

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Die Haut als „Bio-Fabrik“: Erythropoietinsekretion durch retroviral transduzierte und
anschließend selektierte Keratinozyten und Fibroblasten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Frank Scheidemann
aus
Georgsmarienhütte
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. C. Berking

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huss
Prof. Dr. Th. Sitter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. W. Pfützner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Gentherapie	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Methoden des Gentransfers	1
1.1.2.1 Physikalische Methoden	2
1.1.2.2 Nichtvirale Vektoren (Liposomen und Virosomen).....	2
1.1.2.3 Virale Vektoren.....	3
1.1.2.3.1 Adenoviren.....	3
1.1.2.3.2 Rekombinante Adeno-assoziierte Viren	4
1.1.2.3.3 Retroviren	5
1.1.3 Methoden der Genintegration	7
1.1.3.1 Retroviren	7
1.1.3.2 Φ C31-Integrase.....	7
1.1.3.3 Sleeping Beauty Transposon	8
1.1.4 Gentherapie in der Haut.....	9
1.1.4.1 Aufbau der Haut.....	9
1.1.4.1.1 Epidermis	9
1.1.4.1.2 Dermis.....	10
1.1.4.1.3 Subkutis	10
1.1.4.2 Gentherapeutische Nutzungsmöglichkeiten und Anwendungsgebiete	10
1.1.4.3 Steigerung der Effizienz kutaner Genexpression durch topische Selektion	11
1.2 Erythropoietin	12
1.2.1 Aufbau und Funktion im Körper	12
1.2.2 Anwendungsgebiete für EPO in der Medizin.....	13
1.3 Aufgabenstellung der Arbeit.....	14
1.3.1 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren und Zelltypen	14
1.3.2 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB	15

1.3.3	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression in genetisch modifizierter Haut	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Medien	16
2.1.1	Bakterien-Medien	16
2.1.2	Zellkultur-Medien.....	16
2.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	17
2.2.1	Chemikalien und Kits	17
2.2.2	Antikörper.....	19
2.2.3	Plasmide.....	19
2.2.4	Zellen	19
2.2.5	Geräte.....	20
2.2.6	Materialien	20
2.3	Molekularbiologische Methoden	20
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien.....	20
2.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien.....	21
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.3.4	DNA-Fällung	21
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	21
2.3.6	Restriktionsanalyse von DNA	21
2.3.7	5'-Dephosphorylierung von DNA	22
2.3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel	22
2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	22
2.3.10	Quantitative Real-Time-PCR.....	23
2.4	Klonierung der retroviralen Vektoren.....	24
2.4.1	pBMIG.....	24
2.4.2	pBGIM.....	26
2.4.3	pQGIM.....	28
2.4.4	pQEIM	29
2.5	Zellkultur Methoden	30
2.5.1	Isolierung von primären human Fibroblasten und Keratinozyten	30
2.5.2	Kultivierung von Zellen.....	30

2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.5.4	Transfektion von retroviralen Verpackungszellen.....	31
2.5.5	Gewinnung von Virusüberstand für die Transduktion	31
2.5.6	Transduktion von Keratinozyten und Fibroblasten	31
2.5.7	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen.....	32
2.5.8	Gewinnung von Dermis für die Herstellung von Hautkonstrukten	32
2.5.9	Herstellung von Hautkonstrukten mit deepidermalisierter Dermis	32
2.5.10	Gewinnung von Zellen aus Hautkonstrukten für die FACS-Analyse.....	32
2.5.11	Herstellung von Hautkonstrukten mit Kollagen-Gelen	33
2.6	Tierexperimentelle Arbeiten	34
2.6.1	Haltung der Mäuse.....	34
2.6.2	Transplantation von Hautkonstrukten.....	34
2.6.3	Herstellung und Anwendung der Kolchizin-Creme	35
2.6.4	Blutentnahme von den Mäusen.....	35
2.6.5	Gewinung von Plasma aus Mausblut für die EPO-Bestimmung	35
2.6.6	Transplantatentnahme für die Analyse	35
2.7	Analytische Methoden	36
2.7.1	FACS-Analyse von Zellen.....	36
2.7.2	Messung der EPO-Konzentration mittels ELISA.....	37
2.7.3	Bestimmung des Hämatokrit-Wertes von Mausblut.....	37
2.7.4	Anfertigung histologischer Schnitte für Immun- und H&E-Färbungen.	37
2.7.5	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	37
2.7.6	Antigendemaskierung bei entparaffinisierten Schnitten.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Generierung retroviraler Verpackungszellen.....	39
3.2	Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren und Zelltypen	40
3.2.1	Vergleich ohne Kolchizineselektion.....	40
3.2.1.1	FACS-Analyse	40
3.2.1.1.1	Vergleich der Transduktionseffizienz an unterschiedlichen Vektoren	43
3.2.1.1.2	Vergleich der Transduktionseffizienz von Keratinozyten und Fibroblasten	45
3.2.1.1.3	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des GFP	46
3.2.1.1.4	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des MDR	48

3.2.1.2	Real-Time PCR.....	52
3.2.2	Vergleich mit Kolchizineselektion	53
3.2.2.1	FACS-Analyse	53
3.2.2.1.1	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des GFP	55
3.3	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression und Kolchizineselektion genetisch modifizierter KC und FB	58
3.3.1	Untersuchungen in Monolayerkulturen	58
3.3.1.1	Bestimmung der EPO-Expression	58
3.3.1.1.1	Untersuchung ohne Kolchizineselektion	58
3.3.1.1.2	Untersuchung mit Kolchizineselektion	60
3.3.2	Untersuchungen in Dermis-Hautkonstrukten	61
3.3.2.1	Bestimmung der EPO-Expression mit und ohne Kolchizineselektion.	61
3.3.2.2	FACS-Analyse	62
3.3.2.3	Histologische Untersuchung	66
3.3.2.4	Immunhistochemische Untersuchung.....	71
3.3.3	Untersuchungen in Gel-Hautkonstrukten	73
3.3.3.1	Bestimmung der EPO-Expression	73
3.3.4	Einfluss der Differenzierung von KC auf die EPO-Sekretion	74
3.4	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression in genetisch modifizierter Haut 76	
3.4.1	FACS-Analyse	76
3.4.2	Bestimmung des Serum-EPO-Spiegels sowie des Hämatokrits	77
3.4.3	Histologische Untersuchung	81
4	Diskussion	83
4.1	Vergleich bicistronischer GFP/MDR Vektoren.....	83
4.1.1	Vergleich ohne Kolchizineselektion.....	83
4.1.2	Vergleich unter Kolchizin-Selektion	86
4.2	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB	87
4.2.1	EPO-Sekretion und Kolchizin-Selektion in Monolayerkulturen	87
4.2.2	EPO-Sekretion und der Kolchizin-Selektion in Hautkonstrukten	88
4.2.2.1	Dermis-Hautkonstrukte.....	89
4.2.2.2	Gel-Hautkonstrukte.....	91

4.2.3	Vergleich von KC und FB	91
4.2.3.1	Vergleich in Monolayerkulturen.....	92
4.2.3.2	Vergleich in Hautkonstrukten.....	92
4.3	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB	93
4.3.1	FACS-Analyse	93
4.3.2	Bestimmung des Hämatokrits sowie des Serum-EPO-Spiegels.....	94
4.4	Die Haut als „Bio-Fabrik“: Ausblick.....	95
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	101
	Danksagung	110
	Lebenslauf.....	111

Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziierte Viren
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Erworbenes Immunschwäche-Syndrom)
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
attB	bacterial attachment site
attP	phage attachment site
bp	Basenpaare
BPE	Bovine Pituitary Extract (Bovines Hypophysenextrakt)
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CMV	Cytomegalovirus
d	days (Tage)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EB	Epidermolysis Bullosa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FB	Fibroblasten
FBS	Fetale Bovine Serum (Fötale Kälberserum)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescence Protein
h	hours (Stunden)

H&E	Hämatoxylin und Eosin
HAC	Human Artificial Chromosome
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HCK	Hemopoietic Cell Kinase
HdAd	Helper-dependent Adenoviral Vector (Helfer abhängige Adenovirusvektoren)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Humanes Immunschwäche-Virus)
HK	Hautkonstrukte
HKT	Hämatokrit
HPKC	Highly Proliferating Keratinocytes
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule (Intrazelluläres Adhäsionsmolekül)
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ITR	Inverted Terminal Repeat
kb	Kilobasenpaare
KC	Keratinocyten
LB	Luria Broth
LTR	Long Terminal Repeat
MAb	Monoclonal Antibody
MCS	Multiple Cloning Site
MDR	Multi-Drug Resistance
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MoMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NEAA	Non Essential Amino Acids
OD	Optische Dichte
PAH	Phenylalanin Hydroxylase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
r	rekombinant
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
SSC	Sideward Scatter
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer

1 Einleitung

1.1 Gentherapie

1.1.1 Allgemeines

Bei der Gentherapie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem durch das Einbringen von Genen oder Genfragmenten in Zellen des Körpers eine Krankheit behandelt oder ihr vorgebeugt wird. Dabei kann es sich sowohl um vererbte (z.B. Hämophilie (Ponder 2006) oder Phenylketonurie (Ding et al. 2004; Ferrari et al. 2006)) und erworbene (z.B. Krankheiten wie AIDS (Dropulic et al. 2006) oder Verletzungen (Eming et al. 2007)) oder um Krankheiten mit erblicher Vorbelastung (z. B. Tumorleiden (Breckpot et al. 2007), Diabetes mellitus (Samson et al. 2006)) handeln. Die Behandlung erfolgt dabei in der Regel durch die Expression eines spezifischen Proteins in genetisch modifizierten Zellen, das entweder direkte therapeutische Wirkung im Körper entfaltet oder die Expression bestimmter körpereigener Gene entsprechend den physiologischen Erfordernissen reguliert. Die Gentherapieverfahren lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen Therapie zur Behandlung systemischer Krankheiten wie metastasierender Tumoren oder Stoffwechselstörungen. Zum anderen die Behandlung lokalisierter Krankheiten, die auf einzelne Organe oder Organteile beschränkt sind (z.B. kutane Genodermatosen wie die Epidermolysis Bullosa (Ferrari et al. 2005)).

1.1.2 Methoden des Gentransfers

Die erste Hürde bei der Gentherapie besteht in dem Einschleusen der gewünschten genetischen Information in die Zielzellen. Da sowohl die transferierte DNA als auch die Zellmembran negative Ladungen tragen und sich somit abstoßen, ist ein direkter Transfer nicht sehr effizient. Es stehen jedoch verschiedene Methoden zu Verfügung, dieses Problem zu lösen. So kann die DNA in „Genfähren“ (Vektoren) verpackt werden, die die Einschleusung in die Zielzelle erleichtern.

Man unterscheidet beim Gentransfer zwischen *In-vivo*- oder *Ex-vivo*-Gentransfer. Beim *In-vivo*-Transfer erfolgt der Gentransport direkt am Menschen. Bei der *Ex-vivo*-Variante

werden die Zielzellen zunächst dem Körper entnommen, im Labor kultiviert und nach dem erfolgten DNA-Transfer wieder reimplantiert.

1.1.2.1 Physikalische Methoden

Als Alternativen zu biologischen oder chemischen Vektoren (Kapitel **1.1.2.2** und **1.1.2.3**) gibt es einige physikalische Methoden, um unverpackte DNA in die Zielzellen zu überführen. Die einfachste Möglichkeit ist die direkte Injektion großer Mengen Plasmid-DNA. Dies kann entweder systemisch durch intravenöse Injektion oder lokal durch Injektion in das gewünschte Gewebe (z.B. Muskel, Leber, Haut) erfolgen. Die Effizienz ist jedoch aufgrund der geringen Aufnahmefähigkeit unverpackter DNA und des schnellen DNA-Abbaus durch endogene Nukleasen sehr gering, so dass diese Methode kaum zum Einsatz kommt (Niidome et al. 2002; Wells 2004).

Eine weitere Methode ist die Kombination von DNA-Injektion und Elektroporation, bei der mit Hilfe eines elektrischen Feldes die Zellmembran permeabilisiert wird, so dass die Aufnahmefähigkeit für die injizierte DNA deutlich erhöht ist. Die Anwendung ist jedoch nur für direkt zugängliche Gewebe, wie z.B. die Haut, möglich (Niidome et al. 2002; Wells 2004).

Weitere Möglichkeiten sind die Zellpermeabilisierung mittels Ultraschall oder Infrarotlaser, der ballistische Transfer von DNA-beschichteten Goldpartikeln mittels „Gene-Gun“ sowie der Transfer DNA-beschichteter magnetischer Nanopartikel mittels Magnetfeld (Niidome et al. 2002; Wells 2004; Dobson 2006).

1.1.2.2 Nichtvirale Vektoren (Liposomen und Virosomen)

Liposomen sind Partikel, deren Hülle aus einer Lipiddoppelschicht, ähnlich der von Zellmembranen, besteht. Sie bilden sich *in-vitro* spontan aus geeigneten Lipidmischungen und eignen sich als Transportvehikel für Nukleinsäuren oder Proteine. Für den Transfer von DNA in Zellen wird dem Lipidgemisch mindestens ein positiv geladenes Lipid zur Abschirmung der negativen DNA-Ladung beigefügt. Die Aufnahme in die Zielzelle erfolgt durch Endozytose. Der Vorteil von Liposomen ist ihre einfache, kostengünstige Herstellung, geringe Toxizität und die nicht vorhandene Antigenität. Nachteil ist die sehr geringe Effektivität beim DNA-Transport, besonders bei der *In-vivo*-Anwendung, aber bei vielen Zelltypen auch *in-vitro* (Felnerova et al. 2004).

Bei den Virosomen handelt es sich um modifizierte Liposomen, denen Proteine von Virushüllen, wie z.B. das Hämagglutinin vom Influenzavirus, eingebaut sind. Dadurch wird die Effizienz des DNA-Transports gegenüber Liposomen deutlich erhöht (Felnerova et al. 2004; Daemen et al. 2005).

1.1.2.3 Virale Vektoren

Bei den viralen Vektoren handelt es sich um modifizierte Viren. Da bestimmte Viren in humane Zellen mit hoher Effizienz eindringen können, finden sie in der Gentherapie breite Verwendung. Sie werden für den Einsatz in der Gentherapie modifiziert, indem ein Großteil der viralen Gene durch die entsprechenden Therapiene ersetzt wird. Sie enthalten dann keine pathogenen Bestandteile mehr und sind außerdem replikationsinkompetent, so dass die Viren nur noch in speziellen Verpackungszelllinien vermehrt werden können. Das Eindringen der replikationsinkompetenten viralen Vektoren in eine Zielzelle wird nicht mehr Infektion, sondern Transduktion genannt.

Die Eignung eines Virus für den Einsatz in der Gentherapie hängt von mehreren Faktoren ab: Die Möglichkeit zur Erzielung ausreichend hoher Virustiter für eine effiziente Transduktion der Zielzellen, die Aufnahmekapazität des Virus für die Therapiene, eine geringe Antigenität, die Fähigkeit zur Infektion teilungsunfähiger Zellen sowie zur Langzeitexpression der transferierten Gene im Menschen. Die vier gängigsten Virusgruppen in der Gentherapie sind die Adenoviren, die Adenoassoziierten Viren (AAV) sowie die Onkoretroviren und Lentiviren, welche beide zur Gruppe der Retroviren gehören. Ihre Eigenschaften sowie Vor- und Nachteile werden in den folgenden Kapiteln erläutert (Ghazizadeh et al. 2000; Gagnoux-Palacios et al. 2005; Young et al. 2006).

1.1.2.3.1 Adenoviren

Adenoviren sind in der Natur weit verbreitete Krankheitserreger, die bei Menschen Erkrankungen der Atemwege auslösen können. Für den Einsatz in der Gentherapie von Nachteil ist, dass sie eine Immunreaktion hervorrufen. Auch die mögliche Rekombination adenoviraler Vektoren mit Wildtypadenoviren zu replikationsfähigen transgenen Viren stellt ein Risiko dar. Mit adenoviralen Vektoren lassen sich jedoch

hohe Titer (10^{11} - 10^{13} /ml) erreichen, was sie zu den effizientesten Vektoren bei der Einschleusung der DNA in die Zielzellen (Transduktion) macht. Daher sind sie bei Gentherapieanwendungen weit verbreitet. Für die Vektorkonstruktion werden gängigerweise die humanen Serotypen Ad5 und Ad2 verwendet. Durch Entfernen von viralen Genen wird eine Transgenkapazität von 8-9 kb erreicht, was für die meisten Anwendungen ausreichend ist. Außerdem sind sie in der Lage, sowohl sich teilende als auch teilungsunfähige Zellen zu transduzieren. Da die DNA nicht ins Genom integriert wird, ist eine ausreichende Genexpression nur für relativ kurze Zeit möglich, was den Einsatz auf vorübergehende Therapien (z.B. Behandlung von Malignomen oder chronischen Wunden) beschränkt (Jozkowicz et al. 2005; Ghosh et al. 2006).

1.1.2.3.2 Rekombinante Adeno-assoziierte Viren

Die rekombinanten Adeno-assoziierten viralen Vektoren (rAAV) haben einige Eigenschaften, die sie für die Gentherapie interessant machen. Da AAV nicht pathogen sind und viele Menschen mit ihnen schon infiziert sind, stellen sie eine risikoarme Methode für den Gentransfer in die Zelle dar. Sie gehören zu der Gruppe der Dependoviren, das heißt, sie sind abhängig von Helferviren, welche die Zielzelle ebenfalls infiziert haben. Zu den Helferviren gehören die Adeno-, Herpes- oder Vacciniaviren. Ohne deren Hilfe können AAV sich nicht replizieren, sie verweilen dann für die gesamte Lebensdauer der Zelle in ihrem Genom. Durch nachträgliche Infektion mit Helferviren können sie jedoch wieder aktiviert werden (Flotte 2004; Goncalves 2005).

