4 ml bei T-75) Kulturmedium zugegeben, um das Trypsin mit dem enthaltenen Serum zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 500 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in einer geeigneten Menge vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die Aussaat der Zelle erfolgte dann in den oben angegebenen Zelldichten in frischen Kulturgefäßen.

2.2.3.3 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Um die Zellzahlen zu bestimmen, wurden diese in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurde die Zellsuspension gut gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Dann wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension so verdünnt, dass die Gesamtzahl der gezählten Zellen nicht kleiner als 100 und nicht größer als 1,000 war. Von dieser Verdünnung wurden 20 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau Färbelösung versetzt und ein bis zwei Minuten inkubiert. Die lebenden Zellen nehmen den blauen Farbstoff nicht auf, die toten Zellen färben sich aufgrund von Schäden in der Zellmembran blau an. Somit konnten lebende und tote Zellen beim Zählen unterschieden werden. Die obere und untere Kammer einer Zählkammer wurden befüllt und jeweils alle Felder der vier Außenquadrate (A, B, C, D) ausgezählt. Hierbei wurden Zellen die auf den linken und oberen Feldlinien lagen nicht mitgezählt, Zellen die auf den rechten und unteren Feldlinien lagen wurden gezählt. Die Zellzahl wurde mittels der folgenden Formel berechnet:

$$(A_1+B_1+C_1+D_1+A_2+B_2+C_2+D_2) / 2 / 4 \times 1,5 \times 10^4 = Z/ml$$

Die Quote der lebenden Zellen konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$[1,00 - (\text{Anzahl blauer Zellen} / \text{Gesamtanzahl Zellen})] \times 100$$

Der Prozentsatz an lebenden Zellen sollte für gesunde Kulturen in der log-Phase mindestens 95% betragen.

2.2.3.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie beschrieben trypsiniert und in einer Dichte von $1 - 2 \times 10^6$ Z/ml in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Kryoröhrchen verteilt, pro Röhrchen wurde 1 ml der Suspension eingefüllt. Die Gefäße wurden dann in eine spezielle Einfrierbox für Zellkultur Kryoröhrchen gestellt und diese dann über Nacht in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Dadurch wurde ein optimaler Einfrierprozess mit einer Abkühlung von 1°C pro Minute erreicht. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstoff Aufbewahrungstank umgelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zunächst aus dem flüssigen Stickstoff geholt und in ein 37°C Wasserbad gegeben bis die Zellsuspension aufgetaut war. Um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen, wurde die Suspension anschließend in ein 15 ml Reagensgefäß mit vorgewärmtem Kulturmedium überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit $500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß mit der entsprechenden Menge vorgewärmtem Medium überführt. Die Zellen wurden über Nacht unter Normalbedingungen inkubiert und am nächsten Tag unter dem Mikroskop überprüft. Um den Anteil der durch das Einfrieren und Auftauen abgestorbenen nicht adhären Zellen zu entfernen, wurde daraufhin ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.3.5 Differenzierung von hMSCs

Um den Stammzell-Charakter der hMSCs zu bestätigen, wurden die Zellen *in vitro* in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung differenziert (Pittenger et al. 1999). Als Negativkontrolle wurden Zellen identisch in Basalmedium ohne Differenzierungszusätze kultiviert.

Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung wurde nach Jaiswal (Jaiswal et al. 1997) durchgeführt.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro well in 6-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Konfluenz spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierungsfähigkeit der Zellen (McBeath et al. 2004), daher wurden sie in Basalmedium (2 ml/well) kultiviert, bis zu einer Konfluenz von etwa 70%, dann wurde das Basalmedium durch das osteogene Differenzierungsmedium ersetzt. Medienwechsel mit osteogenem Medium wurden 2- bis 3-mal wöchentlich durchgeführt. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 16 Tagen, dann erfolgte die Auswertung mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie, sowie anschließender von Kossa Färbung.

Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurde, wie von Pittenger und Janderova publiziert, durchgeführt (Janderova et al. 2003; Pittenger 1998).

4×10^3 Zellen pro well wurden in 12-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Konfluenz spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierungsfähigkeit der Zellen (McBeath et al. 2004), daher wurden sie in Basalmedium (2 ml/well) bis zu einer vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Differenzierung wurde dann durch Mediumwechsel mit adipogenem Induktionsmedium gestartet. Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Die Zellen wurden für fünf Tage in adipogenem Induktionsmedium kultiviert, dann für zwei Tage in adipogenem Erhaltungsmedium, dann wurde

wieder zu Induktionsmedium gewechselt. Nach 16 Tagen erfolgte die Auswertung mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie, sowie anschließender Lipid Oil Red O Färbung.

Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde durch Kultivierung der Zellen im Pellet in Übereinstimmung mit Mackay und Derfoul durchgeführt (Derfoul et al. 2006; Mackay et al. 1998).

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden pro Pellet eingesetzt. Die Zellen wurden nach Standardprotokoll geerntet und in einem 15 ml Reagensgefäß für 5 Minuten mit $150 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden noch einmal resuspendiert und zentrifugiert, der Überstand verworfen und durch 1 ml chondrogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Die Reagensgefäße mit den pelletierten Zellen wurden dann mit gelöstem Deckel, um den Gasaustausch zu gewährleisten, inkubiert. Innerhalb von 24 Stunden bildeten die sedimentierten Zellen eine kugelförmige Masse am Boden des Gefäßes, welche durch leichtes Ansnipsen des Gefäßes abgelöst werden konnte. Medienwechsel wurden 2- bis 3-mal wöchentlich durchgeführt. Es wurde danach immer darauf geachtet, dass sich das Pellet frei beweglich im Medium befand. Nach 5 Wochen Stimulation wurde das Zellpellet in D-PBS gewaschen und für 20 Minuten bei -20°C in eiskaltem Methanol fixiert. Die Auswertung erfolgte an Kryoschnitten mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie sowie anschließender Toluidinblau Färbung.

2.2.3.6 Transfektion

Für die Transfektion von eukaryoten Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Lipofectamine 2000 Transfektionsreagens verwendet. Die Transfektionen wurden im 6-Well Maßstab durchgeführt. Alle Mengen und Volumina sind pro Well angegeben.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 2 ml Kulturmedium ohne Antibiotika so ausplattiert, dass sie am Tag der Transfektion 90 – 95% konfluent waren ($\sim 1 \times 10^6$ Zellen bei U2OS). Für jedes Well wurden Lipoplexe (vgl.: 2.1.1.3) wie folgt hergestellt: 4 Mikrogramm Plasmid-DNA wurden in 250 μl OptiMEM I serumreduzierten Medium verdünnt und vorsichtig gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 10 μl Lipofectamine 2000 in 250 μl OptiMEM I Medium verdünnt und vorsichtig gemischt. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA mit dem Lipofectamine vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jedes Well mit Zellen und Kulturmedium wurden dann die 500 μl Lipoplex Suspension zugegeben und durch schwenken des Kulturgefäßes gemischt. Die Platten wurden dann im Brutschrank für 5 – 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit Standard Kulturmedium. Die transfizierten Zellen wurden frühestens 24 Stunden nach der Transfektion weiter verwendet.

2.2.4 Virologische Methoden

Alle virologischen Arbeiten und die Handhabung der Viren wurden gemäß der Verfügung des Klinikumsvorstandes (Plewig und Auburger 2004) und den derzeit gültigen Gesetzen und Verordnungen der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit durchgeführt. Alle virologischen Arbeiten wurden in einem S2 Labor des Max-von-Pettenkofer Instituts, Lehrstuhl für Virologie, Pettenkoferstr. 9a, 80336 München durchgeführt.

2.2.4.1 Herstellung der lentiviralen Vektoren

In dieser Arbeit wurde das ViraPower lentivirale Expressionssystem von Invitrogen für die Herstellung von lentiviralen Vektoren zur stabilen Transduktion der Zielzellen verwendet. Die Präparation der Lentiviren erfolgte nach den Anweisungen des Hersteller mit einigen geringfügigen Änderungen nach Coleman (Coleman et al. 2003). Für die Herstellung der lentiviralen Vektoren wurden 293 FT-Zellen verwendet, die nicht älter als Passage 20 waren. Um die Zellen zu synchronisieren, wurden sie nach dem Auftauen vor der Virusherstellung mindestens dreimal passagiert. Die Zellen wurden trypsiniert, gezählt und in einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml in FCS-haltigem (10%) OptiMEM I ohne Antibiotika resuspendiert. 35,7 μg ViraPower lentiviraler Packaging-Mix und 11,9 μg des jeweiligen pLENTI6/V5-Expressionsplasmids wurden in 5,9 ml OptiMEM I Medium ohne Serum verdünnt. Wenn das pLP1/2-Plasmid (vgl. Abbildung 12) für die Virusherstellung verwendet wurde, wurde der Packaging-Mix ersetzt durch 22,5 μg pLP1/2 und 13,2 μg pLP-VSVG. In einem getrennten Reaktionsgefäß wurden 142,8 μl Lipofectamine 2000 in 5,9 ml OptiMEM I Medium ohne Serum verdünnt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten Lipofectamine gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Lipofectamine Komplexe (Lipoplexe, vgl. 2.1.1.3) wurden dann in eine T-225 Zellkulturflasche mit 19,8 ml serumhaltigen OptiMEM I ohne Antibiotika gegeben. Anschließend wurden 19,8 ml der gut resuspendierten 293FT Zellsuspension ($23,76 \times 10^6$ Zellen) in die Zellkulturflasche gegeben und für 6 Stunden bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium mit den Lipoplexen entfernt und durch 21 ml 293FT Kulturmedium ohne Geneticin ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der virushaltige Zellkulturüberstand geerntet, mit 3000 Upm bei Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert, um Zellreste zu sedimentieren und durch einen sterilen Millex-GP 0,45 μm Spritzenaufsatzfilter gefiltert. Die Viruslösung wurde entweder direkt verwendet oder in 5 ml Aliquots bei -80°C für bis zu 12 Monate aufbewahrt. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

2.2.4.2 Transduktion der Zielzellen

Unbehandelter virushaltiger Überstand wurde für die Transduktion der Zielzellen verwendet. Die Transduktionen wurden nach den Angaben im Herstellerprotokoll durchgeführt. Außer für die Titrations-Studien wurde der virale Überstand in einer 1:2 Verdünnung verwendet. Normales Kulturmedium wurde für die Verdünnung verwendet. Wenn Polybrene verwendet wurde, ist es der Medium-Virus-Mischung in einer Endkonzentration von 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ während der Infektion der Zellen zugesetzt worden. Untransduzierte Kontrollzellen wurden identisch behandelt, außer dass die Menge an virushaltigem Medium durch normales Kulturmedium ersetzt wurde. Die Zielzellen wurden einen Tag vor der Transduktion je nach Experiment und Zelltyp in verschiedenen Dichten und Kulturgefäßen ausgesät. In der Regel wurden Transduktionen in 6-Well Platten oder T-75 Zellkulturflaschen durchgeführt. Die Konfluenz der Zellen lag dabei zwischen 30% und 50%. Das Transduktionsvolumen betrug 2 ml bzw. 10 ml. Am Tag der Transduktion wurde das Kulturmedium entfernt und durch die Virus-Polybrene-Mischung ersetzt. Die Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Tag nach der Transduktion wurde das Virus- und Polybrene-haltige Medium entfernt und durch das jeweilige Kulturmedium ohne Blasticidin ersetzt. Die Selektion mit Blasticidin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde frühestens am zweiten Tag nach der Transduktion

begonnen, um den Zellen eine Regenerationsphase zu ermöglichen. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Blastocidinselektion über einen Zeitraum von 12 - 15 Tagen.

2.2.4.3 Titration

Um den lentiviralen Titer zu bestimmen, wurde die Titration des virushaltigen Überstands in HT1080 und hMSCs und die Färbung der resistenten HT1080 Kolonien nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, mit einigen Anpassungen in Bezug auf hMSCs. Für hMSCs wurden T-75 Zellkulturflaschen verwendet und das Kulturvolumen wurde auf 5 ml angepasst, um die gleiche Multiplizität der Infektion (*engl.*: multiplicity of infection, MOI; absolute Virusmenge pro Zelle) und Verdünnungsfaktor in HT1080 und hMSCs zu erreichen, um diese vergleichen zu können. Am Tag vor der Transduktion wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. 2×10^5 Zellen wurden pro Well bzw. Flasche in 6-Well Platten (HT1080) oder T-75 Flaschen (hMSCs) ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transduktion 30% bis 50% konfluent waren. Am Tag der Transduktion wurden 10-fache serielle Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-5} und eine Kontrolle ohne Virus vorbereitet. Für jede Verdünnung wurde der lentivirale Überstand mit Kulturmedium auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Kulturmedium der Zellen wurde entfernt und die jeweilige Verdünnung zu einem/einer Well/Flasche mit Zellen zugegeben. Polybrene wurde zu jeder Probe in einer Konzentration von 6 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Die Kulturgefäße wurden anschließend bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Virus-Polybrene-haltige Medium entfernt und mit 10 ml (T-75 Flasche) oder 5 ml (6-Well) Kulturmedium ohne Blastocidin ersetzt. Am zweiten Tag nach der Transduktion wurden die Zellen wie folgt behandelt: Für die Blastocidinselektion und das Färben der resistenten HT1080 Kolonien wurde das Medium entfernt und durch Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Blastocidin ersetzt. Für die RNA-Isolation und die Bestimmung der EGFP und Blastocidin Expressionslevel in HT1080 und hMSCs wurde das Medium entfernt und durch Kulturmedium ohne Blastocidin ersetzt. Das jeweilige Medium wurde alle 3 - 4 Tage gewechselt. Die RNA-Isolation wurde am Tag 7 nach der Transduktion durchgeführt. Die Färbung der resistenten Kolonien erfolgte am dreizehnten Tag nach der Transduktion. Keine lebenden Zellen konnten in der untransduzierten Kontrolle beobachtet werden und Antibiotika resistente Kolonien, in den Wells, mit den Virusverdünnungen. Das Medium wurde entfernt, die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen und 1 ml pro Well Kristallviolett-Färbelösung zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen wieder zweimal mit D-PBS gewaschen. Die blau gefärbten Kolonien wurden gezählt und der Titer der Lentiviruspräparation bestimmt. Diese Ergebnisse wurden dann mit den mittels qPCR bestimmten EGFP und BSD Expressionsniveaus in HT1080 und hMSCs korreliert.

2.2.5 Fluoreszenz Durchflußzytometrie (FACS)

Zell-Populationen die mit EGFP-Vektoren transduziert wurden, mit und ohne Blastocidinselektion (10 $\mu\text{g/ml}$), wurden mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie (FACS) analysiert um den Prozentsatz EGFP exprimierender Zellen zu quantifizieren. HT1080 und hMSCs wurden für die FACS-Analyse jeweils nach 5 und 14 Tagen Selektion geerntet und einmal in FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300 μl FACS-Puffer sehr gut resuspendiert und in ein 5ml BD Falcon Polystyrol Rundboden Röhrchen transferiert. Der FITC-A Kanal eines BD FACSCanto Geräts mit BD FACSDiva Software wurde verwendet, um den EGFP positiven Anteil der Zellen zu bestimmen. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden verwendet, um eine Sammelbasis einzurichten mit der tote Zellen und Zellreste ausgeschlossen werden konnten. Unspezifische Fluoreszenzsignale wurden durch Verwendung

von untransduzierten Kontrollzellen bestimmt. Die Proben wurden mit einer mittleren Fließgeschwindigkeit gemessen. Es wurden jeweils 30.000 Ereignisse gezählt.

2.2.6 Immunoassays

P24 Antigen-ELISA

Für den Nachweis, dass keine infektiösen Viren in der Zellkultur enthalten sind, wurde die Konzentration des viralen Kernproteins p24 im Kulturmedium von Zellen, welche mit einer 1:2 Virusverdünnung transduziert wurden, gemessen. In der Abwesenheit von vermehrungsfähigen Lentiviren sollte die Konzentration über die Zeit abnehmen, während die Zellen mehrere Passagen durchlaufen. Wenn kein p24 mehr nachweisbar ist, dann ist auch kein intakter, infektiöser Virus enthalten. Um diese Abnahme zu kontrollieren, wurden Proben des Zellkulturüberstandes bei jedem Mediumwechsel und Passagieren abgenommen. Die Quantifizierung der p24-Konzentration mittels ELISA ist eine weit verbreitete Methode die Virusmenge zu bestimmen (Klein et al. 2003; Lee et al. 2005; Sakuma et al. 2003; Sastry et al. 2003; Van Maele et al. 2003; Yang et al. 1996). Mit dem kommerziell erhältlichen Alliance HIV-1 P24 Antigen-ELISA-Kit wurde, unter Beachtung des mitgelieferten Protokolls, ein sehr sensitiver (3,5 pg/ml) anti-P24 ELISA durchgeführt (Escarpe et al. 2003). Es handelt sich dabei um einen „Sandwich“ ELISA unter Verwendung einer mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte und eines Detektionsantikörpers.

Für jeden Test wurde eine Standardkurve generiert, indem zweifache Verdünnungsreihen des im Kit enthaltenen Standards von 100 bis 12,5 pg/ml integriert wurden. Normales Kulturmedium der jeweiligen Zellen wurde als Lösungsmittel und Negativkontrolle verwendet. Um die Zellkulturüberstände von transduzierten Zellen zu testen, wurden 200 µl Überstand direkt eingesetzt. Alle Messungen erfolgten im Duplikat.

2.2.7 Proteinchemische Methoden

2.2.7.1 Proteinisolation

Die Extraktion des Gesamt-Proteingehalts wurde durch Lyse der Zellen mittels RIPA- (*engl.*: radioimmunoprecipitation) Puffer durchgeführt.

Eine Tablette Complete, Mini, EDTA-frei Proteaseinhibitor wurde pro 10 ml in RIPA-Puffer gelöst. Die Zellen wurden trypsiniert, geerntet und mit 500 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 5 ml D-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Pro $\sim 2 \times 10^6$ Zellen wurden 100 µl eiskalter RIPA-Puffer (bei weniger Zellen mindestens 100 µl) zugegeben, die Zellen vorsichtig resuspendiert und die Zellsuspension in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 2 x 2 Sekunden mittels Ultraschall lysiert und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellreste wurden durch Zentrifugieren mit 14.000 Upm für 10 Minuten bei 4°C pelletiert und der Überstand, welcher das komplette Zelllysate enthielt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde immer auf Eis bzw. gekühlt gehandhabt, die Aufbewahrung erfolgte in Aliquots bei -80°C

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben, wurde das BCA Protein Kit nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Der Assay wurde in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde RIPA-Puffer verwendet. Für jeden Test wurde eine Standardkurve generiert, indem zweifache Verdünnungsreihen des im Kit enthaltenen BSA Standards von 1000 bis 15,6 µg/ml integriert wurden. Alle Messungen erfolgten im Duplikat bei einer Wellenlänge von 562 nm.

2.2.7.3 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen, basierend auf der Polypeptidlänge. Die Auftrennung der Proteine erfolgte diskontinuierlich durch Verwendung von Sammel- und Trenngelen nach einer modifizierten Methode von Laemmli und Fling (Fling und Gregerson 1986; Laemmli 1970).

Bei der Probenvorbereitung wurden 10 µg der Proteinproben mit 20% (v/v) 5× Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde DTT im Auftragspuffer verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben durch Erhitzen (5 min, 95° C) denaturiert, dann bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Um das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden abschätzen zu können, wurde der vorgefärbte Seebule Plus2 Molekulargewichts-Standard mit auf die Gele aufgetragen. In dieser Arbeit wurden 10%-ige Trenngele (TG) und 5%-ige Sammelgele (SG) in einem Mini Protean 3 Elektrophoresesystem benutzt. Die Elektrophorese dauerte 45-60 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel (Geldicke: 0,75 mm) in 1x Laufpuffer (für SDS PAGE). Für eine Gelgröße von 8,5 x 6,5 x 0,075 cm wurden für ein Gel die folgenden Gellösungen verwendet:

Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

Komponente	Sammelgel (2,5ml)	Trenngel (5 ml)
H ₂ O	1,72 ml	1,375 ml
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	415 µl	1,65 ml
1 M Tris HCl (pH 6,8)	315 µl	-
1 M Tris Base (pH 8,8)	-	1,875 ml
10% SDS	25 µl	50 µl
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	2 µl

Nach der Elektrophorese wurden die Glassplatten vorsichtig auseinander genommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für Coomassie-Färbung oder Immunoblotting (Westernblot) verwendet.

2.2.7.4 Gelfärbung nach Fairbanks

Grundlage der Fairbanks-Färbung von SDS-Gelen ist eine unspezifische Bindung des Farbstoffs Coomassie-Blau an Proteine. Die Färbung erfolgte leicht modifiziert nach Fairbanks (Fairbanks et al. 1971). Alle Inkubationen erfolgten in Kunststoffwannen bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch unter leichtem Schütteln. Es wurde darauf geachtet, dass die Gele vollständig von den Lösungen bedeckt waren. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden für 15 Minuten in Fixierlösung inkubiert. Nach dem Entfernen der Fixierlösung wurde Coomassie-Blau Färbelösung zugegeben, die Wanne abgedeckt, für 30 Sekunden im Mikrowellenofen aufgeköcht und für 15 bis 20 Minuten

inkubiert. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurde die Entfärbelösung zugegeben, wieder für 30 Sekunden im Mikrowellenofen aufgeköcht und für 15 bis 20 Minuten inkubiert. Die Entfärbung wurde jeweils mit frischer Entfärbelösung solange wiederholt bis die unspezifische Hintergrundfärbung des Gels entfernt war. Nach einem Waschschrift in Wasser wurden die Gele für die Langzeitaufbewahrung mit dem DryEase Mini-Geltrocknungs Kit, gemäß den Herstellerangaben, getrocknet.

2.2.7.5 Immunoblotting (Western Blot)

Nach der Separation durch SDS-PAGE können die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran für die Immunodetektion übertragen werden (Matsudaira 1987). Für den Transfer wurde die Mini Trans-Blot Zelle verwendet. Vor dem Zusammenbau der Blotapparatur wurde das Gel, Filterpapier und die Schwämmchen für 15 Minuten in 1x Blotting Puffer inkubiert. Die PVDF Membran wurde auf die passende Größe zurechtgeschnitten, für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Methanol inkubiert und danach kurz (1 bis 2 Minuten) in $H_2O_{(dd)}$ gewaschen. Der Aufbau der Blottapparatur erfolgte wie vom Hersteller angegeben. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1,5 Stunden in 1x Blotting Puffer durchgeführt. Nach dem Blot wurde die Transfereffizienz überprüft, indem das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Bei einer guten Bloteffizienz sind auf dem Gel nur noch sehr schwache Proteinbanden zu sehen. Die Membran kann für bis zu drei Monate in Waschlösung bei 4°C aufgehoben werden.

Für die Immunodetektion wurden alle Inkubationen in Kunststoffwannen bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch unter leichtem Schütteln durchgeführt. Für jede Lösung wurde eine eigene Wanne verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass die Membran immer vollständig bedeckt war und mit der Seite, auf der die Proteine haften, nach oben inkubiert wurde. Die Waschschrift wurden in großen Volumina (~100 – 200 ml) durchgeführt.

Zunächst wurde die Membran zweimal 5 Minuten in Waschlösung gewaschen und danach für mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzublocken. Der jeweilige primäre Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt (Anti-GAPDH (IgM) aus Maus 1:5000, Anti-GFP (IgG) aus Maus 1:2000) und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Membran gründlich für 4 x 7 Minuten in Waschlösung gewaschen. Der jeweilige HRP-konjugierte, sekundäre Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt (Anti-Maus IgM aus Ziege 1:5000, Anti-Maus IgG aus Rind 1:5000) und mit der Membran für 45 bis 90 Minuten inkubiert. Dann wurde die Membran wieder gründlich für 4 x 7 Minuten in Waschlösung gewaschen.

Nach den finalen Waschschrift wurde das Antikörper-Enzym-Konjugat mittels des ECL Plus Western Blot Detektions Kit unter Verwendung des Herstellerprotokolls nachgewiesen. Die Membran wurde für 5 Minuten mit der ECL-Lösung inkubiert und danach kurz getrocknet. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms, für eine Sekunde bis zu 30 Minuten, in einer Filmkassette wurde die von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen. Der Film wurde mittels eines automatischen Filmentwicklers entwickelt. Die gebundenen Antikörper können anschließend wieder von der Membran abgelöst (*engl.*: stripping) werden, die Membran kann bis zu drei Monate in Waschlösung bei 4°C aufgehoben werden.

2.2.7.6 Ablösen gebundener Antikörper (Stripping)

Das komplette Entfernen der primären und sekundären Antikörper von der Membran ist möglich. Dadurch kann die Membran mehrmals für Immunodetektionen mit verschiedenen Antikörpern verwendet werden. Nach jeder Detektion kann die Membran, wie oben beschrieben, gelagert werden.

Für die Antikörper-Entfernung wurde die Membran in einem Hybridisierungssofen für 30 Minuten bei 50°C unter mäßiger Rotation mit Stripping Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 2 x 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Die vollständige Ablösung der Antikörper wurde überprüft, indem die Membran mit ECL Plus Reagens inkubiert und ein Film aufgelegt wurde. Wenn nach der Prozedur noch ein Signal erkennbar war, wurde der Stripping Vorgang wiederholt, bis kein Signal mehr detektiert werden konnte. Danach wurde die Membran für eine weitere Immunodetektion verwendet, indem mit dem Blocken der Membran begonnen wurde.

2.2.8 Histologische Methoden

2.2.8.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Zellpellets in Einbettwannen mit Einbettmedium ohne Luft einschüsse vollständig bedeckt. Das Präparat wurde über flüssigem Stickstoff langsam abgekühlt bis das komplette Einbettmedium erstarrt war. Nach dem Herauslösen aus der Einbettwanne wurde das Präparat, mit Einbettmedium auf dem Objektträger des auf -20°C Betriebstemperatur gekühlten Kryostaten, fixiert. Es wurden 12 µm Schnitte der Zellpellets angefertigt und für weitere Analysen auf Glasobjektträger übertragen und bei -20°C gelagert. Die Auswertung der Kryoschnitte erfolgte mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie, sowie anschließender Toluidinblau-Färbung.

2.2.8.2 Von Kossa Färbung

Für die von Kossa Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen in D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 15 Minuten in eiskaltem Methanol (100%) bei -20°C fixiert und für 20 Minuten in H₂O_(dd) rehydriert. Um die Kalziumphosphat Einlagerung zu färben wurden die Zellen für 10 Minuten mit 5% (w/v) Silbernitratlösung im Dunkeln inkubiert und anschließend zweimal für 3 Minuten in H₂O_(dd) gewaschen, gefolgt von 10 Minuten Inkubation mit 1% Pyrogallollösung. Nach einmaligem Waschen für 3 Minuten in H₂O_(dd) wurde für 4 bis 5 Minuten in 5% Natronlauge inkubiert und anschließend zweimal 3 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Nachdem das Leitungswasser durch H₂O_(dd) ersetzt wurde, wurden die gefärbten Zellen und Kontrollen mit einer Digitalkamera, welche an ein Axiovert S100 Mikroskop angebracht war, dokumentiert.

2.2.8.3 Oil Red O Färbung

Für die Oil Red O Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen in D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 2 Minuten bei 4°C in 4% Formaldehydlösung fixiert. Nach dem Waschen mit gekühltem 50% Ethanol wurden die Lipidvakuolen in den Zellen durch 20 Minuten Inkubation mit Oil Red O Arbeitslösung angefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen wurden die Zellen noch mal jeweils 12 Minute mit 50% Ethanol gefolgt von H₂O_(dd) gewaschen. Die gefärbten Zellen und Kontrollen wurden mit einer Digitalkamera, welche an ein Axiovert S100 Mikroskop angebracht war, fotografiert.

2.2.8.4 Toluidinblau Färbung

Anionische sulfatierte Proteoglycane wurden mittels der Färbung mit Toluidinblau nachgewiesen. Die Färbung der extrazellulären Matrix ist charakteristisch für die Ablagerung einer knorpeligen Matrix.

Die Schnitte der Zellpellets wurden mit 1% Toluidinblau Lösung für 1 Minute gefärbt.

Anschließend wurden die Objektträger für etwa 2 Stunden in Leitungswasser gewaschen, bis überschüssige Färbelösung entfernt war. Die Deckgläser wurden dann mit DPX-Eindeckmedium auf den Objektträgern befestigt. Nachdem das Medium über Nacht ausgehärtet war, wurden die gefärbten Schnitte und Kontrollen mit einer Digitalkamera, welche an ein Axiovert S100 Mikroskop angebracht war, dokumentiert.

2.2.9 Statistik

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Experimente dreimal in analogem Versuchsaufbau durchgeführt, wenn nicht anders vermerkt.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaPlot. Standardabweichungen wurden mit SigmaPlot berechnet. Signifikanzen wurden mit dem Student's *t*-test berechnet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Die lineare Regression und die Korrelations-Koeffizienten wurden mit SigmaPlot berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der lentiviralen Expressionsvektoren und pLP1/2

In der folgenden Abbildung sind alle in dieser Arbeit hergestellten lentiviralen Expressionsvektoren und die verwendeten Verpackungsplasmide zusammengefasst. Sämtliche Plasmidkarten mit den eingezeichneten, verwendeten Restriktionsschnittstellen sind im Anhang verzeichnet.

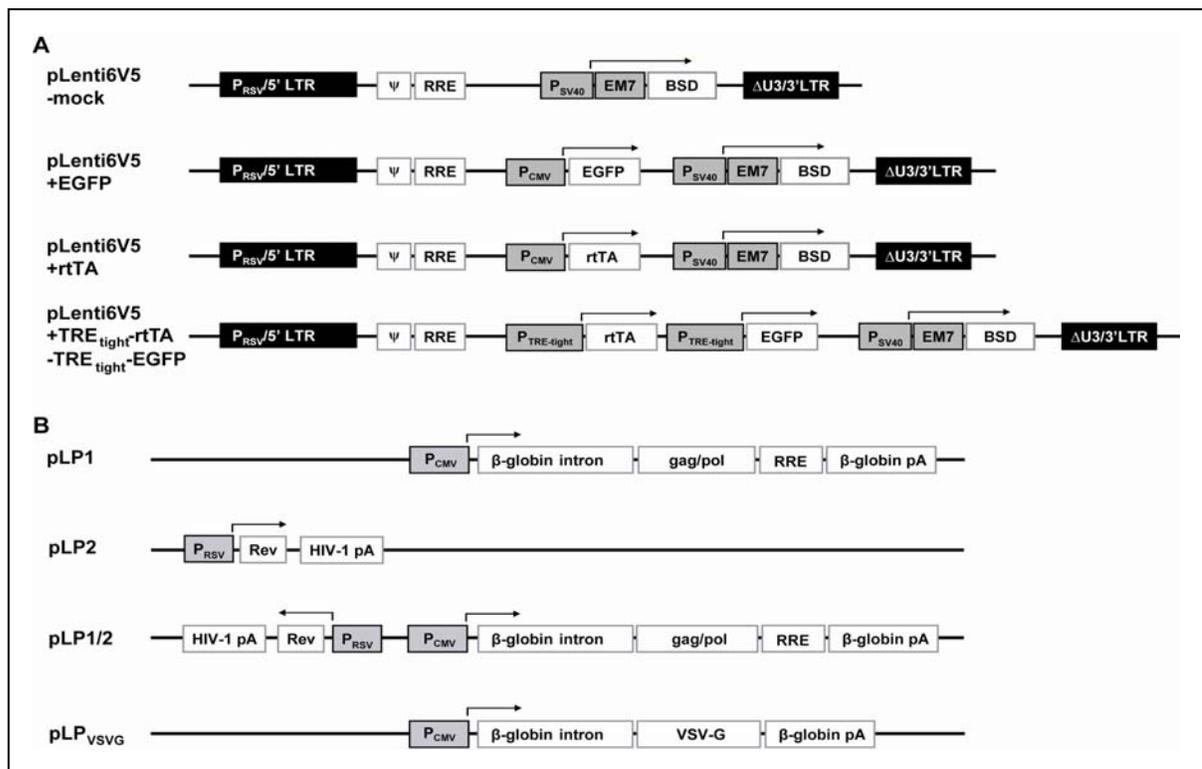


Abbildung 12: Plasmidkarten der Expressions- und Verpackungsplasmide.

(A) Schematische Darstellung der in dieser Arbeit hergestellten lentiviralen Expressionsvektoren. (B) Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Verpackungsplasmide und des neu klonierten pLP1/2-Packaging-Plasmids.

3.1.1 Klonierung der Negativkontrolle pLenti6/V5-mock

Für die Herstellung der lentiviralen Negativkontrolle (Attrappe, *engl.*: mock control) wurde die komplette Expressionskassette, welche den CMV-Promotor, die attR1 Stelle, das Chloramphenicol-Resistenzgen, das *ccdB*-Gen und die attR2 Stelle enthält, aus dem pLenti6/V5-DEST-Plasmid entfernt, um das neue Plasmid pLenti6/V5-mock herzustellen. Hierfür wurde das

Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit den Restriktionsendonukleasen *ClaI* und *XhoI* geschnitten und die resultierenden DNA-Fragmente mit Längen von 6314 bp und 2374 bp mit einem Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte 6314 bp Fragment wurde dann aus dem Gel aufgereinigt und mittels einer Klenow-Reaktion wurden stumpfe DNA-Enden hergestellt. Die Enzyme der Klenow-Reaktion wurden mittels Säulchenreinigung entfernt, das DNA-Fragment anschließend religiert und für die Transformation von chemisch kompetenten *Stbl3 E.coli* verwendet. Die anschließend gepickten Klone wurden mittels „Plasmid-Cracking“ und Kontrollverdau überprüft. Für den Kontrollverdau wurden die Restriktionsendonukleasen *MluI* und *SfoI* verwendet. Zum Überprüfen, ob die Expressionskassette entfernt wurde, wurde in einer Reaktion das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit angesetzt (Abbildung 13). Zum Überprüfen des Kontrollverdaus an sich wurde zusätzlich das ungeschnittene Originalplasmid pLenti6/V5-DEST und der gewählte pLenti6/V5-mock-Klon ungeschnitten zusätzlich mit auf ein Agarosegel aufgetragen (nicht gezeigt). Nach Anfertigung einer endotoxinfreien Plasmid-Maxi-Präparation wurde diese zur Kontrolle erneut nach dem selben Schema verdaut und anschließend mit dem V5rev Primer sequenziert (nicht gezeigt). Die Richtigkeit des pLenti6/V5-mock-Plasmids wurde hierdurch bestätigt.