Das Fehlen der Pathogenität ist der größte Vorteil der AAV. Aufgrund des sehr kleinen Genoms ist die Kapazität für Transgene jedoch auf 4-5 kb beschränkt. Außerdem transduzieren sie nur sich teilende Zellen. Zudem besteht das AAV-Genom aus Einzelstrang-DNA, die in freier Form von den transduzierten Zellen schnell abgebaut wird. Die Expressionsrate der Transgene ist daher von dem Ausmaß der Umwandlung in Doppelstrang-DNA abhängig, welche durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Eine Integration der AAV-DNA in das Zellgenom findet nur relativ selten statt, da rAAV nicht die für die Integration notwendigen Enzyme besitzen und somit auf zelleigene Enzyme angewiesen sind. Ein Großteil der DNA verbleibt daher episomal in der Zelle. Durch Bildung stabiler, zirkulärer DNA-Formen ist dennoch eine langfristige Genexpression durch rAAV möglich (Flotte 2004; Goncalves 2005).

Neueste Studienergebnisse zeigen jedoch, dass die AAV ein onkogenes Risikopotential besitzen (Donsante et al. 2007).

1.1.2.3.3 Retroviren

Der Name Retrovirus leitet sich von der Fähigkeit der Viren ab, ihr RNA-Genom mit Hilfe der reversen Transkriptase in die entsprechende DNA (dann cDNA genannt) zurück zu überführen („retro“ = rückwärts). In **Tabelle 1.1** ist eine Übersicht der Retroviren und ihre Einteilung in verschiedene Untergruppen aufgeführt. Von den sieben Virustypen gehören fünf zur Gruppe der Onkoretroviren, da sie potentiell krebsauslösend (onkogen) sind. Vier davon werden aufgrund ihres vergleichsweise einfachen Aufbaus als „einfache Retroviren“ bezeichnet. Die restlichen Retrovirustypen gehören zu den komplexen Retroviren, welche noch einige zusätzliche Regulatorproteine besitzen. In der Gentherapie kommen das am häufigsten angewandte „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMLV) von den einfachen sowie die Lentiviren (HIV und SIV) von den komplexen Viren zum Einsatz (Coffin et al. 1997; Brenner et al. 2003).

In **Abbildung 1.1** ist der typische Aufbau eines einfachen Retrovirusgenoms gezeigt. Es wird an den Enden von den beiden LTR (Long Terminal Repeats) flankiert, dazwischen befinden sich, in 5'-3'-Richtung, die Primerbindungsstelle PBS (für die reverse Transkription), das Verpackungssignal Ψ , das gag-, pol- und env-Gen sowie ein Polypurintrakt (PPT). Das gag-Protein wird proteolytisch in die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Proteine gespalten, welche für die interne Virusstruktur verantwortlich sind. Das pol-Gen codiert für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase. Das env-Gen codiert für die Proteine der Virushülle. Die komplexen Retroviren enthalten noch eine Reihe weiterer Gene für Regulatorproteine. In retroviralen Vektoren sind das gag-, pol- und env-Gen entfernt und durch entsprechende in die Zielzellen zu transferierende Gene (Transgene) ersetzt worden. Der Retrovektor weist hierfür eine Kapazität von 6-8 kb auf. Die erreichbaren Virustiter liegen jedoch in der Regel deutlich unter denen der Adenoviren. Da das retrovirale Vektorgenom als RNA-



Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des MoMLV-Genoms

Molekül vorliegt, können die Vektorgene direkt nach der Transduktion der Zielzelle exprimiert werden. Das ermöglicht bereits nach kurzer Zeit eine hohe Therapiengenexpression. Mit Hilfe der viruseigenen Integrase kann nach Umwandlung der RNA in DNA der Einbau in das Wirtsgenom erfolgen, was auch langfristig eine stabile Expression ermöglicht. Die einfachen Onkoretroviren können sich im Gegensatz zu den Lentiviren nur in teilungsfähige Zellen integrieren, da ihnen die Enzyme zur Überwindung der Kernmembran fehlen. Lentivirale Vektoren finden allerdings erst seit relativ kurzer Zeit Anwendung in der Gentherapie (Coffin et al. 1997; Brenner et al. 2003).

Virusuntergruppen		Virustyp	Virus
Onkoretroviren	Einfache Retroviren	Avian-Leukosis-Sarcoma Virus	Rous Sarcoma Virus
		Mammalian B-Type Virus	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)
		Mammalian C-Type Virus	Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)
		Mammalian D-Type Virus	Mason-Pfizer Monkey Virus
	Komplexe Retroviren	BLV–HTLV	Bovine Leukemia Virus; Human T-Cell Leukaemia Virus
Retroviren ohne onkogene Potenz		Spumaviren	Foamy Virus
		Lentiviren	HIV; SIV

Tabelle 1.1: Klassifizierung der Retroviren

1.1.3 Methoden der Genintegration

Um eine langfristige Genexpression *in-vivo* zu erzielen, ist es notwendig, dass die Vektoren in einer stabilen Form dauerhaft im Genom der Zielzelle integriert werden. Hierfür gibt es verschiedene Methoden, deren Vor- und Nachteile im Folgenden dargestellt werden.

1.1.3.1 *Retroviren*

Die Retroviren, welche als Vektorsystem bereits in Kapitel 1.1.2.3.3 vorgestellt wurden, sind dank der viruseigenen Integrase, welche das Vektorgenom in Chromosomen der transduzierten Zelle einbaut, ein effizientes Integrationssystem. Die Chromosomenintegration hat jedoch auch Nachteile, da die Integration nicht sehr spezifisch ist und daher an sehr vielen Stellen im Genom stattfinden kann. Da die bevorzugten Integrationsstellen beim HIV im Bereich aktiver Gene und beim MoMLV in den Promotorregionen vor den Genen liegen (Bushman 2002; Schroder et al. 2002; Wu et al. 2003; Cereseto et al. 2004; Mitchell et al. 2004; Wu et al. 2004), kann es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie z.B. der Aktivierung bislang inaktiver Onkogene kommen. Dies wurde bei Tierversuchen an Mäusen (Li et al. 2002) sowie im Verlauf einer Gentherapiestudie auch am Menschen (Hacein-Bey-Abina et al. 2003a; Hacein-Bey-Abina et al. 2003b; Marshall 2003) beobachtet. Dort kam es 30 Monate nach erfolgreicher Gentherapie eines schweren Immundefekt-Syndroms (X-SCID) bei drei Patienten zu einer Leukämie, als deren mögliche Ursache eine Insertion des Therapiogens in der Nähe des Protoonkogens LMO2 angesehen wird.

1.1.3.2 *ΦC31-Integrase*

Eine Alternative zu den Retroviren ist die Verwendung der Integrase des Bakteriophagen ΦC31, welche die Rekombination von DNA zwischen einer „bacterial attachment site“ (attB) und der „phage attachment site“ (attP) katalysiert und so das Phagengenom in ein Bakteriengenom integriert. Da das menschliche Genom Sequenzen besitzt, die eine für die Erkennung durch die Integrase ausreichende Homologie mit den attP-Sequenzen besitzen, funktioniert die Integration auch in menschlichen Zellen, wenn die Transport-DNA entsprechende attB-Sequenzen enthält (Groth et al. 2000). Zur Anwendung in der Gentherapie wird ein modifizierter Vektor, der neben den Zielgenen auch die attB-Sequenz besitzt, zusammen mit einem Vektor, der die ΦC31-

Intergrase kodiert, in die Zielzelle eingebracht. Da bei der Integration sowohl die attB- als auch die attP-Sequenz verloren geht, besteht nicht die Gefahr, dass der integrierte Vektor wieder enzymatisch entfernt wird. Der Vorteil der Φ C31-Intergrase gegenüber den Retroviren liegt in der Beschränkung der Integration auf wenige, spezifische Stellen im Genom, was das Risiko unerwünschter Insertionsmutationen verringert. Es gibt im humanen Genom ungefähr 100 entsprechende Integrationsstellen, wovon an einer besonders häufig eine Integration erfolgt. Diese „human pseudo attP-site“ (human ψ A), liegt im Chromosom 8 an einer ungefährlichen Position (Thyagarajan et al. 2001). Inzwischen gibt es modifizierte Varianten der Integrase, bei denen die Spezifität für human ψ A gegenüber der Wildtyp-Variante deutlich gesteigert und das Risiko für einen Einsatz beim Menschen noch weiter verringert wurde (Sclimenti et al. 2001). Ein weiterer Vorteil ist Fähigkeit der Integrase, auch sehr große DNA-Moleküle zu integrieren. Da das Phagengenom, das natürliche Substrat der Integrase ca. 50 kb groß ist, bietet die Methode für viele Anwendungen ausreichend Kapazität. Außerdem besteht keine Gefahr einer Immunreaktion, da nur unverpackte DNA zum Einsatz kommt. Ein Nachteil ist, dass eine zusätzliche, effiziente Methode zum DNA-Transfer in die Zelle benötigt wird, während retrovirale Vektoren sowohl den DNA-Transfer als auch die DNA-Integration ermöglichen. Die Praxistauglichkeit der Φ C31-Intergrase für die Gentherapie wurde an Tierversuchsmodellen mit humanen Zellen bereits erfolgreich getestet (z.B. zur Therapie von junctionaler und rezessiver dystrophischer Epidermolysis Bullosa mit LAMB3 bzw. COL7A1 als Therapiegen in *ex-vivo* modifizierten KC (Ortiz-Urda et al. 2002; Ortiz-Urda et al. 2003c) oder zur therapeutischen Produktion des Blutgerinnungsfaktors IX in *in-vivo* modifizierten Leberzellen (Olivares et al. 2002)).

1.1.3.3 *Sleeping Beauty Transposon*

Bei Transposons handelt es sich um DNA-Bestandteile, welche im Genom von einer Position zu einer andern wechseln können. Da dies nur innerhalb der Ursprungszelle geschehen kann, sind Transposons im Gegensatz zu Viren nicht infektiös und bieten somit eine risikoärmere Alternative für die Gentherapie. Bei dem Sleeping Beauty Transposon handelt es sich um ein Transposon, welches DNA ausschneidet und ohne Modifikation an anderer Stelle wieder einsetzt. Eine andere Art sind die Retro-

Transposons, welche eine RNA-Kopie eines DNA-Abschnitts anfertigen und ähnlich den Retroviren mittels reverser Transkriptase wieder eine DNA-Kopie erstellen, die an der Zielstelle eingefügt wird (Geurts et al. 2003; Izsvak et al. 2004).

Das Sleeping Beauty Transposon besteht nur aus dem Gen für das Transposase-Protein, welches den Vorgang katalysiert, und den endständigen „inverted repeats“ (IRs). Für den Einsatz in der Gentherapie wird in einem zweiten Plasmid das Transposase Gen durch das Ziel-Gen ersetzt. Da die Integrationseffizienz logarithmisch mit der DNA-Länge abnimmt ist die Transferkapazität jedoch auf ca. 5-6 kb begrenzt, was den Einsatz für Therapien mit großen Transfer-Genen ausschließt. Außerdem erfolgt die Integration völlig unspezifisch, so dass hier kein Vorteil gegenüber retroviralen Vektoren besteht. Wie schon bei der Φ C31-Intergrase wird wiederum zusätzlich eine Methode für den DNA-Transfer in die Zelle benötigt (Geurts et al. 2003; Izsvak et al. 2004).

Die prinzipielle Eignung für die Gentherapie wurde bereits mit *ex-vivo* modifizierten Keratinozyten (KC), die einen Defekt für das LAMB3-Gen aufweisen (verantwortlich für die junktionale EB) (Ortiz-Urda et al. 2003b) sowie an *in-vivo* modifizierten Leberzellen zur Produktion des Blutgerinnungsfaktors IX (Yant et al. 2000) gezeigt.

1.1.4 Gentherapie in der Haut

Als Oberflächenorgan stellt die Haut eine vielversprechende Zielstruktur für gentherapeutische Anwendungen dar.

1.1.4.1 Aufbau der Haut

1.1.4.1.1 Epidermis

Die Epidermis (Oberhaut) stellt die äußerste Schicht der Haut dar. Es handelt sich dabei um ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches zu 90 % aus KC sowie aus Melanozyten, Langerhans- und Merkelzellen besteht. Sie ist in vier horizontale Schichten aufgeteilt. Bei der untersten Schicht handelt es sich um die Basalzellschicht (Stratum basale), welche die Stammzellen sowie sich transient teilende Zellen beinhaltet (Leigh et al. 1994; Fritsch 1998).

Die Stammzellen bilden die Grundlage für die Erneuerung der Epidermis. Sie können sich unbeschränkt, aber nur langsam teilen. Aus ihnen entstehen Zellen, die sich

schnell, aber nur begrenzt teilen und mit der Zeit in die darüberliegende Hautschicht, die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) wandern. Hier beginnen die KC sich zu differenzieren, indem sie zahlreiche neue Zellproteine produzieren und die Fähigkeit zur Zellteilung verlieren. Ein wesentlicher Teil dieser Proteine dient der Ausbildung der abschließenden Hornschicht. Dieser Prozess schreitet nach Einwanderung in die Körnerschicht (Stratum granulosum) weiter voran und endet in der obersten Zellschicht mit der Ausbildung der Hornschicht (Stratum corneum). Dabei produzieren die KC eine zementartige Lipidsubstanz, die sie zusammen mit dem kompletten Zellinneren nach außen abgeben. Die Hornschicht wird ständig in einem Zeitraum von 3-4 Wochen erneuert (Leigh et al. 1994; Fritsch 1998).

1.1.4.1.2 Dermis

Die Epidermis ist über die Basalmembran, welche aus verschiedenen Verankerungsproteinen wie z.B. Integrinen, Lamininen und Kollagenen besteht, mit der Dermis verknüpft (McMillan et al. 2003). Dabei wird die Kontaktfläche der Dermis zur Epidermis und damit auch der Zusammenhalt beider Schichten durch zahlreiche Ausstülpungen in die Epidermis, den dermalen Papillen, vergrößert. Hauptbestandteile der Dermis sind Proteoglykane und Glykosaminoglykane sowie die Proteine Kollagen und Elastin. Darin eingebettet sind die Fibroblasten (FB), der Hauptzelltyp der Dermis, welche die Bestandteile der Dermis produzieren. Des Weiteren finden sich Blut- und Lymphgefäße, Haarfollikel, Mastzellen, Nerven, Schweiß- und Talgdrüsen in der Dermis (Fritsch 1998).

1.1.4.1.3 Subkutis

Unter der Dermis befindet sich die Subkutis, welche hauptsächlich aus Fettgewebe besteht. Sie dient der Wärmeisolierung, als mechanisches Schutzpolster sowie zur Energiespeicherung.

1.1.4.2 *Gentherapeutische Nutzungsmöglichkeiten und Anwendungsgebiete*

Da die Haut als Oberflächenorgan direkt zugänglich ist, ermöglicht sie mit geringem Aufwand den Einsatz verschiedener Methoden des *In-vivo*- als auch des *Ex-vivo*-Gentransfers (siehe Kapitel **1.1.2**). Gentherapeutische Anwendungen sind

beispielsweise die Behandlung lokaler, kutaner Erkrankungen (z.B blasenbildende Genodermatosen, siehe **Tabelle 1.2**).

kutane Erkrankung	Therapiegen	Referenz
junktionale EB	Laminin 5 β 3 (LAMB3)	(Dellambra et al. 1998; Robbins et al. 2001; Ortiz-Urda et al. 2003b; Ortiz-Urda et al. 2003c)
	Integrin β 4 (ITGB4)	(Dellambra et al. 2001)
	Kollagen 17 (COL17A1)	(Dallinger et al. 2003)
dystrophische EB	Kollagen 7 (COL7A1)	(Chen et al. 2002; Mecklenbeck et al. 2002; Ortiz-Urda et al. 2002; Ortiz-Urda et al. 2003a; Gache et al. 2004; Woodley et al. 2004)

Tabelle 1.2: Beispiele für Gentherapeutische Anwendungen zur Behandlung kutaner Erkrankungen

Aber auch die Behandlung systemischer Erkrankungen durch genetische Modifikation der Haut ist denkbar. So wurde erstmals am Beispiel von Apolipoprotein E gezeigt (Fenjves et al. 1989), dass von KC sezernierte Proteine in der Lage sind, die Basalmembran zu durchdringen und über die Blutgefäße der Dermis in den Blutkreislauf zu gelangen. Weitere Beispiele für Proteine, die nach Transfer des entsprechenden Gens in die Haut systemisch sezerniert wurden, sind α -Galactosidase (Medin et al. 1996), Blutgerinnungsfaktor IX (Gerrard et al. 1993; Fenjves et al. 1996; Page et al. 1997) und VII (Fakharzadeh et al. 2000).

1.1.4.3 Steigerung der Effizienz kutaner Genexpression durch topische Selektion

Ein Problem kutaner Gentherapie ist die niedrige Transduktionseffizienz von KC-Stammzellen, so dass kein anhaltend starker, langfristiger gentherapeutischer Effekt erzielbar ist (die Anzahl der KC-Stammzellen und ihre Teilungsaktivität – Voraussetzung einer effizienten retroviralen Transduktion – ist sehr gering) (Kolodka et al. 1998)). Eine Möglichkeit, einen langfristigen gentherapeutischen Effekt in einer

hohen Anzahl transduzierter Zellen zu erreichen, ist die Selektion der transduzierten Zellen, in denen neben dem Therapiegen auch ein Selektionsgen eingebracht wurde. Durch anschließende Anwendung einer zytotoxischen Substanz, gegen die nur Zellen, die das Selektionsgen exprimieren, resistent sind, lassen sich die transduzierten Zellen gezielt vermehren.

Die Haut stellt für einen derartigen Ansatz ein besonders interessantes Zielorgan dar, da sie direkt zugänglich ist und somit eine nur auf das gewünschte Zielgewebe begrenzte Anwendung des Selektionsreagenz ermöglicht. So lassen sich die bei einer systemischen Applikation auftretenden toxischen Nebenwirkungen in anderen Organsystemen vermeiden. Zudem ist die Wirkung effizienter, da bei lokaler Anwendung auch ein Großteil des Selektionsreagenz auf die Zielzellen einwirken kann, während sich bei systemischer Applikation der Wirkstoff auf den ganzen Körper verteilt (Licht et al. 2002; Pfützner et al. 2002).

Ein mögliches Selektionsgen in den KC der Haut ist das humane Multi-Drug Resistance (MDR) Protein, auch p-Glykoprotein genannt. Es handelt sich dabei um einen ABC-Transporter, der verschiedene, meist zytotoxische, Wirkstoffe aus der Zelle pumpen kann (Pastan et al. 1988). Da es sich um ein humanes Protein handelt, sind keine Immunreaktionen bei einer gentherapeutischen Anwendung zu erwarten.