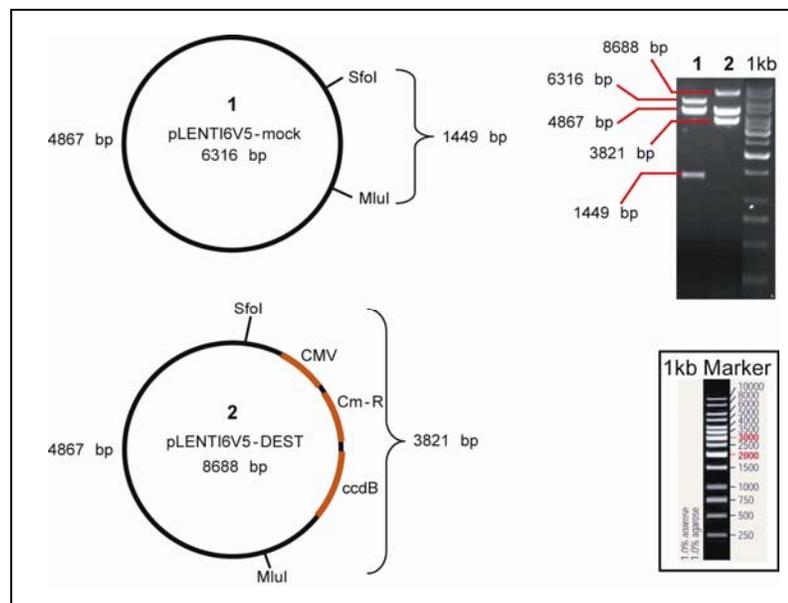


Abbildung 13: Kontrollverdau der Klonierung der lentiviralen Negativkontrolle.

Die entsprechenden Fragmentgrößen sind auf der linken Seite schematisch dargestellt und sind ebenfalls auf dem Gelfoto (rechts oben) eingezeichnet. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts unten dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den Kontrollverdau identifiziert und die Integrität der mock Kontrolle bestätigt werden.

3.1.2 Klonierung des EGFP Expressionsvektor pLenti6/V5+EGFP

Für die Herstellung des lentiviralen EGFP-Expressionsplasmids wurde die komplette cDNA des EGFP aus dem pEGFP-N3-Plasmid direkt in das Zielplasmid pLenti6/V5-DEST kloniert, um das neue Plasmid pLenti6/V5+EGFP herzustellen. Hierfür wurden die Originalplasmide pEGFP-N3 und pLenti6/V5-DEST mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Für pEGFP-N3 wurde NotI, für pLenti6/V5-DEST wurde MluI verwendet. Nach einer Reinigung wurden stumpfe DNA-Enden mittels einer Klenow-Reaktion hergestellt. Nach einer weiteren Reinigung wurden beide Plasmide mit EcoRI geschnitten, und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Von den beiden pEGFP-N3-Fragmenten mit Längen von 3961 bp und 768 bp wurde das kleinere, von den drei pLenti6/V5-DEST-Fragmenten mit Längen von 6875 bp, 1350 bp und 463 bp wurde das größte Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Stbl3 *E.coli* verwendet. Die anschließend gepickten Klone wurden mittels „Plasmid-Cracking“ und Kontrollverdau überprüft. Durch die Verwendung eines stumpfen und eines überlappenden Endes wurde eine gerichtete Klonierung möglich, daher war es im Kontrollverdau nicht notwendig, die Orientierung des Inserts zu überprüfen. Für den Kontrollverdau wurde die Restriktionsendonuklease KpnI verwendet, um zu überprüfen, ob das Plasmid das EGFP Insert enthält (Abbildung 14). Zum Vergleich wurde in einer Restriktionsreaktion das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit angesetzt (nicht gezeigt). Zum Überprüfen des Kontrollverdaus an sich wurde zusätzlich das ungeschnittene Originalplasmid pLenti6/V5-DEST und der gewählte pLenti6/V5+EGFP-Klon ungeschnitten zusätzlich mit auf ein Agarosegel aufgetragen (nicht gezeigt). Nach Anfertigung einer endotoxinfreien Plasmid-Maxi-Präparation wurde diese zur Kontrolle erneut nach dem selben Schema verdaut und anschließend das gesamte Plasmid mit den Primern: EGFP-Nrev, EGFP-Cfor, Tac-Profor, CMV-Profor, pSG5-3', fl-ori-5'rev, BLA-Nrev, BLA-Cfor, ColE1-3'for, Lenti1, Lenti2, EGFPprev, AmpRintfor, AmpRintrev sequenziert (nicht gezeigt). Die Richtigkeit des pLenti6/V5+EGFP-Plasmids und die korrekte Orientierung des EGFP Inserts wurde hierdurch bestätigt.

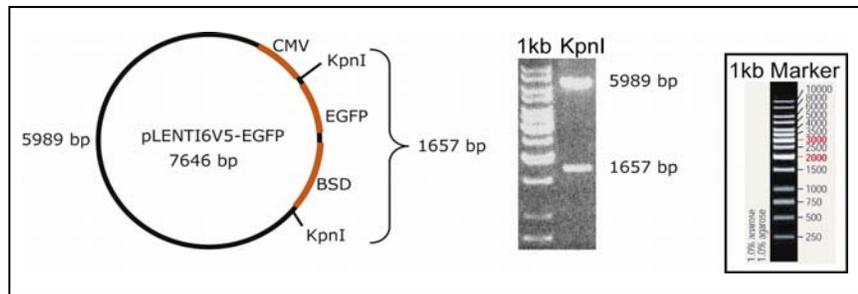


Abbildung 14: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5+EGFP-Plasmids.

Die entsprechenden Fragmentgrößen sind auf der linken Seite schematisch dargestellt und sind ebenfalls auf dem Gelfoto (Mitte) eingezeichnet. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den Kontrollverdau identifiziert und die Integrität des pLenti6/V5+EGFP-Plasmids bestätigt werden.

3.1.3 Klonierung des promotorlosen Zielvektor pLenti6/V5 Δ CMV

Für die Klonierung des selbstregulierten Tet-On-EGFP-Expressionsvektors war es zunächst erforderlich, den CMV-Promotor aus dem pLenti6/V5-DEST-Plasmid zu entfernen, um das neue Plasmid pLenti6/V5 Δ CMV herzustellen.

Hierfür wurden das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit den Restriktionsendonukleasen ClaI und SpeI geschnitten und die resultierenden DNA-Fragmente mit Längen von 8077 bp und 611 bp mit einem Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte 8077 bp Fragment wurde dann aus dem Gel aufgereinigt und mittels einer Klenow-Reaktion wurden stumpfe DNA-Enden hergestellt. Die Enzyme der Klenow-Reaktion wurden mittels Säulchenreinigung entfernt, das DNA-Fragment anschließend religiert und für die Transformation von chemisch kompetenten DB3.1 *E.coli* verwendet. Die anschließend gepickten Klone wurden mittels Kontrollverdau überprüft. Für den Kontrollverdau wurden die Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI verwendet. Da die NdeI Schnittstelle im CMV-Promotor liegt, sollte im NdeI Einzelverdau das Plasmid nicht geschnitten werden, im Doppelverdau NdeI/XhoI wurde das linearisierte Plasmid erwartet. Zum Vergleich wurde das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST ebenso verdaut und zusammen mit ungeschnittenem Plasmid auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 15). Die Richtigkeit des pLenti6/V5 Δ CMV-Plasmids wurde auch durch Sequenzierung mit dem RRE-3'for Primer bestätigt.

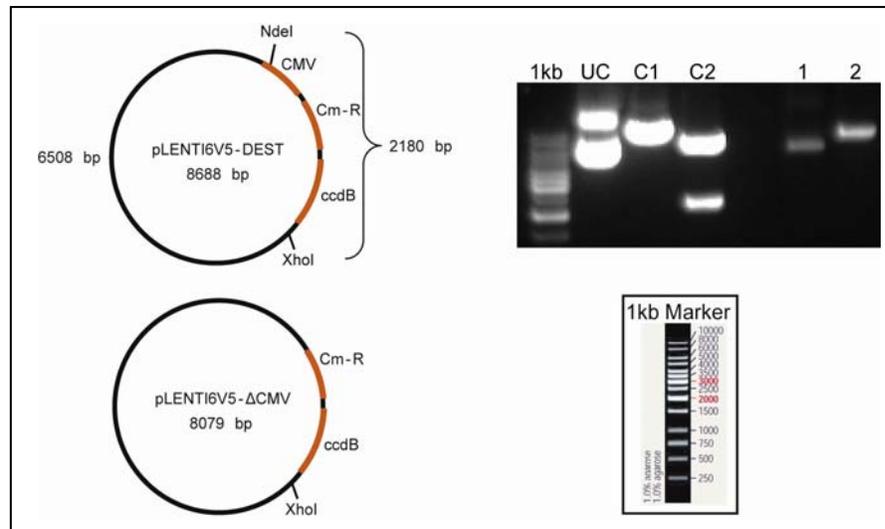


Abbildung 15: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5ΔCMV-Plasmids.

Die entsprechenden Fragmentgrößen sind auf der linken Seite schematisch dargestellt. Das Gelfoto (rechts oben) zeigt die entsprechenden DNA-Fragmente. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts unten dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den Kontrollverdau identifiziert und die Integrität des pLenti6/V5ΔCMV-Plasmids bestätigt werden. UC: pLenti6/V5-DEST ungeschnitten (zirkuläre und supercoiled Laufform), C1: pLenti6/V5-DEST NdeI geschnitten, 8688 bp, C2: pLenti6/V5-DEST NdeI/XhoI geschnitten, 6508 bp, 2180 bp, 1: pLenti6/V5ΔCMV NdeI, ungeschnitten (Supercoiled Laufform), 2: pLenti6/V5ΔCMV NdeI/XhoI, 8079 bp.

3.1.4 Klonierung des Tet-On-Expressionsvektors pLenti6V5+rtTA

Für die Herstellung des lentiviralen rtTA-Expressionsplasmids wurde die komplette cDNA des rtTA-Gens aus dem pTet-ON-Plasmid in das Zielplasmid pLenti6/V5-DEST kloniert, um das neue Plasmid pLenti6/V5+rtTA herzustellen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt zunächst das Plasmid pENTR11+rtTA hergestellt, indem das Originalplasmid pTet-ON mit BamHI und das pENTR11-Plasmid mit EcoRV, welches stumpfe Enden erzeugt, geschnitten wurde. Nach einer Reinigung wurden mittels einer Klenow-Reaktion bei dem pTet-On-Plasmid stumpfe DNA-Enden hergestellt. Nach einer weiteren Reinigung wurden beide Plasmide mit EcoRI geschnitten, und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Von den drei pTet-ON-Fragmenten mit Längen von 3685 bp, 2681 bp und 1025 bp wurde das kleinste, von den drei pENTR11-Fragmenten mit Längen von 2299 bp, 423 bp und 22 bp wurde das größte Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet. Die anschließend gepickten Klone wurden mittels „Plasmid-Cracking“ und Kontrollverdau überprüft (nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurde das rtTA-Gen mittels LR Clonase aus dem pENTR11+rtTA-Plasmid in das pLenti6/V5-DEST-Plasmid rekombiniert, um den neuen lentiviralen Expressionsvektor pLenti6/V5+rtTA zu generieren.

Die anschließend gepickten Klone wurden mittels „Plasmid-Cracking“ und Kontrollverdau überprüft. Durch die Verwendung eines stumpfen und eines überlappenden Endes wurde eine gerichtete Klonierung möglich, daher war es im Kontrollverdau nicht notwendig die Orientierung des Inserts zu überprüfen. Für den Kontrollverdau wurde die Restriktionsendonuklease KpnI verwendet, um zu überprüfen ob das Plasmid das rtTA-Insert enthält (Abbildung 16). Zum Vergleich wurde in einer Restriktionsreaktion das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit angesetzt (nicht gezeigt). Die Richtigkeit des pLenti6/V5+rtTA-Plasmids und die korrekte Orientierung des rtTA-Inserts wurde auch durch Sequenzierung der endotoxinfreien Maxi-Präparation mit dem CMV-Profor Primer bestätigt.

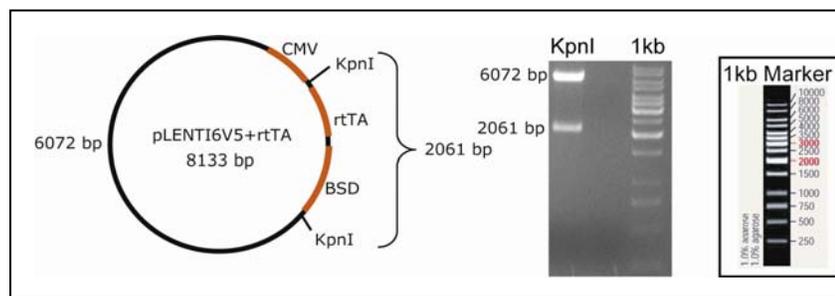


Abbildung 16: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5+rtTA-Plasmids.

Die entsprechenden Fragmentgrößen sind auf der linken Seite schematisch dargestellt und sind ebenfalls auf dem Gelfoto (Mitte) eingezeichnet. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den Kontrollverdau identifiziert und die Integrität des pLenti6/V5+rtTA-Plasmids bestätigt werden.

3.1.5 Klonierung des selbstregulierten Tet-ON-EGFP-Expressionsvektor

Die Klonierung des selbstregulierten Tet-ON-EGFP-Expressionsvektors erfolgte in mehreren Schritten (Abbildung 17A). Für die Herstellung des neuen Plasmids wurde das EGFP aus pEGFP-N3, sowie der rtTA aus pTet-On, jeweils hinter den TRE_{tight}-Promotor in das Zielplasmid pLenti6/V5ΔCMV kloniert, um das lentivirale Expressionsplasmid pLenti6/V5ΔCMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP herzustellen. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden jeweils durch „Plasmid-Cracking“ und geeignete Kontrollverdaue überprüft (nicht gezeigt). Durch die Verwendung mindestens eines überlappenden Endes wurde eine gerichtete Klonierung möglich, daher war es im Kontrollverdau nicht notwendig die Orientierung des Inserts zu überprüfen.

Zunächst wurde die komplette cDNA des EGFP aus dem pEGFP-N3-Plasmid direkt in das Zielplasmid pTRE-tight kloniert, um das neue Plasmid pTRE_{tight}+EGFP herzustellen. Hierfür wurden jeweils die Originalplasmide pEGFP-N3 und pTRE-tight mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und NotI geschnitten. Von den beiden pEGFP-N3-Fragmenten mit Längen von 3961 bp und 768 bp wurde das kleinere, von den beiden pTRE-tight-Fragmenten mit Längen von 2553 bp und 52 bp wurde das größere Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet.

Im zweiten Schritt wurde die komplette cDNA des rtTA-Transaktivators aus dem pTet-On-Plasmid ebenfalls direkt in das Zielplasmid pTRE-tight kloniert, um das neue Plasmid pTRE_{tight}+rtTA herzustellen. Hierfür wurden jeweils die Originalplasmide pTet-On und pTRE-tight mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnitten. Von den drei pTet-On-Fragmenten mit Längen von 3685 bp, 2681 bp und 1025 bp wurde das kleinste, von den beiden pTRE-tight-Fragmenten mit Längen von 2584 bp und 21 bp wurde das größere Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet.

Für die weitere Klonierung wurde die EcoRI Schnittstelle aus dem pTRE_{tight}+rtTA-Plasmid eliminiert, wodurch das neue Plasmid pTRE_{tight}+rtTA-ΔEcoRI entstand. Hierfür wurde das pTRE_{tight}+rtTA-Plasmid mit EcoRI geschnitten, dann wurden mit Klenow stumpfe Enden generiert, nach einer Reinigung religiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet.

Im nächsten Schritt wurde nun die Expressionskassette, welche den TRE_{tight}-Promotor und das EGFP-Gen enthält, aus dem pTRE_{tight}+EGFP-Plasmid in das pTRE_{tight}+rtTA-ΔEcoRI-Plasmid kloniert, um das neue Plasmid pTRE_{tight}-rtTA+TRE_{tight}-EGFP herzustellen. Dafür wurde das Plasmid pTRE_{tight}+EGFP mit XhoI und das pTRE_{tight}+rtTA-ΔEcoRI-Plasmid mit NheI geschnitten. Nach einer Reinigung wurden stumpfe DNA-Enden mittels einer Klenow-Reaktion hergestellt. Nach einer weiteren Reinigung wurden beide Plasmide mit NotI geschnitten und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Von den drei pTRE_{tight}+EGFP-Fragmenten mit Längen von 2005 bp, 1090 bp und 226 bp wurde das mittlere, von den beiden pTRE_{tight}+rtTA-ΔEcoRI-Fragmenten mit Längen von 3606 bp und 7 bp wurde das größere Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet.

Im weiteren Verlauf wurde nun aus dem pTRE_{tight}-rtTA+TRE_{tight}-EGFP-Plasmid die komplette Expressionskassette, welche den TRE_{tight}-Promotor, das rtTA-Gen, den zweiten TRE_{tight}-Promotor und das EGFP-Gen enthält, in das pENTR11-Plasmid kloniert, wodurch das Plasmid pENTR11+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP entstand. Dafür wurde das pTRE_{tight}-rtTA+TRE_{tight}-EGFP-Plasmid mit BbsI und das pENTR11-Plasmid mit BamHI geschnitten. Nach einer Reinigung wurden stumpfe DNA-Enden mittels einer Klenow-Reaktion hergestellt. Nach einer weiteren Reinigung wurden beide Plasmide mit NotI geschnitten und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Von den beiden pTRE_{tight}-rtTA+TRE_{tight}-EGFP-Fragmenten mit Längen von 2483 bp und 2217 bp wurde das größere, von den beiden pENTR11-Fragmenten mit Längen von 2302 bp und 442 bp wurde ebenfalls das größere Fragment aufgereinigt, diese dann ligiert und für die Transformation von chemisch kompetenten Top10 *E.coli* verwendet.

Im letzten Schritt wurde nun die komplette Expressionskassette, welche den TRE_{tight}-Promotor, das rtTA-Gen, den zweiten TRE_{tight}-Promotor und das EGFP-Gen enthält, aus dem pENTR11+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP mittels der LR Clonase in den neu hergestellten Zielvektor pLenti6/V5ΔCMV rekombiniert, um das endgültige lentivirale Expressionsplasmid pLenti6/V5ΔCMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP zu generieren, welches nun für die Transformation von chemisch kompetenten Stbl3 *E.coli* verwendet wurde.

Die Größe des integrierten Fragments, sowie des Plasmids wurde mittels eines XbaI Kontrollverdaus überprüft (Abbildung 17B). Zum Vergleich wurde in einer Restriktionsreaktion das Originalplasmid pLenti6/V5-DEST mit angesetzt (nicht gezeigt). Nach Anfertigung einer endotoxinfreien Plasmid-Maxi-Präparation wurde die richtige DNA-Sequenz des Inserts durch Sequenzierung mit den Primern forattR1, rtTA-intfor, EGFP-Nrev, EGFP-Crev und EGFP-Cfor bestätigt.

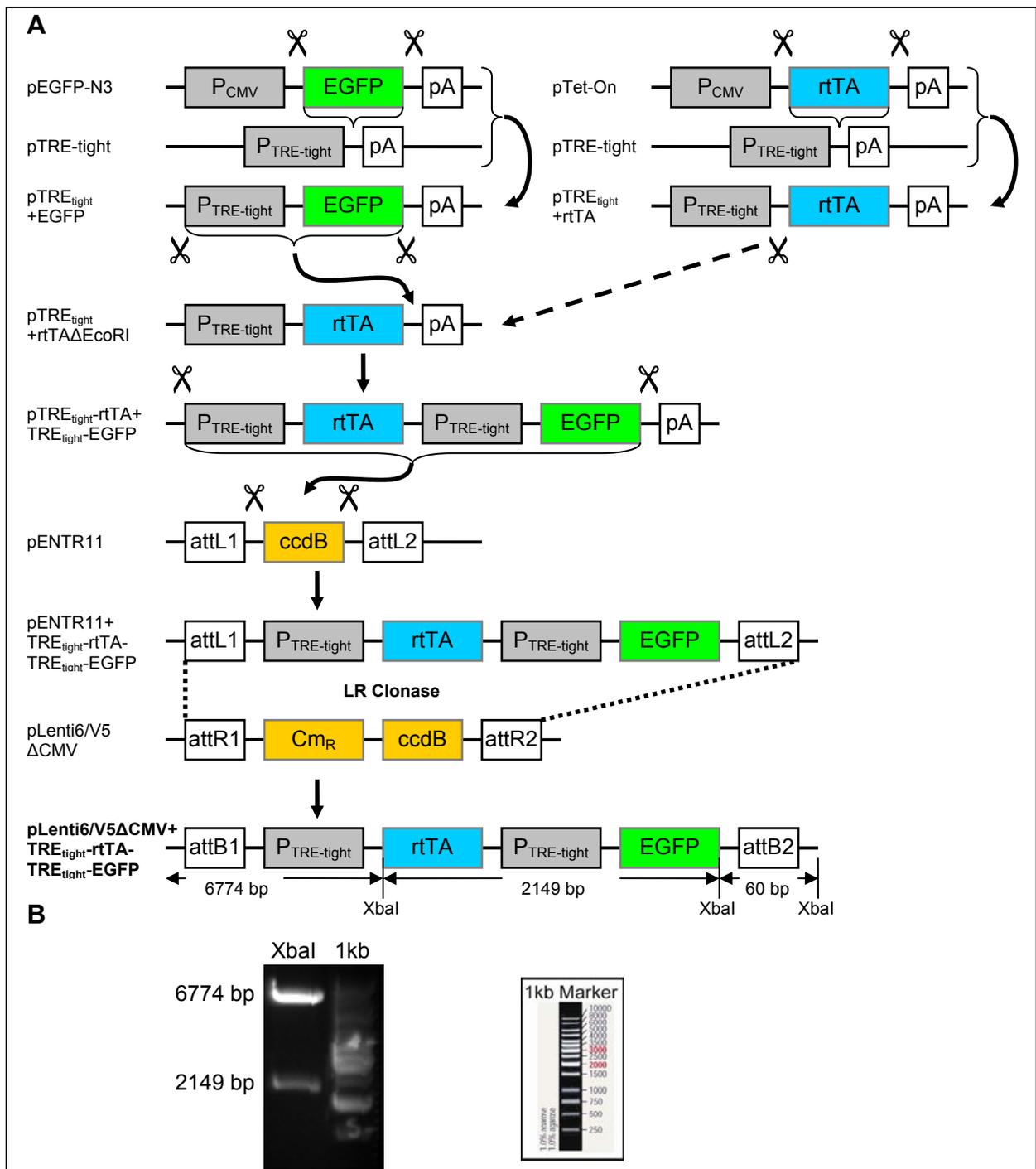


Abbildung 17: Klonierung des selbstregulierten Tet-ON-EGFP-Expressionsvektor.

(A) Klonierungsstrategie für die Herstellung von pLenti6/V5ΔCMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP. Gezeigt sind schematisch die einzelnen Klonierungsschritte. Die Positionen an denen mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden sind mit ✂ angedeutet. Erläuterungen siehe Text. (B) XbaI Kontrollverdau von pLenti6/V5ΔCMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP. Die entsprechenden XbaI Schnittstellen und Fragmentgrößen sind in (A) schematisch dargestellt. Das Gelfoto (links) zeigt die entsprechenden DNA-Fragmente. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den

Kontrollverdau identifiziert und die Integrität des pLenti6/V5ΔCMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP-Plasmids bestätigt werden.

3.1.6 Klonierung von pLP1/2

Für die Klonierung des pLP1/2 lentiviralen Packaging-Plasmids wurde die komplette Expressionskassette des Originalplasmids pLP2, welche den RSV-Promotor, das Rev-Element und den polyA Bereich enthält, in das pLP1-Plasmid integriert.

Da in den Plasmiden keine passenden Schnittstellen zur Verfügung standen, wurde hierfür der gewünschte Bereich aus pLP2 mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so entworfen, dass an den Flanken des PCR-Produkts Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease Bsu36I generiert wurden. Das PCR-Produkt wurde nach der PCR-Reaktion mittels Gelextraktion aufgereinigt und in einem Restriktionsansatz mit Bsu36I geschnitten. Der Zielvektor pLP1 wurde ebenfalls mit Bsu36I geschnitten und nach einer Reinigung dephosphoryliert, danach wieder gereinigt und mit dem geschnittenen PCR Produkt ligiert. Der Ligationsansatz wurde dann für die Transformation von chemisch kompetenten TAM1 *E.coli* verwendet.

Die anschließend gepickten Klone wurden mittels „Plasmid-Cracking“ und Kontrollverdau überprüft. Durch die Verwendung der gleichen Schnittstellen an beiden Enden war keine gerichtete Klonierung möglich, daher musste die Orientierung des Inserts überprüft werden, da ein Vektor, in dem die beiden konstitutiven Promotoren voneinander abweisend liegen, bevorzugt wurde. Für den Kontrollverdau wurde die Restriktionsendonuklease Bsu36I verwendet, um zu überprüfen ob das Plasmid das P_{RSV}-Rev-pA Insert enthält (Abbildung 18). Zum Vergleich wurde in einer Restriktionsreaktion das Originalplasmid pLP1 mit angesetzt (nicht gezeigt). Nach Anfertigung einer endotoxinfreien Plasmid-Maxi-Präparation wurde die richtige Sequenz und Orientierung des Inserts durch Sequenzierung mit dem QE-Profor und CMV-Prorev Primer überprüft. Die Richtigkeit des pLP1/2-Plasmids und die korrekte Orientierung des Inserts wurden hierdurch bestätigt.

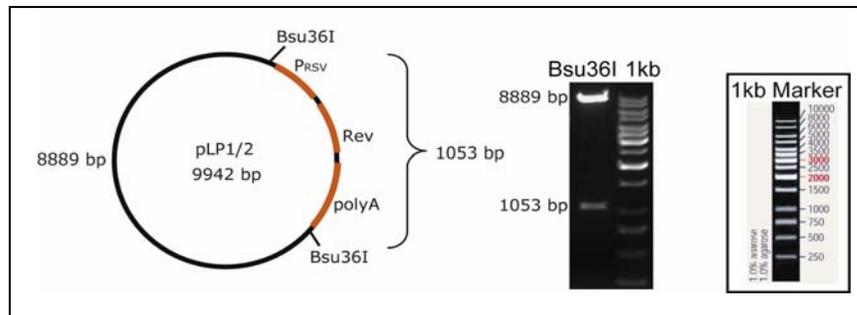


Abbildung 18: Kontrollverdau der Klonierung des pLP1/2-Plasmids.

Die entsprechenden Fragmentgrößen sind auf der linken Seite schematisch dargestellt und sind ebenfalls auf dem Gelfoto (Mitte) eingezeichnet. Die Größen der Banden des 1 kb DNA-Markers sind rechts dargestellt. Die theoretisch erwarteten Fragmente konnten durch den Kontrollverdau identifiziert und die Integrität des pLP1/2-Plasmids bestätigt werden.

3.2 Vergleich verschiedener Verpackungssysteme

Da es theoretisch wahrscheinlicher erscheint, dass eine Zelle bei der Co-Transfektion nur drei anstelle von vier Plasmiden gleichzeitig aufnimmt, wurde in diesem ersten Versuch die Anzahl der Verpackungsplasmide von drei auf zwei reduziert, um zu testen, ob dadurch die Virusproduktion verbessert werden kann. Dafür wurde das pLP1/2-Plasmid hergestellt, welches die Funktionen von pLP1 und pLP2 vereint. Dieses wurde mit dem kommerziellen Packaging-Mix (PM) der dritten Generation (pLP1 und pLP2) verglichen. Für diesen Test wurden Lentiviren, einmal unter Verwendung des kommerziellen Packaging-Mix nach dem Standardprotokoll, und einmal unter Verwendung von pLP1/2 und pLP/VSVG, hergestellt. Außer den Packaging-Plasmiden wurden beide Viruspräparationen parallel unter gleichen Bedingungen hergestellt. Für den Vergleich der beiden Viren wurden HT1080-Zellen parallel und unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene transduziert. Die Zellen wurden nicht mit Blasticidin selektioniert und am fünften Tag nach der Transduktion mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. In den Testzellen, die mit Virus transduziert wurden, welcher mit kommerziellem Packaging-Mix hergestellt wurde, konnte, im Vergleich zu den Zellen, die mit dem pLP1/2 Virus transduziert wurden, eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abbildung 19).

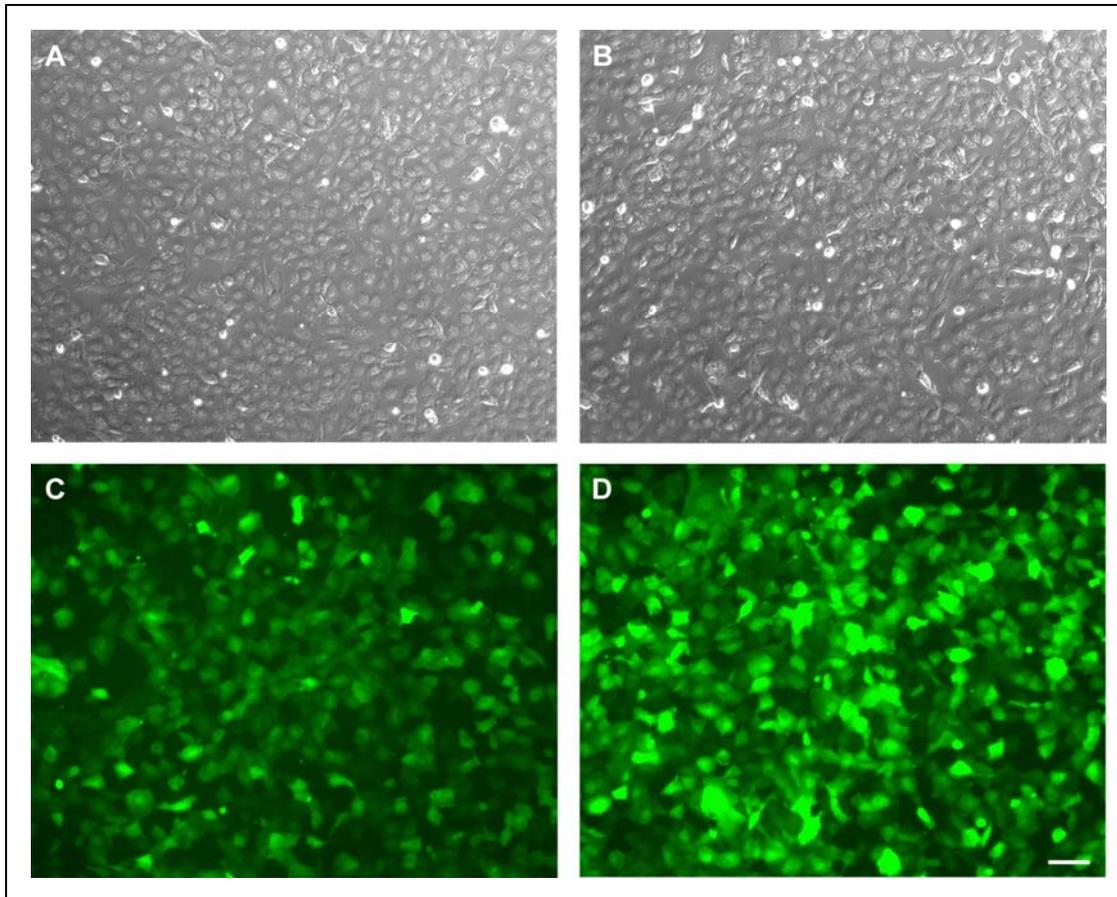


Abbildung 19: Vergleich verschiedener Verpackungssysteme auf Proteinebene.

Vergleich der Fluoreszenzintensität nach der Transduktion von HT1080 mit Virus produziert mit kommerziellem Packaging-Mix (PM) oder pLP1/2. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der transduzierten HT1080-Zellen 5 Tage nach der Transduktion. In der linken Hälfte (A und C) sind die HT1080-Zellen nach der Transduktion mit EGFP Virus, welcher mit dem pLP1/2-Plasmid hergestellt wurde, gezeigt. In der rechten Hälfte (B und D) die HT1080-Zellen nach der Transduktion mit Virus, der mit dem kommerziellen Packaging-Mix hergestellt wurde. (A und B) sind Phasenkontrastaufnahmen (C und D) zeigen die Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte. Bei der Verwendung des PM Virus im Vergleich zu pLP1/2 Virus ist eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität zu erkennen. (Maßstabsbalken: 100 μ m).

Um diesen Effekt genauer zu charakterisieren wurde die Transgenexpression in den HT1080-Zellen mittels qPCR quantifiziert. Dafür erfolgte die RNA-Isolation ebenfalls am fünften Tag nach der Transduktion. Zum Vergleich der beiden Viruspräparationen wurde die Expression von EGFP sowie BSD auf RNA-Ebene gemessen. Sowohl die EGFP- als auch die BSD-Expression waren signifikant höher, wenn der kommerzielle Packaging-Mix anstelle von pLP1/2 verwendet wurde. Die Steigerung betrug bei beiden Transgenen etwa das Doppelte (Abbildung 20; EGFP p

= 0.003, BSD p = 0.002). Daher wurde in den weiteren Studien der kommerzielle Packaging-Mix für die Virusproduktion verwendet.

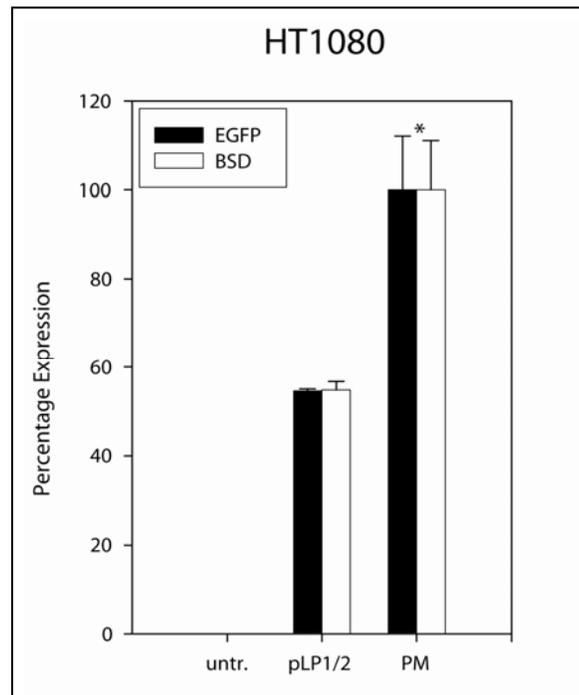


Abbildung 20: Vergleich verschiedener Verpackungssysteme auf RNA-Ebene.