Ein mögliches, zytotoxisches Selektionsreagenz ist der Mitosehemmer Kolchizin. Die Verwendung von Mitosehemmern bietet sich aufgrund der hohen Proliferationsrate der KC in der Haut an. Bei ihrer Anwendung sind nur die erfolgreich transduzierten KC weiterhin in der Lage zu proliferieren, während die nicht transduzierten KC die Proliferation einstellen (Pfützner et al. 2002).

1.2 Erythropoietin

1.2.1 Aufbau und Funktion im Körper

Ein gentherapeutisch vielseitig einzusetzendes Genprodukt ist das humane Hormon Erythropoietin (EPO), ein 165 Aminosäuren großes Glykoprotein mit einer Masse von 30,4 kDa, wovon der Zuckeranteil 40 % ausmacht. Es gehört zu der Gruppe der hämatopoietischen Wachstumsfaktoren (Hematopoietic Growth Factors, HGF), zu der auch Thrombopoetin, Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) gehören, welche die Produktion von Blutzellen regulieren (Jelkmann 1992; Lacombe et al. 1998).

Die Hauptaufgabe von EPO ist die Stimulierung der Erythropoese (Bildung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten)). Die Erythrozyten sind für den Sauerstoff und CO₂-Transport des Blutes verantwortlich. Die Bindung der O₂- und CO₂-Moleküle erfolgt an dem von den Erythrozyten gebildeten Hämoglobin. Sauerstoffmangel führt durch Steigerung der EPO-Produktion somit zu einer vermehrten Bildung von Erythrozyten sowie Hämoglobin, was einen Anstieg des Hämatokrit-Wertes zur Folge hat. Die Wirkung des EPO in der Erythropoese besteht in der Unterbindung der Apoptose der frühen Erythrozyten-Vorläuferzellen, den Colony-Forming Unit-Erythroids (CFU-E). Diese entstehen in mehreren Stufen durch Differenzierung aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und differenzieren im weiteren Verlauf der Erythropoese zu den Erythrozyten. EPO ist für die Produktion und Differenzierung der Vorläuferzellen nicht essentiell. Es wird zum größten Teil in der Niere gebildet, in kleinen Mengen aber auch in der Leber. Geringe Spuren von EPO finden sich auch in anderen Organen, wie z.B. in der Lunge oder im Gehirn (Jelkmann 1992; Lacombe et al. 1998; Fisher 2003).

1.2.2 Anwendungsgebiete für EPO in der Medizin

Für die therapeutische Verabreichung von EPO mittels subkutaner oder intravenöser Injektion des rekombinanten Hormons gibt es viele Indikationen. Primäres Anwendungsgebiet für die Gabe von EPO sind Anämien aufgrund von akutem oder chronischem Nierenversagen, es ist also zu einem Ausfall der Niere als Hauptproduktionsort von EPO gekommen. Auch bei Anämien, die nicht durch eine Niereninsuffizienz bedingt sind, wird EPO therapeutisch genutzt. Dazu gehören Anämien als Folge von Chemotherapien bei Tumorpatienten, von Knochenmarkstumoren, von Hämoglobinopathien, Anämien bei Frühgeborenen oder in Folge von Blutverlust aufgrund von Operationen oder Verletzungen. Auch Patienten mit einer HIV-Infektion leiden oft an einer Anämie, die mit EPO behandelt werden kann. Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet für EPO ist die Neuroprotektion, bei der Nervenzellen des Gehirns geschützt werden (Jelkmann 1992; Ng et al. 2003). Die

gentherapeutische Expression von EPO in der Haut würde einen Verzicht auf die kosten-, zeit- und arbeitsaufwändigen regelmäßigen EPO-Injektionen ermöglichen.

1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert, ist die Haut ein hervorragend geeignetes Ziel für die systemische Produktion therapeutischer Proteine wie beispielsweise EPO mittels genetisch modifizierter Zellen. Das Ziel dieser Arbeit war die *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchung kutaner Zellsysteme hinsichtlich der Möglichkeit, durch genetische Modifikationen in den Zellen EPO zu exprimieren und durch Sekretion der Umgebung zugänglich zu machen. Von besonderem Interesse war hierbei, ob die EPO-Sekretion durch selektive Anreicherung der kutanen Zellen so gesteigert werden kann, dass ein systemischer, therapeutischer Effekt denkbar ist.

1.3.1 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren und Zelltypen

Als Methode für den Gentransfer kamen bicistronische retrovirale Vektoren basierend auf dem MoMLV-Virus zum Einsatz. Bicistronische Vektoren enthalten eine „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES), welche die Expression von zwei Genen auf einem mRNA-Transkript ermöglicht (Ghattas et al. 1991). Während in Eukaryoten der Translationsprozess am Stopp-Codon der mRNA eines Gens stoppt, erlaubt die IRES die Translation eines nachfolgenden zweiten Gens durch Bindung der Ribosomen an der IRES-Sequenz.

Um Unterschiede in der Expression beider Gene in Abhängigkeit von ihrer Position (vor oder hinter der IRES) oder dem retroviralen Grundgerüst des Vektors zu überprüfen, sollten zunächst verschiedene Vektoren mit dem MDR-Gen als Selektionsgen und einem Markergen, hier dem Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen, hergestellt und verglichen werden (Sugimoto et al. 1994; Sugimoto et al. 1995; Aran et al. 1998). Durch die Analyse der Transduktionseffizienz sowie der Expressionsleistung (vor und nach Kolchizins Selektion) in primären humanen KC und FB sollte der optimale Vektor für den Einsatz mit dem EPO-Gen ermittelt werden. Hierbei sollte auch untersucht werden, ob es Unterschiede bei der Expression in diesen beiden Zelltypen gab.

1.3.2 *In-vitro*-Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB

Nach den Untersuchungen in Monolayer-Kulturen sollten mit den transduzierten Zellen Hautkonstrukte als ein vereinfachtes Modell der Haut entwickelt werden und die Untersuchungen, ebenfalls mit und ohne Kolchizinselektion, wiederholt werden. Neben den Unterschieden der Zelltypen und Vektoren sind dabei auch eventuelle Unterschiede zu den Monolayer Versuchen, die durch strukturell-funktionelle Eigenschaften der Haut bedingt sind, von Bedeutung. Auch histologische Unterschiede der Hautkonstrukte sollten untersucht werden.

1.3.3 *In-vivo*-Untersuchungen zur EPO-Expression in genetisch modifizierter Haut

Nach den *In-vitro*-Versuchen in Monolayerkulturen und Hautkonstrukten sollten die Untersuchungen auch an einem *In-vivo*-Modell getestet werden. Dazu sollten die Hautkonstrukte auf immundefekte Nacktmäuse transplantiert werden. Nach erfolgreichem Anwachsen der Transplantate sollte die Sekretion von EPO durch Messungen des humanen EPO-Spiegels im Mausblut und die mögliche Wirkung auf die Erythrozyten mittels Hämatokritbestimmung untersucht werden. Dies sollte sowohl an Mäusen, die mit einer Kolchizincreme behandelt werden, um die Zahl und Sekretionsleistung EPO-exprimierender Zellen zu steigern, als auch an Mäusen die mit einer als Negativkontrolle dienenden Creme ohne Kolchizin behandelt werden, erfolgen. Nach Abschluss des Experiments und Entnahme der Transplantate sollten histologische Untersuchungen, die Bestimmung der *In-vitro*-EPO-Sekretion der Explantate sowie die Bestimmung des Anteils transduzierter Zellen in den Explantaten durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Medien

2.1.1 Bakterien-Medien

LB-Medium 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1 l H₂O, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und
 autoklavieren

LB-Agar LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar, autoklavieren,
 abkühlen bis auf 50 °C,
 + 1 ml 100 mg/ml Ampicillin

2.1.2 Zellkultur-Medien

FB-Medium 450 ml DMEM
 50 ml FBS
 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

KC-Medium 500 ml Keratinocyten-SFM
 1,25 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
 500 µl Amphotericin B (250 µg/ml)
 500 µl Gentamycin (10 mg/ml)
 25 µg/ml BPE
 0,15 ng/ml rEGF

Medium für Hautkonstrukte	450 ml DMEM
	50 ml FBS
	5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	2,5 ml NEAA
	625 µl Transferrin (5 mg/ml)
	500 µl EGF (
	500 µl Amphotericin B (250 µg/ml)
	500 µl Gentamicin
	500 µl Adenin
	250 µl Insulin
	50 µl Triiodothyronin
	5 µL Cholera Toxin

2.2 Verwendete Geräte und Materialien

2.2.1 Chemikalien und Kits

DMEM	Biochrom, Berlin
FBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
NEAA	PAA Laboratories, Pasching
Transferrin	Sigma, Taufkirchen
EGF	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Gentamicin	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Adenin	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Roche, Basel, Schweiz
Triiodothyronin	ICN Biomedicals, Irvine, USA
Cholera Toxin	Sigma, Taufkirchen
Keratinocyten-SFM	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Kolchizin	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, Taufkirchen

Agar	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
NaCl	Sigma, Taufkirchen
NaOH	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Sigma, Taufkirchen
CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
HBSS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Formalin	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
rat tail collagen I	Becton Dickinson, Heidelberg
Erythropoietin-ELISA Kit	IBL, Hamburg
NucleoBond® PC 20 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® PC 500 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Puregene Genomic DNA Purification Kit	Gentra, Minneapolis, USA
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS}	Roche, Basel, Schweiz
SYBR Green I Kit	
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktions-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamin Plus Kit	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain Universal ABC-AP-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vector-Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.2.2 Antikörper

anti P-glycoprotein MRK 16	Kamiya, Seattle, USA
IgG2a	BD-PharMingen, Heidelberg
anti-IgG2a-PE	BD-PharMingen, Heidelberg
Goat F(ab') anti mouse-FITC (Biosource)	Biosource-Invitogen, Karlsruhe
IgG1-PE	BD-PharMingen, Heidelberg
A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
anti P-glycoprotein mab C219	Signet Laboratories, Dedham, USA
anti HLA-A,B,C-PE	BD-PharMingen, Heidelberg

2.2.3 Plasmide

pQCXIX	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pQCXIX-MDR	Jonathan Vogel, National Institutes of Health, Bethesda, USA
pEGFP-1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pHaMDR1a	Michael Gottesmann, National Institutes of Health, Bethesda, USA
p-BMN-I-GFP	Garry P. Nolan, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, USA
Litmus28i	New England Biolabs, Frankfurt
L-huEPO-SN	Karen Pepper, Children's Hospital Los Angeles, USA

2.2.4 Zellen

MAX Efficiency DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe
Phoenix Ampho Zellen	Garry P. Nolan, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, USA

2.2.5 Geräte

FACScan Flow Cytometer mit CELLQUEST Software	Becton Dickinson, Heidelberg
LightCycler® 2.0 mit LightCycler® Software	Roche, Basel

2.2.6 Materialien

Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen	Peske, Aindling-Pichl
Zellkultur-Testplatte	Peske, Aindling-Pichl
Zentrifugenbecher	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Peske, Aindling-Pichl
LightCycler® Capillaries	Roche, Basel
6-well-Platten	BD Falcon, Heidelberg
heparinisierte Kapillaren	neoLab, Heidelberg
heparinisierte Probengefäße (Microvette® 500)	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation von *E. coli* Bakterien

Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA wurde die DNA zunächst in kompetente Bakterien transferiert, welche anschließend in größerem Maßstab kultiviert wurden. Zur Transformation wurden zunächst 100 µl kompetente Bakterien (MAX Efficiency DH5α von Invitrogen) auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die Bakterien für 2 min auf Eis inkubiert, mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 1h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Bakterien auf eine, je nach Plasmid, mit Ampicillin bzw. Kanamycin versetzte LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den sich gebildeten Kolonien konnten dann neue Kulturen beimpft werden.

2.3.2 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

Ein 2 ml Reaktionsgefäß mit LB-Medium wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) versetzt, mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agar Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur konnte nun zur Isolierung von Plasmid-DNA oder zum Animpfen einer größeren Kultur (200 ml Medium im 500 ml Erlenmeyerkolben) verwendet werden.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Kulturen erfolgte mit speziellen Kits, welche auf dem Verfahren der alkalischen Lyse und DNA-Reinigung über Säulen mit einer Silicagel-Membran beruhen. Für die Isolationen wurden das NucleoBond® PC 20 Kit (kleiner Maßstab) und das NucleoBond® PC 500 Kit (größerer Maßstab) von Macherey-Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.3.4 DNA-Fällung

Die Fällung von DNA aus Lösungen dient zur Reinigung und Aufkonzentrierung. Dazu wurde die Lösung mit Natriumacetat (1/10 des Volumens, 3 M, pH 4,8-5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und 5-10 min bei RT inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C wurde das DNA-Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet 5-10 min bei RT getrocknet wurde, konnte es in der gewünschten Menge Puffer aufgenommen werden.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l. Durch zusätzliche Messung der OD_{280} konnte mit dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der DNA überprüft werden. Für reine DNA-Lösungen liegt das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.6 Restriktionsanalyse von DNA

Die Zusammensetzung der Plasmid-DNA wurde durch den Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen und Größenkontrolle der erhaltenen DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel überprüft. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

1 – 5 μl DNA
+ 2 μl 10 x Restriktions-Puffer
+ 1 μl je Restriktionsenzym
ad 20 μl H_2O

Nach 1-2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Anätze mit 4 μl 5x-Loading Dye (Fermentas) versetzt und die DNA-Fragmente auf einem 1-2 %igem Agarose-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wurde entweder mit Ethidiumbromid unter UV-Licht oder mit SYBR-Green I mit blauem Licht sichtbar gemacht.

2.3.7 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um bei Ligationen von DNA-Fragmenten in Vektoren die Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau am 5'-Ende mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIP, Fermentas) dephosphoryliert. Dazu wurden 20 μl Restriktionsansatz mit 0,5 μl CIP versetzt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel

Um spezifische DNA-Fragmente für die Weiterverarbeitung zu erhalten, wurden nach Auftrennung auf dem Agarose-Gel die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits von Machery-Nagel die DNA isoliert.

2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase, welches die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten zu einem DNA-Strang katalysiert, können DNA-Fragmente in einen Zielvektor eingebaut werden. Die Ligation wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

250 ng Vektor-DNA
x ng DNA-Insert
+ 2 μl 10 x Ligationspuffer
+ 1 μl T4-Ligase
ad 20 μl H_2O

Für die Ligation wurde die 1-5 fache molare Menge des Inserts gegenüber des Vektors eingesetzt. Die entsprechende Menge an DNA-Insert wurde dabei mit folgender Formel ausgerechnet:

$$m_{\text{Fragment}}[\text{ng}] = \frac{m_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}}[\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]}$$

Der Ligationsansatz wurde nun für 2h bei RT inkubiert und anschließend ein Teil davon in kompetente Bakterien transformiert.

2.3.10 Quantitative Real-Time-PCR

Um die relative Zahl der Kopien des MDR-Gens im Genom der transduzierten Zellen zu bestimmen, wurde die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt, welche auf der Methode der klassischen PCR beruht. Während bei dieser das Ergebnis erst am Ende der Reaktion mittels Gelelektrophorese analysiert werden kann, gestattet die Real-Time PCR eine Verfolgung des PCR-Verlaufs während der Reaktion. Dazu wird dem PCR-Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. SYBR-Green I zugesetzt, welcher sich an die doppelsträngigen DNA-Moleküle, welche im Verlauf der PCR gebildet werden, bindet. Mit steigender DNA-Menge nimmt dabei die Fluoreszenzintensität zu. Um eine Echtzeitverfolgung der PCR zu ermöglichen, wird die Reaktion nicht in einem herkömmlichen Thermocycler durchgeführt, sondern in einem speziellen Cycler, welcher die Fluoreszenz anregt und ihre Intensität misst. Zur Quantifizierung wurde das LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit in Verbindung mit den LightCycler[®] Capillaries (20 µl) und dem LightCycler[®] 2.0 von Roche verwendet.

Folgende Primer wurden benutzt:

MDR1, forward 5'- AGA AAG CGA AGC AGT GGT TCA - 3'

MDR1, reverse 5'- CGA ACT GTA GAC AAA CGA TGA GCT A - 3'

HCK, forward 5'- TAT TAG cAC CAT CCA TAG GAG GCT T - 3'

HCK, reverse 5'- GTT AGG GAA AGT GGA GCG GAA G - 3'

PCR-Programm:

initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1 x
Denaturierung	10 s	95 °C	} 35 x
Annealing	10 s	58 °C	
Elongation	5 s	72 °C	

Zur Auswertung wurden mit Hilfe der LightCycler[®] Software die Ct-Werte für das Ziel-Gen (MDR) und das Referenz-Gen (HCK) bestimmt. Der Ct-Wert (CT = Threshold Cycle), auch Cp-Wert (Crossing Point) genannt, gibt die Zyklusnummer der PCR an, ab der die Fluoreszenzintensität signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Dies wird mathematisch nach der "Second Derivative Maximum" Methode ermittelt, bei der das erste Maximum der 2. Ableitung der Fluoreszenzkurve bestimmt wird. Die relative Kopienzahl des Ziel-Gens wird mit folgender Formel berechnet: rel. Kopienzahl = $2^{\Delta Ct}$ mit $\Delta Ct = Ct_{HCK} - Ct_{MDR}$

2.4 Klonierung der retroviralen Vektoren

Es wurden verschiedene bicistronische retrovirale Vektoren hergestellt, welche das MDR-Gen und das GFP-Gen, an das MDR-Gen gekoppelt über ein IRES-Element, enthalten. Dabei sollten Vektoren mit unterschiedlicher Reihenfolge des MDR- und GFP-Gens sowie Vektoren mit unterschiedlichem Plasmidgrundgerüst erstellt werden. Ziel war die Bestimmung des optimalen Grundgerüsts für den bicistronischen Vektor, in dem dann das EPO-Gen an das MDR-Gen gekoppelt wurde. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Klonierungsstrategien der unterschiedlichen Plasmide anhand detaillierter Abbildungen erläutert.

2.4.1 pBMIG

Der Vektor pBMN-MDR-IRES-GFP (pBMIG) basiert auf dem pBMN-I-GFP Vektor von Garry Nolan (Stanford University). Er enthält 5'- und 3'-LTR sowie das Verpackungssignal des Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) und die ECMV-IRES Sequenz. Da der Ursprungsvektor schon das GFP-Gen enthält, musste nur noch das MDR-Gen eingefügt werden. Um die Enden des MDR-Gens, welches aus dem

pHaMDR1a Vektor (Pastan et al. 1988) stammte, für die Klonierung mit den notwendigen Schnittstellen zu versehen, fand wieder eine Zwischenklonierung in einen anderen Vektor (pEGFP-1, Clontech) statt. Anschließend konnte es in den Zielvektor (pBMN-I-GFP) überführt werden (**Abbildung 2.1**).

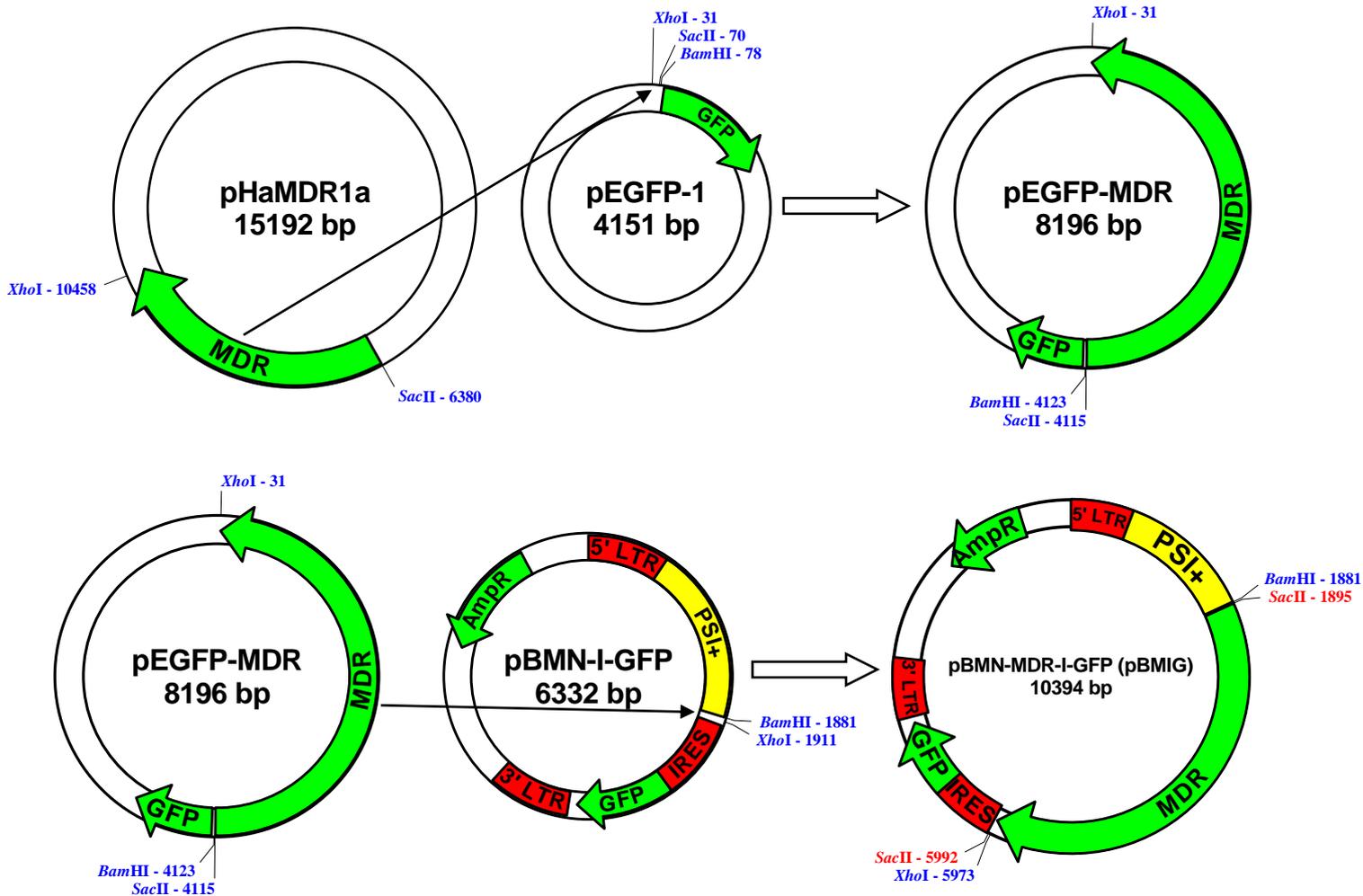


Abbildung 2.1: Das MDR-Gen wurde zunächst aus dem Vektor pHaMDR1a mit *SacII* und *XhoI* ausgeschnitten und in den mit den entsprechenden Enzymen geöffneten pEGFP-1 Vektor eingefügt. Von dort konnte es mit *BamHI* und *XhoI* wieder ausgeschnitten und in den pBMN-I-GFP Vektor an den gleichen Schnittstellen eingefügt werden.

2.4.2 pBGIM

Die Klonierung des Vektors pBMN-GFP-IRES-MDR (pBGIM), in welchem die Reihenfolge der MDR- und GFP-Gene gegenüber dem Vektor pBMIG vertauscht ist, war deutlich aufwendiger. Das Ersetzen des GFP-Gens durch das MDR-Gen war nicht ohne weiteres möglich, da keine kompatiblen Schnittstellen vorhanden waren. Daher wurde das GFP zunächst durch die MCS eines Klonierungsvektors ersetzt. Aufgrund der geringen Größe und der damit verbundenen Schwierigkeiten beim Klonieren musste die MCS erst durch Einbau eines DNA-Fragmentes vergrößert werden (**Abbildung 2.2**).

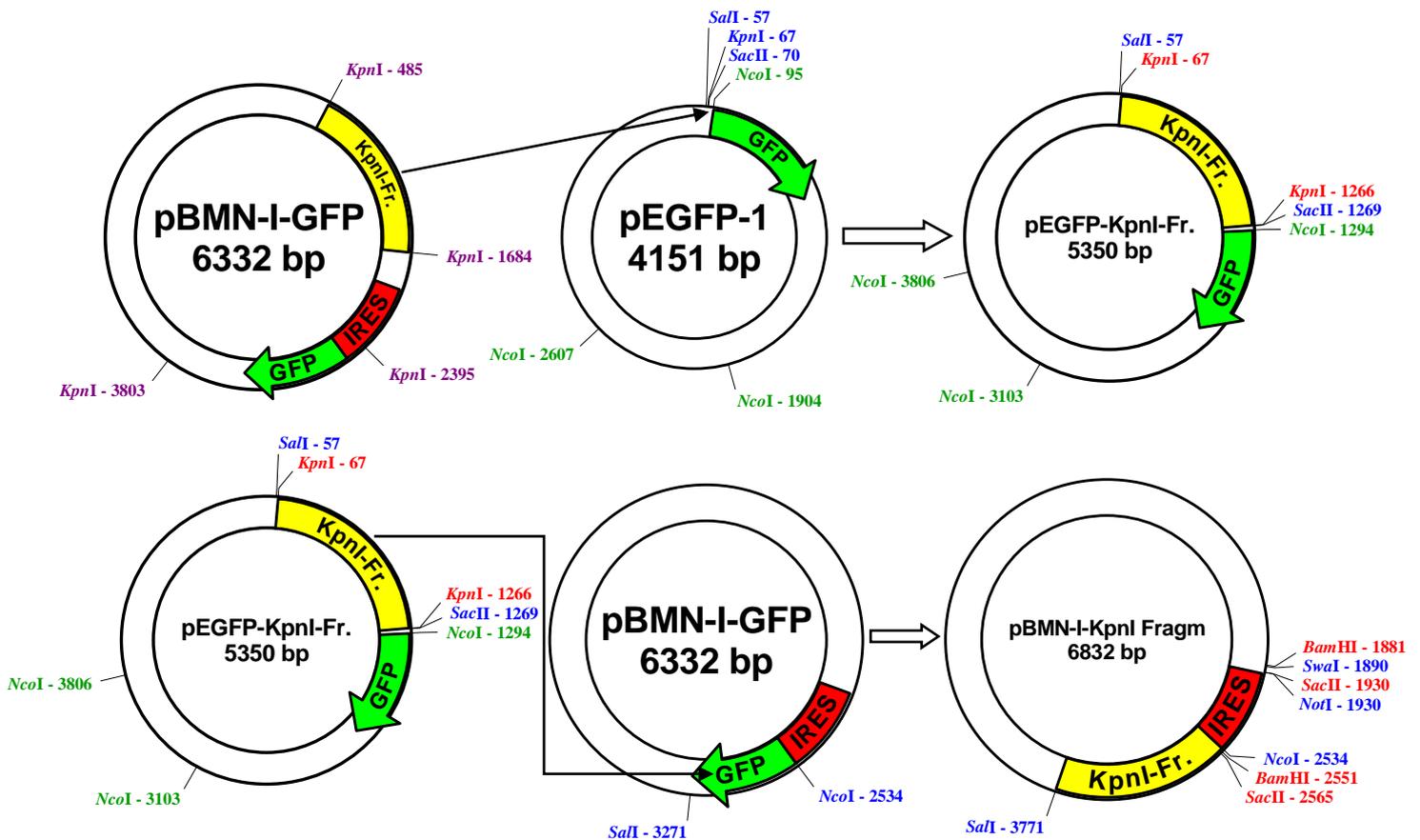


Abbildung 2.2: Im ersten Schritt wurde die MCS des pEGFP-1 Vektors durch das Einfügen eines 1,2 kb großen DNA-Fragmentes mit KpnI-Schnittstellen an den Enden (KpnI-Fragment) vergrößert. Im zweiten Schritt erfolgte der Transfer der MCS in den pBMN-I-GFP Vektors zwischen die NcoI und SalI Schnittstelle des GFP.

In den darauf folgenden Schritten wurden dann das GFP-Gen in die ursprüngliche MCS des Zielvektors sowie das MDR-Gen in die neu eingebrachte MCS transferiert, wobei das dort eingefügte DNA-Fragment wieder wegfiel (**Abbildung 2.3**).

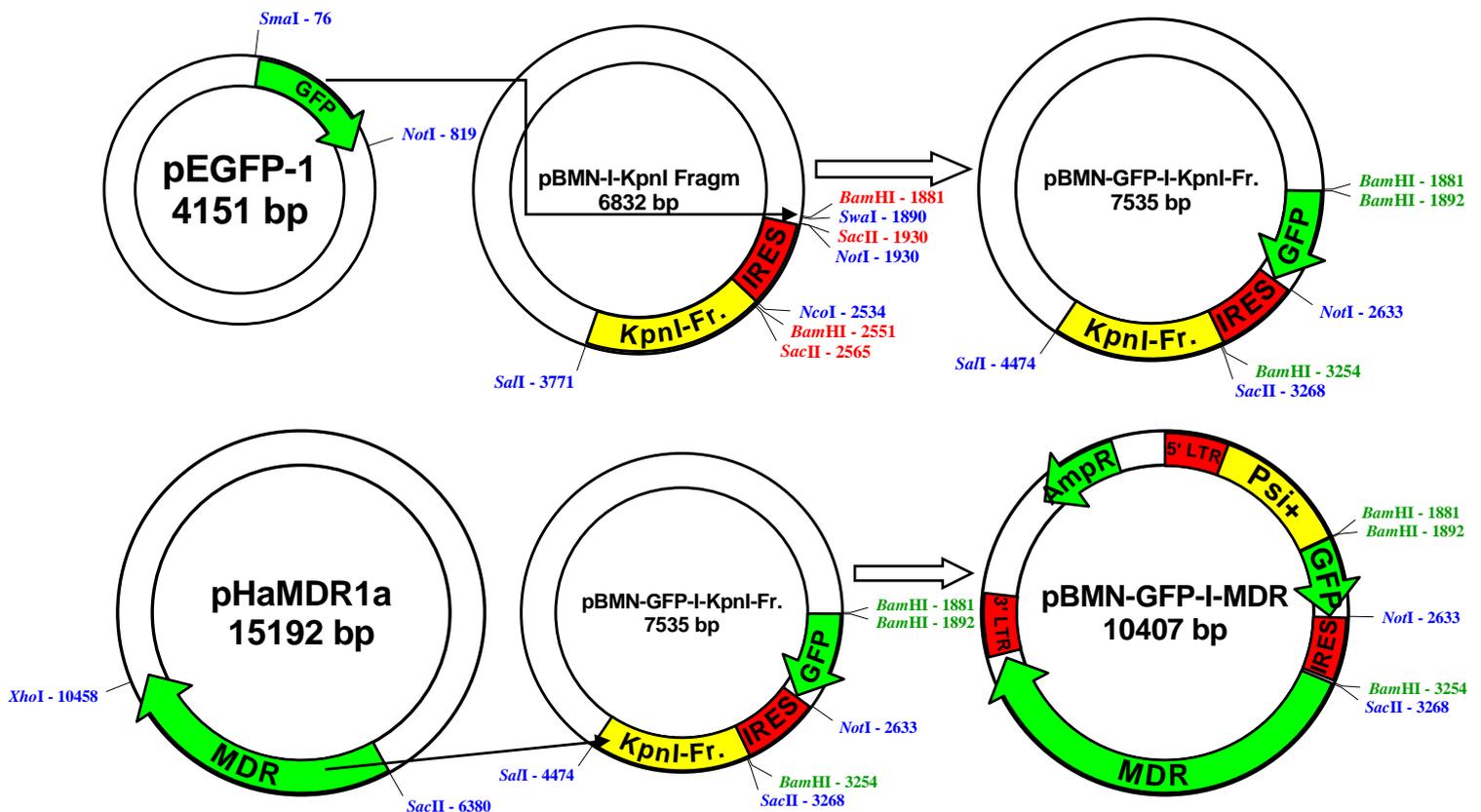


Abbildung 2.3: Nach dem erfolgreichen Einbau der zusätzlichen MCS in den Zielvektor wurde zunächst das GFP-Gen aus dem pEGFP-1 Vektor mit den Enzymen *Sma*I und *Not*I ausgeschnitten und im pBMN-I Vektor zwischen den *Swa*I und *Not*I Schnittstellen inseriert (*Swa*I und *Sma*I bilden glatte Enden, weshalb die Schnittstellen kompatibel sind). Dann konnte das MDR-Gen aus dem pHaMDR1a Vektor an den Positionen *Sac*II und *Xho*I ausgeschnitten und in den mit *Sac*II und *Sal*I geöffneten Zielvektor ligiert werden (*Xho*I und *Sal*I bilden kompatible Überhänge), wodurch gleichzeitig das KpnI-Fragment wegfiel.

2.4.3 pQGIM

Der Vektor pQCXIX-GFP-IRES-MDR (pQGIM) basiert auf dem bicistronischen Vektor pQCXIX von Clontech. Der Vektor enthält eine hybride 5' LTR, bestehend aus dem Cytomegalovirus (CMV) Type I Enhancer und dem Mouse Sarcoma Virus (MSV) Promoter, das Verpackungssignal, den 3'LTR des Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV), den Immediate Early CMV (CMV IE) Promoter des Cytomegalovirus (CMV) sowie die ECMV-IRES Sequenz. Das Ausgangsprodukt, der pQCXIX Vektor mit bereits eingefügtem MDR-Gen wurde von Jonathan Vogel, National Institutes of Health, Bethesda, USA, zu Verfügung gestellt. In diesem konnte durch Einfügen des GFP-Gens aus dem pBMN-I-GFP Vektor, zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, USA, das fertige Konstrukt hergestellt werden. Da der Zielvektor keine passenden

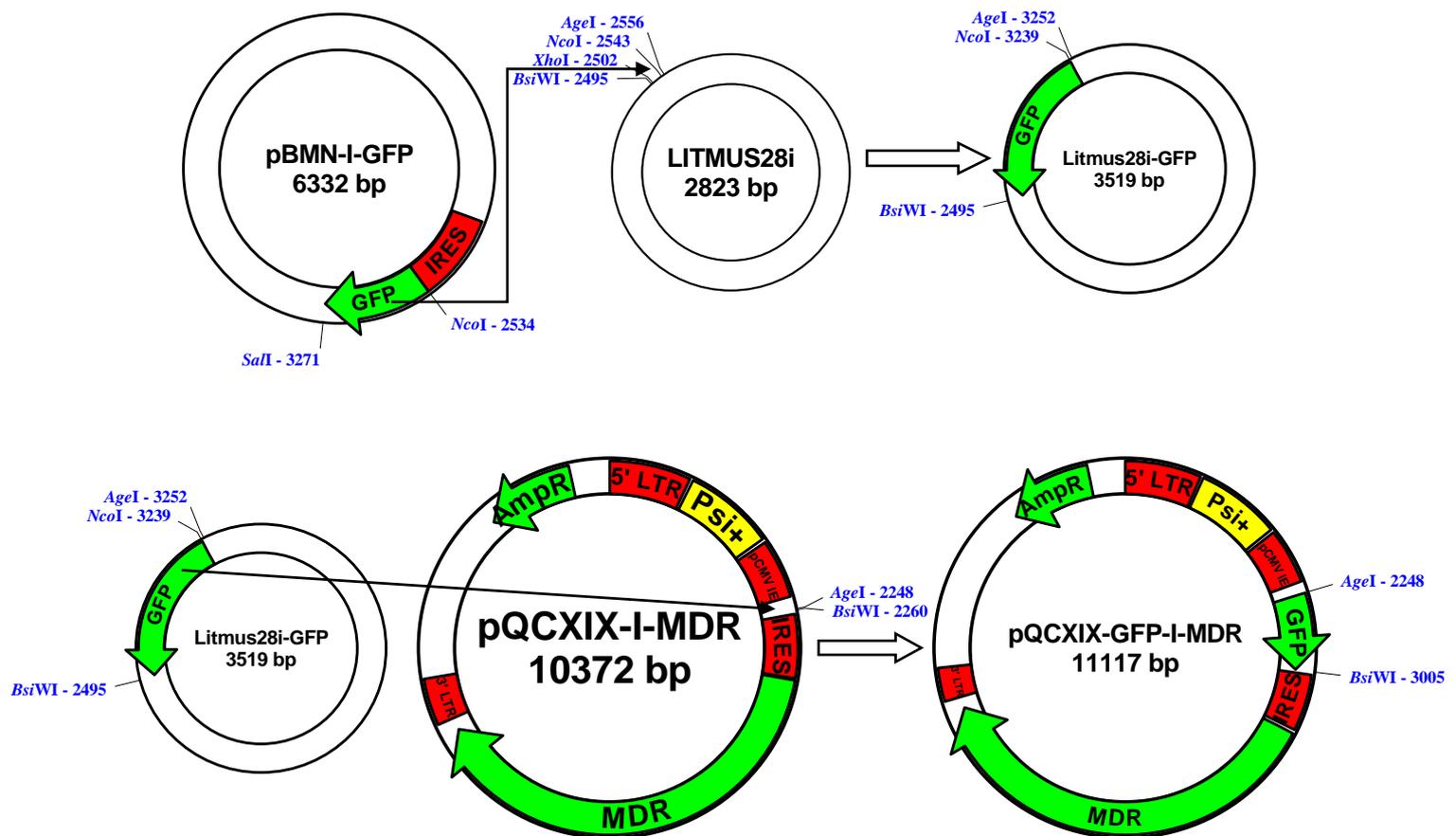


Abbildung 2.4: Das GFP-Gen wurde mit *NcoI* und *Sall* aus dem pBMN-I-GFP Vektor ausgeschnitten und in den mit *NcoI* und *XhoI* geöffneten Litmus28i Vektor ligiert. Dadurch erhalten die Enden des GFP-Gens neue Schnittstellen (*AgeI* und *BsiWI*). An diesen wurde es dann wieder ausgeschnitten und in den Zielvektor transferiert.