Vergleich der Transgenexpression nach der Transduktion von HT1080 mit Virus produziert mit kommerziellem Packaging-Mix (PM) oder pLP1/2. Die Transgenexpression ist signifikant höher unter Verwendung von PM anstelle von pLP1/2 Virus. Die Steigerung betrug bei beiden Transgenen etwa das Doppelte (* Student's t-test: EGFP p=0,003, BSD p=0,002; n=3).

3.3 Optimierung der lentiviralen Transduktionseffizienz in hMSCs

In der Vergangenheit wurde Polybrene verwendet, um die Transduktionseffizienz diverser retroviraler Vektoren zu erhöhen. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt von Polybrene auf die Transduktionseffizienz von Lentiviren in humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. In Vorversuchen zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, toxischer Effekt von Polybrene auf hMSCs. Mit steigenden Polybrenekonzentrationen ab 6 µg/ml wurde zunehmendes Zellsterben beobachtet (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden 6 µg/ml Polybrene für alle Transduktionen von hMSCs verwendet. Der Effekt von Polybrene wurde in 293FT-Zellen, HT1080-Zellen und hMSCs getestet. In allen Zelltypen konnte durch die Zugabe von Polybrene während der Transduktion eine deutliche Zunahme der Anzahl EGFP exprimierender Zellen beobachtet werden und somit eine Steigerung der Transduktionseffizienz (Abbildung 21).

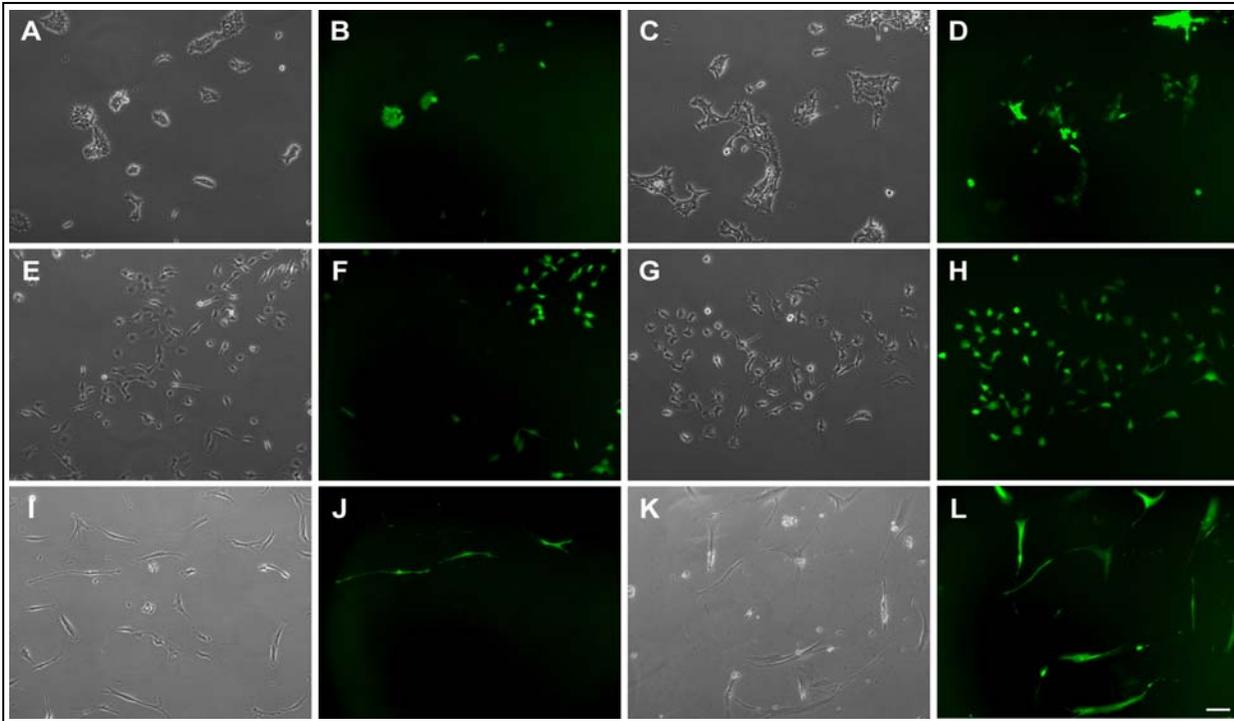


Abbildung 21: Effekt von Polybrene auf die Transduktionseffizienz auf Proteinebene.

Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen getesteten Zelltypen: (A - D) 293FT-Zellen, (E - H) HT1080 und (I - L) hMSCs eine Woche nach der Transduktion. In der linken Hälfte (A, B, E, F, I, J) sind die entsprechenden Zelltypen nach der Transduktion ohne Polybrene gezeigt. In der rechten Hälfte (C, D, G, H, K, L) sieht man die gleichen Zelltypen nach der Transduktion mit Polybrene. (A, E, I, C, G, K) sind Phasenkontrastaufnahmen; (B, F, J, D, H, L) zeigen die Fluoreszenzaufnahmen der gleichen Bildausschnitte. Die Anzahl fluoreszierender Zellen, und somit die Transduktionseffizienz, wird durch die Verwendung von Polybrene (Poly) während der Transduktion von 293FT, HT1080 und hMSCs sichtbar erhöht (Maßstabsbalken: 100 μ m).

Die Transgenexpression von EGFP, sowie BSD in HT1080-Zellen und hMSCs wurde auf RNA-Ebene quantifiziert, um diesen Effekt genauer zu charakterisieren. In 293FT zeigte sich durch die Addition von Polybrene während der Transduktion, eine signifikante Steigerung der Transgenexpression um fast das Doppelte (Abbildung 22A; EGFP $p=0,011$; BSD $p=0,009$;). In HT1080 verursachte die Zugabe von Polybrene einen Anstieg der Transgenexpression um mehr als das Doppelte (Abbildung 22B; EGFP $p = 0,002$; BSD $p = 0,02$). In hMSCs führte Polybrene zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz mit einer Steigerung der EGFP und BSD Transgenexpression um das 100-fache. (Abbildung 22C; EGFP $p = 0,002$; BSD $p = 0,004$). In allen Fällen korrelierte die Steigerung der EGFP-Expression mit der Steigerung der BSD-Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass der lentivirale Gentransfer speziell in hMSCs sehr

stark auf Polybrene reagiert und dies daher sehr wirksam ist, um die Transduktionseffizienz in hMSCs zu erhöhen.

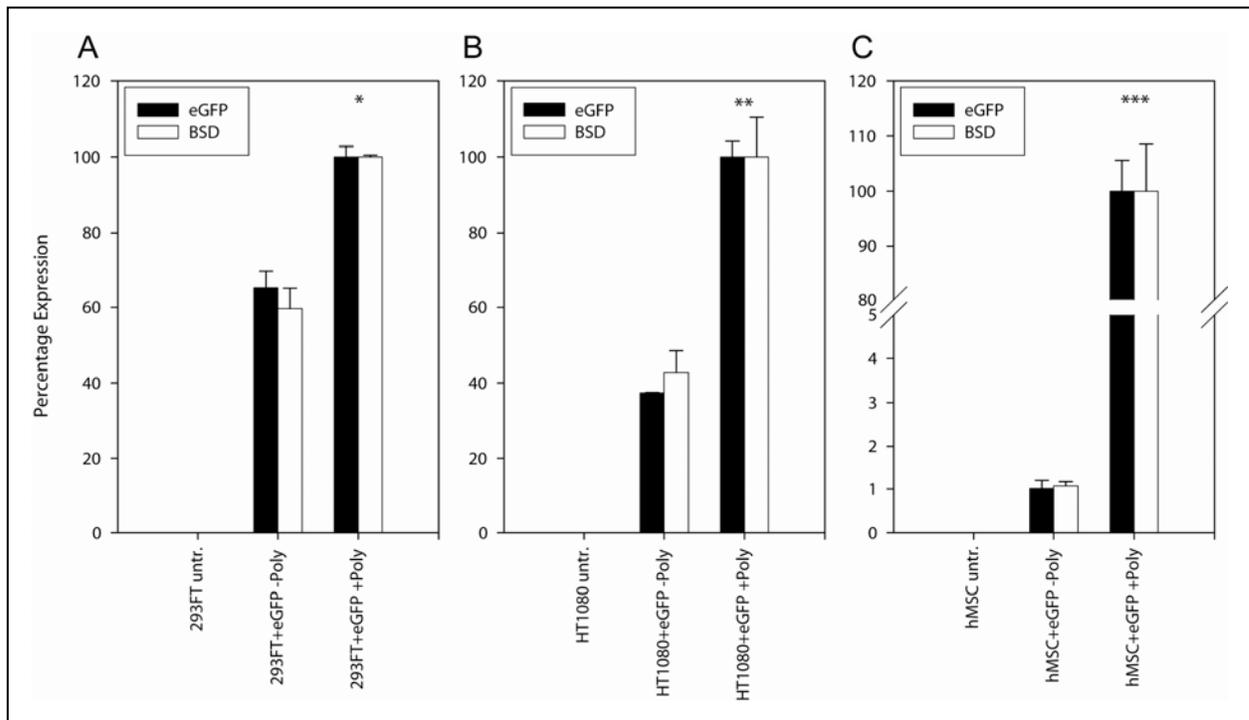


Abbildung 22: Effekt von Polybrene auf die Transduktionseffizienz auf RNA-Ebene.

Vergleich der Transgenexpression nach der Transduktion von (A) 293FT-Zellen, (B) HT1080-Zellen und (C) hMSCs ohne und mit Polybrene. Die Verwendung von Polybrene (Poly), während der Infektion von 293FT, HT1080 und hMSCs erhöht signifikant die Transduktionseffizienz und somit die Expression der Transgene (* Student's t-test: EGFP $p=0,011$; BSD $p=0,009$; $n=2$; ** Student's t-test: EGFP $p=0,002$; BSD $p=0,02$; $n=2$; *** Student's t-test: EGFP $p=0,002$; BSD $p=0,004$; $n=2$).

3.4 Optimierung der Ausbeute transgener hMSCs

Alle in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Expressionsvektoren tragen das Blastocidin-S-Deaminase-Gen. Aus diesem Grund sind alle transduzierten Zellen, die dieses Gen stabil integriert haben, resistent gegen das Antibiotikum Blastocidin. Mit der Selektion kann der Anteil der transgenen Zellen erhöht werden, indem alle untransduzierten Zellen durch Blastocidin eliminiert werden. Um einen möglichst hohen Selektionsdruck auf die heterogenen Zellpopulationen auszuüben und dadurch einen großen Anteil transduzierter Zellen zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die höchste empfohlene Blastocidin Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Der Effekt der Blastocidinselektion wurde in HT1080 und hMSCs untersucht. In beiden Zelltypen zeigte sich eine ausgeprägte Steigerung des Anteils der GFP exprimierenden

Zellen und der Fluoreszenzintensität. Dieser Anstieg war abhängig von dem Zeitraum über den die Zellen selektiert wurden. In Anwesenheit von Blasticidin stieg der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen deutlich an. Nach der Selektion konnten nur noch wenige Zellen beobachtet werden die im Fluoreszenzlicht nicht grün leuchteten (Abbildung 23).

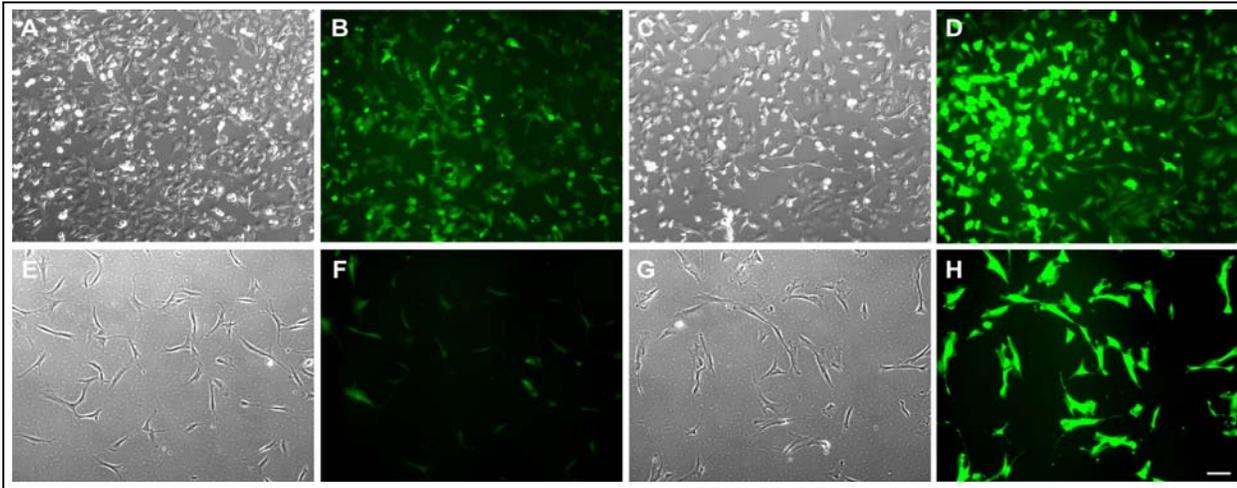


Abbildung 23: Effekt von Blasticidin auf die transgenen Zellen.

Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der getesteten HT1080-Zellen (A - D) und hMSCs (E - H) vor und nach der Blasticidinselektion. In der linken Hälfte (A, B, E, F) sind die entsprechenden Zellen vor der Selektion mit Blasticidin gezeigt. In der rechten Hälfte (C, D, G, H) die gleichen Zelltypen nach der Selektion. (A, E, C, G) sind Phasenkontrastaufnahmen (B, F, D, H) zeigen die Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte. Die Anzahl der transgenen hMSCs sowie die Fluoreszenzintensität von HT1080 und hMSCs wird durch die Blasticidinselektion nach der Transduktion deutlich erhöht (Maßstabsbalken: 100 µm).

Die Fluoreszenzmikroskopie von EGFP ist zwar sehr sensitiv aber die Quantifizierung des Anteils EGFP positiver Zellen mittels derselben sehr ungenau. Deshalb wurden die Zellen auch mit Hilfe von fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie (FACS) gezählt, um den Effekts der Blasticidinselektion genauer zu untersuchen. In der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass in den HT1080-Zellen eine sehr hohe Transduktionseffizienz erreicht wurde. 99,4% Prozent der HT1080-Zellen exprimierten mindestens eine Kopie des EGFP-Gens vor der Selektion (Abbildung 24A und C Population P2; P3 $p=0,000004$; P4 $p=0,00007$; P5 $p=0,0000001$; $n=4$); 30,4 % dieser Zellen hatten ein niedriges (P3), 49,5% ein mittleres (P4), und 10,2% ein hohes Transgen-Expressionsniveau. Nach 5 Tagen Blasticidinselektion sank der Anteil an Zellen mit niedrigem Expressionsniveau (12,3%, P3), wohingegen die Menge der Zellen mit mittlerer (58,0%, P4) und hoher EGFP-Expression (19,9%, P5) anstieg. In den hMSCs war die Transduktionseffizienz, gemessen an der EGFP-Expression, vor Selektion geringer als in

HT1080-Zellen (Abbildung 24B und E; P2 $p=0,007$; P2* $p=0,02$; $n=2$). 26,8% der hMSCs exprimierten mindestens eine Kopie von EGFP vor der Selektion (P2). Nach kurzer Zeit der Selektion mit Blasticidin verdoppelte sich die Anzahl der EGFP exprimierenden Zellen (52,1%, P2) wobei auch ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität beobachtet wurde (P2*).

Nach der Langzeitkultivierung von transduzierten Zellen mit Blasticidin konnte in beiden Zelltypen ein sehr hoher Anteil transgener Zellen erreicht werden (Abbildung 24D und F). In diesem Experiment lag die Transduktionseffizienz in den HT1080-Zellen bei etwa 85%. Nach der Selektion stieg der Anteil der EGFP positiven Zellen auf etwa 97% an (Abbildung 24D; $p=0,000002$; $n=2$). Die Transduktionseffizienz betrug etwa 72% in hMSCs. Nach der Selektion exprimierten ebenfalls etwa 97% der Zellen das EGFP-Gen (Abbildung 24F; $p=0,003$; $n=2$).

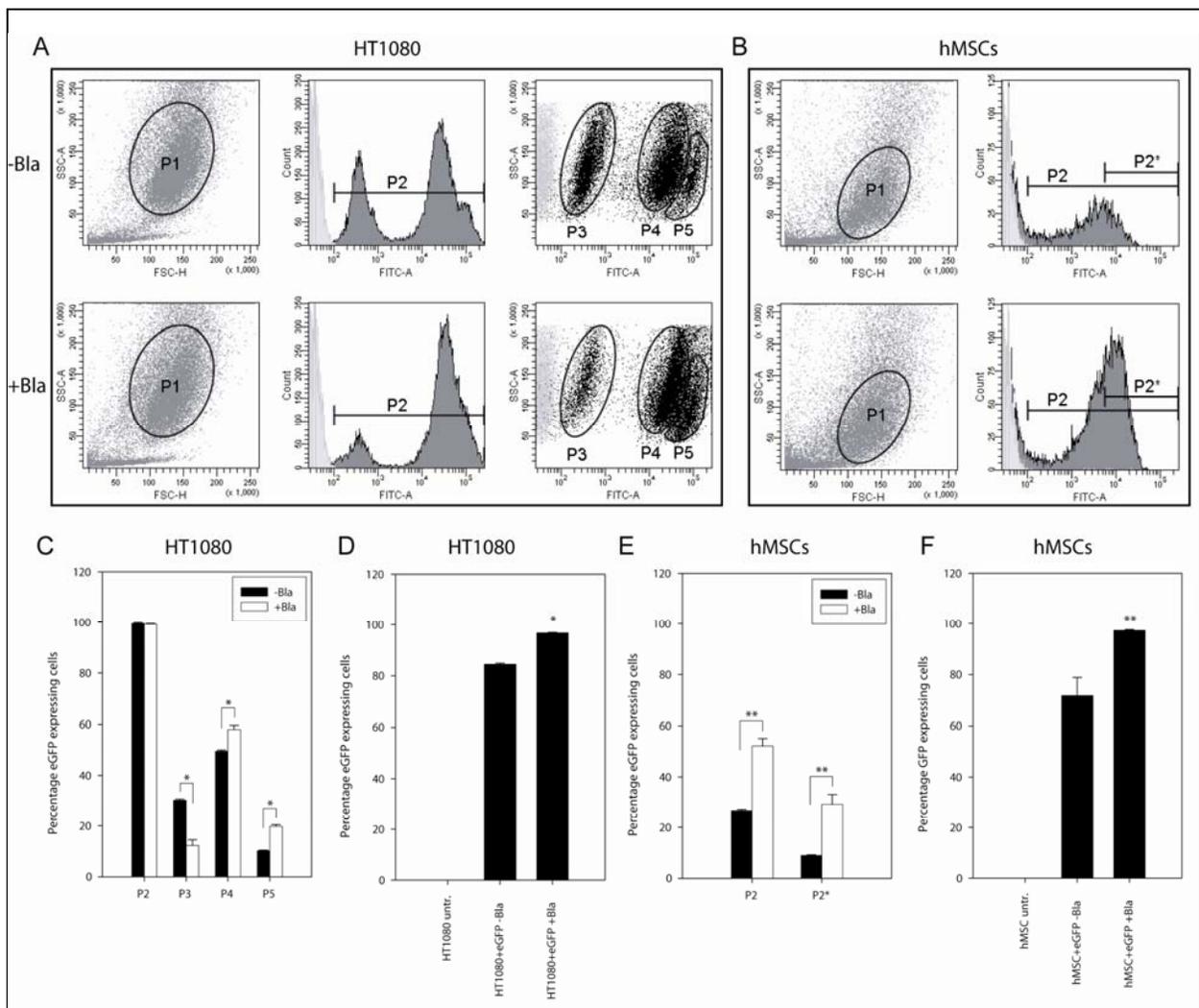


Abbildung 24: Effekt der Blasticidinselektion auf die transgenen Zellpopulationen.

FACS-Analysen von (A, C, D) HT1080-Zellen und (B, E, F). (A, B) FACS-Daten und (C, E) zugehörige Balkendiagramme von EGFP-transduzierte Zellen vor und nach Selektion mit 10 µg/ml Blasticidin (-Bla/+Bla) für 5 Tage (untransduzierte Kontrollzellen sind in hellgrau gezeigt). Die Analyse der Populationen 2 bis 5 (P2 – P5) basiert jeweils auf der Grundpopulation 1 (P1) (* Student's t-test: P3 p=0,000004; P4 p=0,00007; P5 p=0,0000001; n=4; ** Student's t-test: P2 p=0,007; P2* p=0,02; n=2). (D, F) Langzeiteffekt der Blasticidinselektion. Balkendiagramme repräsentieren die FACS-Daten der EGFP transduzierten Zellen ohne und mit Blasticidinselektion für 12 – 15 Tage (* Student's t-test: p=0,000002; n=2; ** Student's t-test p=0,003; n=2).

3.5 Vergleich von hMSCs verschiedener Spender

Um zu zeigen, dass die positiven Effekte der Zugabe von Polybrene während der Transduktion und der Selektion mit Blasticidin nach der Transduktion nicht spezifisch für hMSCs eines bestimmten Spenders sind, wurden hMSCs verschiedener Spender auf RNA- und Proteinebene verglichen. Zu diesem Zweck wurden die hMSCs nach dem Standardprotokoll mit pLenti6V5+EGFP transduziert. Die Transduktion erfolgte in Anwesenheit von Polybrene, anschließend wurden die Zellen mit Blasticidin selektioniert. Danach wurde RNA und Protein aus den Zellen isoliert und die Expressionsniveaus der Zellen verschiedener Spender mittels semi-quantitativer PCR und Western Blot verglichen (Abbildung 25). Hierbei zeigten sich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene keine Unterschiede in den Expressionsniveaus des EGFP-Transgens. Dies spricht dafür, dass während der Transduktion und bei der Transgenexpression keine spenderspezifischen Effekte auftreten, und auch die Effekte von Polybrene und Blasticidin sind nicht davon abhängig, von welchem Spender die jeweiligen hMSCs stammen.

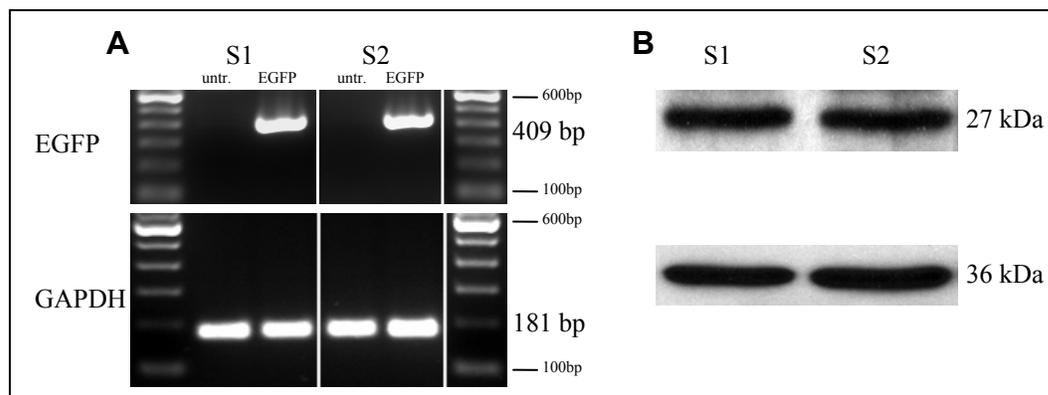


Abbildung 25: Vergleich der Transgenexpression von hMSCs verschiedener Spender.

Gezeigt ist die Transgenexpression von EGFP transduzierten hMSCs aus zwei verschiedenen Spendern (S1 und S2) mit (A) PCR und (B) Western Blot Analyse. Um Sicherzustellen dass jeweils die gleiche RNA- bzw. Proteinmenge eingesetzt wurde ist jeweils zusätzlich die Normierung für das GAPDH-Gen gezeigt. In (A) sind zusätzlich die

untransduzierten Kontrollzellen gezeigt. Die entsprechenden Größen der DNA- bzw. Proteinbanden sind angegeben. Die Expressionsstärken beider hMSC Populationen sind auf gleichem Niveau.

3.6 Tetrazyclin-regulierte Transgenexpression

Die Funktionsfähigkeit des selbstregulierten pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP-Expressionsvektors wurde durch Fluoreszenz-Mikroskopie überprüft. Hierfür wurde die U2OS-Zelllinie verwendet, da diese aus Knochengewebe stammt und für Transfektionsstudien besonders geeignet ist. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll mit pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP-Lentiviren transduziert und mit Blasticidin selektioniert, um eine möglichst hohe Ausbeute transgener Zellen zu erreichen. Als Kontrolle wurden die U2OS-Zellen parallel mit den unregulierten pLenti6/V5+EGFP Viren transduziert. Nach der Selektion wurden die zu testenden pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP U2OS-Zellen mit dem pTet-On-Plasmid, welches den rtTA Transaktivator unter Kontrolle des starken CMV-Promotors trägt, transient transfiziert. Als Negativkontrolle wurden parallel U2OS mit dem selbstregulierten Vektor ohne transiente Transfektion des pTet-On-Plasmids verwendet. Am Tag nach der Transfektion wurde sowohl bei den Testzellen als auch den Zellen für die Negativkontrolle die Stimulation mit 1 μ g/ml Doxycyclin begonnen. Die Expression des EGFP-Transgens wurde dann für mehrere Tage mittels Fluoreszenz-Mikroskopie verfolgt.

Bereits am dritten Tag nach der Zugabe von Doxycyclin konnte in den Testzellen eine schwache Expression des EGFP-Transgens beobachtet werden, die über mehrere Tage zunahm. Noch 7 Tage nach Beginn der Stimulation konnte in den Testzellen eine deutliche EGFP-Expression nachgewiesen werden, wohingegen in den ebenfalls mit Doxycyclin stimulierten Zellen der Negativkontrolle auch nach 7 Tagen noch keine Expression beobachtet wurde (Abbildung 26).

Da das pTet-On-Plasmid nur transient, episomal in den Zellen vorliegt und die U2OS-Zellen eine hohe Teilungsrate haben, verlieren sie das Plasmid sehr schnell. Da aber noch 8 Tage nach der Transfektion ein Großteil der Zellen das EGFP-Transgen exprimiert, spricht dies dafür, dass die selbstregulierende Eigenschaft des im pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP integrierten rtTA Transaktivators unter Kontrolle des TRE_{tight}-Promotors voll funktionsfähig ist. Die Tatsache, dass in den Zellen der Negativkontrolle ohne episomales pTet-On-Plasmid auch mit Doxycyclin-Stimulation nach 7 Tagen noch keine EGFP-Expression zu erkennen war, bestätigt eine äußerst niedrige Basalexpression des TRE_{tight}-Promotors. Somit konnte die

grundsätzliche Funktionsfähigkeit und Anwendbarkeit dieses selbstregulierenden Systems bestätigt werden.

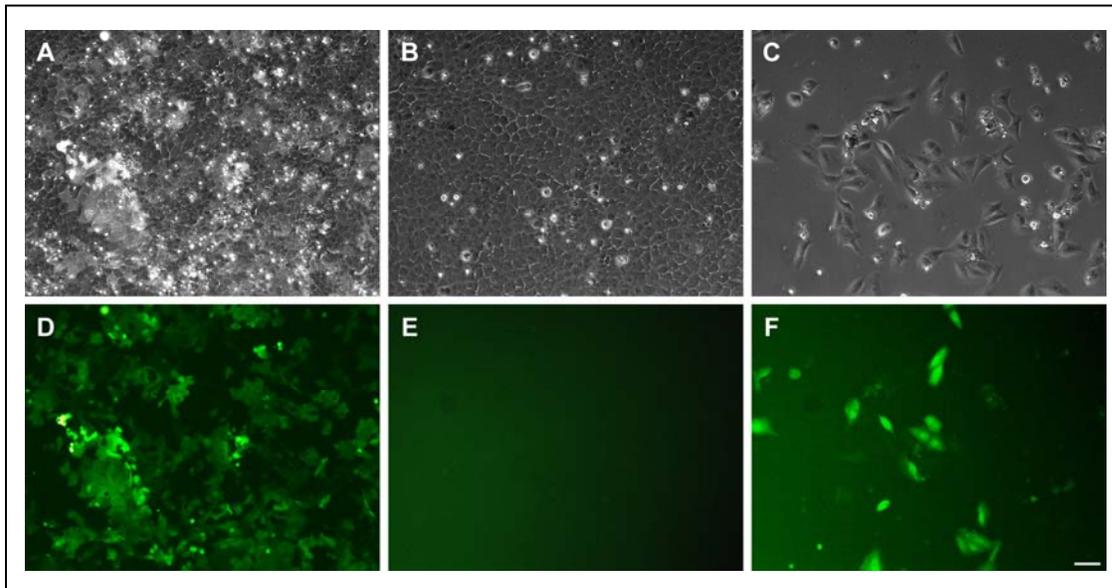


Abbildung 26: Tetrazyclin-regulierte Expression.

Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der getesteten U2OS-Zellen. (A - C) Phasenkontrast- und (B - F) Fluoreszenz-Aufnahmen. (A, D) Positivkontrolle: U2OS-pLenti6/V5+EGFP, (B, E) Negativkontrolle: U2OS-pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP nach 7 Tagen Stimulation mit 1 μ g/ml Doxycyclin (C, F) Testzellen: U2OS-pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP transduziert mit pTet-On nach 7 Tagen Stimulation mit 1 μ g/ml Doxycyclin. In den Zellen der Positivkontrolle ist eine starke EGFP-Expression zu erkennen, wohingegen in den Zellen der Negativkontrolle auch nach 7 Tagen Stimulation keine EGFP-Expression zu beobachten ist. In den Testzellen ist nach der transienten Transfektion mit pTet-On und Stimulation für 7 Tage ein deutlicher Anteil EGFP-positiver Zellen vorhanden. Die unterschiedliche Zelldichte in den Testzellen beruht auf den toxischen Effekten der Transfektion (Maßstabsbalken: 100 μ m).

3.7 Nachweis viraler Antigene nach der Transduktion

Gerade im Bereich der Gentherapie und der Tissue Engineering Anwendungen ist es essentiell, dass *ex vivo* lentiviral transduzierte Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation keine infektiösen Partikel enthalten. Daher wurde der zeitliche Verlauf der Anwesenheit des HIV-1 p24 (CA)-Kernprotein-Antigens im Zellkulturüberstand von HT1080-Zellen und hMSCs über mehrere Medienwechsel bzw. Passagen verfolgt. Die Proben wurden unmittelbar vor den Medienwechseln entnommen. Der ELISA-Test wurde mit je einer weiteren Probe des ersten positiven und des ersten negativen Zeitpunkt wiederholt. In den HT1080-Zellen (Abbildung 27A) konnte bereits nach einmaligem Passagieren und einem weiteren Mediumwechsel kein p24-

Antigen mehr nachgewiesen werden. In den hMSCs (Abbildung 27B) war der p24-Gehalt im Zellkulturmedium nach dem dritten Mediumwechsel unter die Nachweisgrenze gesunken. Um sicherzustellen, dass auch im weiteren Verlauf keine infektiösen Partikel mehr entstanden sind, wurde die p24 Menge noch über mehrere Medienwechsel verfolgt. Auch zu den späteren Zeitpunkten wurde kein p24-Antigen mehr detektiert. Der verwendete ELISA-Test ist somit ein geeignetes Mittel um die Abwesenheit infektiöser Partikel und daher die biologische Sicherheit der transduzierten Zellen zu bestätigen.

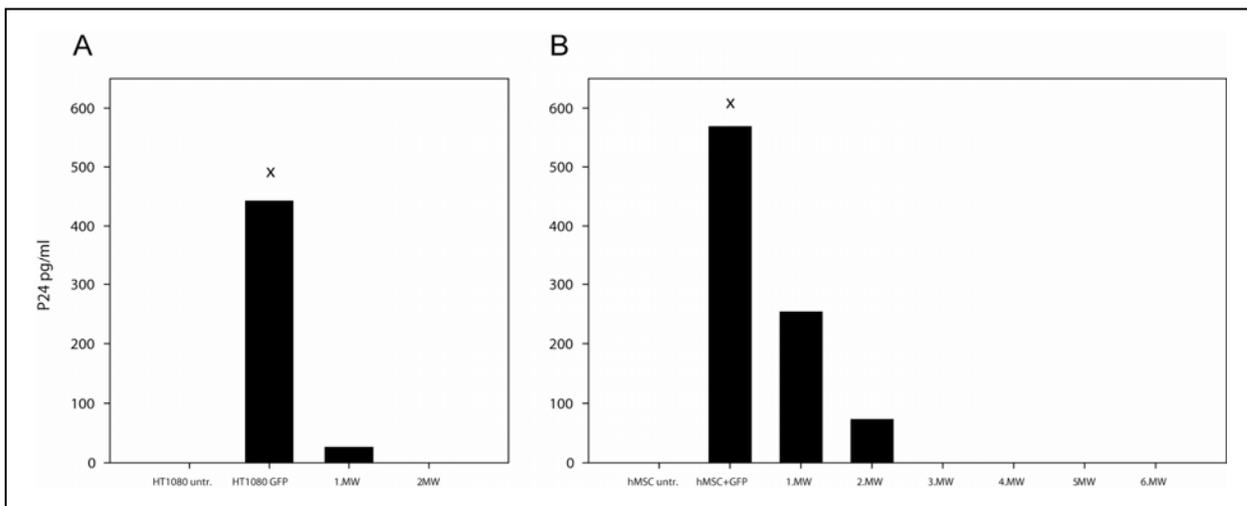


Abbildung 27: Anti-p24 ELISA.

Messungen der Menge des viralen Antigens p24 (CA) in Zellkultur nach der Transduktion von HT1080-Zellen (A) und hMSCs (B) mit EGFP während aufeinander folgenden Passagen bzw. Medienwechseln (MW). Bereits nach einmaligem Passagieren und einem weiteren Mediumwechsel konnte in den HT1080-Zellen kein p24-Antigen mehr nachgewiesen werden. Nach dem dritten Mediumwechsel war der p24 Gehalt im Zellkulturmedium der hMSCs unter die Nachweisgrenze gesunken. Auch im weiteren Verlauf wurde kein p24-Antigen mehr detektiert. (X: Messwert war oberhalb der Nachweisgrenze).

3.8 Virustiterbestimmung durch Quantifizierung der Transgenexpression

Durch die empfohlene, konventionelle Methode der Titerbestimmung mittels Kristallviolett-Färbung und Zählung der blasticidinresistenten HT1080-Kolonien konnte ein Virustiter von $2,47 \times 10^4$ $((8 \text{ cfu} + 12 \text{ cfu} + 17 \text{ cfu}) / 3 \text{ (Mittelwert)} / 5 \text{ ml (Gesamtvolumen)} \times 10^4 \text{ (Virusverd\u00fcnnung)})$ transduzierenden Einheiten (*engl.*: transducing units, TU) pro Milliliter (TU/ml) ermittelt werden (Abbildung 28A). Als n\u00e4chstes wurden HT1080-Zellen und hMSCs mit zehnfachen fortlaufenden Verd\u00fcnnungen des virushaltigen \u00dcberstandes transduziert. Die Verd\u00fcnnungen wurden mit den EGFP- und BSD-Expressionsst\u00e4rken in HT1080-Zellen

(Abbildung 28B) und hMSCs (Abbildung 28C) korreliert. Die Transgenexpression wurde mittels qPCR bestimmt und normalisiert auf die GAPDH-Expressionsstärke. Es konnte ein starker linearer Zusammenhang zwischen der Virusverdünnung und den Expressionsstärken der Transgene ermittelt werden. Daher ist durch die Quantifizierung der normalisierten Transgenexpression eine Bestimmung des Virustiters möglich.

In den HT1080-Zellen korreliert ein EGFP/GAPDH-Wert von $\sim 0,2$ (1/5) und ein BSD/GAPDH-Wert von $\sim 0,005$ (0,02/5) mit einem infektiösen Titer von $2,47 \times 10^4$ TU/ml (Abbildung 28B, n = 3). In den hMSCs (Abbildung 28C, n = 3) korreliert ein EGFP/GAPDH-Wert von 4 (20/5) und ein BSD/GAPDH-Wert von $\sim 0,02$ (0,1/5) mit einem EGFP/GAPDH-Wert von $\sim 0,2$ und einem BSD/GAPDH-Wert von $\sim 0,005$ in HT1080-Zellen und einem infektiösen Titer von $2,47 \times 10^4$ TU/ml. Durch die starke lineare Korrelation ($r^2 \sim 1$) zwischen der Stärke der Transgenexpression und der Virusverdünnung ist es möglich, den funktionellen lentiviralen Titer in verschiedenen viralen Verdünnungen bzw. Konzentrationen durch die Messung der Stärke der Transgenexpression zu bestimmen. Durch die starke Korrelation zwischen der EGFP- und der BSD-Expression ist es möglich, dieses System der Titerbestimmung für jedes beliebige Transgen anzuwenden. Da jedes lentivirale Konstrukt im Normalfall das BSD-Gen (oder ein anderes Resistenzgen) trägt, ist es möglich, unter Verwendung der BSD-Expressionsstärke, Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des eigentlichen Transgens und des infektiösen Titers zu ziehen. Außerdem ermöglicht diese Methode die Bestimmung des lentiviralen Titers direkt in den transduzierten hMSCs.

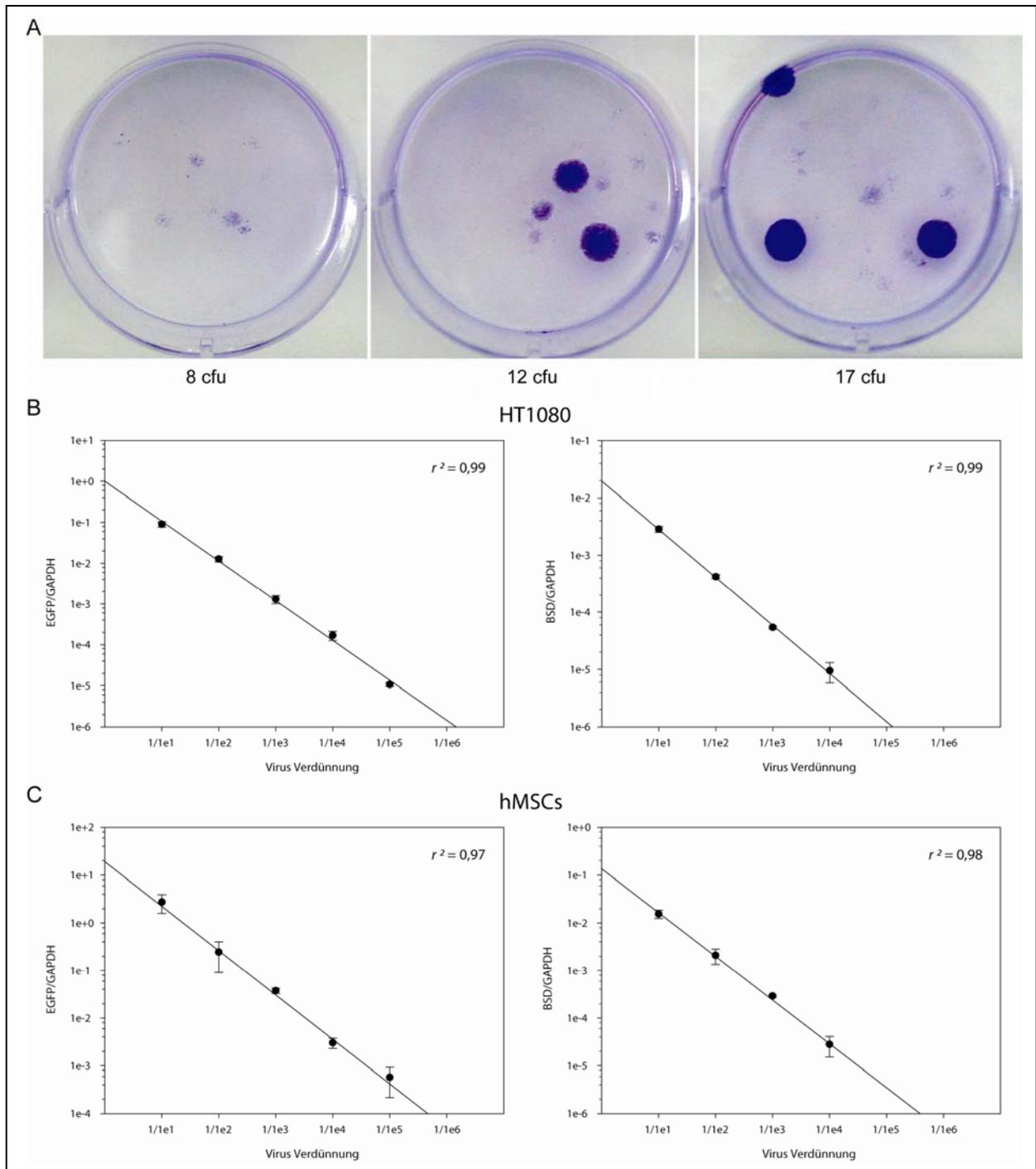


Abbildung 28: Bestimmung des Virustiters mit qRT-PCR

Bestimmung des Virustiters in 5 ml Gesamtvolumen (A) Kristallviolett-Färbung und Zählung der Blasticidin-resistenten HT1080-Kolonien in der $1:10^4$ Virusverdünnung. Der infektiöse Virustiter betrug im Mittel $2,47 \times 10^4$ TU/ml. (B, C) Titrationskurven ermittelt durch Quantifizierung der EGFP- und BSD-Expressionsstärken normalisiert auf GAPDH mittels qPCR in (B) HT1080-Zellen und (C) hMSCs. Eine starke lineare Korrelation zwischen der Virusverdünnung und den Transgen-Expressionsniveaus wurde ermittelt. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten (r^2) sind angegeben.

Um die generelle Anwendbarkeit dieses Titrationssystems zu bestätigen, wurden nun in einem nächsten Schritt verschiedene Viruspräparationen in der beschriebenen Weise in hMSCs titriert. Hierzu wurden hMSCs nach dem Standardprotokoll mit zehnfachen Verdünnungsreihen von zwei weiteren EGFP-Viruspräparationen und einer Präparation der Negativkontrolle (Attrappenkontrolle, mock Kontrolle) transduziert und daraufhin die BSD-Expressionsstärken bestimmt (Abbildung 29). Für jede Viruspräparation zeigte sich wieder eine starke lineare Korrelation zwischen der Virusverdünnung und dem BSD-Expressionsniveau. Die Titerbestimmung mittels der BSD-Transgenexpression direkt in den transduzierten hMSCs ist somit universell für die verschiedensten Transgene einsetzbar. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die etablierte Methode eine äußerst präzise Möglichkeit ist, um die Schwankungen der Titer in den einzelnen Viruspräparation zu quantifizieren und somit gleiche Virustiter für die Transduktion der Zielzellen einzusetzen.

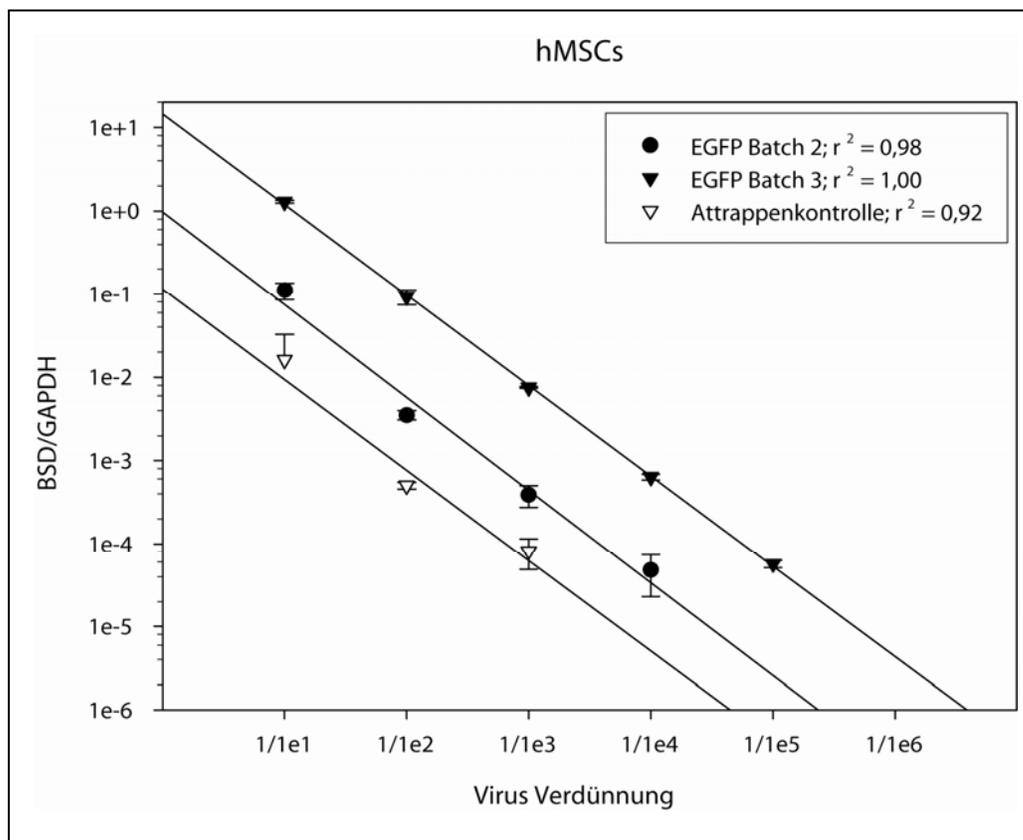


Abbildung 29: Titration verschiedener Viruspräparationen.

Gezeigt ist die Titration verschiedener Viruspräparationen nach der beschriebenen Methode. Es wurden zwei weitere EGFP-Viruspräparationen sowie eine Präparation der Negativkontrolle (Attrappenkontrolle) getestet. Für jede Viruspräparation zeigte sich wieder eine starke lineare Korrelation ($r^2 \sim 1$) zwischen der Virusverdünnung und dem BSD-Expressionsniveau. Die jeweiligen BSD/GAPDH-Werte konnten wie folgt bestimmt werden: EGFP Batch 2:

~0,2 (1/5); EGFP Batch 3: ~3,0 (15/5); Negativkontrolle (Attrappe): ~0,02 (0,1/5). Die Titer der einzelnen Viruspräparationen unterscheiden sich in ihren BSD/GAPDH-Werten etwa um den Faktor 10. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten (r^2) sind angegeben.

3.9 Differenzierung lentiviral transduzierter hMSCs

Um zu zeigen, dass hMSCs nach der lentiviralen Transduktion ihren Stammzellcharakter behalten und ihre Differenzierungsfähigkeit nicht beeinflusst wird, wurden EGFP-transduzierte hMSCs und untransduzierte Kontrollzellen in die drei üblichen mesenchymalen Stammzellgewebe differenziert. Die transduzierten hMSCs waren immer noch in der Lage, ebenso wie die Kontrollzellen, in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung zu differenzieren. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass die Zellen ihre Stammzeleigenschaften trotz der lentiviralen Transduktion behalten haben. Außerdem war die EGFP-Transgenexpression unbeeinflusst von der Zelldifferenzierung und über einen Zeitraum von 8 Wochen zu beobachten (Abbildung 30).

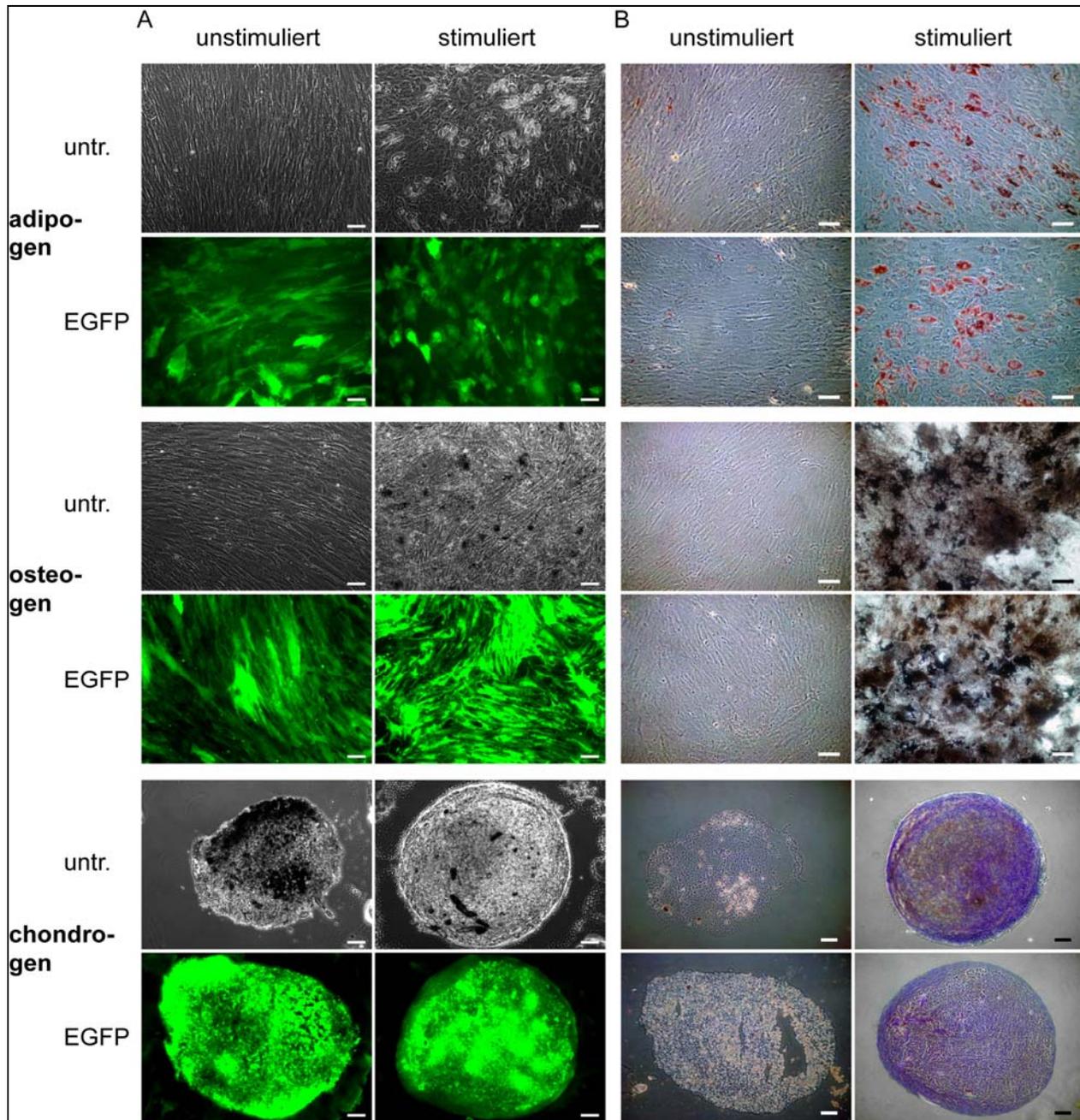


Abbildung 30: Differenzierungsfähigkeit von lentiviral transduzierten hMSCs.

(A) Phasenkontrast/Fluoreszenz-Aufnahmen und (B) histologische Bilder von adipogen, osteogen und chondrogen differenzierten EGFP-transduzierten hMSCs, differenzierten untransduzierten Kontroll-hMSCs und unstimulierten Kontrollzellen. Es wurden jeweils spezifische Färbemethoden verwendet. Die adipogene Differenzierung wurde mit der Lipid Oil Red O Färbung, die osteogene Differenzierung mit von Kossa Färbung und die chondrogene Differenzierung mit Toluidinblau Färbung nachgewiesen (Maßstabsbalken: 100 µm).

4 Diskussion

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) können leicht aus humanem Knochenmark isoliert und *in vitro* expandiert werden. Nur 0,001% bis 0,01% der Zellen mit Nukleus im Knochenmark sind MSCs, aber Millionen von Zellen können nach mehreren Passagen generiert werden, ohne dass spontane Differenzierung auftritt (Pittenger et al. 1999). MSCs besitzen die Fähigkeit, in mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel und Muskel zu differenzieren. Transplantierte MSCs können in einer ortsspezifischen Weise differenzieren (Liechty et al. 2000). Diese Eigenschaft macht sie zu potentiellen Kandidaten für therapeutische Zelltransplantationen (Kan et al. 2005). Mehrere klinische Versuche wurden durchgeführt mit positivem klinischem Ergebnis. Bei Kindern mit schwerer Osteogenesis Imperfecta differenzierten injizierte MSCs in Osteoblasten und Fibroblasten, welches zu einer klinischen Verbesserung führte, aber ohne eine bedeutende Toxizität zu zeigen (Horwitz et al. 2002). Außerdem berichten erste Studien von einem erfolgreichen *ex vivo* Gen „Targeting“, unter Verwendung von MSCs aus Patienten mit Osteogenesis Imperfecta, mit einer Verbesserung der Knochenqualität *ex vivo* (Chamberlain et al. 2004; Pochampally et al. 2005).

Trotzdem sind noch einige Hürden zu überwinden für die *ex vivo* Gentherapie in hMSCs. Studien haben gezeigt, dass die klinische Anwendung von hMSCs limitiert sein könnte durch den mit Seneszenz assoziierten Wachstumsstopp unter den gegenwärtigen *in vitro* Kulturbedingungen. Dieses Phänomen wird als „replikative Seneszenz“ bezeichnet (Stenderup et al. 2003). hMSCs können *in vitro* maximal 24 – 40 Populationsverdopplungen durchlaufen, bevor sie ihr Proliferationspotential, ihre zielsuchenden Eigenschaften, sowie ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren (Banfi et al. 2000; Bruder et al. 1997; DiGirolamo et al. 1999). Dadurch kann die Möglichkeit von transplantierten MSCs begrenzt sein, ihre Vermehrungsfähigkeit zu behalten, um eine differenzierte Nachkommenschaft zu produzieren, welche verletztes oder beschädigtes Gewebe ersetzen und die Gewebeerneuerung über die Lebensspanne aufrechterhalten kann. *Ex vivo* Gentherapie und Tissue Engineering kann durch die Seneszenz während der *in vitro* Vermehrung beschränkt sein, da große Zellmengen benötigt werden. Daher ist die *ex vivo* Gentherapie mit hMSCs nur möglich, wenn einerseits zeitaufwendige Selektionsprozesse durch die Verwendung einer sehr effizienten Gentransfer-Methode vermieden werden können, und andererseits eine schnelle und präzise Methode zur Bestimmung der Transgenexpression zur Verfügung steht.

Mehrere Systeme für den Gentransfer wurden bereits in MSCs untersucht (Aluigi et al. 2006; Hoelters et al. 2005). Für zahlreiche gentherapeutische Anwendung ist die langfristige Genexpression mit einer stabilen Integration des Transgens notwendig. Adeno-assoziierte Viren (AAV) und retrovirale Vektoren sind angemessene Systeme für den Gentransfer, allerdings haben Studien gezeigt, dass sie in hMSCs im Vergleich zu lentiviralen Vektoren eine geringere Effizienz besitzen. Verglichen mit oncoretroviralen Vektoren zeigen Lentiviren höhere Transduktionsraten in hMSCs in Verbindung mit Langzeit-Genexpression (Van Damme et al. 2006).

Insertionsmutagenese ist ein bekanntes und gängiges Phänomen, das bei der Verwendung von Retroviren auftritt. Oncogenese trat bei der X-SCID Gentherapie-Studie in einer unerwartet hohen Frequenz auf (Engel et al. 2003). Da lentivirale Vektoren eine hohe Ähnlichkeit zu gamma-retroviralen Vektoren haben, bestand eine große Sorge darin, dass lentivirale Vektoren ebenfalls Insertionsmutagenese auslösen könnten. Allerdings wurde bis jetzt noch kein nachteiliger Effekt beschrieben, der nach der Transplantation von lentiviral transduzierten Zellen auftrat. Der bis jetzt einzige Gentherapie Versuch unter Verwendung von lentiviralen Vektoren der dritten Generation begann im Juli 2003 für die Behandlung von HIV Patienten. Bis heute ist bei keinem der Patienten ein nachteiliger Effekt aufgrund der Behandlung aufgetreten (Levine et al. 2006). Außerdem zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der ebenfalls lentivirale Vektoren der dritten Generation in einem Mausmodell verwendet wurden, dass die lentivirale Transduktion sogar mit hohen Integrationszahlen die Tumorgenese nicht erhöht hat. Im Gegensatz dazu führte die retrovirale Transduktion zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung der Tumorentstehung in Abhängigkeit der Aktivität der im Vektor enthaltenen langen terminalen Repetitionen (LTR) und der Integration in der Nähe bekannter Proto-Onkogene und Gene, die den Zellzyklus regulieren (Montini et al. 2006). Einer der Hauptgründe für die geringere Genotoxizität der lentiviralen Vektoren könnte im Fehlen von transkriptional aktiven LTRs liegen. Derzeit deuten alle verfügbaren Daten darauf hin, dass lentivirale Vektoren ein sicheres Mittel für die *ex vivo* Gentherapie sind (vgl. 1.3).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Einklang mit anderen Studien, welche zeigen konnten, dass der lentivirale Gentransfer ein hohes Maß der Transgenexpression zur Folge hat, ohne dass die hMSCs ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren (Van Damme et al. 2006; Zhang et al. 2002).

Um das lentivirale Expressionssystem optimieren und charakterisieren zu können, ist eine genaue Beobachtung und Messung der Transgenexpression notwendig. Zu diesem Zweck wurde in

dieser Arbeit das verbesserte grün-fluoreszierende Protein (*engl.*: enhanced green fluorescent protein, EGFP) als Markergen/-protein verwendet (Zhang et al. 1996a). Der Vorteil liegt darin, dass die EGFP-Fluoreszenz direkt, ohne weitere Hilfsmittel, wie enzymatischer Verstärkung oder anderer Markierungen, mittels Fluoreszenz-Mikroskopie direkt beobachtet werden kann. Dies ist außerdem mit einer größeren Sensitivität möglich, als sie z.B. mit der äquivalenten Messung der durch β -Galactosidase katalysierten Umwandlung von X-Gal erreicht wird. Hierbei ist die Helligkeit der Proben annähernd proportional zur Stärke der Genexpression. Außerdem kann die EGFP-Fluoreszenz auch direkt mit Fluoreszenz-Durchflußzytometrie gemessen werden. Selbstverständlich können auch alle konventionellen Detektionsmethoden, wie z.B. PCR und Western Blot eingesetzt werden. Für die Verwendung von EGFP als Markergen wurde dieses aus dem pEGFP-N3-Plasmid in die verschiedenen lentiviralen Expressionsvektoren kloniert.

In Gentherapie und Tissue Engineering Anwendungen ist es unbedingt notwendig, die Effekte der Transgenexpression von Effekten, die durch die lentivirale Transduktion an sich entstehen, unterscheiden zu können. Die Möglichkeit, negative Effekte der Transduktion bereits vorab in experimentellen Studien ausschließen zu können, ist hierfür sehr wichtig. Zu diesem Zweck ist die Verwendung von geeigneten Negativkontrollen in parallelen Versuchsansätzen von großer Bedeutung. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde in dieser Arbeit als Negativkontrolle eine Attrappe (*engl.*: *mock*) des pLenti6/V5-DEST hergestellt, in dem aus diesem die komplette Expressionskassette, bestehend aus dem CMV-Promotor, dem Chloramphenicol-Resistenzgen, und dem toxischen *ccdB*-Gen, entfernt wurde. Der Einsatz ähnlich konstruierter so genannter mock-Kontrollen wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Ge et al. 1998; Kluger et al. 2002; Lu et al. 2000; Qin et al. 2003; Rousseau et al. 1996; Xiao et al. 1998). Der Vorteil beim Einsatz solcher mock-Kontrollen besteht darin, dass sie die gleichen Eigenschaften wie die eigentlichen Expressionsvektoren besitzen, ohne das Transgen zu exprimieren. Die in dieser Arbeit hergestellte lentivirale mock-Kontrolle trägt außerdem noch das Blasticidin-S-Deaminase-Resistenzgen (BSD) und bietet somit den Vorteil, dass die mock transduzierten Zellen ebenfalls mit Blasticidin selektioniert werden können.

Für die effiziente Virusproduktion ist es notwendig, vier verschiedene Plasmide mittels Co-Transfektion in die Produzentenzelle einzuschleusen. Da grundsätzlich die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass eine Zelle vier statt nur drei Plasmiden gleichzeitig aufnimmt, wurde in dieser Arbeit ein Verpackungssystem hergestellt, in dem die Anzahl der Verpackungsplasmide von drei auf zwei reduziert wurde. Hierfür wurde das pLP1/2-Plasmid hergestellt, welches die Funktionen

der Verpackungsplasmide pLP1 und pLP2 vereint. Um zu testen, ob durch die Verwendung des neuen Systems die Virusproduktion verbessert werden kann, wurde dieses mit dem kommerziellen Packaging-Mix (PM) der dritten Generation (pLP1 und pLP2) verglichen. Es stellte sich heraus, dass der in dieser Arbeit hergestellte Packaging-Mix nicht effektiver ist als das kommerzielle System. Hierfür gibt es mehrere Gründe. Bei der Transfektion ist die Anzahl der Plasmide, die in die Lipoplexe integriert und von der Zelle aufgenommen werden, sehr groß, d.h. von dem jeweiligen Plasmid ist nicht nur eine Kopie vorhanden, sondern es können bis zu mehreren Tausend Kopien sein, d.h. die Wahrscheinlichkeit, das entsprechende Plasmid aufzunehmen, ist für vier verschiedene Plasmide annähernd so groß wie für drei Plasmide. Außerdem ist das genaue Verhältnis der Plasmide im kommerziellen PM unbekannt und konnte für pLP1/2 nicht reproduziert werden. In dem selbst hergestellten PM wurden die Plasmide pLP1/2 und pLP/VSVG in äquivalenten Mengen verwendet. Aus dem oben genannten Grund spielt dieses Verhältnis für die Aufnahme eines speziellen Plasmids nur eine untergeordnete Rolle. Es besteht aber die Möglichkeit, dass für eine optimale Virusproduktion eines der Plasmide im Überschuss vorhanden sein muss. Im Fall von pLP1 oder pLP2 lässt sich dies mit pLP1/2 nicht verwirklichen. Es ist außerdem unbekannt, ob in dem kommerziellen Packaging-Mix bestimmte Zusätze vorhanden sind, wodurch die Transfektionseffizienz im Allgemeinen verbessert werden könnte. Durch den eventuell höheren Aufreinigungsgrad in der kommerziellen Herstellung könnten ebenfalls höhere Transfektionseffizienzen erreicht werden. Da das kommerzielle System effizienter funktioniert und ein niedrigeres biologisches Sicherheitsrisiko darstellt, wurde dies im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet.

Um einen effizienten lentiviralen Gentransfer in primären Zellen wie hMSCs zu erreichen, ist derzeit der Einsatz hoher MOIs (*engl.*: multiplicities of infection, hohe Virusanzahl pro Zielzelle) notwendig. Dies kann erreicht werden, durch die Konzentration des Vektors, durch Filtration oder mittels Ultrazentrifugation. Allerdings ist die Verwendung großer MOIs nicht kompatibel mit der Anwendung in klinischen Versuchen für die Gentherapie (Rouas et al. 2002). Für klinische Anwendungen wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um die Transduktionseffizienz der Lentiviren in hMSCs und die Ausbeute der transgenen hMSCs unter Verwendung unkonzentrierter Viruspräparationen, zu erhöhen.

In dieser Arbeit wurde durch die Addition von Polybrene ein Transduktionsvorgang entwickelt mit dem der Bedarf an hoch konzentrierten lentiviralen Vektoren und die Verwendung großer MOIs vermieden werden kann. Es ist bekannt, dass die Transduktionseffizienz von Retroviren

durch die Zugabe von Polybrene erhöht werden kann (Davis et al. 2002; Le Doux et al. 2001). Polybrene verbessert die retrovirale Gentransfereffizienz, indem die rezeptorunabhängige Virus-Adsorption an der Zielzellmembran verbessert wird (Davis et al. 2002). Dies geschieht durch die Ladungsneutralisierung der Zielzellmembran und die Aggregation der Viruspartikel durch Polybrene (Davis et al. 2004b). Ein positiver Effekt von Polybrene wurde ebenfalls auf die Transduktionseffizienz von HIV-1-basierenden Lentiviren beobachtet (Costello et al. 2000; Wu und Lu 2007). Das Ausmaß der Effizienzverbesserung ist abhängig vom verwendeten Zelltyp und wurde bisher mit Werten zwischen 2-fach bis 40-fach beschrieben (Davis et al. 2002; Landazuri und Le Doux 2004; Le Doux et al. 2001). Es ist allerdings bekannt, dass Polybrene mit steigenden Konzentrationen aufgrund seiner Wirkungsweise an der Zellmembran auch zytotoxische Effekte hat (Davis et al. 2004b; Landazuri et al. 2007). Die Verträglichkeit von Polybrene ist auch abhängig vom Zelltypus. In dieser Arbeit wurde für hMSCs eine optimierte Polybrene Konzentration von 6 µg/ml verwendet, die keinen (oder nur sehr geringen) toxischen Effekt auf die hMSCs hat. Da die Toleranz der 293FT- und HT1080-Zellen gegenüber Polybrene etwas größer ist, wurde hier die Konzentration minimal auf 8 µg/ml erhöht. Somit ist eine Vergleichbarkeit der Zelltypen gewährleistet. In Übereinstimmung mit den genannten Studien konnte in dieser Arbeit durch die Zugabe von Polybrene in allen Zelltypen eine Steigerung der Transgenexpression und somit der Transduktionseffizienz beobachtet werden. Allerdings wird hier zum ersten Mal eine massive Steigerung um das 100-fache bei der lentiviralen Transduktion von hMSCs unter Zugabe von Polybrene gezeigt.

Eine weitere Möglichkeit um einen effizienten und klinisch anwendbaren lentiviralen Gentransfer unter Verwendung niedriger MOIs durchzuführen, ohne das die Viren zu konzentriert werden müssen, bietet die Verwendung eines Antibiotikum Resistenzgens. Durch die Antibiotikumselektion kann der Anteil transduzierter Zellen in der heterogenen Population erhöht werden, wodurch hohe MOIs vermieden werden und dadurch die biologische Sicherheit des Systems erhöht wird (Zielske und Gerson 2002).

In dieser Arbeit wird die effiziente Transduktion von hMSCs mit lentiviralen Vektoren, die das Blasticidin-S-Deaminase Resistenzgen (BSD) tragen, gezeigt. Wenn Blasticidinselektion in dem klinischen Protokoll integriert ist, können untransduzierte Zielzellen eliminiert werden. Daher ist die Blasticidinselektion eine wichtige Möglichkeit den Anteil der Transgen-positiven Zellen zu erhöhen und eine homogene Zellpopulation zu erhalten. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch die Kontrolle der Blasticidinkonzentration möglich ist, eine

Subpopulation von Zellen mit höheren Kopienzahlen des Transgens zu selektionieren. Hierin besteht allerdings auch ein gewisses biologisches Sicherheitsrisiko, gerade im Bereich der klinischen Anwendung für die Gentherapie, da eine höhere Integrationsanzahl zu einem erhöhten Auftreten negativer Effekte führen könnte.

Es konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass die positiven Effekte der Zugabe von Polybrene während der Transduktion und der Selektion mit Blasticidin nach der Transduktion nicht spezifisch für hMSCs eines bestimmten Spenders sind. Die hohe Transgenexpression war reproduzierbar in hMSCs von verschiedenen Spendern. Somit ist das lentivirale Vektorsystem mit der Zugabe von Polybrene und der Blasticidinselektion für die Transduktion von hMSCs universell einsetzbar und sehr gut geeignet.