Restriktionsschnittstellen für die Enden des GFP-Gens besitzt, wurde dieses zunächst in die MCS eines Klonierungsvektors (Litmus28i, New England Biolabs) überführt. Aus diesem konnte es dann mit den passenden Schnittstellen in den pQCXI-I-MDR Vektor eingefügt werden (**Abbildung 2.4**).

2.4.4 pQEIM

Der Vektor pQCXIX-EPO-IRES-MDR (pQEIM) entspricht dem pQGIM Vektor, jedoch findet sich anstelle des GFP-Gens das humane EPO-Gen vor dem MDR-Gen. Die Klonierungsstrategie war analog zu der des pQGIM, jedoch mit dem EPO anstatt des GFP sowie anderen Restriktionsschnittstellen. Als Quelle für das EPO-Gen diente der monocistronische retrovirale Vektor pL-huEPOSN von Karen Pepper, Children's Hospital Los Angeles, der auf dem pLXSN Vektor von Clontech basiert (**Abbildung 2.5**).

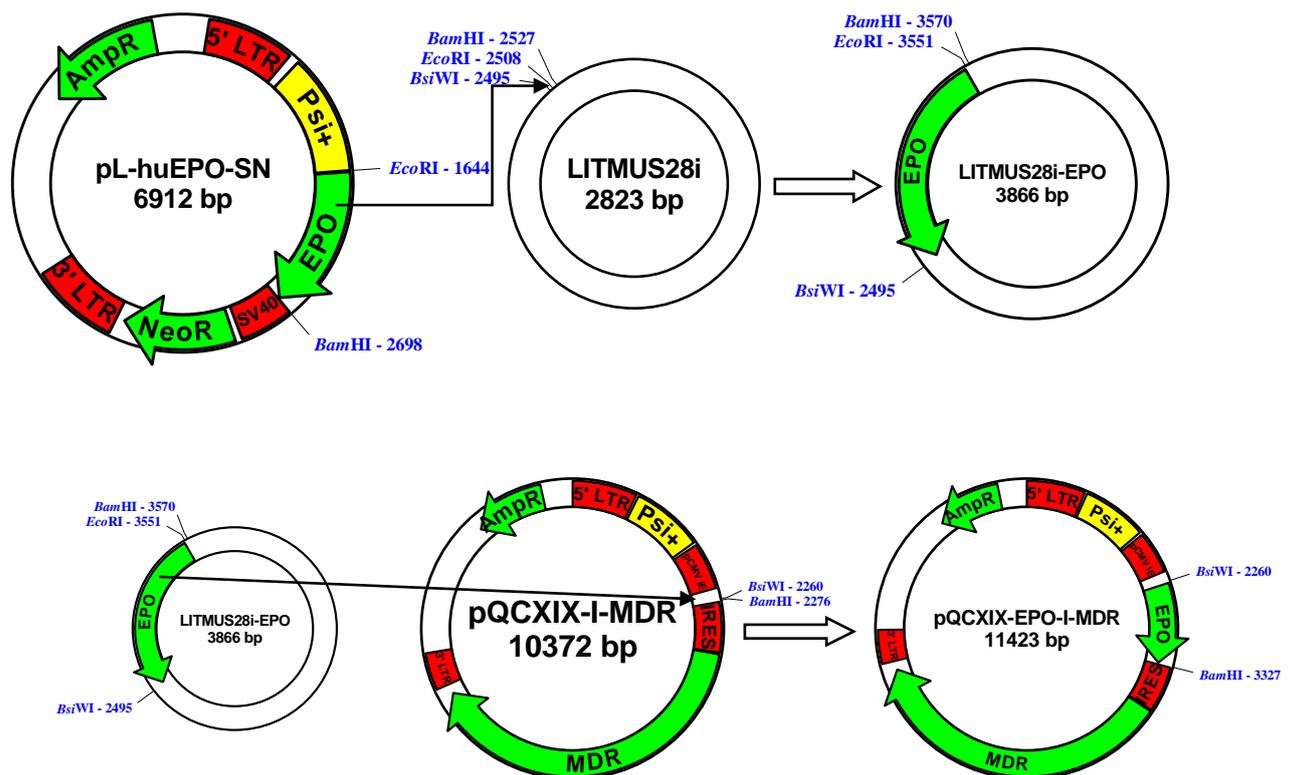


Abbildung 2.5: Das EPO-Gen wurde an den Schnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor LITMUS 28i überführt. Aus diesem konnte es an den Schnittstellen BamHI und BsiWI in den Zielvektor pQCXIX-I-MDR transferiert werden.

2.5 Zellkultur Methoden

2.5.1 Isolierung von primären human Fibroblasten und Keratinozyten

KC wurden aus der Epidermis und FB aus der Dermis von humanen Vorhäuten gewonnen. Dazu wurde die Haut in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und über Nacht bei 4 °C in Dispase (25 U/ml) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis mit einer Pinzette abgelöst, in 10 ml Trypsin/EDTA gegeben, und unter regelmäßigem Schütteln im Wasserbad bei 37 °C für 7 min inkubiert. Der Überstand wurde dann in 20 ml FB-Medium gegeben, und nach Zugabe von 10 ml Trypsin/EDTA der Vorgang wiederholt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und die KC mit 10 ml KC-Medium in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Für die Isolierung der FB wurde die Dermis mit dem Skalpell in kleine Stücke zerteilt, in eine 10 cm Zellkulturschale überführt und 10 ml FB-Medium zugegeben. Im verlaufe einiger Tage wanderten die FB aus der Dermis aus und konnten mittels Trypsinisierung gewonnen werden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.5.2 Kultivierung von Zellen

Bei allen Zellen wurde nach jeweils 2-3 Tagen ein Mediumswechsel durchgeführt. Hatten sie die maximale Zelldichte erreicht (KC 70 %, FB und retrovirale Verpackungszellen ΦNX Ampho je 100 %), mussten sie gesplittet werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA für 5-10 min bei 37 °C inkubiert und dann mit 2 ml FB-Medium das Trypsin neutralisiert. Nach Zentrifugation der Zellen und Resuspendierung in Medium wurden sie mit geringerer Zellzahl erneut ausgesät.

2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden sie zunächst trypsinisiert, abzentrifugiert und dann in 900 µl DMEM resuspendiert. Dann wurden sie in ein Kryoröhrchen mit 900 µl Einfriermedium (720 µl DMEM, 180 µl DMSO) überführt, für 4-5 Tage bei -80 °C gelagert und anschließend bei -196 °C in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein Röhrchen mit 10 ml FB-Medium überführt, abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und Zellkulturflaschen überführt.

2.5.4 Transfektion von retroviralen Verpackungszellen

Zur Generierung von Verpackungszelllinien, welche Viren mit den gewünschten Zielgenen produzieren, wurden die retroviralen Verpackungszellen (Φ NX Amphi) mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Dafür wurden am Tag vorher 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde dann die eigentliche Transfektion mit dem Lipofectamin Plus Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.5.5 Gewinnung von Virusüberstand für die Transduktion

Am Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion der Verpackungszellen begonnen. Die Selektion mit Kolchicin (50 ng/ml) dient zur Anreicherung der erfolgreich transfizierten, MDR exprimierenden Zellen. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70% - 80 % erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Die Selektion wurde nun zusätzlich mit Diphtheriatoxin (200 μ g/ml, Sigma) und Hygromycin B (1 μ g/ml, Sigma), welches zur Anreicherung Virusproduzierender Zellen diente, fortgesetzt. Das Hygromycinresistenzgen ist an die gag-pol-Gene und das Resistenzgen für das Diphtheria Toxin an das env Gen gekoppelt. Die Zellen wurden für zwei Wochen selektiert, und bei entsprechender Zelldichte zwischenzeitlich gesplittet. Nach Abschluss der Selektion wurde jeweils für 8 h Überstand gesammelt (25 ml aus einer T175 Flasche) und bei -80 °C eingefroren.

2.5.6 Transduktion von Keratinozyten und Fibroblasten

Für die Transduktion wurden am Tag vorher jeweils 250.000 KC oder FB in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Vor der Transduktion wurde zunächst der Virusüberstand im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit einem Spritzenfilter (PES, 0,45 μ M) eventuell noch vorhandene Zellen abfiltriert. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen, 10 ml filtrierter Virusüberstand sowie 10 μ l Polybrene (5 mg/ml) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurde die Transduktion beendet und die Zellen wieder mit normalem Medium versetzt. Die Transduktion wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

2.5.7 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und abzentrifugiert, in Cell Lysis Solution aus dem PUREGENE-Kit von Gentra resuspendiert und dann nach dem Herstellerprotokoll die DNA isoliert.

2.5.8 Gewinnung von Dermis für die Herstellung von Hautkonstrukten

Als Ausgangsmaterial diente Schweinehaut (gewonnen von Schweinen nach Finalversuchen im Institut für Tierexperimentelle Medizin, Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München). Nach Entnahme wurde die Haut mit einem Skalpell von Haaren und Schuppen befreit, 3x in sterilem PBS gewaschen, in sterilem PBS im Wasserbad bei 56 °C für 45 min inkubiert und dann die Epidermis mit einer Pinzette entfernt. Nach 3x Waschen in PBS wurde die deepidermalisierte, avitale Dermis für 2-3 Wochen in FB-Medium bei 37 °C inkubiert, wobei alle 2-3 Tage das Medium gewechselt wurde. Die gewonnene Dermis konnte nun direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert werden.

2.5.9 Herstellung von Hautkonstrukten mit deepidermalisierter Dermis

Die Dermis wurde in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten, in KC-Medium gewaschen, in Zellkultureinsätze (0,45 µm Porengröße) überführt und in 6-Well Platten gegeben. In die Vertiefungen wurden 8-9 ml Medium (KC- und FB-Medium im Verhältnis 6:4) vorgelegt, so dass die Einsätze nur von der Unterseite Kontakt mit dem Medium hatten. Auf die Dermisstücke wurden nun jeweils 50.000 KC in 20 µl KC-Medium ausgesät, für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Medium komplett überschichtet. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt. Ab dem 3. Tag wurde mit der Kolchizinselektion begonnen und ab dem 5. Tag wurde das Medium nur in die Vertiefungen gegeben, so dass die Epidermis der Luft ausgesetzt war (Air-Lift). An Tag 8, 11 und 14 wurden Proben für FACS-Analyse und die Histologie gewonnen sowie 4 h-Überstand für die Bestimmung der EPO-Sekretion durch ELISA gesammelt.

2.5.10 Gewinnung von Zellen aus Hautkonstrukten für die FACS-Analyse

Zum Ablösen der Epidermis wurden die HK über Nacht bei 4 °C in Dispase (25 U/ml) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis mit einer Pinzette abgelöst, 3x in PBS gewaschen und in 15 ml 0,05 % Trypsin-Lsg. für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach

Neutralisation des Trypsin mit 15 ml PBS/5%FBS-Lsg. sowie Zugabe von HBSS/5% FBS-Lsg. erfolgte die mechanische Vereinzelnung der KC durch wiederholtes (7x) Auf- und Abziehen in einer 50 ml-Spritze. Dann wurde die Lösung durch ein Filter in ein 50 ml Röhrechen überführt und der Vorgang nach Zugabe von HBSS/5% FBS-Lsg wiederholt. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4°C) wurden die Zellen in FACS-Puffer (PBS, 5% FBS, 0,01 % NaN₃) resuspendiert.

2.5.11 Herstellung von Hautkonstrukten mit Kollagen-Gelen

Die HK bestehen aus 3 Schichten, einer azellulären Kollagenschicht, einer zellulären Kollagenschicht mit den FB sowie der Epidermis mit den KC. Sie wurden in Zellkultureinsätzen (0,4 µm PC-Membran) für 6-well Platten (Falcon) hergestellt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Kollagen (Kollagen I, rat tail, von BD) mit 0,02 N Essigsäure auf eine Konzentration von 3 mg/ml gebracht. Dann erfolgte die Herstellung der azellulären Schicht (1 ml je Hautkonstrukt) durch Mischung von 8 Teilen Kollagen, 1 Teil DMEM (10x, Biochrom) und ein 1 Teil FBS (Biochrom) mit einem Glasstab. Dann wurde die Mischung durch Zugabe von NaOH (1 N, Sigma) auf einen pH ≥ 8 , erkennbar am Farbumschlag von gelb nach pink, eingestellt und je 1 ml in die Einsätze gegossen. Während die azelluläre Schicht bei RT aushärtete, konnte mit der Herstellung der zellulären Schicht begonnen werden. Dazu wurden je Hautkonstrukt 3 ml einer Mischung aus 8 Teilen Kollagen und 1 Teil DMEM (10x,) hergestellt und wieder auf einen pH ≥ 8 eingestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 1 Teil FBS mit 4×10^5 FB. Nach gründlichem, möglichst blasenfreiem Mischen, wurden pro Einsatz 3 ml der Mischung auf die ausgehärtete azelluläre Schicht gegeben. Die Aushärtung erfolgte zunächst für 15 min bei RT und anschließend für 2 h bei 37°C im Inkubator. Dann wurde zu den fertigen Gelen HK-Medium in die Einsätze und die Vertiefungen der Platte gegeben und alle 2 Tage gewechselt.

Im Laufe der nächsten Tage begannen die Konstrukte zu kontrahieren, so dass sich im Zentrum eine Einsenkung bildete. Dies war in der Regel nach 4-7 Tagen der Fall. In diese Vertiefung konnten dann die KC ausgesät werden. Dazu wurde das Medium der Konstrukte abgenommen, je Hautkonstrukt 1×10^6 KC in 30 µl HK-Medium mit Ascorbinsäure (Konzentration im Medium: 50 µg/ml) resuspendiert und in die Einsenkungen der Gele gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT und 1 h bei 37 °C im

Inkubator waren die KC an die Geloberfläche adhärirt. Dann wurde HK-Medium, ab hier immer mit Ascorbninsäure, zugegeben und alle 2 Tage das Medium gewechselt. Ab dem 3. Tag wurde mit der Kolchizin-Selektion (20 ng/ml) begonnen.

Nach 4 Tagen begann die Air-Lift-Phase, in der die Oberseite der Hautkonstrukte der Luft ausgesetzt war und nur noch von unten mit Nährstoffen aus dem Medium versorgt wurde. Dazu wurden die Einsätze auf 4-5 kleine Gummistopfen (Sarstedt) gestellt und das Medium nur noch in die Vertiefungen gegeben. Zu dem Medium wurde ab jetzt CaCl_2 (1 ml einer 60 mM CaCl_2 -Lsg. auf 100 ml Medium, Endkonzentration $\sim 1,4$ mM) hinzugefügt. Die Luft-Exposition der Konstrukte und die Zugabe von CaCl_2 führten zur Differenzierung der KC und der Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis, welches als Stratifikation bezeichnet wird. An Tag 8, 11 und 14 nach dem Aussäen der KC wurde jeweils für 4 h Medium für die EPO-Bestimmung gesammelt. Es wurden Hautkonstrukte mit insgesamt 4 Kombinationen an KC und FB, die mit unterschiedlichen Vektoren transduziert wurden, verwendet (**Tabelle 2.1**)

	HK 1	HK 2	HK 3	HK 4
FB	QEIM	QGIM	QEIM	QGIM
KC	QEIM	QEIM	QGIM	QGIM

Tabelle 2.1: Übersicht der Vektorkombinationen in Hautkonstrukten

2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

2.6.1 Haltung der Mäuse

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden 4-5 Wochen alte, männliche immundefekte Nacktmäuse (NMRI-nu/nu, Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich) verwendet, welche in der Zentralen Versuchstierhaltung des Klinikums Innenstadt der Universität München gehalten wurden.

2.6.2 Transplantation von Hautkonstrukten

Die HK wurden wie in Abschnitt 2.5.11 beschrieben hergestellt. Die Kultivierung erfolgte nur für weitere 3-4 Tage nach Beginn der Air-Lift-Phase.

Zunächst wurden die Mäuse durch intramuskuläre Injektion von 80 μl einer Mischung aus Ketamin, Xylazin und PBS im Verhältnis 3:2:7 narkotisiert. Nach Desinfektion mit 70 % EtOH wurde am Mäusrücken, mittig, ca. 1cm hinter den Vorderpfoten, ein rundes

Loch (d=14 mm) in die Haut geschnitten. Dann wurde aus einem Hautkonstrukt mit einer Hautstanze (d=14 mm, Delasco, Council Bluffs, USA) das Transplantat ausgestanzt und auf die Maus überführt. Das Transplantat wurde mit Vaseline-Gaze abgedeckt und dann die Maus mit zwei sich überlappenden Pflastern eng umwickelt. Nach 2-3 Wochen wurde der Verband wieder abgenommen.

2.6.3 Herstellung und Anwendung der Kolchizin-Creme

Zur Herstellung der Creme wurde zunächst das Kolchizin (Sigma) in DMSO gelöst, mit Wasser verdünnt und dann mit Creme (Velvachol, von Healthpoint, San Antonio, Texas, USA) zu Konzentrationen von 200-400 µg/g gründlich vermischt.

Die Behandlung der Mäuse mit der Creme erfolgte alle 2-3 Tage. Sie wurden dafür kurzzeitig mit CO₂ betäubt, dann die Creme auf das Transplantat aufgetragen und anschließend mit einem Pflaster das Transplantat abgedeckt. Am nächsten Tag wurde das Pflaster wieder entfernt.

2.6.4 Blutentnahme von den Mäusen

Zur Bestimmung des Hämatokrits und der EPO-Konzentration im Plasma wurde den Mäusen Blut entnommen. Dazu wurden sie zunächst mittels Injektionsnarkose betäubt (siehe Abschnitt 2.6.2). Dann wurde mit einer heparinisierten Kapillare (0,8 x 32 mm, neoLab) der retrobulbäre Venenplexus punktiert und das abfließende Blut in einem heparinisierten Probengefäß (Microvette[®] 500, Sarstedt) aufgefangen. Es wurden jeweils ungefähr 300 µl Blut entnommen.

2.6.5 Gewinnung von Plasma aus Mausblut für die EPO-Bestimmung

Das Plasma wurde durch Zentrifugation in den Heparin-Rörchen für 20 min bei RT und 3000 U/min von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt und bei -20 °C gelagert.

2.6.6 Transplantatentnahme für die Analyse

Die Mäuse wurden zunächst mit CO₂ betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Das Transplantat wurde dann mit einer Schere ausgeschnitten und für die weitere Analyse in Formalin oder Dispase überführt.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 FACS-Analyse von Zellen

Bei der FACS- (Fluorescence activated cell sorting) Analyse, auch als Durchflusszytometrie bezeichnet, werden zunächst zu detektierende Proteine mittels spezifischer Fluoreszenzkonjugierter Antikörper markiert. Im Durchflusszytometer erfolgt dann die Bestrahlung der Zellen durch einen Laser und verschiedene Detektoren messen daraufhin das emittierte Fluoreszenzlicht. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich mehrere Proteine gleichzeitig detektieren. Die Messung des Vor- und Seitwärtsstreulichts der Zellen erlaubt zudem Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der Zellen.

Die Antikörpermarkierungen der trypsinisierten und in FACS-Puffer (PBS, 5 % FBS, 0,1 % NaN₃) resuspendierten Zellen erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Greiner Bio One, Frickenhausen). Die Inkubationen der Antikörper wurden bei 4 °C für 20 min durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und die Reihenfolge der Inkubationen sind in **Tabelle 2.2** aufgeführt. Zwischen den Inkubationen wurden die Zellen 3x mit je 200 µl FACS-Puffer je Vertiefung gewaschen. Nach beendeter Färbung wurden die Zellen mit 300-600 µl FACS-Puffer in 5 ml Polystyrolröhrchen (BD) überführt. Direkt vor der Messung erfolgte die Zugabe von 10 µl Propidiumiodid (Sigma), welches die Detektion und spätere Aussortierung von toten Zellen ermöglicht. Die Messungen wurden mit dem FACScan von BD durchgeführt

Primärer Antikörper / Isotypenkontrolle	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
anti P-glycoprotein MRK 16 (Kamiya) / IgG2a (BD)	1:50 1:5	αIgG2a-PE (BD) oder Goat F(ab') anti mouse – FITC (Biosource)	1:5 1:200
anti HLA-A,B,C-PE (BD) / IgG1-PE (BD)	unverdünnt 1:10		

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten AK für die FACS-Analyse

2.7.2 Messung der EPO-Konzentration mittels ELISA

Die Bestimmung der EPO-Konzentration erfolgte mit dem Erythropoietin-ELISA Kit von IBL-Hamburg nach Angaben des Herstellerprotokolls.

2.7.3 Bestimmung des Hämatokrit-Wertes von Mausblut

Der Hämatokrit-Wert wurde maschinell in der Klinischen Chemie der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München bestimmt.

2.7.4 Anfertigung histologischer Schnitte für Immun- und H&E-Färbungen

Die Gewebeproben wurden zunächst mindestens 24 h in 4% phosphatgepuffertem Formalin (Sigma) fixiert. Dann wurden die fixierten Proben in der Mitte geteilt, in Kunststoffeinbettkassetten (Marienfeld, Lauda-Königshofen) gegeben, in 80 % Ethanol überführt, maschinell über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden dann 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Eiweiß/Glycerin (Sigma) beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser Braunschweig) überführt. Anschließend fand die maschinelle Färbung mit Hämatoxilin/Eosin (H&E) statt.

Für die immunhistochemische Färbung wurden Objektträger mit besonders starker Haftung (SuperFrost[®] Plus, Menzel-Gläser) ohne vorherige Beschichtung verwendet.

2.7.5 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Die Paraffineingebetteten Schnitte wurden zunächst für 3x2 min in Xylol entparaffinisiert und über eine absteigende Alkoholreihe (je 2x2 min 100% EtOH, 50 % EtOH, ddH₂O, PBS) rehydriert. Daran schloss sich entweder direkt oder nach Antigendemaskierung (AGR, Antigenretrieval) (siehe Abschnitt 2.7.6) die Inkubation des primären Antikörpers an. Die entsprechenden Antikörper und ihre Inkubationsbedingungen finden sich in Tabelle 2.3. Die anschließende Alkalische Phosphatase-Färbung fand mit dem Vectastain Universal ABC-AP-Kit und dem Vector-Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (beide Vector Laboratories) nach Herstellerangaben statt. Zum Schluss wurden die Schnitte noch mit Hämatoxilin gegengefärbt. Dazu wurden je Objektträger 50 µl Hämatoxilin auf die Schnitte verteilt, 20-30 s gefärbt, mit ddH₂O das Hämatoxilin abgespült, die Objektträger 2x1 min in ddH₂O gewaschen und noch einmal kurz in 100 % EtOH getaucht. Nach dem Trocken

bei RT wurden zum Schutz der Schnitte Deckgläschen mit Permount (Biomedica, Burlingame, USA) auf den Objektträgern befestigt.

Antikörper / Isotypenkontrolle	AGR	Verdünnung	Zeit	Temp.
anti P-glycoprotein mab C219 (Signet Laboratories) / IgG2a (BD)	Ja	1:20 1:10	16-18 h	4 °C
A.v. Monoclonal Antibody (JL-8) (Clontech) / IgG2a (BD)	Nein	1:2000	1 h	RT

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten AK für die Immunhistochemie

2.7.6 Antigendemaskierung bei entparaffinisierten Schnitten

Durch die Fixierung der Gewebeschnitte wird die Tertiärstruktur der Antigene (Proteine) verändert. Da diese aber für die Wechselwirkung mit Antikörpern eine wichtige Rolle spielt, ist es möglich, dass diese aufgrund der veränderten Tertiärstruktur nicht mehr binden. Mit Hilfe der Antigendemaskierung wird ein Teil dieser Veränderungen wieder rückgängig gemacht. Die Demaskierung kann entweder enzymatisch oder durch Hitzeeinwirkung erfolgen. Letzteres wurde hier verwendet.

Dazu wurden zunächst 200 ml RETRIEVE-ALL™ 1 Puffer (Signet Laboratories) im Wasserbad auf 95 °C erhitzt, die entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte zugegeben und für 10-15 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgten nach 5-10 minütiger Abkühlung bei RT zwei Waschschrte in ddH₂O und in PBS. Dann konnte mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung retroviraler Verpackungszellen

Um aus den bicistronischen Plasmiden die entsprechenden retroviralen Vektoren zu erzeugen, wurden sie in retrovirale Verpackungszellen (Φ NX ampho, Garry Nolan, Stanford University) transfiziert. Dies war auch gleichzeitig ein Test der Plasmide für die Fähigkeit zur Expression der Zielgene (MDR, GFP und EPO). Diese wurde für das GFP und das MDR mittels FACS-Analyse der Zellen und für das EPO mittels ELISA des Zellüberstandes überprüft. Die Ergebnisse, welche in **Tabelle 3.1** zusammengestellt sind, zeigen, dass alle Plasmide sowohl das GFP- als auch das MDR-Gen exprimieren. Dabei zeigte sich auch, dass das GFP deutlich besser als das MDR exprimiert wird. Die EPO-Bestimmung im Zellüberstand der mit pQEIM transfizierten Zellen ergab einen sehr hohen EPO-Gehalt von 113 IU/ml. In den Überständen der anderen Zellen ließ sich kein EPO nachweisen. Damit wurde das erste Ziel, die Herstellung funktionsfähiger bicistronischer Plasmide, erreicht.

Vektor	GFP	MDR	GFP + MDR
pQEIM		58,4 %	
pQGIM	32,8 %	16,9 %	16,9 %
pBGIM	68,6 %	33,7 %	33,7 %
pBMIG	55,9 %	25,5 %	25,5 %

Tabelle 3.1: Gesamtanteil der transfizierten Φ NX-Zellen, der GFP oder MDR exprimiert sowie Gesamtanteil, der beides exprimiert.

3.2 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren und Zelltypen

Der Anschaulichkeit halber werden im Folgenden die Ergebnisse für alle Vektoren in gemeinsamer Übersicht dargestellt, auch wenn der Vektor QEIM erst nach der Analyse der verschiedenen GFP-Vektoren konstruiert und analysiert wurde.

KC und FB wurden mit den Überständen der retroviralen Verpackungszellen transduziert und als Monolayer kultiviert. Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde dann das Ausmaß der MDR- und GFP-Expression analysiert. Dabei ging es zum einen um den Effizienzvergleich der verschiedenen Vektoren untereinander als auch um einen Vergleich der Vektoren in FB und KC. Weiterhin wurden die Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Kolchizin selektierten Zellen untersucht.

3.2.1 Vergleich ohne Kolchizins Selektion

3.2.1.1 FACS-Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse können Proteine in Zellen detektiert werden. Dazu wurden die Proteine mit verschiedenen Fluorochromen markiert, welche bei der Messung spezifisch detektiert werden. Das GFP brauchte aufgrund seiner Autofluoreszenz nicht zusätzlich markiert werden. Diese Analysemethode dient zur Bestimmung des Anteils der Zellen, welche nur MDR (GFP-/MDR+), nur GFP (GFP+/MDR-) oder beides

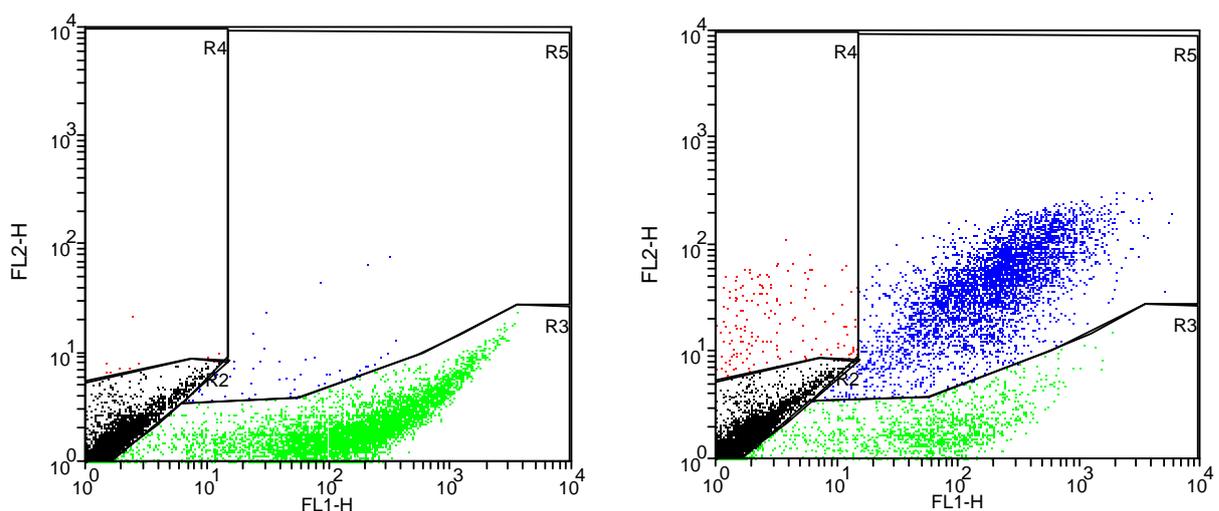


Abbildung 3.1: Beispiel für eine Auswertung der FACS-Analyse mit dem Vektor QGIM transduzierter FB (gefärbt mit Isotypenkontrolle (links) oder anti-MDR AK (rechts)). In R2 (schwarz) sind MDR-/GFP- FB, in R3 (grün) MDR-/GFP+ FB, in R4 (rot) MDR+/GFP- FB und in R5 (blau) MDR+/GFP+ FB enthalten. Alle MDR+ ergeben sich aus R4 und R5, alle GFP+ aus R3 und R5

(GFP+/MDR+) exprimiert haben. Daraus ergeben sich auch die Anteile der Zellen, welche MDR und/oder GFP (MDR+) bzw. GFP und/oder MDR (GFP+) exprimiert haben. In **Abbildung 3.1** ist die Auswertung einer FACS-Analyse zur Veranschaulichung an einem Beispiel transduzierter FB dargestellt. Da in dem Vektor QEIM das GFP- durch das EPO-Gen ersetzt wurde und das EPO sich nicht im FACS detektieren lässt, ist bei mit diesem Vektor transduzierten Zellen nur ein Wert für die MDR-Expression aufgeführt. In **Tabelle 3.2** sind die Ergebnisse der Transduktion von KC mit den verschiedenen Vektoren aufgeführt. Die Messungen fanden einmal 48h nach der Transduktion (d0) und einmal nach weiteren 14 Tagen in Kultur (d14) statt. In **Abbildung 3.2** sind diese Werte grafisch dargestellt. Es zeigt sich, dass die Transduktion der KC mit allen vier Vektoren zu MDR produzierenden bzw. mit den drei GFP-Vektoren (QGIM, BMIG, BGIM) auch zu GFP exprimierenden KC führt. Beim Vergleich von d0 mit d14 findet sich ein leichter Abfall beim Anteil der MDR+ Zellen sowie eine leichte Zunahme der MDR-/GFP+ Zellen. Die Veränderungen fallen jedoch insgesamt gering aus und liegen teilweise noch innerhalb der Standardabweichung, so dass die KC über einen Zeitraum von 14 Tagen eine stabile Expression von MDR und GFP zeigen.

In **Abbildung 3.3** bzw. **Tabelle 3.3** sind die Resultate für die Transduktion von FB dargestellt. Wie schon bei den KC führt die Transduktion bei allen vier Vektoren zu MDR und bei den GFP-Vektoren auch zu GFP exprimierenden Zellen. Der Vergleich von Tag 0 und Tag 14 ergibt einen scheinbar ansteigenden Gesamtanteil MDR-positiver

Vektor		d0				d14			
		GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+
QEIM	MW	67,2%			32,7%	73,3%			26,9%
	SD	3,9%			3,9%	1,0%			1,1%
QGIM	MW	27,6%	12,2%	58,3%	1,7%	33,2%	17,3%	47,9%	1,9%
	SD	5,5%	1,5%	5,7%	0,1%	7,1%	9,1%	2,9%	0,6%
BMIG	MW	45,2%	15,0%	37,4%	2,6%	45,6%	16,1%	35,5%	2,9%
	SD	0,8%	1,9%	1,3%	0,5%	3,0%	0,7%	2,4%	0,4%
BGIM	MW	14,9%	2,2%	26,9%	56,0%	26,7%	2,8%	17,9%	52,7%
	SD	12,7%	1,5%	4,5%	11,3%	5,4%	0,8%	2,6%	2,7%

Tabelle 3.2: FACS-Ergebnisse der transduzierten KC an Tag 0 und Tag 14. Aufgeführt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) aus je 3 unabhängigen Experimenten. (von links nach rechts: GFP und MDR negative Zellen, nur GFP positive Zelle, GFP und MDR positive Zellen, nur MDR positive Zellen)

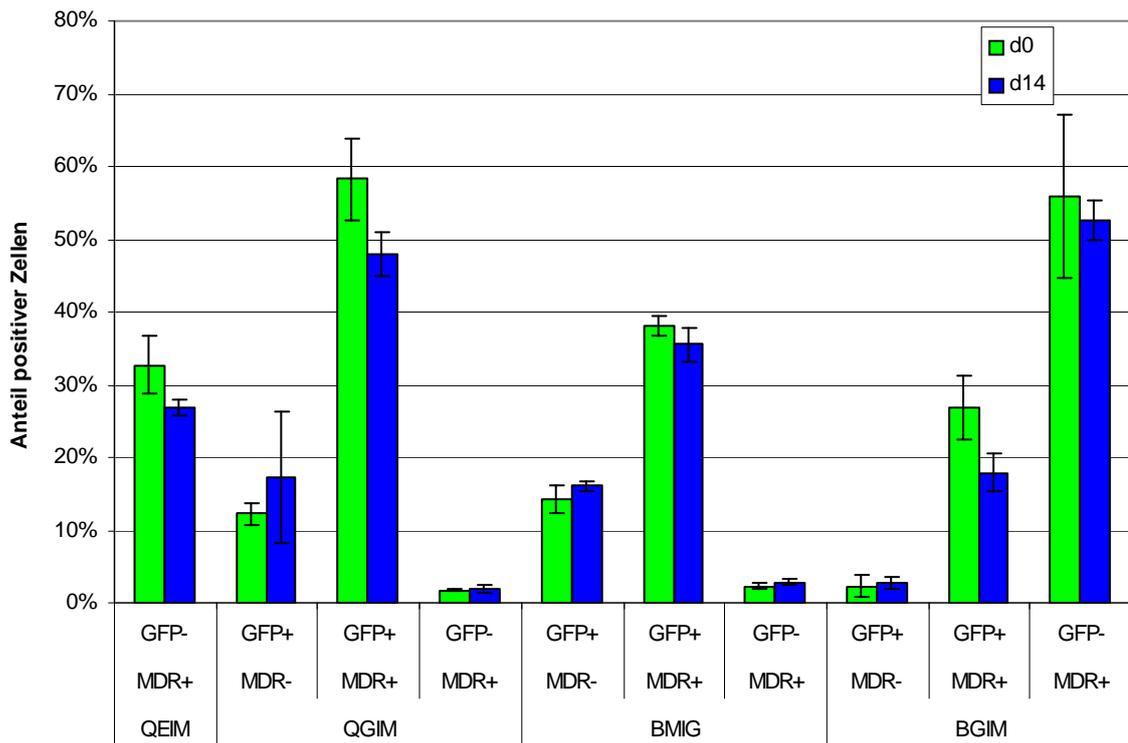


Abbildung 3.2: Vergleich des Anteils GFP- und/oder MDR-positiver KC, transduziert mit den unterschiedlichen Vektoren BGIM, BMIG, QGIM oder QEIM, an d0 und d14