Für viele Anwendungen in der Gentherapie oder dem Tissue Engineering ist eine regulierbare Transgenexpression wünschenswert, um die Sicherheit und Wirksamkeit des therapeutischen Gentransfers zu erhöhen (vgl. 1.2.2). Eines der am besten charakterisierten und etablierten regulierbaren Expressionssysteme ist das tetrazyclinsensitive Tet-System. Hierbei hat das System in der Tet-On Konfiguration für klinische Anwendung die größere Relevanz (Sipo et al. 2006). Durch die Zugabe von Tetrazyklin wird es aktiviert, wodurch im Gegensatz zum Tet-Off System eine dauerhafte Verabreichung von Tetrazyklin zur Unterdrückung der Expression vermieden wird. Für die Verwendung des Tet-Systems ist es notwendig, in den Zellen einen Transaktivator zu exprimieren, welcher die eigentliche Transgenexpression von einem induzierbaren Promotor in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration steuert. Da eine dauerhafte Expression des Transaktivators eine unnötige Belastung für die Biosynthesemaschinerie der Zelle bedeuten kann, wurde in dieser Arbeit ein selbstregulierender lentiviraler Vektor hergestellt, welcher den Transaktivator, ebenfalls reguliert von dem induzierbaren Promotor, im Tandem mit dem induzierbaren Transgen trägt. Ähnliche Vorgehensweisen zur Herstellung selbstregulierender Expressionsvektoren wurden mehrfach beschrieben und diese mit Erfolg getestet (Markusic et al. 2005; Vigna et al. 2002; Vigna et al. 2005). Zum Aktivieren des nach der Transduktion in die Zielzellen integrierten Systems ist das einmalige Einbringen des Transaktivators notwendig, da dieser wegen der äußerst niedrigen basalen Aktivität des TRE_{tight}-Promotors sich nicht selbst durch die regulierte Expression anschalten kann. Dieses Einbringen kann durch die einmalige transiente Transfektion des pTet-On-Plasmids erreicht werden, in dem der rtTA-Transaktivator von einem CMV-Promotor konstitutiv exprimiert wird. Nach Zugabe von Doxycyclin (Tetrazyklin-Derivat) führt dieser Transaktivator zur Aktivierung der TRE_{tight}-Promotoren in dem

integrierten lentiviralen Vektor, wodurch es zur Transgenexpression und zur Expression des Transaktivators kommt. Diese Transgenexpression ist dauerhaft, solange die Stimulation mit Doxycyclin erfolgt. Wird kein Doxycyclin mehr zugegeben, kommt es zur Einstellung der Transgenexpression, bis das System durch Transfektion von pTet-On und Doxycyclin-Stimulation erneut gestartet wird. Durch die Expression von EGFP als Transgen konnte in dieser Arbeit die grundsätzliche Funktionsfähigkeit und Anwendbarkeit dieses Systems für klinische Gentherapie- und Tissue-Engineering-Studien gezeigt werden. Das System ist so konstruiert, dass das EGFP-Gen ohne großen Aufwand durch jedes beliebige Transgen ersetzt werden kann. Dieser lentivirale Vektor mit doxycyclinregulierter Transgenexpression könnte sehr nützlich für zukünftige Gentherapie- und Tissue-Engineering-Anwendungen und in experimentellen Versuchen sein, in denen zeitlich genau regulierte Expression eines Transgens notwendig ist. In Zukunft könnten regulierte lentivirale Vektoren die Sicherheit und Wirksamkeit der Gentherapie enorm verbessern.

Um z.B. für *in vitro* Zellkulturstudien eine Zelllinie herstellen zu können, welche den für die Aktivierung des Systems notwendigen rtTA-Transaktivator stabil exprimiert, wurde ebenfalls ein lentiviraler Vektor konstruiert, welcher den Transaktivator unter Kontrolle des starken, konstitutiven CMV-Promotors trägt (pLenti6/V5+rtTA). Dieser ist geeignet, um Zellen stabil zu transduzieren und die transduzierten Zellen können ebenfalls mit Blasticidin selektioniert werden. Da die lentiviralen Vektoren sehr effizient stabil in das Wirtsgenom integrieren, beherbergen sie ein potentielles biologisches Sicherheitsrisiko. Übrig gebliebene infektiöse virale Partikel in den kultivierten hMSCs können für den Patienten und das behandelnde Personal potentiell schädlich sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines sehr sensitiven ELISA-Systems dazu geeignet ist, die Menge an verbliebenen viralen p24-Antigenen zu bestimmen und somit den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem ausgeschlossen werden kann, dass sich noch infektiöse Partikel in der Zellkultur befinden. Hierdurch wird die Herabstufung der transduzierten Zellen von der biologischen Sicherheitsstufe S2 in die Sicherheitsstufe S1 ermöglicht.

Für Anwendungen im Bereich der Gentherapie und des Tissue Engineering mit MSCs ist die präzise Bestimmung des lentiviralen Titers essentielle Voraussetzung. Die Durchführung der Titration in einem ersten Schritt des experimentellen Protokolls ermöglicht die Qualitätskontrolle der Viruscharge und Kontrolle der Transduktionseffizienz des Virus. Mehrere Methoden der lentiviralen Titration wurden bisher beschrieben. Die Quantifizierung der viralen Partikel im Zellkulturüberstand wurde indirekt durch die Bestimmung der Konzentration des p24-Proteins

durchgeführt (Naldini et al. 1996b). Allerdings zeigte sich nur eine grobe Korrelation zwischen der p24-Konzentration und dem funktionellen Virustiter (Geraerts et al. 2006). Die Methode überschätzt den wirklichen funktionellen Titer dadurch, dass ebenfalls freies, nicht in funktionsfähigen Viruspartikeln gebundenes Protein gemessen wird, welches nach der Standard Plasmid-Co-Transfektion von den Produzentenzellen abgegeben oder bei dem Zerfall der Viruspartikel freigesetzt wird. Viruspartikel im Zellkulturüberstand können auch mittels Northern blotting der viralen genomischen RNA quantifiziert werden (Mary et al. 1994). Diese Vorgehensweise ist äußerst arbeits- und zeitaufwendig und zudem unpräzise. Weniger aufwendig ist die ebenfalls beschriebene Quantifizierung der viralen genomischen RNA im Zellkulturüberstand mittels quantitativer PCR. Allerdings ist auch die Titerbestimmung durch Messung der viralen genomischen RNA äußerst unpräzise und führt zu einer großen Überschätzung des realen funktionellen Virustiters (Geraerts et al. 2006; Higashikawa und Chang 2001; Kirkwood und Bangham 1994). Dies wird auch durch die Beobachtung verschiedener Studien unterstützt, dass die durch quantitative RT-PCR bestimmten lentiviralen genomischen RNA-Titer höher liegen (Faktor 2×10^2 bis 1×10^3) als die der integrierten proviralen DNA (Lizee et al. 2003; Sastry et al. 2002). Aber auch die mittels quantitativer RT-PCR bestimmten Titer der integrierten proviralen DNA liegen um das etwa 250-fache höher als die mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie (FACS) gemessenen funktionellen Titer (Rohr et al. 2002). Die FACS-Methode wird stellenweise für die Titration infektiöser Viren verwendet durch die Bestimmung der Menge an viralen Strukturproteinen (Lambeth et al. 2005; Lonsdale et al. 2003) in den infizierten Zellen. Da die für die Gentherapie verwendeten rekombinanten Vektoren selbstinaktivierend und vermehrungsunfähig sind und daher die infizierten Zellen keine viralen Proteine bilden, ist diese Titrationmethode hierfür ungeeignet. Eine Möglichkeit der Titration mittels FACS-Analyse ist die Detektion von fluoreszierenden Markerproteinen, entweder einzeln oder als Fusionsprotein mit den zu titrierenden Proteinen (Rohr et al. 2002). Die zusätzliche Expression fluoreszierender Marker ist allerdings im Zusammenhang mit therapeutischen Anwendungen am Menschen nicht durchführbar. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung fluoreszierender Antikörper für die Markierung der gewünschten Transgene. Allerdings ist diese Vorgehensweise äußerst kosten- bzw. zeitaufwendig für den Erwerb oder die Herstellung entsprechend markierter Antikörper für jedes zu testende Protein. Die vom Hersteller des in dieser Arbeit verwendeten ViraPower lentiviralen Expressionssystems empfohlene Titration der Lentiviren durch Zählung der Blastocidin resistenten Kolonien ist zeitaufwendig, sehr unpräzise

und nur möglich unter Verwendung des Blastocidin-Resistenzgens (oder eines äquivalenten Resistenzgens) in einer schnell wachsenden, kolonienbildenden Zelllinie. Zudem sind die ermittelten Werte stark von der für die Selektion verwendeten Blastocidinkonzentration abhängig. Bei Verwendung von hohen Konzentrationen (10 µg/ml) kann der wahre Titer unterschätzt werden, da auch Zellen sterben die zwar transduziert wurden, aber nur eine schwache Transgenexpression aufweisen. Dagegen kommt es bei niedrigen Blastocidinkonzentrationen (2 µg/ml) zu einer Überschätzung des realen Titers, da auch untransduzierte Zellen überleben und fälschlicherweise mitgezählt werden. Die auf diese Weise bestimmten Titer sind nicht ohne weiteres auf andere Zelllinien übertragbar und ermöglichen lediglich einen Vergleich der Viruschargen untereinander.

Die mRNA Level der Transgene, die durch qRT-PCR ermittelt werden, korrelieren gut mit den transduzierenden Einheiten (TU) (Geraerts et al. 2006). Außerdem ist die Transgenexpression in Zielzellen das Hauptziel der lentiviralen Transduktion und es ist möglich, durch die Messung auf der mRNA-Ebene exprimierter Transgene, Schwankungen in den Expressionsstärken und toxische Effekte der Transgene mit zu berücksichtigen. Zudem ist die Methode der quantitativen RT-PCR, basierend auf der Messung der Transgene, eine schnell durchführbare, präzise und zuverlässige Methode für die Titerbestimmung neuer rekombinanter Lentiviren (Geraerts et al. 2006; Lizee et al. 2003).

In dieser Arbeit wurde erstmals die Methode der quantitativen RT-PCR als zuverlässige Methode etabliert, um den funktionellen lentiviralen Titer in hMSCs zu bestimmen. qPCR ist als technisch hoch entwickelte und sehr akkurate Methode bekannt, die auch zur Messung viraler Titer verwendet werden kann (Delenda und Gaillard 2005). Lentivirus Titration wurde erfolgreich durchgeführt durch die Quantifizierung verschiedener viraler Nukleinsäurespezies wie z.B. virale RNA (Murdoch et al. 1997; Sanburn und Cornetta 1999; Tafuro et al. 1996) und „strong stops“ minus Strang cDNA in viralem Überstand, als auch die Bestimmung der proviralen DNA und transgenen mRNA Kopienzahl in transduzierten Zielzellen (Delenda und Gaillard 2005). Studien konnten zeigen, dass lentivirale Titer von vielen Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. dem Transduktionsvorgang, der Anzahl und dem Typus der Zielzellen und der Dauer der Vektorabsorption (Zhang et al. 2004a). Veränderungen in den Transduktionsbedingungen können eine mehr als 50-fache Veränderung des Vektortiters aus dem gleichen Batch des Vektors verursachen. Außerdem sind die Titer, welche durch die Quantifizierung der Transgenexpression bestimmt wurden auch von der Promotoraktivität abhängig. In dieser Arbeit wurde der sehr

starke konstitutive Promotor des Cytomegalievirus (CMV) bzw. des SV40 verwendet. Aber der Einsatz von regulierten oder gewebespezifischen Promotoren könnten die Möglichkeit der Quantifizierung der Transgene beschränken, da sie nur nach einer Stimulation bzw. Differenzierung der hMSCs aktiv sind. Jede Modifikation der lentiviralen Vektoren könnte letztendlich die Transgenexpression in den Zielzellen beeinflussen. Daher ist es für zukünftige Anwendungen im Bereich der Gentherapie und des Tissue Engineering in hMSCs nicht nur notwendig, die lentiviralen Titer zu bestimmen, sondern auch wichtig, Einsicht in die Transgenexpression zu erlangen.

Da die Transgenexpression das letztendliche Ziel der meisten Gentherapie-Anwendungen ist, wurden die Lentiviren in dieser Arbeit durch die Quantifizierung der Transgenexpression mittels qPCR direkt in den zu modifizierenden hMSCs titriert. Dieses Vorgehen wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Genexpression nicht zwangsläufig mit der proviralen DNA-Kopienzahl im Wirtsgenom korreliert, da einige genomische Integrationen in Abhängigkeit vom Ort der Integration keine, oder nur eine sehr schwache Transkription ermöglichen (Sastry et al. 2002). Außerdem wird durch die Quantifizierung der lentiviralen genomischen RNA der funktionelle Titer massiv um den Faktor 10^3 bis 10^4 überschätzt (Sastry et al. 2002), beruhend auf der Tatsache, dass durch diese Analyse ebenfalls fehlerhafte oder auf andere Weise nicht-infektiöse Partikel, als auch frei im Überstand befindliche virale RNA-Genome, gezählt werden (Higashikawa und Chang 2001; Lizee et al. 2003). Dennoch ist die Messung der lentiviralen DNA-Integrationsereignisse mittels qPCR präziser als die konventionellen Methoden, wie z.B. Durchflußzytometrie, um die funktionellen Titer zu bestimmen (Pan et al. 2002; Sastry et al. 2002). Anders als die qPCR der genomisch integrierten proviralen DNA, durch welche es zu einer Überschätzung des funktionellen Virustiters kommen kann (Lizee et al. 2003) und die qRT-PCR der viralen RNA, die ebenfalls zu einer Überschätzung führt (Sastry et al. 2002), spiegelt die qRT-PCR der Transgenexpression den funktionellen Titer genauer wider (Geraerts et al. 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Titrationsstudien zeigen deutlich, dass ein starker linearer Zusammenhang zwischen der viralen Partikelanzahl und der Transgenexpression bzw. dem funktionellen Virustiters besteht. Daher kann die Bestimmung des funktionellen Titers durch die Quantifizierung der Transgenexpression mittels qRT-PCR dazu verwendet werden den Virustiter (TU) zu messen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren tragen das Blasticidin-S-Deaminase-Resistenzgen (BSD) unter Kontrolle des SV40-Promotors. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der viralen Partikelanzahl und der Expression des BSD-Gens ebenfalls ein starker linearer Zusammenhang besteht, der außerdem stark mit der Expressionsstärke des Transgens EGFP korreliert. Daher kann die Titerbestimmung mittels der BSD-Transgenexpression (oder eines beliebigen anderen Resistenzgens) direkt in den transduzierten hMSCs universell für unterschiedliche lentivirale Vektoren mit den verschiedensten Transgenen (oder für die Negativkontrolle) eingesetzt werden, ohne dass für jedes neue Transgen neue Komponenten (Primer, Sonden Antikörper, etc.) für das Titrationssystem entwickelt werden müssen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die etablierte Methode eine äußerst präzise Möglichkeit ist, um die Titterschwankungen der einzelnen Viruspräparation zu quantifizieren, und somit können gleiche Virustiter für die Transduktion der Zielzellen eingesetzt werden.

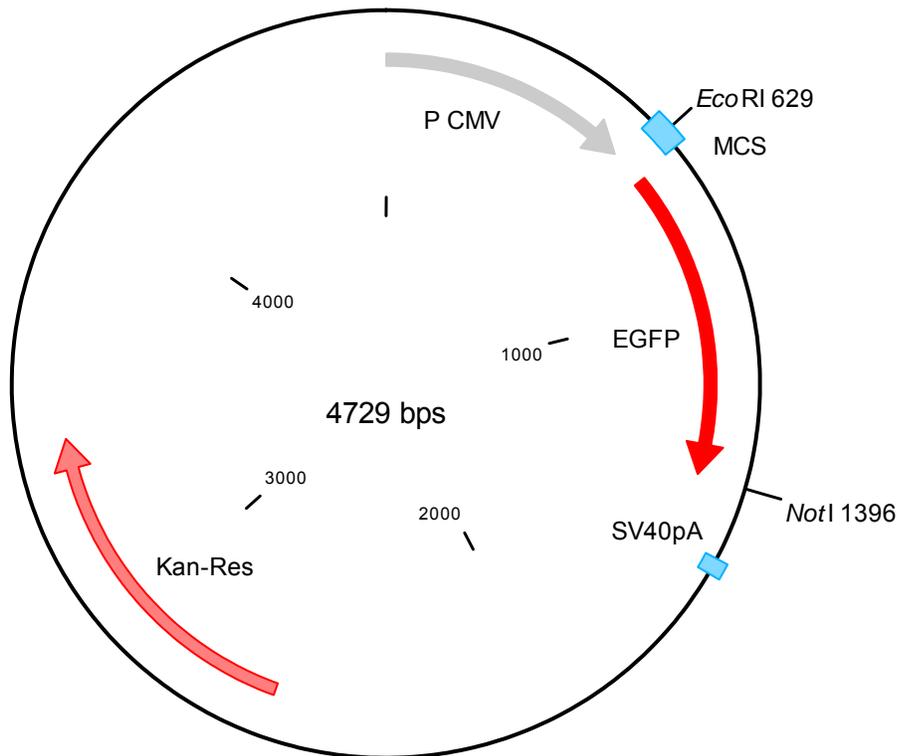
Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass die hMSC durch die lentivirale Transduktion ihre Differenzierungsfähigkeit nicht verlieren. Außerdem bleibt die Transgenexpression in den therapeutisch relevanten differenzierten hMSCs erhalten, wodurch demonstriert werden konnte, dass es weder zu Promotordämpfung noch zum Verlust transduzierter Zellen während der Differenzierung kommt.

Quantifizierung der Transgen-Kopienzahl mittels qRT-PCR ist eine schnelle und verlässliche Methode, um die funktionellen Titer nach dem *ex vivo* Gentransfer in hMSCs zu bestimmen.

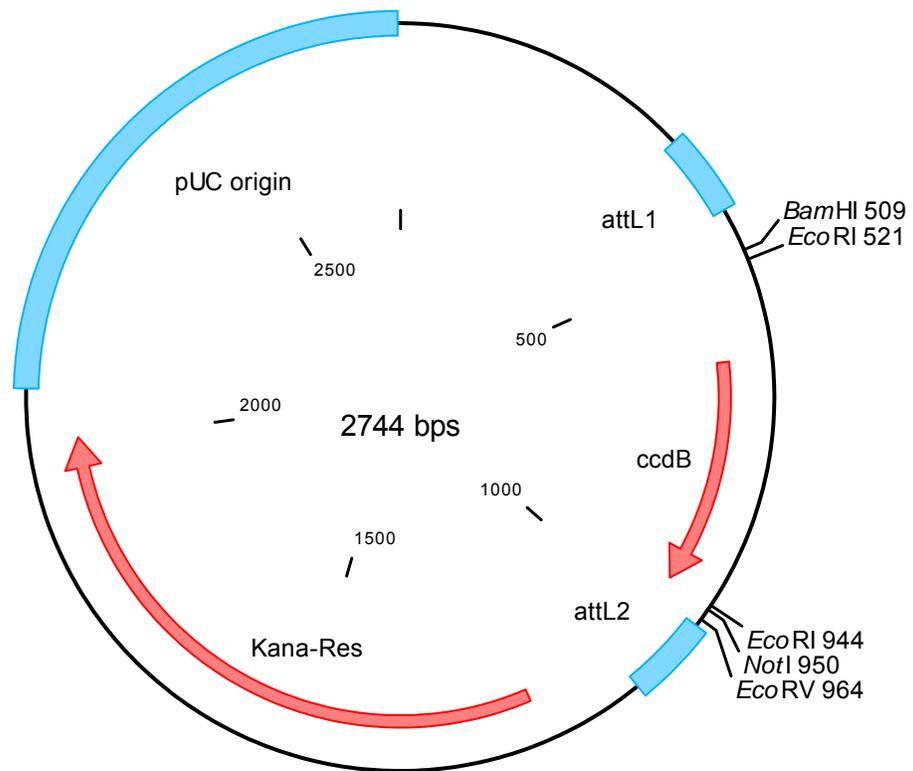
Die in dieser Arbeit optimierte und charakterisierte Methode für die effiziente lentivirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen, in Verbindung mit regulierbarer Genexpression, ist ein sicheres, verlässliches und leistungsstarkes Verfahren und bildet eine aussichtsreiche Grundlage für zukünftige Gentherapie und Tissue Engineering Anwendungen in hMSCs.

Anhang

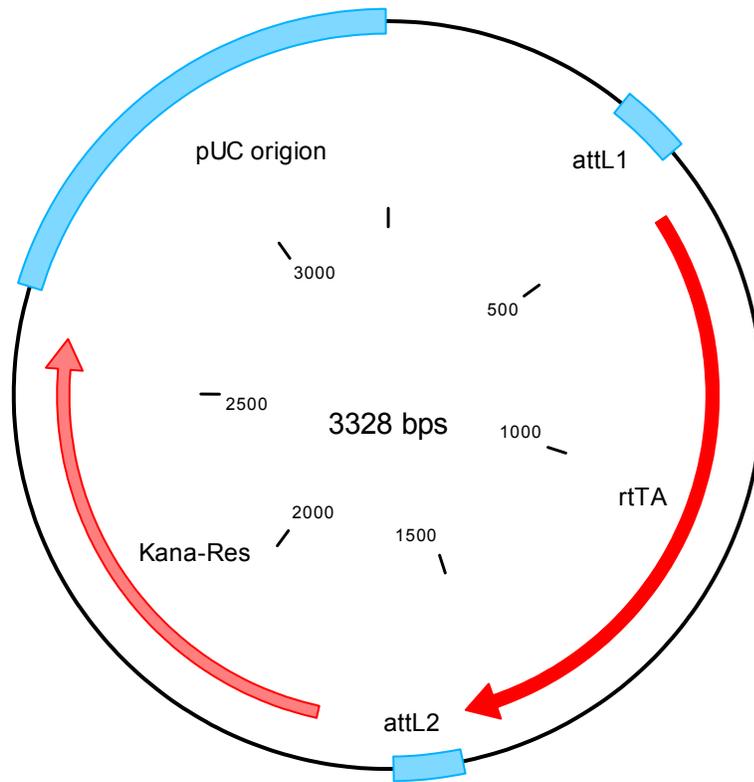
Plasmidkarte pEGFP-N3

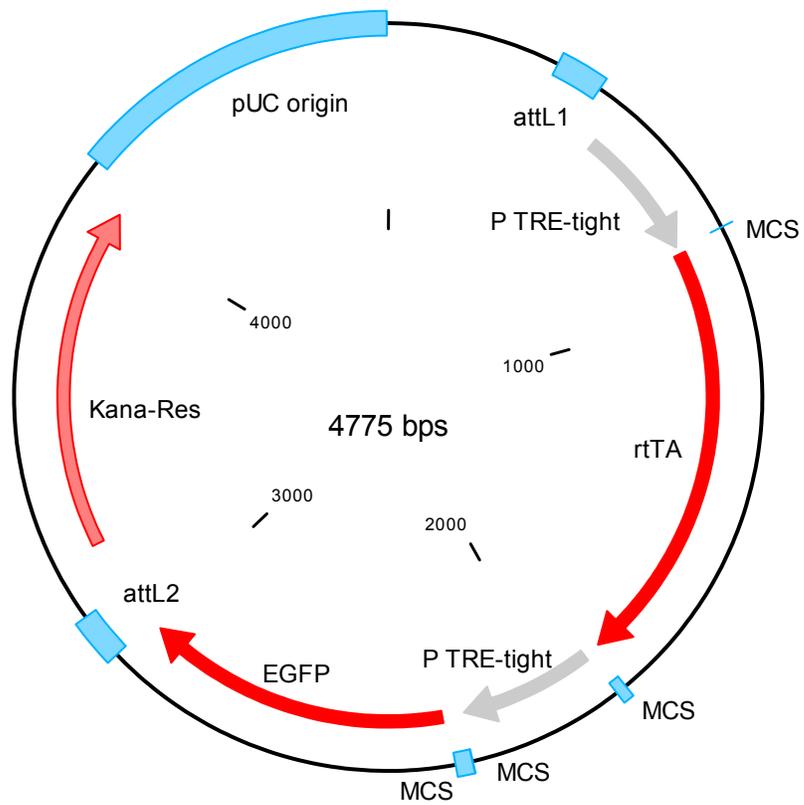


Plasmidkarte pENTR11

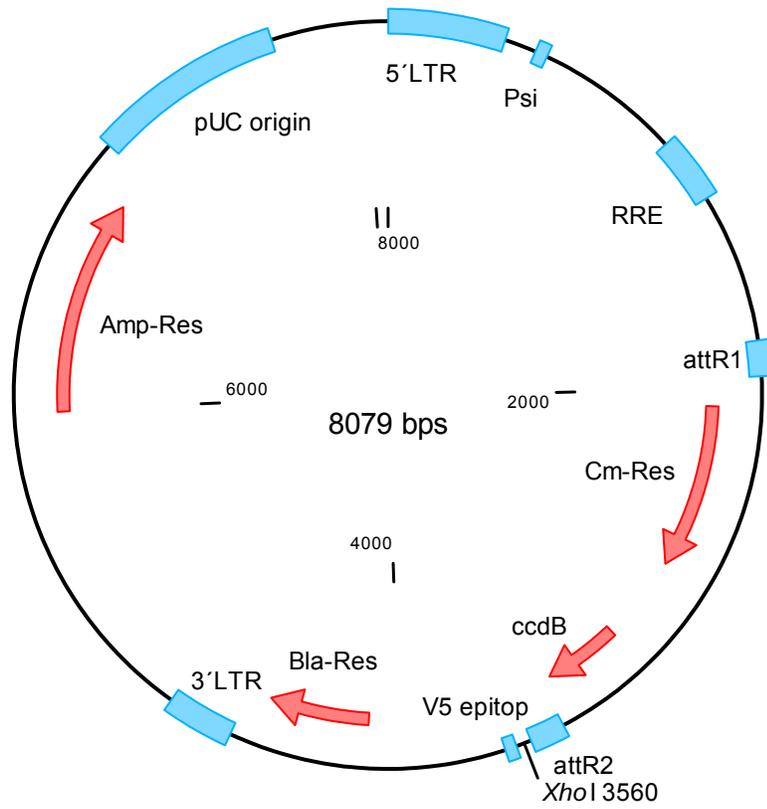


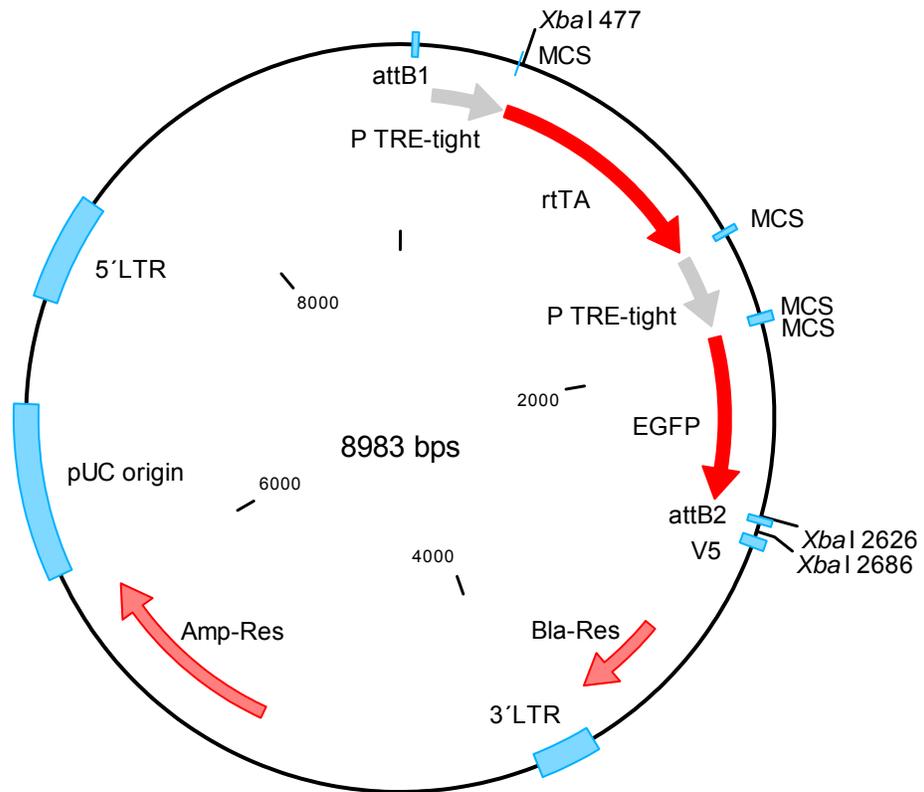
Plasmidkarte pENTR11+rtTA



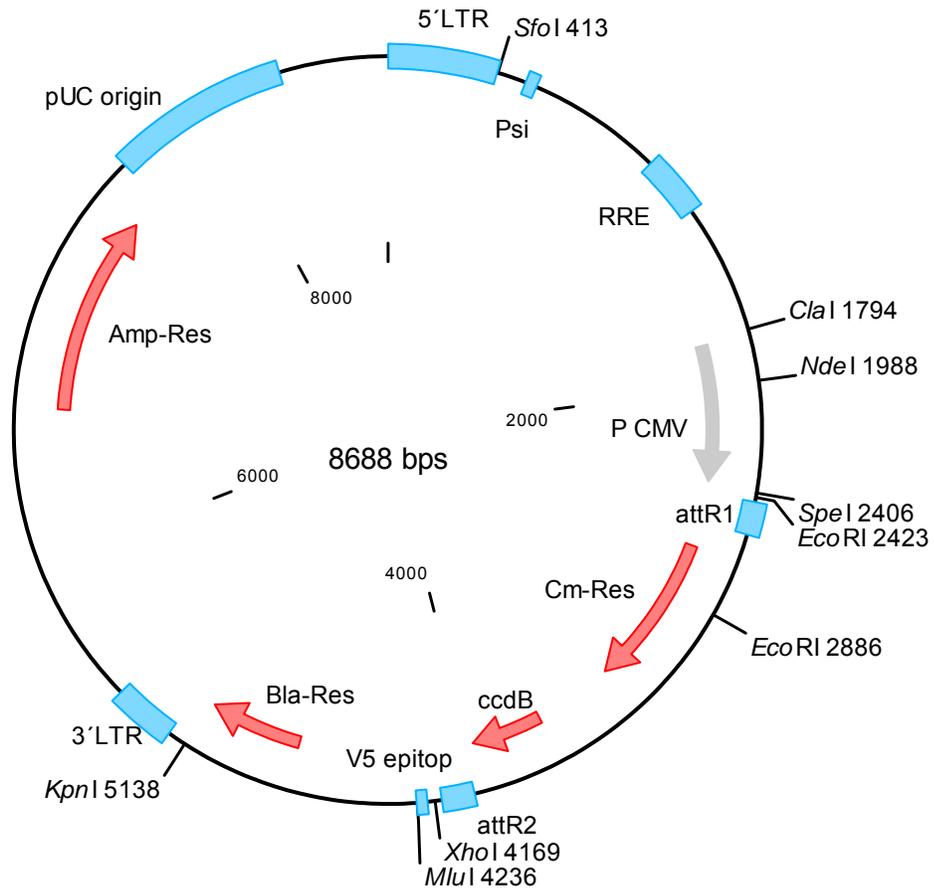
Plasmidkarte pENTR11+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP