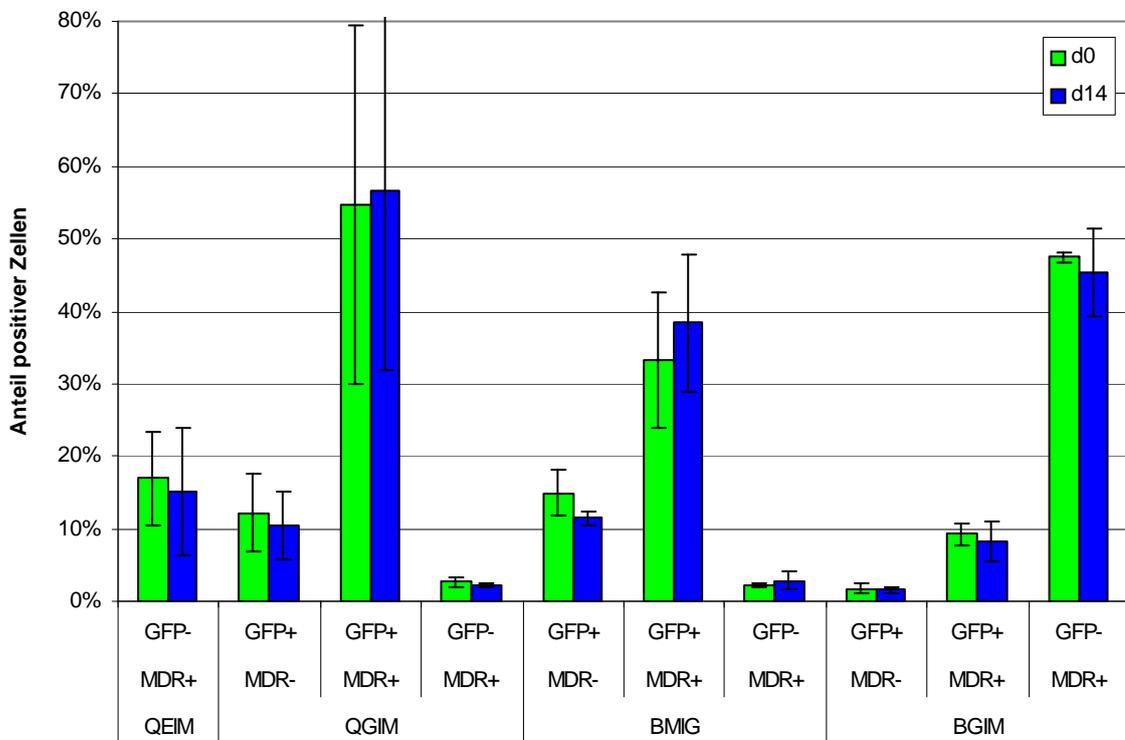


Abbildung 3.3: Vergleich des Anteils GFP- und/oder MDR-positiver FB, transduziert mit den unterschiedlichen Vektoren BGIM, BMIG, QGIM oder QEIM, an d0 und d14

		d0				d14			
Vektor		GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+
QEIM	MW	83,0%			17,0%	85,0%			15,1%
	SD	6,2%			6,4%	8,8%			8,7%
QGIM	MW	30,5%	12,2%	54,7%	2,7%	30,6%	10,4%	56,7%	2,2%
	SD	19,4%	5,3%	24,6%	0,6%	20,5%	4,8%	25,0%	0,3%
BMIG	MW	49,7%	14,9%	33,2%	2,1%	47,4%	11,5%	38,4%	2,9%
	SD	12,2%	3,2%	9,4%	0,3%	11,2%	1,0%	9,5%	1,1%
BGIM	MW	41,6%	1,7%	9,2%	47,5%	45,2%	1,6%	8,3%	45,5%
	SD	2,9%	0,7%	1,6%	0,6%	9,0%	0,5%	2,8%	6,1%

Tabelle 3.3: FACS-Ergebnisse der transduzierten FB an Tag 0 und Tag 14

Zellen und einen konstanten Gesamtanteil GFP-exprimierender Zellen. Da diese Abweichungen jedoch größtenteils innerhalb der Standardabweichung liegen, ergibt sich auch bei den FB insgesamt eine stabile Expression von MDR und GFP. Da die Resultate keine bedeutsamen Unterschiede zwischen Tag 0 und Tag 14 aufweisen und für den späteren Vergleich mit selektierten Zellen nur der Tag 14 relevant ist, wird zur Vereinfachung nur dieser für die weiteren Vergleiche berücksichtigt.

3.2.1.1.1 Vergleich der Transduktionseffizienz an unterschiedlichen Vektoren

In **Abbildung 3.4** sind die Transduktionsresultate unterschiedlicher Vektoren an KC (Tag 14) dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der Vektor BGIM aus dem Rahmen fällt. So findet sich hier ein sehr hoher Anteil GFP-/MDR+ Zellen von 52,7 % im Gegensatz zu weniger als 3 % bei den anderen beiden GFP-Vektoren. Außerdem finden sich mit 2,8 % gegenüber 17,3 und 16,1 % bei den mit QGIM und BMIG transduzierten KC wenig GFP+/MDR- Zellen. Der Anteil GFP+/MDR+ Zellen ist mit 17,9 % ebenfalls am niedrigsten, steigt auf 35,5 % bei mit BMIG transduzierten und ist bei mit QGIM transduzierten KC schließlich mit 47,9 % am höchsten. Somit ergibt sich für die Transduktionseffizienz der KC mit den verschiedenen GFP-Vektoren, bezogen auf den Anteil der GFP+/MDR+ KC, die Reihenfolge QGIM > BMIG > BGIM. Die gleichen Resultate ergeben sich für den erzielten Anteil an GFP-produzierenden Zellen. Bei der Betrachtung wieviele MDR+ Zellen durch Transduktion entstehen, zeigt der Vektor BGIM dagegen die höchste Effizienz, gefolgt von QGIM, BMIG, QEIM. Der Vergleich der Vektoren QEIM und QGIM, welche sich nur durch das erste Gencistron

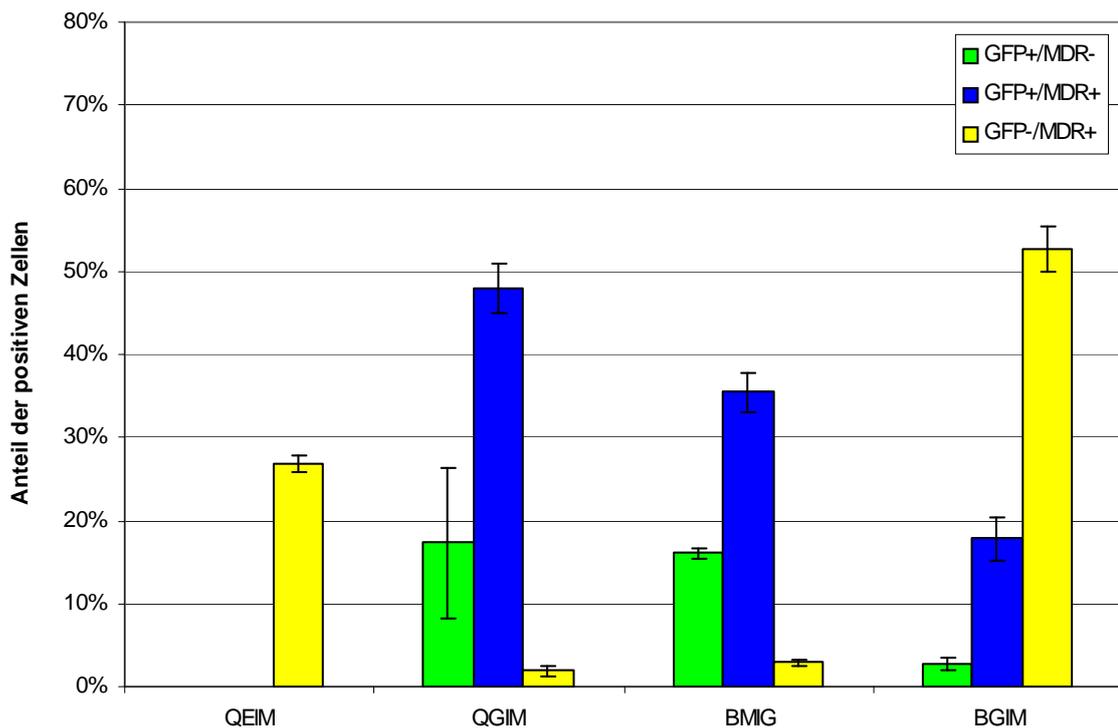


Abbildung 3.4: Vergleich der Transduktionseffizienz der unterschiedlichen Vektoren in KC

(EPO bzw. GFP) unterscheiden, ergibt hierbei für den Vektor QGIM mit 49,8 % gegenüber 26,9 % beim Vektor QEIM einen fast doppelt so hohen Anteil MDR-exprimierender KC.

Der Vergleich der Vektoren in FB ist in **Abbildung 3.5** dargestellt. Die Resultate entsprechen weitestgehend denen in KC. Der Vektor BGIM fällt auch hier mit 45,5% GFP-/MDR+ Zellen gegenüber 2,2 % und 2,9 % bei den Vektoren QGIM und BMIG aus dem Rahmen. Der Anteil GFP+/MDR+ Zellen liegt hier mit 8,3 % nochmal deutlich niedriger als die 38,4 % bei den mit BMIG transduzierten FB sowie die 56,7 % bei den mit QGIM transduzierten FB, ebenso die Rate an GFP+/MDR- Zellen (1,6 % beim Vektor BGIM, 10,4 % beim Vektor QGIM und 11,5 % beim Vektor BMIG). Somit ist, bezogen auf GFP+ sowie GFP+/MDR+ FB, QGIM vor BMIG und BGIM der effizienteste Vektor. Auch zeigt sich hier, dass bei den mit dem Vektor QGIM transduzierten FB mit 58,9 % der Anteil MDR+ Zellen viermal so hoch ist wie bei den mit dem Vektor QEIM transduzierten FB (15,1%), was nochmals deutlich geringer als bei den KC ist.

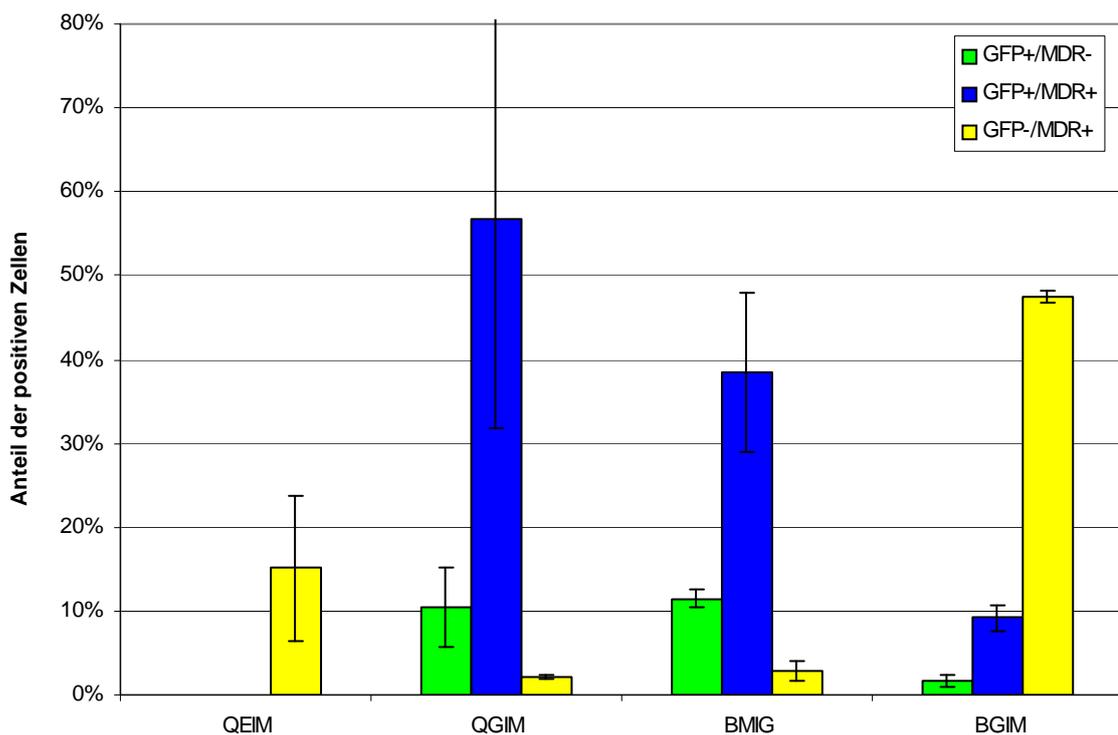


Abbildung 3.5: Vergleich der Transduktionseffizienz unterschiedlichen Vektoren in FB

3.2.1.1.2 Vergleich der Transduktionseffizienz von Keratinozyten und Fibroblasten

Nachdem die Vektoren untereinander verglichen wurden, folgt nun der zellspezifische Vergleich der einzelnen Vektoren, welcher in **Abbildung 3.6** dargestellt ist. Insgesamt zeigen sich hier nur geringfügige Unterschiede für KC und FB. Die KC-Transduktion mit den Vektoren QGIM und BMIG führt zu 47,9 % und 35,5 %, die FB-Transduktion zu 56,7 % bzw. 38,4 % GFP+/MDR+ Zellen. Der Anteil GFP+/MDR- Zellen beträgt für den Vektor QGIM bei KC 17,3 %, bei FB 10,4%, für den Vektor BMIG bei KC 16,1 %, bei FB 11,5 %. Und die Rate GFP-/MDR+ KC bzw. FB ist für QGIM (1,9% bzw. 2,2%) und BMIG (je 2,9 %) wie auch der Gesamtanteil GFP-positiver KC bzw. FB (nach QGIM-Transduktion 65,3% bzw. 67,2%; nach BMIG-Transduktion 51,3% bzw. 49,9%) nahezu gleich. Der Gesamtanteil MDR+Zellen beträgt nach Transduktion mit dem Vektor QGIM 49,8% KC bzw. 58,9 % FB, nach BMIG-Transduktion 38,4% KC und 41,3% FB. Somit besitzen beide Vektoren in FB eine geringfügig höhere Effizienz

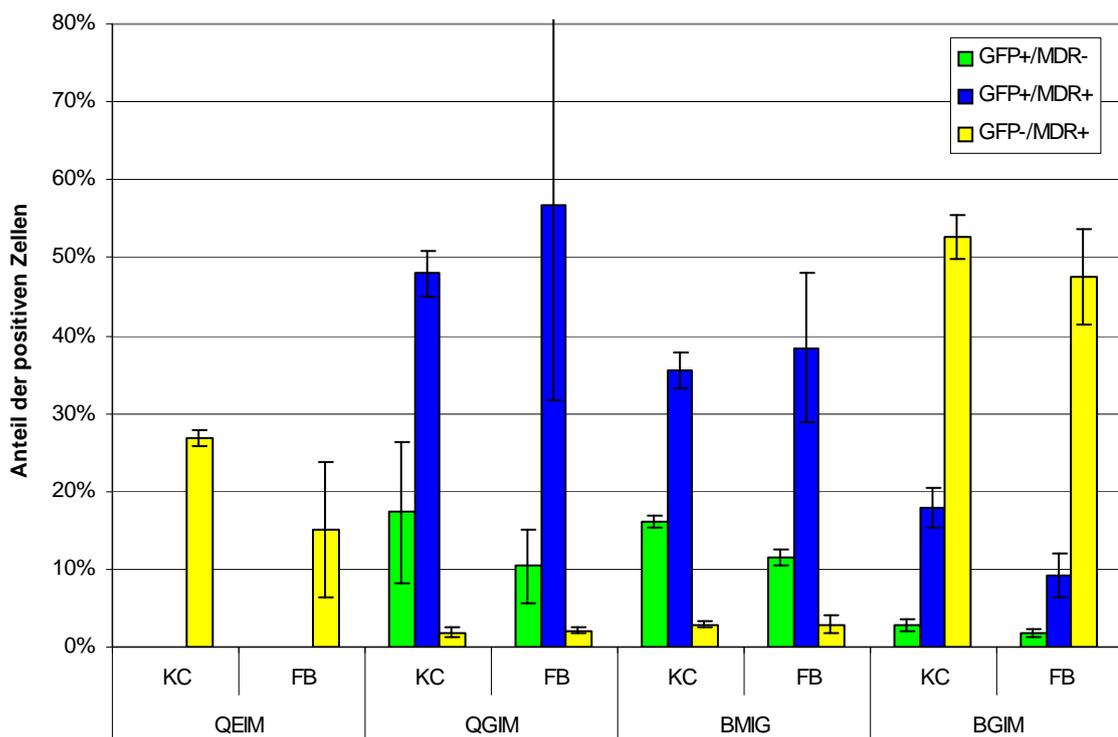


Abbildung 3.6: Vergleich der Transduktionseffizienzen von KC und FB bei den verschiedenen Vektoren

als in KC. Im Gegensatz dazu zeigt der Vektor BGIM in KC sowohl für MDR+ und/oder GFP+ Zellen etwas bessere Transduktionsergebnisse als in FB. Transduktion mit dem Vektor QEIM führt dagegen zu deutlich höheren Raten an MDR+KC (26,9%) als MDR+FB (15,6 %).