Plamidkarte pLenti6/V5ΔCMV

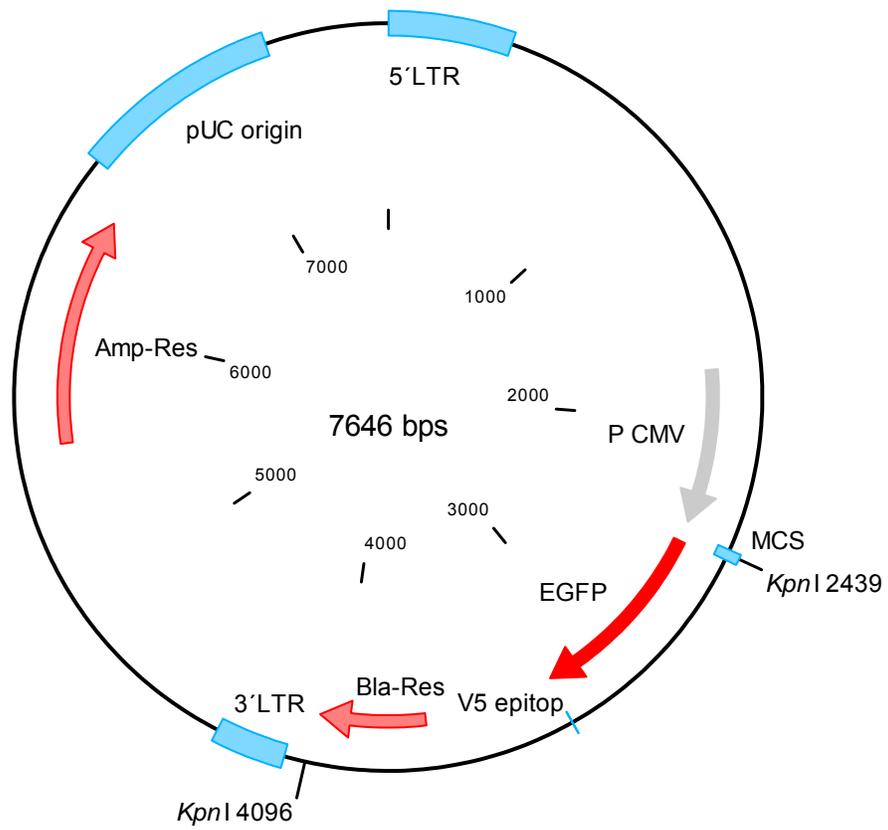


Plasmidkarte pLenti6/V5 Δ CMV+TRE_{tight}-rtTA-TRE_{tight}-EGFP

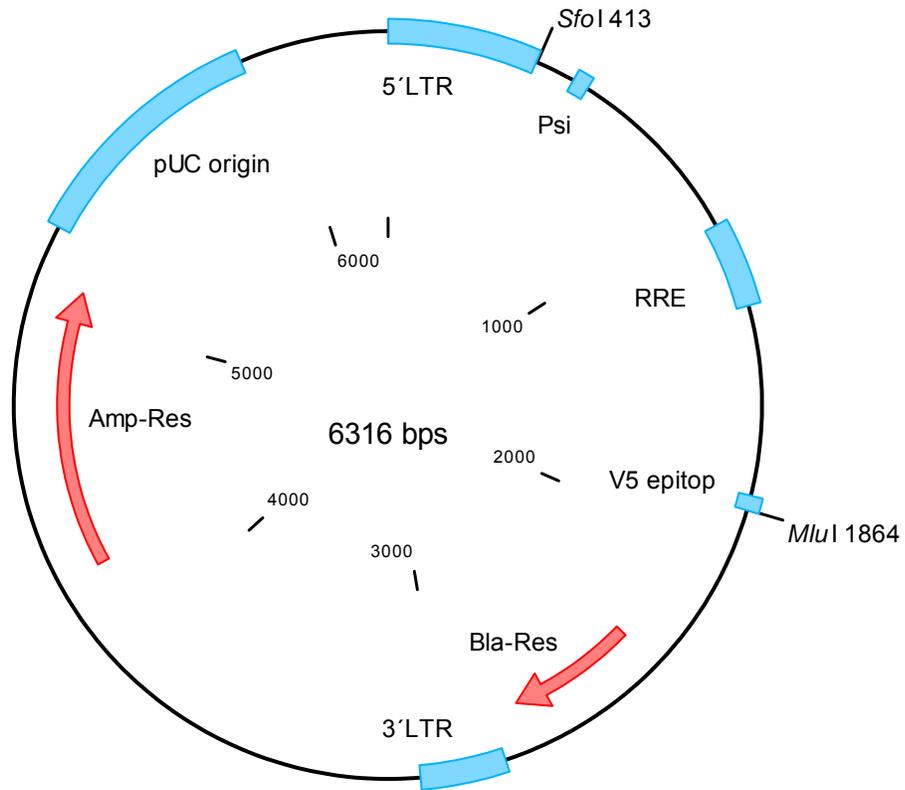
Plamidkarte pLenti6/V5-DEST



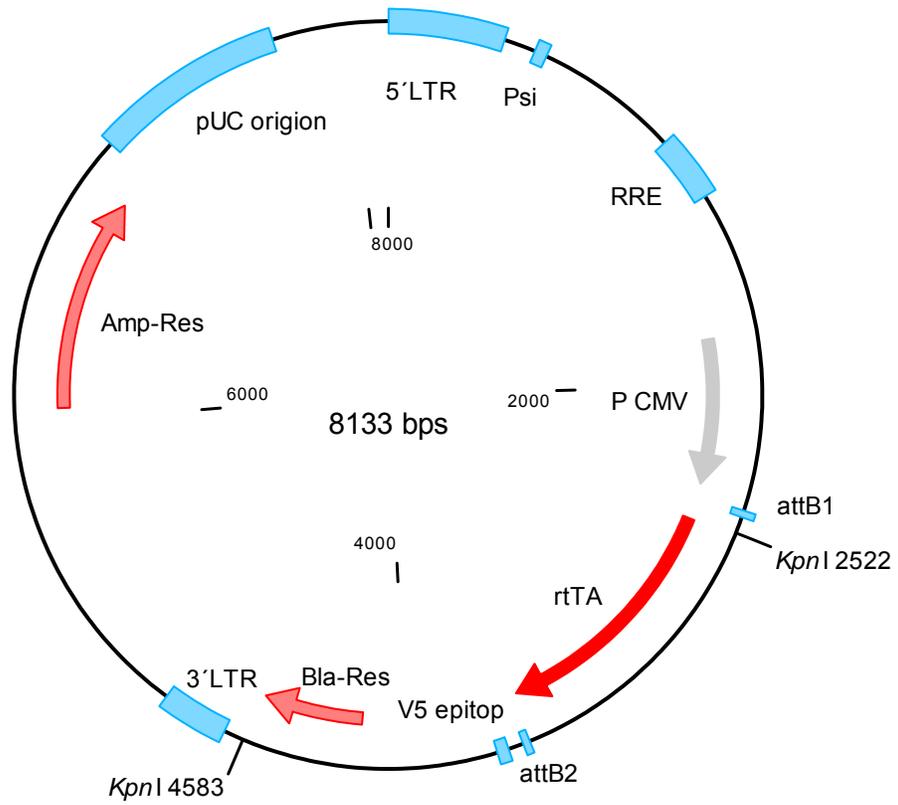
Plamidkarte pLenti6/V5+EGFP



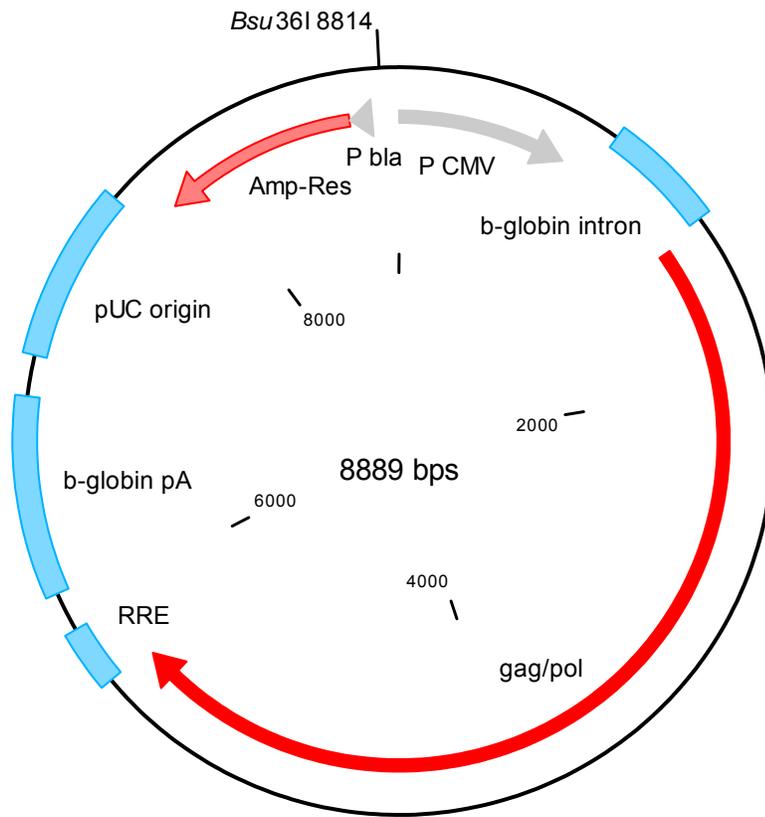
Plamidkarte pLenti6/V5-mock



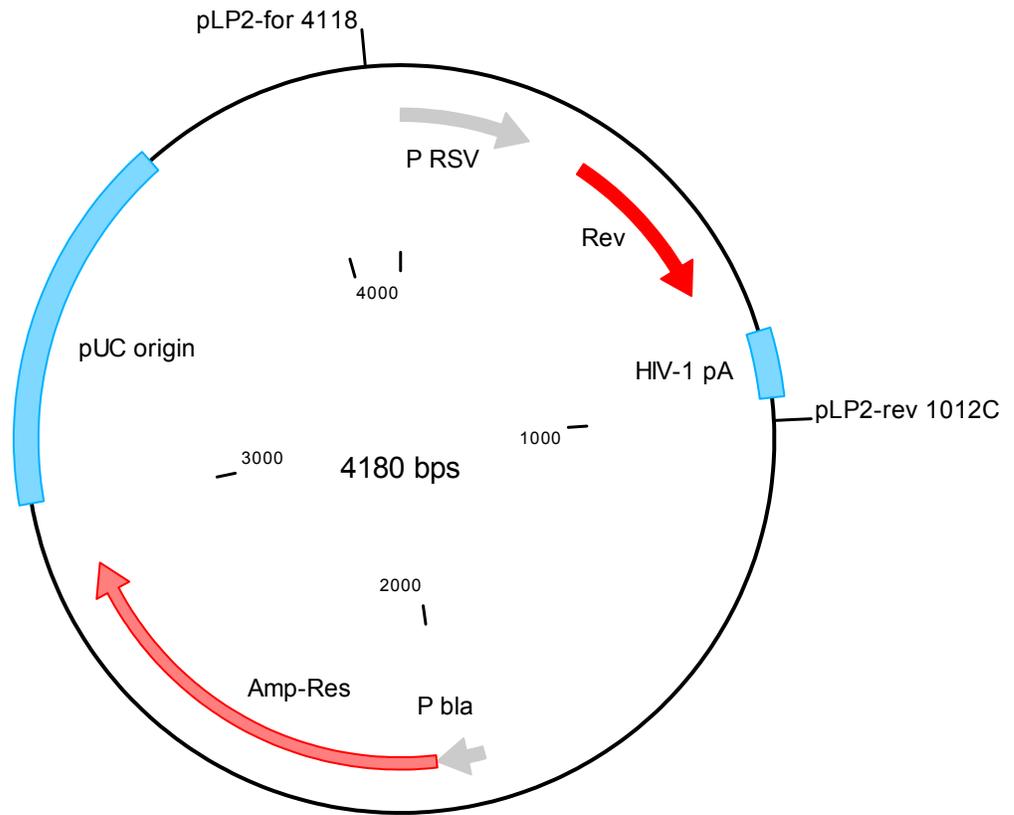
Plamidkarte pLenti6/V5+rtTA



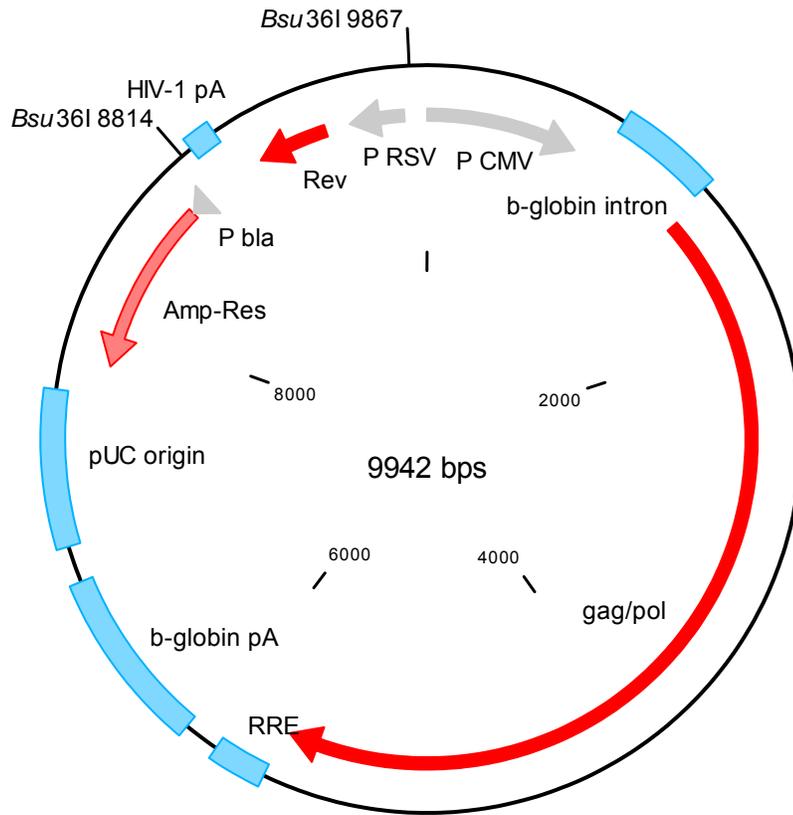
Plasmidkarte pLP1



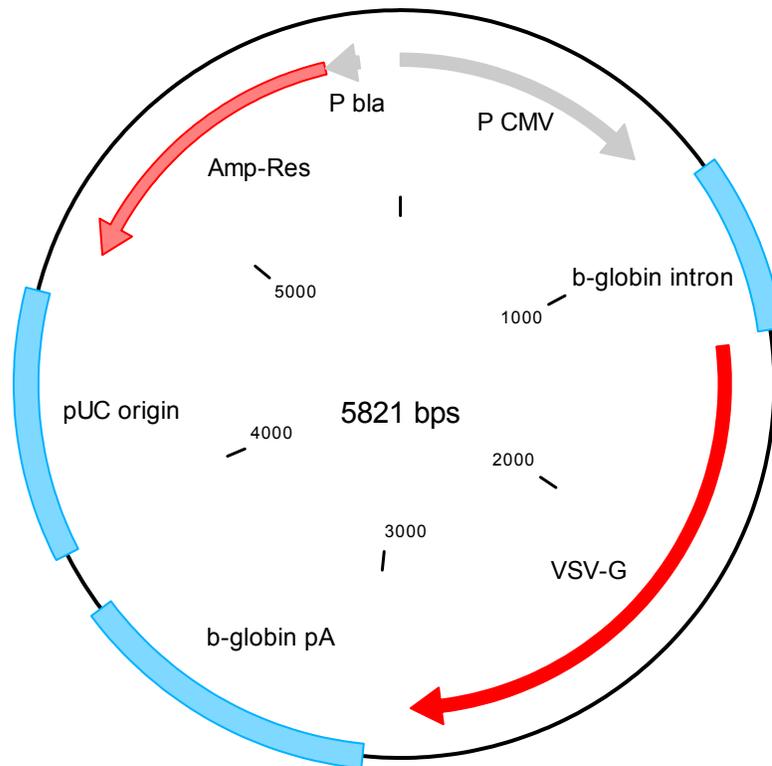
Plasmidkarte pLP2



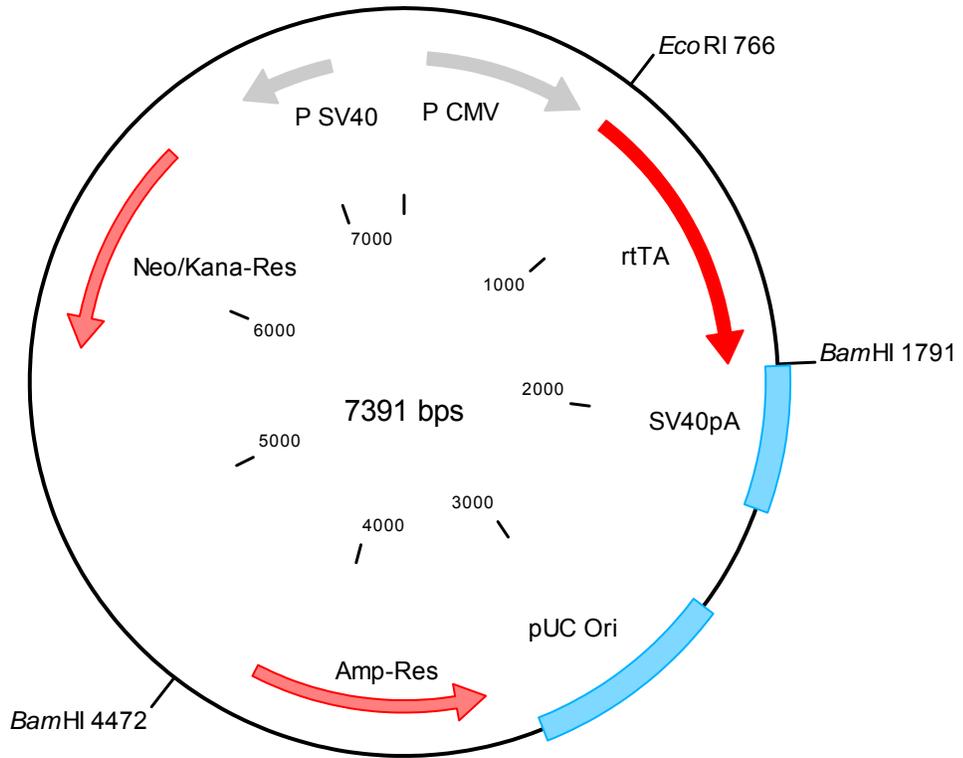
Plasmidkarte pLP1/2



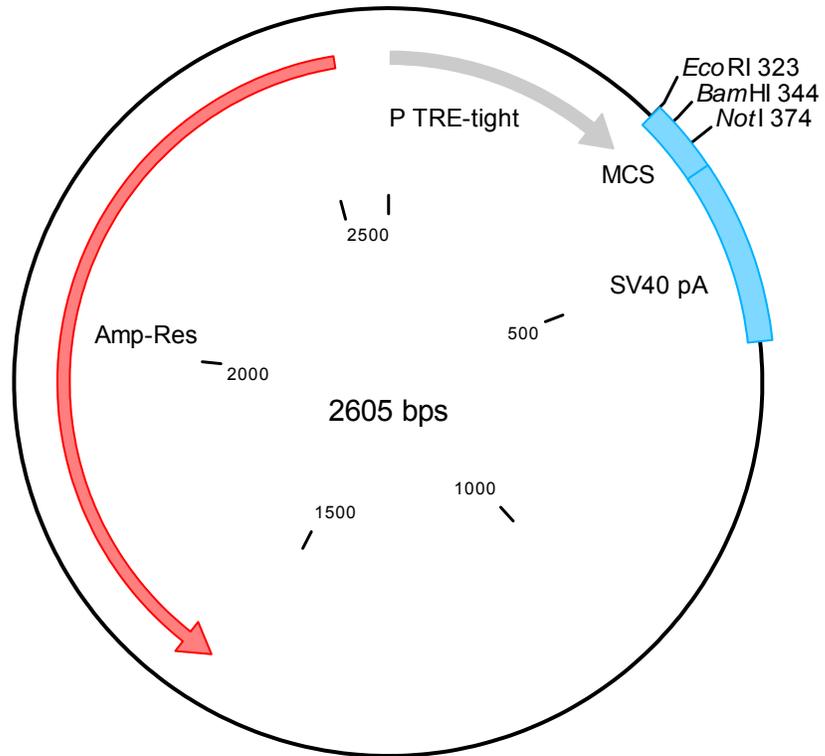
Plasmidkarte pLP/VSVG



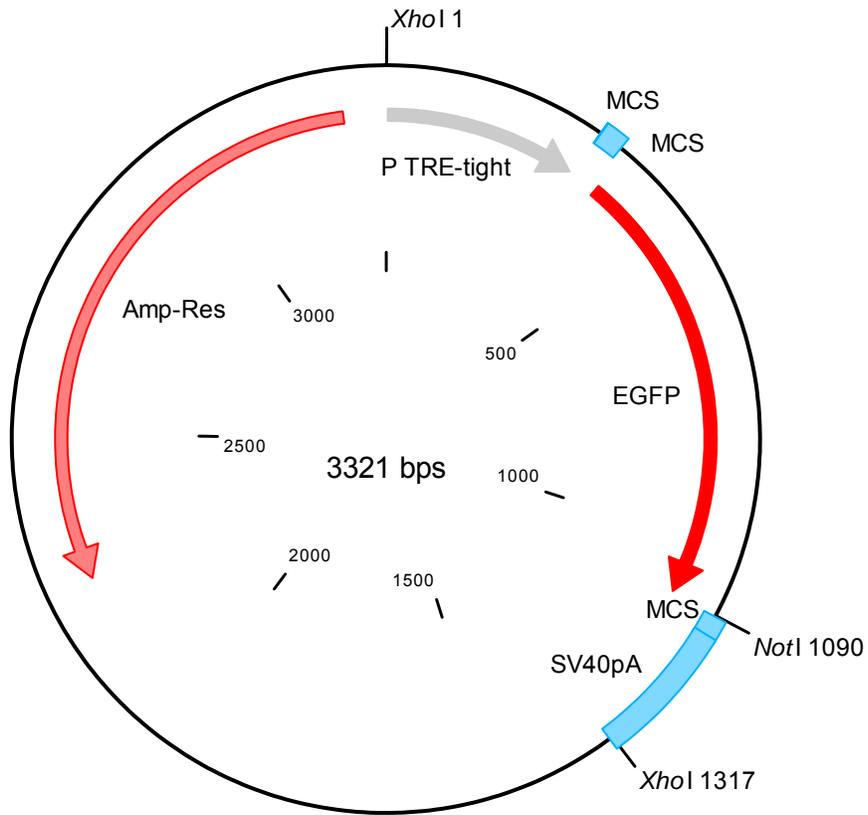
Plamidkarte pTet-On



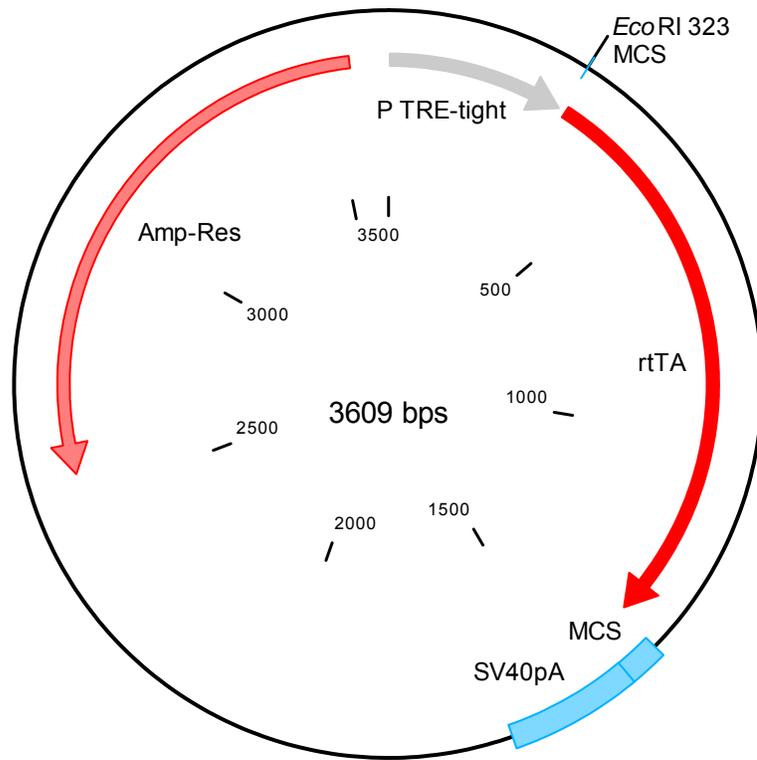
Plamidkarte pTRE-tight



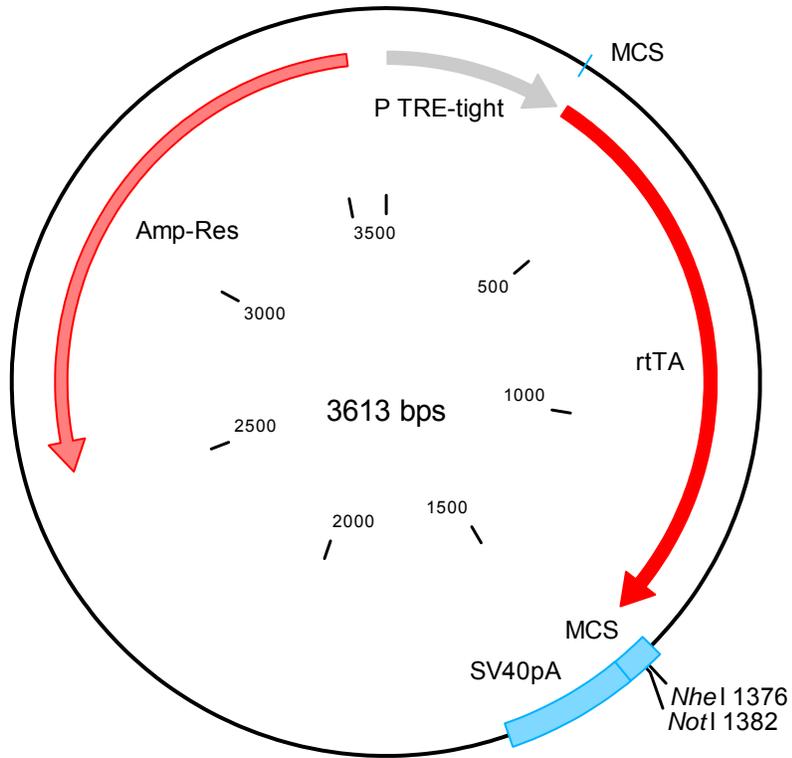
Plasmidkarte pTRE_{tight}+EGFP



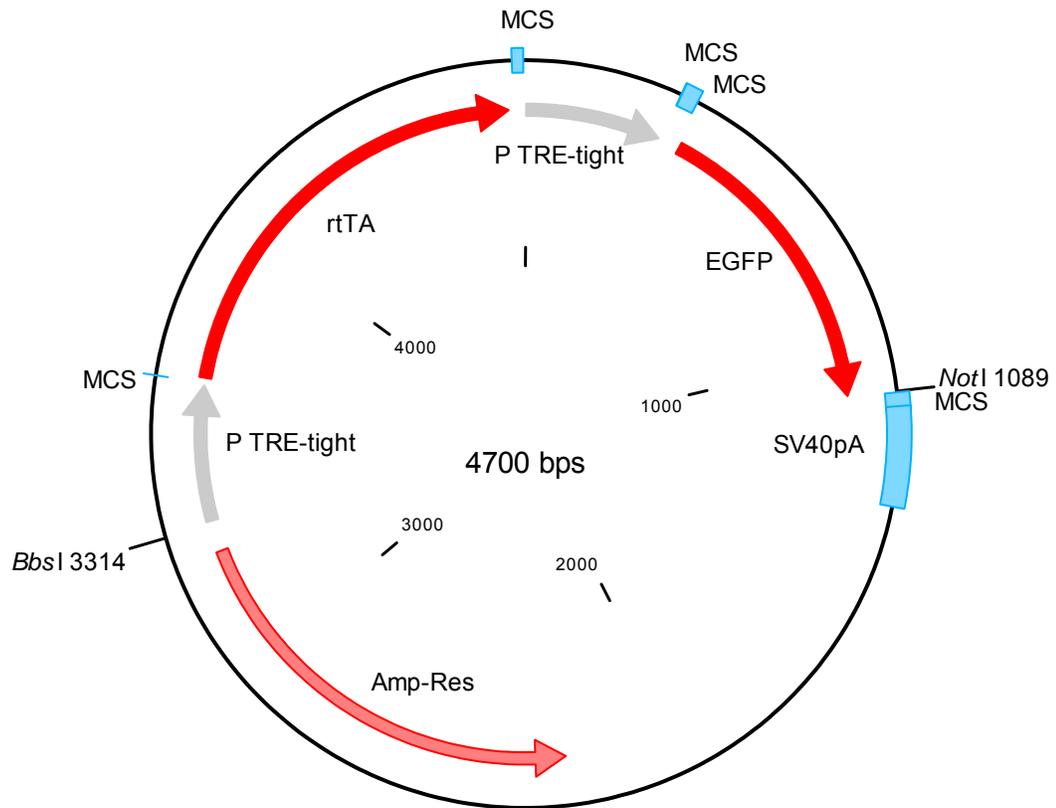
Plasmidkarte pTRE_{tight}+rtTA



Plasmidkarte pTRE_{tight}+rtTA-ΔEcoRI



Plasmidkarte pTRE_{tight}-rtTA+TRE_{tight}-EGFP



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plastizität (Differenzierung) von mesenchymalen Stammzellen.	7
Abbildung 2: Phasenkontrastaufnahmen der Subpopulationen von hMSCs.	9
Abbildung 3: Die Tet-Off und Tet-On Systeme.	14
Abbildung 4: Morphologie und Genomstruktur von HIV-1.	24
Abbildung 5: Replikationszyklus von HIV-1.	36
Abbildung 6: Plasmidkarte von pLenti6/V5-DEST (Invitrogen 2006a).	41
Abbildung 7: Plasmidkarte von pLP1 (Invitrogen 2006b).	43
Abbildung 8: Plasmidkarte von pLP2 (Invitrogen 2006b).	43
Abbildung 9: Plasmidkarte von pLP/VSVG (Invitrogen 2006b).	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Virusproduktion und der Transduktion.	47
Abbildung 11: Die Gateway LR Klonierung.	70
Abbildung 12: Plasmidkarten der Expressions- und Verpackungsplasmide.	85
Abbildung 13: Kontrollverdau der Klonierung der lentiviralen Negativkontrolle.	86
Abbildung 14: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5+EGFP-Plasmids.	88
Abbildung 15: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5 Δ CMV-Plasmids.	89
Abbildung 16: Kontrollverdau der Klonierung des pLenti6/V5+rtTA-Plasmids.	90
Abbildung 17: Klonierung des selbstregulierten Tet-ON-EGFP-Expressionsvektor.	93
Abbildung 18: Kontrollverdau der Klonierung des pLP1/2-Plasmids.	95
Abbildung 19: Vergleich verschiedener Verpackungssysteme auf Proteinebene.	96
Abbildung 20: Vergleich verschiedener Verpackungssysteme auf RNA-Ebene.	97
Abbildung 21: Effekt von Polybrene auf die Transduktionseffizienz auf Proteinebene.	98
Abbildung 22: Effekt von Polybrene auf die Transduktionseffizienz auf RNA-Ebene.	99
Abbildung 23: Effekt von Blasticidin auf die transgenen Zellen.	100
Abbildung 24: Effekt der Blasticidinselektion auf die transgenen Zellpopulationen.	101
Abbildung 25: Vergleich der Transgenexpression von hMSCs verschiedener Spender.	102
Abbildung 26: Tetracyclin-regulierte Expression.	104
Abbildung 27: Anti-p24 ELISA.	105
Abbildung 28: Bestimmung des Virustiters mit qRT-PCR	107
Abbildung 29: Titration verschiedener Viruspräparationen.	108
Abbildung 30: Differenzierungsfähigkeit von lentiviral transduzierten hMSCs.	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften viraler Vektoren für die Gentherapie.	18
Tabelle 2: Merkmale von pLenti6V5-DEST.	41
Tabelle 3: Merkmale von pLP1.	43
Tabelle 4: Merkmale von pLP2.	44
Tabelle 5: Merkmale von pLP/VSVG.	44
Tabelle 6: Primer für PCR.	55
Tabelle 7: PCR-Ansätze.	72
Tabelle 8: Programmierung des PCR Thermocyclers.	72
Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele	81

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
1kb	1 kb DNA Leiter
A	Ampere
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
Bla	Blasticidin
bp	Basenpaare
BSD	Blasticidin-S-Deaminase
Cm	Chloramphenicol
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> : deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>engl.</i> : double-stranded DNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> : enhanced green fluorescent protein)
engl.	englisch (in englischer Sprache)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol

FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>engl.</i> : fluorescent activated cell sorting)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O _(dd)	bidestilliertes Wasser
hMSC(s)	humane mesenchymale Stammzelle(n) (<i>engl.</i> : human mesenchymal stem cell(s))
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>engl.</i> : horseradish peroxidase)
HSC(s)	hematopoetische Stammzelle(n) (<i>engl.</i> : hematopoetic stem cell(s))
HSV	Herpes Simplex Virus
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
ISCT	Internationale Gemeinschaft für Zelltherapie (<i>engl.</i> : international society for cellular therapy)
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
L, l	Liter
lat.	lateinisch (in lateinischer Sprache)
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	magnetische Zellsortierung (<i>engl.</i> : magnetic cell separation)
MCS	Polylinker (<i>engl.</i> : multiple cloning site)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
miRNA	Mikro-RNA
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mod.	modifiziert
MSC(s)	mesenchymale Stammzelle(n) (<i>engl.</i> : mesenchymal stem cell(s))

MW	Molekulargewicht (<i>engl.</i> : molecular weight)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
ori	Replikationsursprung (<i>engl.</i> : origin of replication)
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> : polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert (<i>lat.</i> : Potentia Hydrogenii)
PM	Verpackungsmischung (<i>engl.</i> : packaging mix)
Poly	Polybrene
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
rER	raues Endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> : ribonucleic acid)
RNAi	RNA Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rtTA	reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
s	Sekunde(n)
Sek.	Sekunde(n)
shRNA	kurze Haarnadel RNA (<i>engl.</i> : short hairpin RNA)
siRNA	kurze störende RNA (<i>engl.</i> : short interfering RNA)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>engl.</i> : single-stranded DNA)
T	Temperatur
tech.	technisch
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	Units
ü.N., ÜN	über Nacht

untr.	untransduziert
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Literaturverzeichnis

- Abdellatif, A. A., Pelt, J. L., Benton, R. L., Howard, R. M., Tsoulfas, P., Ping, P., Xu, X. M., and Whittmore, S. R. (2006). Gene delivery to the spinal cord: comparison between lentiviral, adenoviral, and retroviral vector delivery systems. *J.Neurosci.Res.* 84 [3], 553-567.
- Adami, R. C. and Rice, K. G. (1999). Metabolic stability of glutaraldehyde cross-linked peptide DNA condensates. *J.Pharm.Sci.* 88 [8], 739-746.
- Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., and Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J.Virol.* 70 [4], 2581-2585.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272 [5270], 1955-1958.
- Allan, J. S., Coligan, J. E., Barin, F., McLane, M. F., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Lee, T. H., and Essex, M. (1985). Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 228 [4703], 1091-1094.
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., Colombo, M. P., Versura, P., D'Errico-Grigioni, A., Ferri, E., Baccarani, M., and Lemoli, R. M. (2006). Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24 [2], 454-461.
- Amar, L., Desclaux, M., Faucon-Biguot, N., Mallet, J., and Vogel, R. (2006). Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* 34 [5], e37.
- Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H., and Russell, D. W. (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J.Biol.Chem.* 264 [14], 8222-8229.
- Anjos-Afonso, F., Siapati, E. K., and Bonnet, D. (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J.Cell Sci.* 117 [Pt 23], 5655-5664.
- Arber, W. (1965). Host-controlled modification of bacteriophage. *Annu.Rev.Microbiol.* 19, 365-378.
- Arya, S. K., Guo, C., Josephs, S. F., and Wong-Staal, F. (1985). Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229 [4708], 69-73.
- Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68 [4-5], 245-253.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D., and Gazit, Z. (2006). Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 24 [7], 1728-1737.
- Aubin, J. E. (1998). Bone stem cells. *J.Cell Biochem.Suppl* 30-31, 73-82.
- Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., and Gupta, A. K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17 [2 Suppl], 77S-83S.
- August, J. T., Bolognesi, D. P., Fleissner, E., Gilden, R. V., and Nowinski, R. C. (1974). A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. *Virology* 60 [2], 595-600.
- Awad, H. A., Butler, D. L., Boivin, G. P., Smith, F. N., Malaviya, P., Huijbregtse, B., and Caplan, A. I. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5 [3], 267-277.
- Awad, H. A., Zhang, X., Reynolds, D. G., Guldborg, R. E., O'keefe, R. J., and Schwarz, E. M. (2007). Recent Advances in Gene Delivery for Structural Bone Allografts: A Review. *Tissue Eng*.
- Baksh, D., Song, L., and Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J.Cell Mol.Med.* 8 [3], 301-316.
- Ballas, C. B., Zielske, S. P., and Gerson, S. L. (2002). Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J.Cell Biochem.Suppl* 38, 20-28.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226 [5252], 1209-1211.
- Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp.Hematol.* 28 [6], 707-715.
- Baron, U. and Bujard, H. (2000). Tet Repressor-Based System for Regulated Gene Expression in Eukaryotic Cells: Principles and Advances. *Meth.Enzymol.* 401-421.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 [4599], 868-871.
- Bartosch, B. and Cosset, F. L. (2004). Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. *Curr.Gene Ther.* 4 [4], 427-443.
- Bazan-Peregrino, M., Seymour, L. W., and Harris, A. L. (2007). Gene therapy targeting to tumor endothelium. *Cancer Gene Ther.* 14 [2], 117-127.
- BD Biosciences Clontech • www.bdbiosciences.com. (2003). pTRE-tight Vectors. *Clontechniques XVIII* [2], 10-11.
- BD Biosciences Clontech • www.bdbiosciences.com. (2005). BD™ Tet-On & Tet-Off Systems.
- Beard, B. C., Dickerson, D., Beebe, K., Gooch, C., Fletcher, J., Okbinoglu, T., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Kaul, R., Kiem, H. P., and Trobridge, G. D. (2007a). Comparison of HIV-derived Lentiviral and MLV-based Gammaretroviral Vector Integration Sites in Primate Repopulating Cells. *Mol.Ther.*
- Beard, B. C., Keyser, K. A., Trobridge, G. D., Peterson, L. J., Miller, D. G., Jacobs, M., Kaul, R., and Kiem, H. P. (2007b). Unique integration profiles in a canine model of long-term repopulating cells transduced with gammaretrovirus, lentivirus, or foamy virus. *Hum.Gene Ther.* 18 [5], 423-434.
- Berkhout, B. and Jeang, K. T. (1989). trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J.Virol.* 63 [12], 5501-5504.
- Berkhout, B., Silverman, R. H., and Jeang, K. T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59 [2], 273-282.
- Bernard, P. and Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J.Mol.Biol.* 226 [3], 735-745.
- Bess, J. W., Jr., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (1997). Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations. *Virology* 230 [1], 134-144.

- Bette T.M.Korber, Christian Brander, Barton F.Haynes, Richard Koup, John P.Moore, Bruce D.Walker, and David I.Watkins (eds). HIV Molecular Immunology 2005. (2005). Los Alamos, New Mexico, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics.
- Beyer, Nardi N. and da Silva, Meirelles L. (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb.Exp.Pharmacol.* [174], 249-282.
- Bianco, P. and Gehron, Robey P. (2000). Marrow stromal stem cells. *J.Clin.Invest* 105 [12], 1663-1668.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P. G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19 [3], 180-192.
- Bianco, P. and Robey, P. G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414 [6859], 118-121.
- Bilello, J. P., Delaney, W. E., Boyce, F. M., and Isom, H. C. (2001). Transient disruption of intercellular junctions enables baculovirus entry into nondividing hepatocytes. *J.Virol.* 75 [20], 9857-9871.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 [6], 1513-1523.
- Bittner, J. J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumour incidence in mice. *Science* 84 , 162.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41 [2], 521-530.
- Bour, S., Geleziunas, R., and Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol.Rev.* 59 [1], 63-93.
- Brough, R., Papanastasiou, A. M., and Porter, A. C. (2007). Stringent and reproducible tetracycline-regulated transgene expression by site-specific insertion at chromosomal loci with pre-characterised induction characteristics. *BMC.Mol.Biol.* 8 , 30.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J.Cell Biochem.* 64 [2], 278-294.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., Ricatlon, N. S., Mosca, J. D., Kraus, K. H., and Kadiyala, S. (1998a). Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin.Orthop.Relat Res.* [355 Suppl], S247-S256.
- Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M., Hayes, W. C., Jaiswal, N., and Kadiyala, S. (1998b). Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J.Orthop.Res.* 16 [2], 155-162.
- Bryant, M. and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 [2], 523-527.
- Buchschacher, G. L., Jr. and Wong-Staal, F. (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95 [8], 2499-2504.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365 [6447], 666-669.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 [17], 8033-8037.
- Butler, I. F., Pandrea, I., Marx, P. A., and Apetrei, C. (2007). HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr.HIV.Res.* 5 [1], 23-45.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J.Orthop.Res.* 9 [5], 641-650.
- Caplan, A. I. (1994). The mesengenic process. *Clin.Plast.Surg.* 21 [3], 429-435.
- Caplan, A. I. (1995). Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect.Tissue Res.* 31 [4], S9-14.
- Caplan, A. I. (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11 [7-8], 1198-1211.
- Caplan, A. I. and Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol.Med.* 7 [6], 259-264.
- Caplan, A. I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., and Goldberg, V. M. (1997). Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin.Orthop.Relat Res.* [342], 254-269.
- Caplan, A. I. and Goldberg, V. M. (1999). Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin.Orthop.Relat Res.* [367 Suppl], S12-S16.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H. E., and Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56 [2], 289-301.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint, Basile G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bouso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 [5466], 669-672.
- Chamberlain, J. R., Schwarze, U., Wang, P. R., Hirata, R. K., Hankenson, K. D., Pace, J. M., Underwood, R. A., Song, K. M., Sussman, M., Byers, P. H., and Russell, D. W. (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303 [5661], 1198-1201.
- Chen, L. B., Jiang, X. B., and Yang, L. (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J.Gastroenterol.* 10 [20], 3016-3020.
- Cheng, L., Qasba, P., Vanguri, P., and Thiede, M. A. (2000). Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J.Cell Physiol* 184 [1], 58-69.
- Choate, K. A. and Khavari, P. A. (1997). Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum.Gene Ther.* 8 [14], 1659-1665.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85 [7], 1135-1148.
- Chrystie, I. L. and Almeida, J. D. (1989). Recovery of antigenically reactive HIV-2 cores. *J.Med.Virol.* 27 [3], 188-195.
- Clapham, P. R., Blanc, D., and Weiss, R. A. (1991). Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology* 181 [2], 703-715.
- Clavel, F. and Orenstein, J. M. (1990). A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J.Virol.* 64 [10], 5230-5234.
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270 [5243], 1811-1815.

- Cochrane, A., Kramer, R., Ruben, S., Levine, J., and Rosen, C. A. (1989). The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* 171 [1], 264-266.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (eds). *Retroviruses*. (1997). Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cohen, E. A., Subbramanian, R. A., and Gottlinger, H. G. (1996). Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 214 , 219-235.
- Cohen, J. (1996). New role for HIV: a vehicle for moving genes into cells. *Science* 272 [5259], 195.
- Coleman, J. E., Huentelman, M. J., Kasparov, S., Metcalfe, B. L., Paton, J. F., Katovich, M. J., Semple-Rowland, S. L., and Raizada, M. K. (2003). Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol Genomics* 12 [3], 221-228.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., and Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 [7], 3213-3218.
- Colter, D. C., Sekiya, I., and Prockop, D. J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 [14], 7841-7845.
- Conget, P. A. and Minguell, J. J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J.Cell Physiol* 181 [1], 67-73.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173 [1 Spec No], 33-38.
- Costello, E., Munoz, M., Buetti, E., Meylan, P. R., Diggelmann, H., and Thali, M. (2000). Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther.* 7 [7], 596-604.
- Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C. H., Wu, B., and Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat.Biotechnol.* 22 [5], 560-567.
- Craigie, R. (2001). HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J.Biol.Chem.* 276 [26], 23213-23216.
- Craven, R. C., Bennett, R. P., and Wills, J. W. (1991). Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly. *J.Virol.* 65 [11], 6205-6217.
- Cullen, B. R. (1991). Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.* 5 [10], 2361-2368.
- Cullen, B. R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93 [5], 685-692.
- Cullen, B. R. and Greene, W. C. (1990). Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 178 [1], 1-5.
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., and Landsberger, N. (2002). Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol.Cell Biol.* 22 [9], 3157-3173.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., Roos, B. A., and Schiller, P. C. (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J.Cell Sci.* 117 [Pt 14], 2971-2981.
- D'Souza, M. P. and Harden, V. A. (1996). Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat.Med.* 2 [12], 1293-1300.
- da Silva, Meirelles L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J.Cell Sci.* 119 [Pt 11], 2204-2213.
- Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., and Chaplin, D. J. (1997). Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol.Res.* 9 [6-7], 313-325.
- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312 [5996], 763-767.
- Danna, K. and Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 68 [12], 2913-2917.
- Davis, B. M., Humeau, L., Slepushkin, V., Binder, G., Korshalla, L., Ni, Y., Ogunjimi, E. O., Chang, L. F., Lu, X., and Dropulic, B. (2004a). ABC transporter inhibitors that are substrates enhance lentiviral vector transduction into primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 104 [2], 364-373.
- Davis, H. E., Morgan, J. R., and Yarmush, M. L. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys.Chem.* 97 [2-3], 159-172.
- Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R., and Yarmush, M. L. (2004b). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys.J.* 86 [2], 1234-1242.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44 [8], 1928-1942.
- de Lima, M. C., Simoes, S., Pires, P., Gaspar, R., Slepushkin, V., and Duzgunes, N. (1999). Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol.Membr.Biol.* 16 [1], 103-109.
- Delenda, C. and Gaillard, C. (2005). Real-time quantitative PCR for the design of lentiviral vector analytical assays. *Gene Ther.* 12 Suppl 1 , S36-S50.
- Delorme, B., Chateauvieux, S., and Charbord, P. (2006). The concept of mesenchymal stem cells. *Regen.Med.* 1 [4], 497-509.
- Deng, W., Han, Q., Liao, L., Li, C., Ge, W., Zhao, Z., You, S., Deng, H., Murad, F., and Zhao, R. C. (2005). Engrafted bone marrow-derived flk-1(+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng* 11 [1-2], 110-119.
- Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J., and Tuan, R. S. (2006). Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24 [6], 1487-1495.
- Dewar, R. L., Vasudevachari, M. B., Natarajan, V., and Salzman, N. P. (1989). Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: effects of monensin on glycosylation and transport. *J.Virol.* 63 [6], 2452-2456.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99 [10], 3838-3843.
- Dickson, P. V., Nathwani, A. C., and Davidoff, A. M. (2005). Delivery of antiangiogenic agents for cancer gene therapy. *Technol.Cancer Res.Treat.* 4 [4], 331-341.
- DiGirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., and Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br.J.Haematol.* 107 [2], 275-281.
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., and Schieker, M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J.Cell Mol.Med.* 11 [1], 21-38.

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 [4], 315-317.
- Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., and Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85 [7], 1149-1158.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J.Virol.* 68 [3], 1689-1696.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J.Virol.* 72 [11], 8463-8471.
- Earl, P. L., Moss, B., and Doms, R. W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J.Virol.* 65 [4], 2047-2055.
- El Badri, N. S., Maheshwari, A., and Sanberg, P. R. (2004). Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev.* 13 [5], 463-472.
- El Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruyschaert, J. M., and Vandenbranden, M. (1997). The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* 414 [2], 187-192.
- Ellermann, V. and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl.Bakteriol.Parasitenkd.Infectionskr.Hyg.Abt.Orig.* 46 , 595-609.
- Emi, N., Friedmann, T., and Yee, J. K. (1991). Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J.Virol.* 65 [3], 1202-1207.
- Engel, B. C., Kohn, D. B., and Podsakoff, G. M. (2003). Update on gene therapy of inherited immune deficiencies. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 5 [5], 503-507.
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br.J.Haematol.* 109 [1], 235-242.
- Escarpe, P., Zayek, N., Chin, P., Borellini, F., Zufferey, R., Veres, G., and Kiermer, V. (2003). Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol.Ther.* 8 [2], 332-341.
- Escricu, V., Cioliina, C., Helbling-Leclerc, A., Wils, P., and Scherman, D. (1998). Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol.Toxicol.* 14 [2], 95-104.
- Evans, D. T., Bricker, J. E., and Desrosiers, R. C. (2004). A novel approach for producing lentiviruses that are limited to a single cycle of infection. *J.Virol.* 78 [21], 11715-11725.
- Facke, M., Janetzko, A., Shoeman, R. L., and Krausslich, H. G. (1993). A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J.Virol.* 67 [8], 4972-4980.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 [13], 2606-2617.
- Fan, L. and Peden, K. (1992). Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1. *Virology* 190 [1], 19-29.
- Fasbender, A., Zabner, J., Zeiher, B. G., and Welsh, M. J. (1997). A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther.* 4 [11], 1173-1180.
- Fehlmann, C., Krapf, R., and Solioz, M. (1993). Reverse transcriptase can block polymerase chain reaction. *Clin.Chem.* 39 [2], 368-369.
- Fehrer, C. and Lepperding, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Exp.Gerontol.* 40 [12], 926-930.
- Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G. N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 [5], 1495-1499.
- Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E., and Wu, G. (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum.Gene Ther.* 8 [5], 511-512.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84 [21], 7413-7417.
- Feng, S. and Holland, E. C. (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334 [6178], 165-167.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272 [5263], 872-877.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 [5356], 1528-1530.
- Fling, S. P. and Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal.Biochem.* 155 [1], 83-88.
- Franceschi, R. T. (2005). Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J.Dent.Res.* 84 [12], 1093-1103.
- Freed, E. O. and Moulard, A. J. (2006). The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology.* 3 , 77.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3 [4], 393-403.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., and Keiliss-Borok, I. V. (1974a). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17 [4], 331-340.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A., and Ruadkow, I. A. (1974b). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp.Hematol.* 2 [2], 83-92.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs I. *Exp.Hematol.* 4 [5], 267-274.
- Friedenstein, A. J., Ivanov-Smolenski, A. A., Chajlakhjan, R. K., Gorskaya, U. F., Kuralesova, A. I., Latzinik, N. W., and Gerasimow, U. W. (1978). Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp.Hematol.* 6 [5], 440-444.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6 [2], 230-247.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., and Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 16 [3], 381-390.
- Friend, D. S., Papahadjopoulos, D., and Debs, R. J. (1996). Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1278 [1], 41-50.
- Gabuzda, D. H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W. A., and Sodroski, J. (1992). Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J.Virol.* 66 [11], 6489-6495.

- Gale, C. V., Yirell, D. L., Campbell, E., Van der, Paal L., Grosskurth, H., and Kaleebu, P. (2006). Genotypic variation in the pol gene of HIV type 1 in an antiretroviral treatment-naive population in rural southwestern Uganda. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 22 [10], 985-992.
- Gallaher, W. R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50 [3], 327-328.
- Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C., and Montelaro, R. C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 5 [4], 431-440.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 [4599], 865-867.
- Galmiche, M. C., Koteliensky, V. E., Briere, J., Herve, P., and Charbord, P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82 [1], 66-76.
- Gao, X. and Huang, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* 35 [3], 1027-1036.
- Gao, X., Kim, K. S., and Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS.J.* 9 [1], E92-104.
- Garcia, J. V. and Miller, A. D. (1992). Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res.Virol.* 143 [1], 52-55.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., and Popovic, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233 [4760], 215-219.
- Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K. T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251 [5001], 1597-1600.
- Gatignol, A., Kumar, A., Rabson, A., and Jeang, K. T. (1989). Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-responsive TAR element RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 [20], 7828-7832.
- Ge, Y., Li, Z. H., Marshall, M. S., Broxmeyer, H. E., and Lu, L. (1998). Involvement of H-ras in erythroid differentiation of TF1 and human umbilical cord blood CD34 cells. *Blood Cells Mol.Dis.* 24 [2], 124-136.
- Gelderblom, H. R. (1997). Fine Structure of HIV and SIV. Korber, B., Brander, C., Haynes, B, Koup, R., Moore, J., and Walker, B. (eds). *HIV Molecular Immunology Database 1997. IV-37-IV-50.* Los Alamos, NM, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M. A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156 [1], 171-176.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., and Gijssbers, R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC.Biotechnol.* 6, 34.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., and Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J.Cell Biochem.* 88 [5], 873-884.
- Giordano, A., Galderisi, U., and Marino, I. R. (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J.Cell Physiol* 211 [1], 27-35.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Jr., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Henderson, L. E., and Rein, A. (1990). Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J.Virol.* 64 [7], 3207-3211.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., and Howard, B. H. (1982). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79 [22], 6777-6781.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 [12], 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268 [5218], 1766-1769.
- Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 [8], 3195-3199.
- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 [15], 5781-5785.
- Goverdhan, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J. M., Barcia, C., Curtin, J. F., Soffer, E. B., Mondkar, S., King, G. D., Hu, J., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Greengold, D. S., Lowenstein, P. R., and Castro, M. G. (2005). Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol.Ther.* 12 [2], 189-211.
- Grassi, G., Kohn, H., Dapas, B., Farra, R., Platz, J., Engel, S., Cjsareck, S., Kandolf, R., Teutsch, C., Klima, R., Triolo, G., and Kuhn, A. (2006). Comparison between recombinant baculo- and adenoviral-vectors as transfer system in cardiovascular cells. *Arch.Virol.* 151 [2], 255-271.
- Greatorex, J. and Lever, A. (1998). Retroviral RNA dimer linkage. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 12), 2877-2882.
- Gregory, C. A., Prockop, D. J., and Spees, J. L. (2005a). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp.Cell Res.* 306 [2], 330-335.
- Gregory, C. A., Ylostalo, J., and Prockop, D. J. (2005b). Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci.STKE.* 2005 [294], e37.
- Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S., and Simmons, P. J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84 [12], 4164-4173.
- Gysin, R., Wergedal, J. E., Sheng, M. H., Kasukawa, Y., Miyakoshi, N., Chen, S. T., Peng, H., Lau, K. H., Mohan, S., and Baylink, D. J. (2002). Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats. *Gene Ther.* 9 [15], 991-999.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Anglikler, H., Shaw, E., Klenk, H. D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360 [6402], 358-361.
- Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K., Kawano, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., and Niitsu, Y. (2005). Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci.* 96 [3], 149-156.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166 [4], 557-580.
- Haseltine, W. A. (1991). Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 5 [10], 2349-2360.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (1992a). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13 [1], 69-80.
- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1992b). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13 [1], 81-88.

- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 [15], 7311-7315.
- Heller, L. C., Ugen, K., and Heller, R. (2005). Electroporation for targeted gene transfer. *Expert.Opin.Drug Deliv.* 2 [2], 255-268.
- Henderson, L. E., Bowers, M. A., Sowder, R. C., Serabyn, S. A., Johnson, D. G., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Bryant, D. K., and Fenselau, C. (1992). Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J.Virol.* 66 [4], 1856-1865.
- Heyde, M., Partridge, K. A., Oreffo, R. O., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M., and Garnett, M. C. (2007). Gene therapy used for tissue engineering applications. *J.Pharm.Pharmacol.* 59 [3], 329-350.
- Hickman, M. A., Malone, R. W., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T. R., Knoell, D., Szoka, F. C., Walzem, R., Carlson, D. M., and Powell, J. S. (1994). Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum.Gene Ther.* 5 [12], 1477-1483.
- Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280 [1], 124-131.
- Hill, M. K., Bellamy-McIntyre, A., Vella, L. J., Campbell, S. M., Marshall, J. A., Tachedjian, G., and Mak, J. (2007). Alteration of the proline at position 7 of the HIV-1 spacer peptide p1 suppresses viral infectivity in a strain dependent manner. *Curr.HIV.Res.* 5 [1], 69-78.
- Hill, M. K., Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M., and Mak, J. (2002). Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J.Virol.* 76 [22], 11245-11253.
- Ho, Y. C., Chen, H. C., Wang, K. C., and Hu, Y. C. (2004). Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol.Bioeng.* 88 [5], 643-651.
- Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H., Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M., and Neth, P. (2005). Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J.Gene Med.* 7 [6], 718-728.
- Hoglund, S., Ofverstedt, L. G., Nilsson, A., Lundquist, P., Gelderblom, H., Ozel, M., and Skoglund, U. (1992). Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 8 [1], 1-7.
- Hopkins, N. (1993). High titers of retrovirus (vesicular stomatitis virus) pseudotypes, at last. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 [19], 8759-8760.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 [13], 8932-8937.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7 [5], 393-395.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Gordon, P. L., Koo, W. W., Fitzpatrick, L. A., Neel, M. D., McCarville, M. E., Orchard, P. J., Pyeritz, R. E., and Brenner, M. K. (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97 [5], 1227-1231.
- Hu, W. S. and Pathak, V. K. (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol.Rev.* 52 [4], 493-511.
- ICTV (eds). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. (eds). (2000). 1st. New York, San Diego, Academic Press.
- Ide, H., Yoshida, T., Matsumoto, N., Aoki, K., Osada, Y., Sugimura, T., and Terada, M. (1997). Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res.* 57 [22], 5022-5027.
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., and Takashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 6 [6], 543-553.
- Invitrogen (eds). pLenti4/V5-DEST, pLenti6/V5-DEST, pLenti6.2/V5-DEST and pLenti6/Ubc/V5-DEST Gateway® Vector Kits; User Manual. (2006a). Version G.
- Invitrogen (eds). *Virapower Lentiviral Expression Systems; User Manual.* (2006b). Version G.
- Invitrogen. (2007). BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits. <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=10897>.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331 [6153], 280-283.
- Jackson, D. A., Juranek, S., and Lipps, H. J. (2006). Designing nonviral vectors for efficient gene transfer and long-term gene expression. *Mol.Ther.* 14 [5], 613-626.
- Jacobo-Molina, A. and Arnold, E. (1991). HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* 30 [26], 6351-6356.
- Jacobsen, H., Klenow, H., and Overgaard-Hansen, K. (1974). The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur.J.Biochem.* 45 [2], 623-627.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. L., and Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J.Cell Biochem.* 64 [2], 295-312.
- Janderova, L., McNeil, M., Murrell, A. N., Mynatt, R. L., and Smith, S. R. (2003). Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes.Res.* 11 [1], 65-74.
- Jiang, K. T., Xiao, H., and Rich, E. A. (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J.Biol.Chem.* 274 [41], 28837-28840.
- Jenkins, F. J. and Turner, S. L. (1996). Herpes simplex virus: a tool for neuroscientists. *Front Biosci.* 1, d241-d247.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 [6893], 41-49.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C. M. (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp.Hematol.* 30 [8], 896-904.
- Jiang, Z. S., Gao, Y., and Mu, N. (2007). [Multipotent adult progenitor cells from human bone marrow differentiate into hepatocyte-like cells induced by co-culture with human hepatocyte line]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* 87 [6], 414-418.
- Jones, K. A. and Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 717-743.
- Jones, O. Y., Good, R. A., and Cahill, R. A. (2004). Nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplantation for treatment of childhood overlap syndrome and small vessel vasculitis. *Bone Marrow Transplant.* 33 [10], 1061-1063.
- Jorgensen, C., Djouad, F., Apparailly, F., and Noel, D. (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther.* 10 [10], 928-931.

- Jowett, J. B., Hockley, D. J., Nermut, M. V., and Jones, I. M. (1992). Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J.Gen.Virol.* 73 (Pt 12) , 3079-3086.
- Justesen, J., Stenderup, K., and Kassem, M. S. (2001). [Mesenchymal stem cells. Potential use in cell and gene therapy of bone loss caused by aging and osteoporosis]. *Ugeskr.Laeger* 163 [40], 5491-5495.
- Kadivar, M., Khatami, S., Mortazavi, Y., Shokrgozar, M. A., Taghikhani, M., and Soleimani, M. (2006). In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 340 [2], 639-647.
- Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A., and Bruder, S. P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 6 [2], 125-134.
- Kan, I., Melamed, E., and Offen, D. (2005). Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Curr.Drug Targets.* 6 [1], 31-41.
- Kang, X. Q., Zang, W. J., Bao, L. J., Li, D. L., Song, T. S., Xu, X. L., and Yu, X. J. (2005). Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J.Gastroenterol.* 11 [47], 7461-7465.
- Kaplan, A. H., Krogstad, P., Kempf, D. J., Norbeck, D. W., and Swanstrom, R. (1994a). Human immunodeficiency virus type 1 virions composed of unprocessed Gag and Gag-Pol precursors are capable of reverse transcribing viral genomic RNA. *Antimicrob.Agents Chemother.* 38 [12], 2929-2933.
- Kaplan, A. H., Manchester, M., and Swanstrom, R. (1994b). The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.* 68 [10], 6782-6786.
- Kassem, M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 6 [4], 369-374.
- Katz, R. A. and Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* 63 , 133-173.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24 [5], 1294-1301.
- Kido, H., Kamoshita, K., Fukutomi, A., and Katunuma, N. (1993). Processing protease for gp160 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor in human T4+ lymphocytes. Purification and characterization. *J.Biol.Chem.* 268 [18], 13406-13413.
- Kimura, M., Takatsuki, A., and Yamaguchi, I. (1994). Blasticidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1219 [3], 653-659.
- Kirkwood, T. B. and Bangham, C. R. (1994). Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 [18], 8685-8689.
- Kjems, J., Brown, M., Chang, D. D., and Sharp, P. A. (1991). Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 [3], 683-687.
- Klaver, B. and Berkhout, B. (1994). Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J.Virol.* 68 [6], 3830-3840.
- Klein, S. A., Karsten, S., Ruster, B., Klebba, C., Pape, M., Ottmann, O. G., Hoelzer, D., and Roth, W. K. (2003). Comparison of TaqMan real-time PCR and p24 Elisa for quantification of in vitro HIV-1 replication. *J.Virol.Methods* 107 [2], 169-175.
- Kluger, M. S., Shiao, S. L., Bothwell, A. L., and Pober, J. S. (2002). Cutting Edge: Internalization of transduced E-selectin by cultured human endothelial cells: comparison of dermal microvascular and umbilical vein cells and identification of a phosphoserine-type di-leucine motif. *J.Immunol.* 168 [5], 2091-2095.
- Koc, O. N. and Lazarus, H. M. (2001). Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 27 [3], 235-239.
- Kofron, M. D. and Laurencin, C. T. (2006). Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 58 [4], 555-576.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., and Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 [19], 10711-10716.
- Korbling, M. and Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N.Engl.J.Med.* 349 [6], 570-582.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237 [4820], 1351-1355.
- Koyanagi, Y., Miles, S., Mitsuyasu, R. T., Merrill, J. E., Vinters, H. V., and Chen, I. S. (1987). Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* 236 [4803], 819-822.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15 [20], 8125-8148.
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101 [9], 3722-3729.
- Krausslich, H. G., Facke, M., Heuser, A. M., Konvalinka, J., and Zentgraf, H. (1995). The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J.Virol.* 69 [6], 3407-3419.
- Kulkosky, J. and Skalka, A. M. (1994). Molecular mechanism of retroviral DNA integration. *Pharmacol.Ther.* 61 [1-2], 185-203.
- Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., and Robey, P. G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J.Bone Miner.Res.* 12 [9], 1335-1347.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *J.Cell Biol.* 153 [5], 1133-1140.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 [5259], 680-685.
- Lambeth, C. R., White, L. J., Johnston, R. E., and de Silva, A. M. (2005). Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J.Clin.Microbiol.* 43 [7], 3267-3272.
- Landazuri, N., Krishna, D., Gupta, M., and Le Doux, J. M. (2007). Retrovirus-polymer complexes: study of the factors affecting the dose response of transduction. *Biotechnol.Prog.* 23 [2], 480-487.
- Landazuri, N. and Le Doux, J. M. (2004). Complexation of retroviruses with charged polymers enhances gene transfer by increasing the rate that viruses are delivered to cells. *J.Gene Med.* 6 [12], 1304-1319.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu.Rev.Biochem.* 58 , 913-949.
- Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J. R., Whittle, P. J., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., and . (1989). X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature* 342 [6247], 299-302.
- Laspia, M. F., Rice, A. P., and Mathews, M. B. (1990). Synergy between HIV-1 Tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes Dev.* 4 [12B], 2397-2408.

- Laufs, S., Guenechea, G., Gonzalez-Murillo, A., Zsuzsanna, Nagy K., Luz, Lozano M., del Val, C., Jonnakuty, S., Hotz-Wagenblatt, A., Jens, Zeller W., Bueren, J. A., and Fruehauf, S. (2006). Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells. *J.Gene Med.* 8 [10], 1197-1207.
- Lavigne, M. D. and Gorecki, D. C. (2006). Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy. *Expert.Opin.Emerg.Drugs* 11 [3], 541-557.
- Lawrie, A., Brisken, A. F., Francis, S. E., Cumberland, D. C., Crossman, D. C., and Newman, C. M. (2000). Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther.* 7 [23], 2023-2027.
- Le Doux, J. M., Landazuri, N., Yarmush, M. L., and Morgan, J. R. (2001). Complexation of retrovirus with cationic and anionic polymers increases the efficiency of gene transfer. *Hum.Gene Ther.* 12 [13], 1611-1621.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal.Biochem.* 219 [1], 164.
- Le Grice, S. F., Naas, T., Wohlgensinger, B., and Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* 10 [12], 3905-3911.
- Le, S. Y., Malim, M. H., Cullen, B. R., and Maizel, J. V. (1990). A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency viruses. *Nucleic Acids Res.* 18 [6], 1613-1623.
- Lee, C. I., Kohn, D. B., Ekert, J. E., and Tarantal, A. F. (2004a). Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol.Ther.* 9 [1], 112-123.
- Lee, L. K., Williams, C. L., Devore, D., and Roth, C. M. (2006). Poly(propylacrylic acid) enhances cationic lipid-mediated delivery of antisense oligonucleotides. *Biomacromolecules.* 7 [5], 1502-1508.
- Lee, M. S., LeMaistre, A., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Freireich, E. J., Trujillo, J. M., and Stass, S. A. (1989). Detection of two alternative bcr/abl mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 73 [8], 2165-2170.
- Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., Bae, Y. C., and Jung, J. S. (2004b). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 14 [4-6], 311-324.
- Lee, R. J. and Huang, L. (1996). Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J.Biol.Chem.* 271 [14], 8481-8487.
- Lee, S. K., Dykxhoorn, D. M., Kumar, P., Ranjbar, S., Song, E., Maliszewski, L. E., Francois-Bongarcon, V., Goldfeld, A., Swamy, N. M., Lieberman, J., and Shankar, P. (2005). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV. *Blood* 106 [3], 818-826.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J. M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S. P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A. M., Temin, H. M., and . (1988). Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J.Virol.* 62 [5], 1808-1809.
- Lemey, P., Rambaut, A., and Pybus, O. G. (2006). HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Rev.* 8 [3], 125-140.
- Lever, A. M., Strappe, P. M., and Zhao, J. (2004). Lentiviral vectors. *J.Biomed.Sci.* 11 [4], 439-449.
- Levine, B. L., Humeau, L. M., Boyer, J., MacGregor, R. R., Rebello, T., Lu, X., Binder, G. K., Slepishkin, V., Lemiale, F., Mascola, J. R., Bushman, F. D., Dropulic, B., and June, C. H. (2006). Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 [46], 17372-17377.
- Li, X., Hyink, D. P., Polgar, K., Gusella, G. L., Wilson, P. D., and Burrow, C. R. (2005a). Protein kinase X activates ureteric bud branching morphogenesis in developing mouse metanephric kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 16 [12], 3543-3552.
- Li, Y., Yang, Y., and Wang, S. (2005b). Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter. *Exp.Physiol* 90 [1], 39-44.
- Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. M., Deans, R., Marshak, D. R., and Flake, A. W. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat.Med.* 6 [11], 1282-1286.
- Lilley, C. E., Branston, R. H., and Coffin, R. S. (2001). Herpes simplex virus vectors for the nervous system. *Curr.Gene Ther.* 1 [4], 339-358.
- Liss, B. (2002). Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res.* 30 [17], e89.
- Liu, D., Ren, T., and Gao, X. (2003). Cationic transfection lipids. *Curr.Med.Chem.* 10 [14], 1307-1315.
- Liu, F., Shollenberger, L. M., Conwell, C. C., Yuan, X., and Huang, L. (2007). Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J.Gene Med.*
- Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6 [7], 1258-1266.
- Liu, Y. P., Dovzhenko, O. V., Garthwaite, M. A., Dambaeva, S. V., Durning, M., Pollastrini, L. M., and Golos, T. G. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein. *Stem Cells Dev.* 13 [6], 636-645.
- Lizee, G., Aerts, J. L., Gonzales, M. I., Chinnasamy, N., Morgan, R. A., and Topalian, S. L. (2003). Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum.Gene Ther.* 14 [6], 497-507.
- Lo, H. W., Day, C. P., and Hung, M. C. (2005). Cancer-specific gene therapy. *Adv.Genet.* 54 , 235-255.
- Lonsdale, R., Pau, M. G., Oerlemans, M., Ophorst, C., Vooy, A., Havenga, M., Goudsmit, J., UytdeHaag, F., and Marzio, G. (2003). A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry. *J.Virol.Methods* 110 [1], 67-71.
- Lu, L., Ge, Y., Li, Z. H., Dai, M. S., and Broxmeyer, H. E. (2000). Enhancement of proliferation and differentiation of erythroid progenitors by co-transduction of erythropoietin receptor and H-ras cDNAs into single CD34(3+) cord blood cells. *Bone Marrow Transplant.* 26 [8], 817-822.
- Lutzberger, M., Reinert, L. S., Das, A. T., Berkhout, B., and Kijms, J. (2006). A novel splice donor site in the gag-pol gene is required for HIV-1 RNA stability. *J.Biol.Chem.* 281 [27], 18644-18651.
- Luukkonen, B. G., Tan, W., and Schwartz, S. (1995). Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J.Virol.* 69 [7], 4086-4094.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., and Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4 [4], 415-428.
- MacKenzie, T. C. and Flake, A. W. (2002). Human mesenchymal stem cells: insights from a surrogate in vivo assay system. *Cells Tissues.Organs* 171 [1], 90-95.
- Mageed, A. S., Pietryga, D. W., DeHeer, D. H., and West, R. A. (2007). Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation* 83 [8], 1019-1026.

- Mahato, R. I. (1999). Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J.Drug Target* 7 [4], 249-268.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M., and Gerson, S. L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J.Cell Physiol* 176 [1], 57-66.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338 [6212], 254-257.
- Mammano, F., Ohagen, A., Hoglund, S., and Gottlinger, H. G. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J.Virol.* 68 [8], 4927-4936.
- Manchester, K. L. (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques* 19 [2], 208-210.
- Mann, R., Mulligan, R. C., and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33 [1], 153-159.
- Marciniak, R. A., Calnan, B. J., Frankel, A. D., and Sharp, P. A. (1990a). HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell* 63 [4], 791-802.
- Marciniak, R. A., Garcia-Blanco, M. A., and Sharp, P. A. (1990b). Identification and characterization of a HeLa nuclear protein that specifically binds to the trans-activation-response (TAR) element of human immunodeficiency virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 [9], 3624-3628.
- Markusic, D., Oude-Elferink, R., Das, A. T., Berkhout, B., and Seppen, J. (2005). Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter. *Nucleic Acids Res.* 33 [6], e63.
- Martin, M. E. and Rice, K. G. (2007). Peptide-guided gene delivery. *AAPS.J.* 9 [1], E18-E29.
- Mary, C., Telles, J. N., Cheynet, V., Oriol, G., Mallet, F., Mandrand, B., and Verrier, B. (1994). Quantitative and discriminative detection of individual HIV-1 mRNA subspecies by an RNase mapping assay. *J.Virol.Methods* 49 [1], 9-23.
- Mason, J. M., Grande, D. A., Barcia, M., Grant, R., Pergolizzi, R. G., and Breitbart, A. S. (1998). Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther.* 5 [8], 1098-1104.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.* 262 [21], 10035-10038.
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev.Cell* 6 [4], 483-495.
- McClure, M. O., Marsh, M., and Weiss, R. A. (1988). Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.* 7 [2], 513-518.
- McDougal, J. S., Kennedy, M. S., Slioh, J. M., Cort, S. P., Mawle, A., and Nicholson, J. K. (1986). Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231 [4736], 382-385.
- McKenzie, D. L., Kwok, K. Y., and Rice, K. G. (2000). A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J.Biol.Chem.* 275 [14], 9970-9977.
- Meirelles, Lda S. and Nardi, N. B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br.J.Haematol.* 123 [4], 702-711.
- Menon, G. K., Brandsma, J. L., and Schwartz, P. M. (2007). Particle-mediated gene delivery and human skin: ultrastructural observations on stratum corneum barrier structures. *Skin Pharmacol.Physiol* 20 [3], 141-147.
- Metharom, P., Ellem, K. A., and Wei, M. Q. (2005). Gene Transfer to Dendritic Cells Induced a Protective Immunity against Melanoma. *Cell Mol.Immunol.* 2 [4], 281-288.
- Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T. (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J.Mol.Biol.* 225 [1], 39-52.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol.Cell Biol.* 10 [8], 4239-4242.
- Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C., and Feinberg, M. B. (1994). The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J.Exp.Med.* 179 [1], 101-113.
- Minguell, J. J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226 [6], 507-520.
- Miyazaki, M., Obata, Y., Abe, K., Furusu, A., Koji, T., Tabata, Y., and Kohno, S. (2006). GENE TRANSFER USING NONVIRAL DELIVERY SYSTEMS. *Perit.Dial.Int.* 26 [6], 633-640.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J.Virol.* 72 [10], 8150-8157.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J. (1980). A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann* 71 [1], 155-156.
- Mizuguchi, H. and Hayakawa, T. (2002). The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J.Gene Med.* 4 [3], 240-247.
- Mochizuki, H., Schwartz, J. P., Tanaka, K., Brady, R. O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J.Virol.* 72 [11], 8873-8883.
- Monahan, J. J., Harris, S. E., Woo, S. L., Robberson, D. L., and O'Malley, B. W. (1976). The synthesis and properties of the complete complementary DNA transcript of ovalbumin mRNA. *Biochemistry* 15 [1], 223-233.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., and Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat.Biotechnol.* 24 [6], 687-696.
- Morrow, C. D., Park, J., and Wakefield, J. K. (1994). Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am.J.Physiol* 266 [5 Pt 1], C1135-C1156.
- Mortimer, I., Tam, P., MacLachlan, I., Graham, R. W., Saravolac, E. G., and Joshi, P. B. (1999). Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther.* 6 [3], 403-411.
- Mossner, E., Boll, M., and Pfeleiderer, G. (1980). Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 361 [4], 543-549.
- Moutsatsos, I. K., Turgeman, G., Zhou, S., Kurkalli, B. G., Pelled, G., Tzur, L., Kelley, P., Stumm, N., Mi, S., Muller, R., Zilberman, Y., and Gazit, D. (2001). Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol.Ther.* 3 [4], 449-461.
- Mühlbock, O. (1955). Note on a new inbred mouse strain GR/A. *Eur.J.Cancer* 1, 123-124.
- Mullins, J. I. and Jensen, M. A. (2006). Evolutionary dynamics of HIV-1 and the control of AIDS. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 299, 171-192.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

- Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 7), 1161-1166.
- Murdoch, B., Pereira, D. S., Wu, X., Dick, J. E., and Ellis, J. (1997). A rapid screening procedure for the identification of high-titer retrovirus packaging clones. *Gene Ther.* 4 [7], 744-749.
- Nakahara, H., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1991). Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J.Orthop.Res.* 9 [4], 465-476.
- Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* 9 [5], 457-463.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. (1996a). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 [21], 11382-11388.
- Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996b). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 [5259], 263-267.
- Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C., and Smith, B. A. (1987). Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol.Cell Biol.* 7 [11], 4125-4129.
- Nermut, M. V. and Hockley, D. J. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 214 , 1-24.
- Nermut, M. V., Hockley, D. J., Jowett, J. B., Jones, I. M., Garreau, M., and Thomas, D. (1994). Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus. *Virology* 198 [1], 288-296.
- Neu, M., Fischer, D., and Kissel, T. (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J.Gene Med.* 7 [8], 992-1009.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1 [7], 841-845.
- Nilsson, A., Lunqvist, P., Love, A., Torfason, E., Gelderblom, H. R., and Högglund, S. (1992). Spatial visualization of progressive states of maturing lentivirus. *Vet.Microbiol.* 33 [1-4], 333-340.
- Noel, D., Djouad, F., and Jorgense, C. (2002). Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 3 [7], 1000-1004.
- Noth, U., Osyczka, A. M., Tuli, R., Hickok, N. J., Danielson, K. G., and Tuan, R. S. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J.Orthop.Res.* 20 [5], 1060-1069.
- Ohnishi, Y., Shioda, T., Nakayama, K., Iwata, S., Gotoh, B., Hamaguchi, M., and Nagai, Y. (1994). A furin-defective cell line is able to process correctly the gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 68 [6], 4075-4079.
- Oligino, T. J., Yao, Q., Ghivizzani, S. C., and Robbins, P. (2000). Vector systems for gene transfer to joints. *Clin.Orthop.Relat Res.* [379 Suppl], S17-S30.
- Orosz, A., Boros, I., and Venetianer, P. (1991). Analysis of the complex transcription termination region of the *Escherichia coli* *rrnB* gene. *Eur.J.Biochem.* 201 [3], 653-659.
- Otto, W. R. and Rao, J. (2004). Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 37 [1], 97-110.
- Owen, M. (1985). Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. Peck, W. A. (eds). *Bone and Mineral Research.* 1-25. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J.Cell Sci.Suppl* 10 , 63-76.
- Owen, M. and Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found.Symp.* 136 , 42-60.
- Paillart, J. C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. (1996). Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie* 78 [7], 639-653.
- Paillart, J. C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., and Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat.Rev.Microbiol.* 2 [6], 461-472.
- Palizban, A. A., Salehi, R., Nori, N., and Galehdari, H. (2007). In vivo transfection rat small intestine K-cell with pGIP/Ins plasmid by DOTAP liposome. *J.Drug Target* 15 [5], 351-357.
- Pan, D., Gunther, R., Duan, W., Wendell, S., Kaemmerer, W., Kafri, T., Verma, I. M., and Whitley, C. B. (2002). Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol.Ther.* 6 [1], 19-29.
- Panganiban, A. T. and Temin, H. M. (1984). The retrovirus *pol* gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus *int* locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 [24], 7885-7889.
- Parkin, N. T., Chamorro, M., and Varmus, H. E. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 *gag-pol* frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J.Virol.* 66 [8], 5147-5151.
- Peng, H. and Huard, J. (2004). Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl.Immunol.* 12 [3-4], 311-319.
- Peng, H., Usas, A., Hannallah, D., Olshanski, A., Cooper, G. M., and Huard, J. (2005). Noggin improves bone healing elicited by muscle stem cells expressing inducible BMP4. *Mol.Ther.* 12 [2], 239-246.
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A. H., Nantermet, P. V., Klein, C. A., and Swanstrom, R. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 *Gag* regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J.Virol.* 68 [12], 8017-8027.
- Phillips, J. E., Gersbach, C. A., and Garcia, A. J. (2007a). Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials* 28 [2], 211-229.
- Phillips, J. E., Gulberg, R. E., and Garcia, A. J. (2007b). Dermal Fibroblasts Genetically Modified to Express *Runx2/Cbfa1* as a Mineralizing Cell Source for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng.*
- Pieroni, L., Maione, D., and La Monica, N. (2001). In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum.Gene Ther.* 12 [8], 871-881.
- Pires, P., Simoes, S., Nir, S., Gaspar, R., Duzgunes, N., and Pedrosa de Lima, M. C. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1418 [1], 71-84.
- Pittenger, M., Vanguri, P., Simonetti, D., and Young, R. (2002). Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J.Musculoskelet.Neurol.Interact.* 2 [4], 309-320.
- Pittenger, M. F. (1998). 1996. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Osiris Therapeutics, Inc.* **08/700,753 [5,827,740]**. US Patent.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 [5411], 143-147.

- Plewig, G. and Auburger, G. (eds). Verfügung des Klinikumsvorstandes über den Vollzug der Rechtsvorschriften für den Bereich der Biologischen Sicherheit im Klinikum der Universität München. (2004).
- Pochampally, R. R., Horwitz, E. M., DiGirolamo, C. M., Stokes, D. S., and Prockop, D. J. (2005). Correction of a mineralization defect by overexpression of a wild-type cDNA for COL1A1 in marrow stromal cells (MSCs) from a patient with osteogenesis imperfecta: a strategy for rescuing mutations that produce dominant-negative protein defects. *Gene Ther.* 12 [14], 1119-1125.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77 [12], 7415-7419.
- Pouliot, F., Blais, A., and Labrie, C. (2003). Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 63 [2], 277-281.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 [2], 229-233.
- Preston, B. D., Poiesz, B. J., and Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242 [4882], 1168-1171.
- Prockop, D. J. (1998). What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol.* 16 [9], 519-528.
- Prockop, D. J., Gregory, C. A., and Spees, J. L. (2003). One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 Suppl 1 , 11917-11923.
- Prockop, D. J., Sekiya, I., and Colter, D. C. (2001). Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 3 [5], 393-396.
- Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S., and Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 [1], 183-188.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., and . (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313 [6000], 277-284.
- Reil, H., Kollmus, H., Weidle, U. H., and Hauser, H. (1993). A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J.Virol.* 67 [9], 5579-5584.
- Rein, A. (1994). Retroviral RNA packaging: a review. *Arch.Virol.Suppl* 9 , 513-522.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 [26], 15266-15271.
- Requejo, H. I. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev.Saude Publica* 40 [2], 331-345.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., and Verfaillie, C. M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98 [9], 2615-2625.
- Rietveld, L. E., Caldenhoven, E., and Stunnenberg, H. G. (2002). In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes. *EMBO J.* 21 [6], 1389-1397.
- Robey, W. G., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L. O., Gonda, M. A., Gallo, R. C., and Fischinger, P. J. (1985). Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* 228 [4699], 593-595.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12 [5], 2099-2108.
- Rogers, J. J., Young, H. E., Adkison, L. R., Lucas, P. A., and Black, A. C., Jr. (1995). Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am.Surg.* 61 [3], 231-236.
- Rohr, U. P., Wulf, M. A., Stahn, S., Steidl, U., Haas, R., and Kronenwett, R. (2002). Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *J.Virol.Methods* 106 [1], 81-88.
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G., Goh, W. C., Dayton, A. I., Lippke, J., and Haseltine, W. A. (1986). Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature* 319 [6054], 555-559.
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41 [3], 813-823.
- Rouas, R., Uch, R., Cleuter, Y., Jordier, F., Bagnis, C., Mannoni, P., Lewalle, P., Martiat, P., and Van den, Broeke A. (2002). Lentiviral-mediated gene delivery in human monocyte-derived dendritic cells: optimized design and procedures for highly efficient transduction compatible with clinical constraints. *Cancer Gene Ther.* 9 [9], 715-724.
- Rougeon, F. and Mach, B. (1976). Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73 [10], 3418-3422.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J.Exp.Med.* 13 , 397-411.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 [3], 1065-1070.
- Sabatini, F., Petecchia, L., Tavian, M., Jodon, de Villeroche, V., Rossi, G. A., and Brouty-Boye, D. (2005). Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 85 [8], 962-971.
- Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Kawamura, M., and Adachi, A. (1993). Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J.Virol.* 67 [3], 1663-1666.
- Sakuma, R., Kobayashi, N., Ae, K., and Kitamura, Y. (2003). Inhibitory and enhancing effects of insertion of central polypurine tract sequence on gene expression with vectors derived from human immunodeficiency virus type 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 302 [3], 489-495.
- Salucci, V., Scarito, A., Aurisicchio, L., Lamartina, S., Nicolaus, G., Giampaoli, S., Gonzalez-Paz, O., Toniatti, C., Bujard, H., Hillen, W., Ciliberto, G., and Palombo, F. (2002). Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther.* 9 [21], 1415-1421.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (eds). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* (2001). 3rd Edition . Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanburn, N. and Cornetta, K. (1999). Rapid titer determination using quantitative real-time PCR. *Gene Ther.* 6 [7], 1340-1345.
- Sanchez-Pescador, R., Power, M. D., Barr, P. J., Steimer, K. S., Stempien, M. M., Brown-Shimer, S. L., Gee, W. W., Renard, A., Randolph, A., Levy, J. A., and . (1985). Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* 227 [4686], 484-492.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., and Sanberg, P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp.Neurol.* 164 [2], 247-256.
- Sanders, D. A. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr.Opin.Biotechnol.* 13 [5], 437-442.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 [12], 5463-5467.
- Sastry, L., Johnson, T., Hobson, M. J., Smucker, B., and Cornetta, K. (2002). Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther.* 9 [17], 1155-1162.
- Sastry, L., Xu, Y., Johnson, T., Desai, K., Rissing, D., Marsh, J., and Cornetta, K. (2003). Certification assays for HIV-1-based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol.Ther.* 8 [5], 830-839.
- Satija, N. K., Gurudutta, G. U., Sharma, S., Afrin, F., Gupta, P., Verma, Y. K., Singh, V. K., and Tripathi, R. P. (2007). Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev.* 16 [1], 7-23.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H., and Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106 [2], 756-763.
- Schieker, M. and Mutschler, W. (2006). [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 109 [9], 715-732.
- Schieker, M., Pautke, C., Reitz, K., Hemraj, I., Neth, P., Mutschler, W., and Milz, S. (2004a). The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J.Anat.* 204 [2], 133-139.
- Schieker, M., Seitz, S., Gulkan, H., Nentwich, M., Horvath, G., Regauer, M., Milz, S., and Mutschler, W. (2004b). [Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model]. *Orthopade* 33 [12], 1354-1360.
- Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., Maldarelli, F., and Strebel, K. (1996). The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J.Virol.* 70 [2], 809-819.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat.Med.* 2 [3], 338-342.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M., and Pavlakis, G. N. (1990). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J.Virol.* 64 [11], 5448-5456.
- Schwartz, S., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1992). Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol.Cell Biol.* 12 [1], 207-219.
- Seitz, S., Em, K., Lamper, G., Docheva, D., Drosse, I., Milz, S., Mutschler, W., and Schieker, M. (2007). Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation. *Tissue Eng* 13 [5], 1059-1067.
- Sekiya, I., Colter, D. C., and Prockop, D. J. (2001). BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 284 [2], 411-418.
- Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J. G., and Prockop, D. J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20 [6], 530-541.
- Sellner, L. N., Coelen, R. J., and Mackenzie, J. S. (1992). Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* 20 [7], 1487-1490.
- Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C. M., Robey, P. G., and Wang, C. Y. (2002). Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat.Biotechnol.* 20 [6], 587-591.
- Sierra, M., Thomson, M. M., Posada, D., Perez, L., Aragonés, C., Gonzalez, Z., Perez, J., Casado, G., and Najera, R. (2007). Identification of 3 Phylogenetically Related HIV-1 BG Intersubtype Circulating Recombinant Forms in Cuba. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.* 45 [2], 151-160.
- Simmons, P. J. and Torok-Storb, B. (1991). CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78 [11], 2848-2853.
- Sipo, I., Hurtado, Pico A., Wang, X., Eberle, J., Petersen, I., Weger, S., Poller, W., and Fehner, H. (2006). An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J.Mol.Med.* 84 [3], 215-225.
- Skowronski, J., Parks, D., and Mariani, R. (1993). Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* 12 [2], 703-713.
- Smith, A. J., Srinivasakumar, N., Hammarskjold, M. L., and Rekosh, D. (1993). Requirements for incorporation of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 into virus-like particles. *J.Virol.* 67 [4], 2266-2275.
- Smith, H. O. and Wilcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J.Mol.Biol.* 51 [2], 379-391.
- Smith, J. R., Pochampally, R., Perry, A., Hsu, S. C., and Prockop, D. J. (2004). Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 22 [5], 823-831.
- Smogorzewska, E. M. and Weinberg, K. I. (2004). [Treatment progress of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)]. *Med.Wieku.Rozwoj.* 8 [1], 25-32.
- Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W. A. (1986). Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322 [6078], 470-474.
- Sorgi, F. L., Bhattacharya, S., and Huang, L. (1997). Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 4 [9], 961-968.
- Sourvinos, G., Tsatsanis, C., and Spandidos, D. A. (2000). Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol.(Praha)* 46 [6], 226-232.
- Southern, J. A., Young, D. F., Heaney, F., Baumgartner, W. K., and Randall, R. E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J.Gen.Virol.* 72 (Pt 7), 1551-1557.
- Steffy, K. and Wong-Staal, F. (1991). Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microbiol.Rev.* 55 [2], 193-205.
- Stegmann, T. and Legendre, J. Y. (1997). Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochim.Biophys.Acta* 1325 [1], 71-79.
- Stein, B. S. and Engleman, E. G. (1990). Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J.Biol.Chem.* 265 [5], 2640-2649.
- Stender, S., Murphy, M., O'Brien, T., Stengaard, C., Ulrich-Vinther, M., Soballe, K., and Barry, F. (2007). Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur.Cell Mater.* 13 , 93-99.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33 [6], 919-926.
- Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Lamonica, C. A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 9 [5], 1551-1560.
- Stiehler, M., Duch, M., Mygind, T., Li, H., Ulrich-Vinther, M., Modin, C., Baatrup, A., Lind, M., Pedersen, F. S., and Bunger, C. E. (2006). Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 585 , 31-48.

- Stoltzfus, C. M. and Madsen, J. M. (2006). Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr.HIV.Res.* 4 [1], 43-55.
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M. A. (1987). The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328 [6132], 728-730.
- Studený, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., Zompetta, C., Fidler, I. J., and Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62 [13], 3603-3608.
- Subbramanian, R. A. and Cohen, E. A. (1994). Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J.Virol.* 68 [11], 6831-6835.
- Sucupira, M. C., Caseiro, M. M., Alves, K., Tescarollo, G., Janini, L. M., Sabino, E. C., Castelo, A., Page-Shafer, K., and Diaz, R. S. (2007). High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient.Care STDS.* 21 [2], 116-128.
- Tafuro, S., Zentilin, L., Falaschi, A., and Giacca, M. (1996). Rapid retrovirus titration using competitive polymerase chain reaction. *Gene Ther.* 3 [8], 679-684.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kyo, S., Ohno, T., Taira, T., Ariga, H., Nakajima, K., Hatta, M., Kobayashi, M., Sano, H., Kohgo, T., and Shindoh, M. (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 63 [23], 8338-8344.
- TAKEUCHI, S., HIRAYAMA, K., UEDA, K., Sakai, H., and YONEHARA, H. (1958). Blasticidin S, a new antibiotic. *J.Antibiot.(Tokyo)* 11 [1], 1-5.
- Tanese, N. and Goff, S. P. (1988). Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 [6], 1777-1781.
- Tarrago-Litvak, L., Andreola, M. L., Nevinsky, G. A., Sarih-Cottin, L., and Litvak, S. (1994). The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention. *FASEB J.* 8 [8], 497-503.
- Tee, K. K., Li, X. J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.* 43 [5], 523-529.
- Temin, H. M. and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226 [5252], 1211-1213.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414 [6859], 112-117.
- Teschemacher, A. G., Wang, S., Lonergan, T., Duale, H., Waki, H., Paton, J. F., and Kasparov, S. (2005). Targeting specific neuronal populations using adeno- and lentiviral vectors: applications for imaging and studies of cell function. *Exp.Physiol* 90 [1], 61-69.
- Tiede, S., Kloepper, J. E., Bodo, E., Tiwari, S., Kruse, C., and Paus, R. (2007). Hair follicle stem cells: Walking the maze. *Eur.J.Cell Biol.* 86 [7], 355-376.
- Tischer, T., Schieker, M., Stengele, M., Pautke, C., Neth, P., Jochum, M., Mutschler, W., and Milz, S. (2004). [3D-Culturing of human osteoblastic cells with vessel like nutrient supply]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 142 [3], 344-349.
- Tocci, A. and Forte, L. (2003). Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol.J.* 4 [2], 92-96.
- Tolar, J., Nauta, A. J., Osborn, M. J., Panoskaltzis, Mortari A., McElmurry, R. T., Bell, S., Xia, L., Zhou, N., Riddle, M., Schroeder, T. M., Westendorf, J. J., Mclvor, R. S., Hogendoorn, P. C., Suzhai, K., Oseth, L., Hirsch, B., Yant, S. R., Kay, M. A., Peister, A., Prockop, D. J., Fibbe, W. E., and Blazar, B. R. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25 [2], 371-379.
- Totsugawa, T., Kobayashi, N., Okitsu, T., Noguchi, H., Watanabe, T., Matsumura, T., Maruyama, M., Fujiwara, T., Sakaguchi, M., and Tanaka, N. (2002). Lentiviral transfer of the LacZ gene into human endothelial cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 11 [5], 481-488.
- Trono, D. (1998). When accessories turn out to be essential. *Nat.Med.* 4 [12], 1368-1369.
- Trono, D. (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.* 7 [1], 20-23.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 [14], 7963-7968.
- Van Damme, A., Thorrez, L., Ma, L., Vandenburgh, H., Eyckmans, J., Dell'Accio, F., De Bari, C., Luyten, F., Lillcrap, D., Collen, D., VandenDriessche, T., and Chuah, M. K. (2006). Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells* 24 [4], 896-907.
- van der Hoek, L., Pollakis, G., Lukashov, V. V., Jebbink, M. F., Jeeninga, R. E., Bakker, M., Dukers, N., Jurriaans, S., Paxton, W. A., Back, N. K., and Berkhout, B. (2007). Characterization of an HIV-1 group M variant that is distinct from the known subtypes. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 23 [3], 466-470.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E., and Debyser, Z. (2003). Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J.Virol.* 77 [8], 4685-4694.
- Venkatesh, L. K., Mohammed, S., and Chinnadurai, G. (1990). Functional domains of the HIV-1 rev gene required for trans-regulation and subcellular localization. *Virology* 176 [1], 39-47.
- Veronese, F. D., DeVico, A. L., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Gallo, R. C., and Sarngadharan, M. G. (1985). Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229 [4720], 1402-1405.
- Vidal, N., Niyongabo, T., Nduwimana, J., Butel, C., Ndayiragije, A., Wakana, J., Nduwimana, M., Delaporte, E., and Peeters, M. (2007). HIV type 1 diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Burundi. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 23 [1], 175-180.
- Vigna, E., Amendola, M., Benedicenti, F., Simmons, A. D., Follenzi, A., and Naldini, L. (2005). Efficient Tet-dependent expression of human factor IX in vivo by a new self-regulating lentiviral vector. *Mol.Ther.* 11 [5], 763-775.
- Vigna, E., Cavaliere, S., Ailles, L., Geuna, M., Loew, R., Bujard, H., and Naldini, L. (2002). Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol.Ther.* 5 [3], 252-261.
- Vink, C. and Plasterk, R. H. (1993). The human immunodeficiency virus integrase protein. *Trends Genet.* 9 [12], 433-438.
- Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W., and Buhning, H. J. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88 [2], 126-133.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76 [2], 615-619.
- Vollweiler, J. L., Zielske, S. P., Reese, J. S., and Gerson, S. L. (2003). Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. *Bone Marrow Transplant.* 32 [1], 1-7.
- von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C., and Trono, D. (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J.Virol.* 67 [8], 4945-4955.
- Wadhwa, M. S., Collard, W. T., Adami, R. C., McKenzie, D. L., and Rice, K. G. (1997). Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug.Chem.* 8 [1], 81-88.

- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40 [1], 9-17.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., and Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J.Bone Joint Surg.Am.* 76 [4], 579-592.
- Wan, M., Takagi, M., Loh, B. N., Xu, X. Z., and Imanaka, T. (1996). Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease. *Biochem.J.* 316 (Pt 2), 569-573.
- Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Jeang, K. T., and Huang, L. M. (2000). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* 33 [3], 131-140.
- Watanabe, S. and Temin, H. M. (1983). Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Mol.Cell Biol.* 3 [12], 2241-2249.
- Wattiaux, R., Jadot, M., Warnier-Pirotte, M. T., and Wattiaux-De Coninck, S. (1997). Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett.* 417 [2], 199-202.
- Wei, C. M., Gibson, M., Spear, P. G., and Scolnick, E. M. (1981). Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 39 [3], 935-944.
- Weiss, C. D., Levy, J. A., and White, J. M. (1990). Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J.Virol.* 64 [11], 5674-5677.
- Weiss, R. A. (2000). Getting to know HIV. *Trop.Med.Int.Health* 5 [7], A10-A15.
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., and Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br.J.Haematol.* 121 [2], 368-374.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 [3], 474-481.
- Wilke, M., Fortunati, E., van den Broek M., Hoogeveen, A. T., and Scholte, B. J. (1996). Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther.* 3 [12], 1133-1142.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 [4949 Pt 1], 1465-1468.
- Wong-Staal, F. (1991). The AIDS virus. What we know and what we can do about it. *West J.Med.* 155 [5], 481-487.
- Wrobel, I. and Collins, D. (1995). Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1235 [2], 296-304.
- Wu, C. and Lu, Y. (2007). Inclusion of high molecular weight dextran in calcium phosphate-mediated transfection significantly improves gene transfer efficiency. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* 53 [4], 67-74.
- Wu, G. Y. and Wu, C. H. (1988). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J.Biol.Chem.* 263 [29], 14621-14624.
- Xiao, Q., Claassen, G., Shi, J., Adachi, S., Sedivy, J., and Hann, S. R. (1998). Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev.* 12 [24], 3803-3808.
- Xu, Y. and Szoka, F. C., Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35 [18], 5616-5623.
- Yamaguchi, H., Yamamoto, C., and Tanaka, N. (1965). Inhibition of protein synthesis by blasticidin S. I. Studies with cell-free systems from bacterial and mammalian cells. *J.Biochem.(Tokyo)* 57 [5], 667-677.
- Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 [24], 9568-9572.
- Yang, N. S. and Sun, W. H. (1995). Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat.Med.* 1 [5], 481-483.
- Yang, O. O., Kalams, S. A., Rosenzweig, M., Trocha, A., Jones, N., Koziol, M., Walker, B. D., and Johnson, R. P. (1996). Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* 70 [9], 5799-5806.
- Yee, J. K., Miyanojara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J. C., and Friedmann, T. (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 [20], 9564-9568.
- Yee, J. K., Moores, J. C., Jolly, D. J., Wolff, J. A., Respass, J. G., and Friedmann, T. (1987). Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84 [15], 5197-5201.
- Yen, T. H. and Wright, N. A. (2006). The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev.* 2 [3], 203-212.
- Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A., and Black, A. C., Jr. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat.Rec.* 264 [1], 51-62.
- Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L., and Fink, D. J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J.Orthop.Res.* 16 [4], 406-413.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 [10], 3194-3198.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J.Virol.* 66 [8], 4966-4971.
- Yuan, X., Yu, X., Lee, T. H., and Essex, M. (1993). Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J.Virol.* 67 [11], 6387-6394.
- Zeng, J., Du, J., Zhao, Y., Palanisamy, N., and Wang, S. (2007). Baculoviral vector-mediated transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25 [4], 1055-1061.
- Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K. A., Cleghorn, G., West, M. J., and Wei, M. Q. (2004a). The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet.Vaccines.Ther.* 2 [1], 6.
- Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J. A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum.Gene Ther.* 10 [10], 1735-1737.
- Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S. R. (1996a). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 227 [3], 707-711.
- Zhang, W. H., Hockley, D. J., Nermut, M. V., Morikawa, Y., and Jones, I. M. (1996b). Gag-Gag interactions in the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 p24 capsid antigen are essential for Gag particle assembly. *J.Gen.Virol.* 77 (Pt 4), 743-751.
- Zhang, X. and Godbey, W. T. (2006). Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 58 [4], 515-534.
- Zhang, X. Y., La Russa, V. F., Bao, L., Kolls, J., Schwarzenberger, P., and Reiser, J. (2002). Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol.Ther.* 5 [5 Pt 1], 555-565.

- Zhang, X. Y., La Russa, V. F., and Reiser, J. (2004b). Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *J.Virol.* 78 [3], 1219-1229.
- Zhao, L. R., Duan, W. M., Reyes, M., Keene, C. D., Verfaillie, C. M., and Low, W. C. (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp.Neurol.* 174 [1], 11-20.
- Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W., and Resh, M. D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J.Virol.* 68 [4], 2556-2569.
- Zhou, X. and Huang, L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim.Biophys.Acta* 1189 [2], 195-203.
- Zielske, S. P. and Gerson, S. L. (2002). Lentiviral transduction of P140K MGMT into human CD34(+) hematopoietic progenitors at low multiplicity of infection confers significant resistance to BG/BCNU and allows selection in vitro. *Mol.Ther.* 5 [4], 381-387.
- Zipori, D. (2005). The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 23 [6], 719-726.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J.Virol.* 72 [12], 9873-9880.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat.Biotechnol.* 15 [9], 871-875.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* 13 [12], 4279-4295.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 [2], 211-228.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., and Maini, R. N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2 [6], 477-488.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Wolfgang Böcker, Leiter der Arbeitsgruppe Gentransfer und Herrn Dr. med. Matthias Schieker, Leiter der Experimentellen Chirurgie und Regenerativen Medizin bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit angeregt und gefördert haben, sowie für die fachliche Betreuung der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler, Direktor der Klinik, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit an der Chirurgischen Klinik anzufertigen, und der die Erstellung des Erstgutachtens übernommen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Koszinowski und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Haas, Max-von-Pettenkofer-Institut, Abteilung Virologie, danke ich sehr für die Möglichkeit, die S2 Einrichtungen im Max-von-Pettenkofer-Institut für die virologischen Arbeiten benutzen zu können.

Herrn Dipl.-Biol. Georg Malterer, Arbeitsgruppe Jürgen Haas, möchte ich danken für die vielen intensiven Diskussion und Tipps über lentiviralen Gentransfer.

Tierärztin Frau Inga Drosse und Frau Dr. rer. nat. Denitsa Docheva danke ich für viele anregende Diskussion und Vorschläge, während der Erstellung dieser Arbeit.

Dem gesamten Team der Experimed, insbesondere Herrn Dipl.-Biol. Tzvetan Popov, Frau Brigitte Hackl, Frau Martina Burggraf, Zahnärztin Frau Christina Ern und Frau Claudia Harbauer, möchte ich für die Unterstützung danken.

In beispielhafter Weise unterstützte mich meine Lebensgefährtin bei dieser Arbeit. Sie teilte stetig mein Engagement und gab mir damit auch in schwierigen Phasen des Projekts Mut und Kraft. Für ihre Geduld und Unterstützung bin ich besonders dankbar.

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt haben und ohne die ich nicht in die Lage gekommen wäre, diese Dissertation anfertigen zu können. Ihnen ist diese Arbeit daher gewidmet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher noch keiner Prüfungskommission vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Oliver Roßmann

Lebenslauf

Zur Person

Dipl.-Biol. Oliver Roßmann
Geb. am 24. April 1977 in München
ledig

Heideweg 27
85598 Baldham

Schulausbildung

1983 bis 1987 Grundschule Baldham
1987 bis 1988 Hauptschule Vaterstetten
1988 bis 1997 Gymnasium Vaterstetten

Abschluss

Abitur (Leistungskurse: Mathematik, Biologie)

Zivildienst

09/1997 bis 09/1998 Piusheim, Baiern

Hochschulstudium

10/1998 bis 03/2004 Biologie, Diplom
TU München

Thema der Diplomarbeit Entwicklung eines Expressionssystems zur rekombinanten
Synthese von Muschelkollagenen in *Saccharomyces cerevisiae*

Abschluss

Diplom mit Note 1,7
(Hauptfach: Genetik;
Nebenfächer: Biochemie, Angew. Botanik)

Promotion

09/2004 bis heute Promotion zum Doktor der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.)
am Klinikum der Universität München, Chirurgische Klinik und
Poliklinik – Innenstadt, Institut für experimentelle Chirurgie
und regenerative Medizin

Thema der Doktorarbeit Optimierung und Charakterisierung des lentiviralen
Gentransfers in humanen mesenchymalen Stammzellen

Publikationen

- 2007 Juli **Journal of Gene Medicine 9(7):585-95**
Rossmann O, Böcker W, Docheva D, Malterer G, Mutschler W, Schieker M.
Quantitative polymerase chain reaction as a reliable method to determine functional lentiviral titer after ex vivo gene transfer in human mesenchymal stem cells
- Eingereicht **Journal of Molecular Medicine**
Böcker W, Docheva D, Egea V, Rossmann O, Pappou E, Popov T, Mutschler W, Ries C, Schieker M
IKK-2 is required for TNF- α -induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells
- Eingereicht **Journal of Cellular and Molecular Medicine**
Böcker W, Yin Z, Drosse I, Docheva D, Rossmann O, Wierer M, Haasters F, Popov C, Mutschler W, Schieker M
A human mesenchymal stem cell line expressing *hTERT* without neoplastic transformation after lentiviral gene transfer

Poster Präsentationen

- 3./4. Nov 2006 **Erster Kongress der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung**
Rossmann O, Böcker W, Docheva D, Mutschler W, Schieker M.
Efficient Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells and Determination of Viral Titers
- Yin Z, Böcker W, Docheva D, Rossmann O, Sadoni N, Mutschler W, Schieker M.*
Establishment of a clonal immortalized human mesenchymal stem cell line expressing hTERT using lentiviral gene transfer
- Böcker W, Rossmann O, Egea-Alonso V, Ries C, Mutschler W, Schieker M.*
IKK-2 plays a critical role in human mesenchymal stem cell migration in vitro