3.2.1.1.3 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des GFP

Neben den Anteilen positiv transduzierter Zellen lassen sich mit der FACS-Analyse auch die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der verwendeten Fluorochrome bzw. des GFP bestimmen. Die MFI ist dabei ein Maß für das Verhältnis der durchschnittlichen Menge des pro Zelle detektierten Proteins. Daraus lassen sich jedoch keine absoluten Werte ableiten. Auch ist der Vergleich der MFI verschiedener Fluorochrome miteinander nicht möglich, da die absoluten Fluoreszenzintensitäten sich unterscheiden. In **Abbildung 3.7** sind die MFI des GFP für die unterschiedlichen Vektoren und Zellen dargestellt. Außerdem wurde noch zwischen GFP+/MDR- und GFP+/MDR+ Zellen sowie der Summe aus beiden (GFP+/MDR+/-) unterschieden. Dabei zeigen GFP+Zellen, die auch MDR exprimieren (GFP+/MDR+ Zellen) in allen

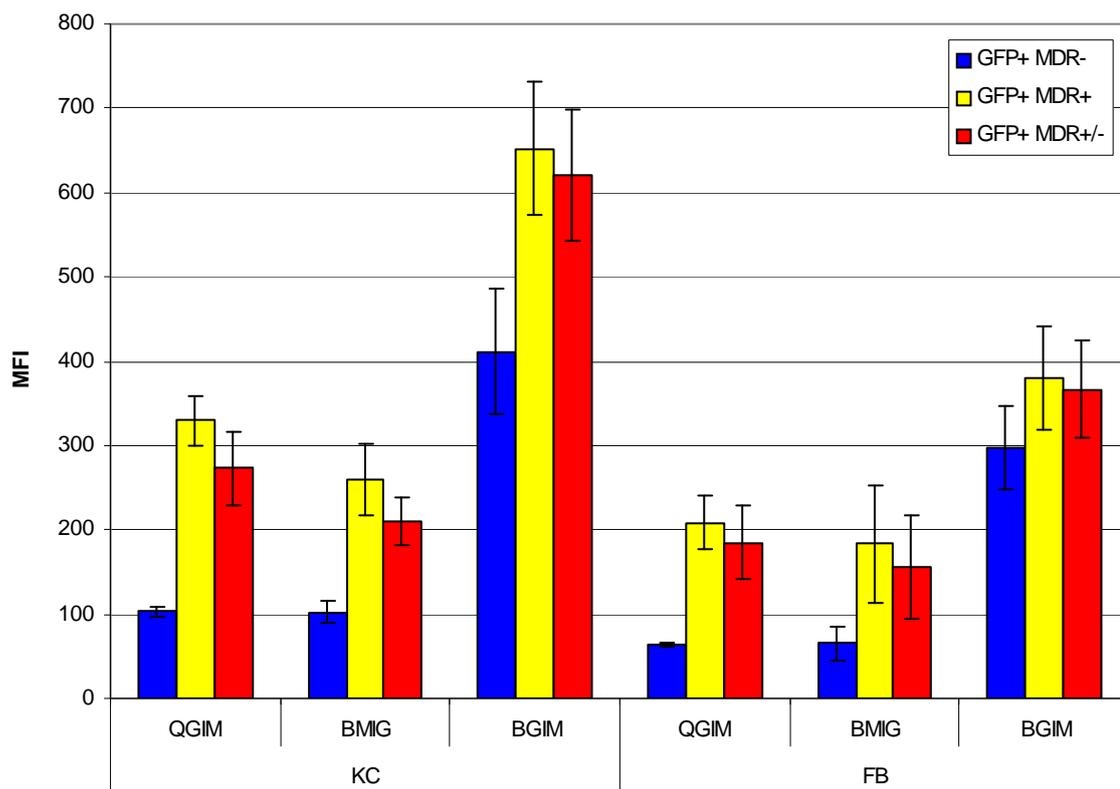


Abbildung 3.7: Ausmaß der GFP-Expression (MFI) in transduzierten KC und FB

Fällen eine, teilweise sogar deutlich, höhere GFP-Expression als MDR-/GFP+ Zellen. Für alle GFP-exprimierenden, also die GFP+/MDR+/-, Zellen ergeben sich somit als Mittelwerte der GFP-MFI unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zellzahlen Werte, die etwas niedriger als die der GFP+/MDR+ aber deutlich höher als die der GFP+/MDR- Zellen liegen. Für die weiteren Betrachtungen werden nur diese Mittelwerte berücksichtigt, da sich aus den Einzelwerten keine zusätzlichen, für die Zielsetzung dieser Arbeit bedeutsamen Erkenntnisse, ergeben.

In **Abbildung 3.8** ist das Ausmaß der GFP-Expression unterschiedlicher Vektoren in KC und FB gegenübergestellt. Die mit dem Vektor BGIM transduzierten KC weisen eine GFP-MFI auf, die fast das dreifache der in BMIG-transduzierten und mehr als das doppelte der in QGIM-transduzierten KC gemessenen MFI beträgt. Ein ähnliches Bild ergibt sich in FB.

In Bezug auf die pro Zelle gebildete GFP-Menge ergibt der Vektor BGIM in KC und FB die höchste Expressionsrate, gefolgt vom Vektor QGIM, der etwas effizienter als der Vektor BMIG ist. Beim Vergleich von KC und FB zeigt sich, dass

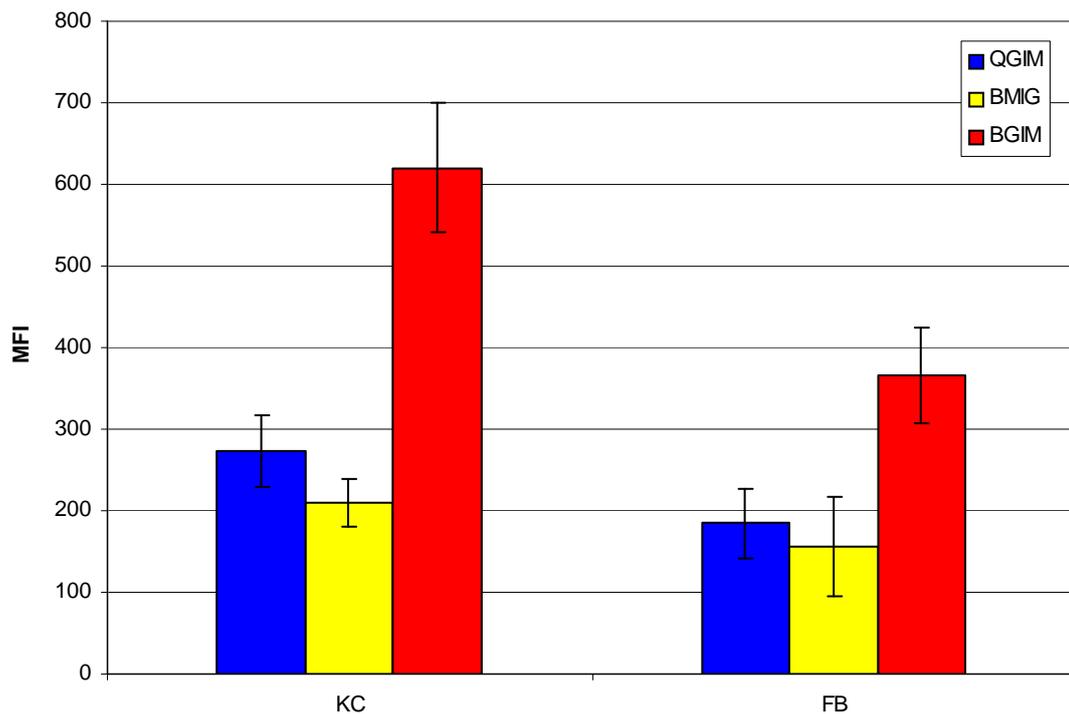


Abbildung 3.8: Vergleich der GFP-Expression (MFI) unterschiedlicher Vektoren in KC und FB

die GFP-MFI aller Vektoren in KC höher als in FB ist. Sie liegt in KC beim 1,3 fachen für den Vektor BMIG, 1,5 fachen für den Vektor QGIM und 1,7 fachen für den Vektor BGIM über der in FB. Somit produzieren alle Vektoren in KC mehr GFP als in FB.

Setzt man das durch die MFI-Messung ermittelte Ausmass der GFP-Expression mit dem Anteil der GFP+Zellen in Beziehung, so ergibt sich, dass die Transduktion mit den Vektoren QGIM und BMIG zwar zu ungefähr gleich hohen prozentualen Anteilen an GFP+ KC und FB führt, jedoch in KC eine höhere GFP-Expression als in FB zur Folge hat. Insgesamt ist die Transduktion mit diesen Vektoren, bezogen auf das GFP, somit in KC effizienter als in FB. Transduktion mit dem Vektor BGIM ergibt für KC sogar sowohl einen höheren Anteil GFP+Zellen als auch stärkere GFP-Expression als für FB.

3.2.1.1.4 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des MDR

Abbildung 3.9 zeigt die Fluoreszenzintensitäten des Phycoerythrins (PE), welches zur Detektion des MDR diente. Da für die Messungen in KC beim Vektor QEIM Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet wurde, ist hier ein Vergleich mit den anderen Vektoren aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzstärken der Farbstoffe nicht

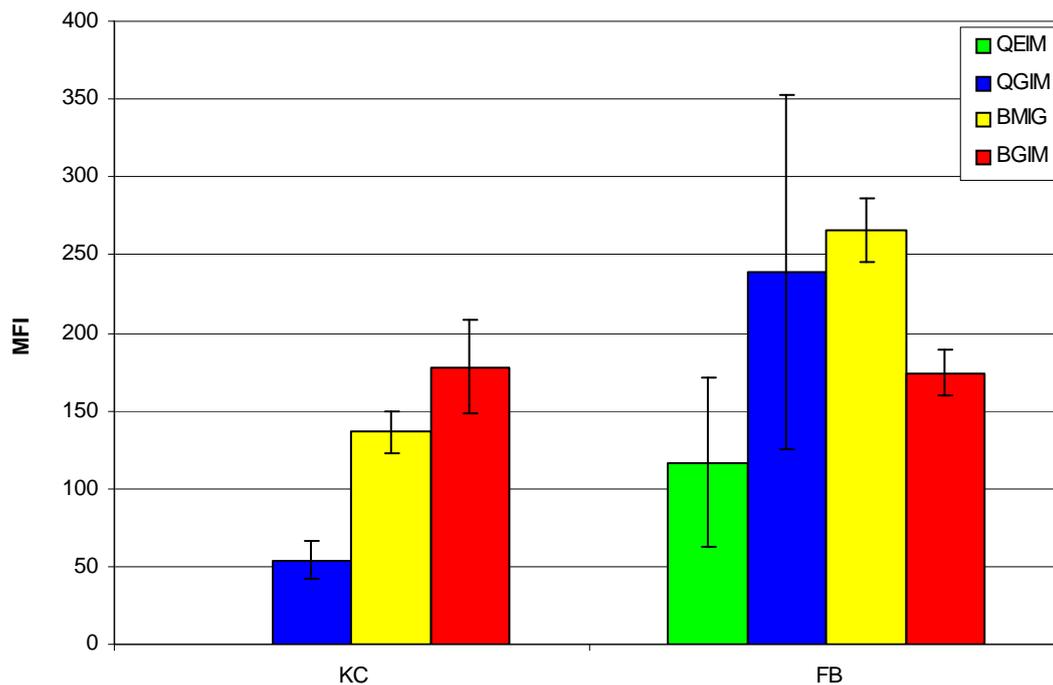


Abbildung 3.9: Vergleich der MDR-Expression (MFI, detektiert durch PE) unterschiedlicher Vektoren in KC und FB (da in QEIM-transduzierten KC die MDR-MFI durch FITC detektiert wurde, taucht diese hier nicht auf)

möglich. Die MDR-Expressionsstärke in QGIM-transduzierten KC liegt weit unter den Werten der mit den Vektoren BMIG und BGIM transduzierten Zellen. In FB ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Hier ist die MDR-MFI in BMIG-transduzierten FB am höchsten, in FB, die mit dem Vektor QGIM oder BGIM transduziert wurden, dagegen deutlich niedriger. Somit hängt das Ausmass der MDR-Expression zelltypspezifisch von dem jeweils verwendeten Transduktionsvektor ab. Interessant ist auch der Vergleich der FB, die mit QGIM oder QEIM transduziert wurden, da der Vektor QGIM in FB eine doppelt so hohe MDR-Expression pro Zelle aufweist als der Vektor QEIM. Bei der Betrachtung der MDR-Expression in KC und FB (**Abbildung 3.10**) zeigt sich, dass nach Transduktion mit QGIM und BMIG die MDR-Expression in FB deutlich gegenüber der in KC gesteigert ist, und zwar auf mehr als das vierfache für den Vektor QGIM und fast das Doppelte für den Vektor BMIG, während sie für den Vektor BGIM auf gleichem Niveau bleibt.

Der Vergleich der erzielten MDR-Expressionsstärke mit dem Anteil MDR+ Zellen zeigt, dass die Transduktion der KC mit dem Vektor BGIM sowohl den höchsten Anteil MDR+ Zellen als auch die höchste MDR-Expression erzielt. Dagegen ergibt die

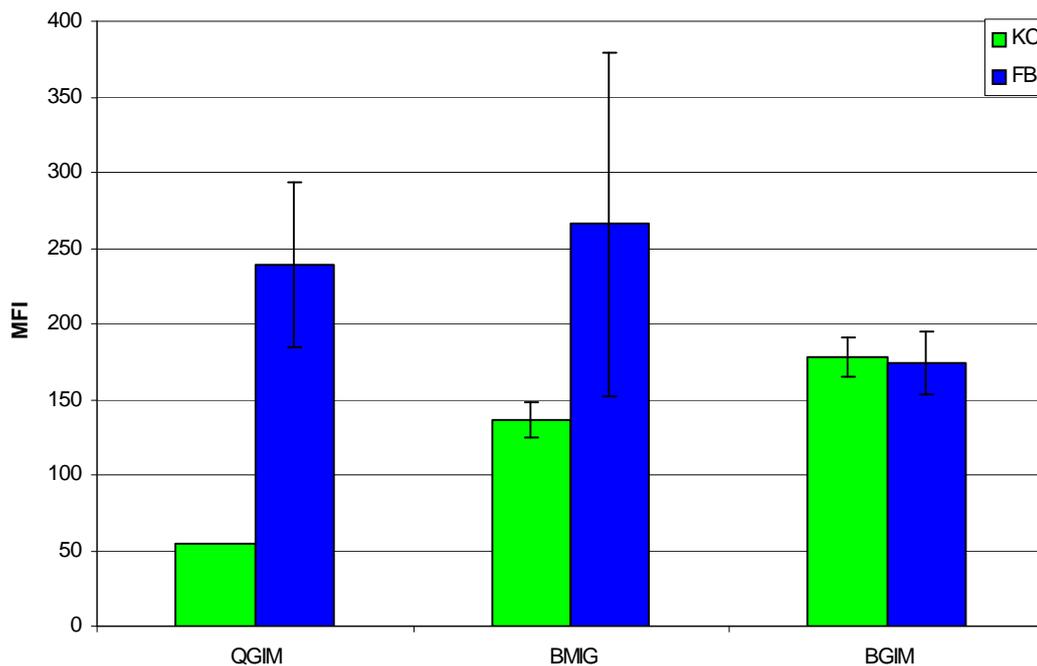


Abbildung 3.10: Vergleich der MDR-Expressionsstärke (MFI) in transduzierten KC und FB in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Transduktionsvektoren

Transduktion mit dem Vektor QGIM zwr den zweithöchsten Anteil MDR+ KC, aber die niedrigste Expressionsrate für das MDR, während die Expressionsrate nach Transduktion mit dem Vektor BMIG trotz des geringsten Prozentsatzes MDR+ KC sehr hoch ist. Für die FB ergeben sich im Vergleich zu den KC völlig andere Resultate. So ist die MDR-Expression der mit dem Vektor BMIG transduzierten FB trotz des niedrigsten Prozentsatzes MDR+ Zellen am höchsten, während es sich für die mit dem Vektor BGIM transduzierten FB genau umgekehrt verhält

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass beim Vergleich der 3 GFP-Vektoren in KC und FB in Bezug auf die Expression des an das GFP gekoppelten MDR der Vektor BGIM die höhere Effizienz als Vektoren BMIG und QGIM aufweist.

Die einzelnen Ergebnisse sind noch einmal in **Tabelle 3.4** für die KC und in **Tabelle 3.5** für die FB dargestellt.

Tag	Vektor		GFP+	GFP+		GFP-	GFP+	GFP+/-
			MDR-	MDR+		MDR+	MDR +/-	MDR +
			GFP	GFP	MDR	MDR	GFP	MDR
d0	QGIM	MW	76,1	262,0	194,3	65,1	227,8	188,5
		SD	4,8	48,3	51,6	20,8	61,0	52,1
	BMIG	MW	70,9	192,8	173,5	86,1	155,0	168,0
		SD	24,3	70,6	11,9	14,2	57,1	10,8
	BGIM	MW	352,7	411,9	269,8	212,1	403,3	221,5
		SD	44,6	4,7	21,7	22,8	9,0	21,4
d14	QGIM	MW	64,1	208,1	245,5	67,1	184,9	239,2
		SD	2,5	31,5	116,3	16,0	42,8	114,1
	BMIG	MW	65,3	183,2	279,5	86,8	156,5	265,6
		SD	19,5	70,0	27,6	26,1	61,0	20,7
	BGIM	MW	297,3	378,9	204,3	168,5	366,4	174,2
		SD	50,4	61,5	21,8	14,2	58,0	14,5

Tabelle 3.4: Expressionsstärke des GFP bzw. MDR in KC, die mit unterschiedlichen bicistronischen, GFP- und MDR-kodierenden Vektoren transduziert wurden

Tag	Vektor		GFP+	GFP+		GFP-	GFP+	GFP+/-
			MDR-	MDR+		MDR+	MDR +/-	MDR +
			GFP	GFP	MDR	MDR	GFP	MDR
d0	QGIM	MW	258,5	588,9	87,4	22,7	531,5	71,7
		SD	133,9	88,8	24,7	0,6	91,4	3,6
	BMIG	MW	63,7	173,1	78,3	31,9	142,1	75,2
		SD	5,0	23,8	16,4	7,2	20,7	15,2
	BGIM	MW	415,2	512,4	172,1	107,1	505,9	128,4
		SD	83,4	119,0	5,7	9,2	121,6	7,9
d14	QGIM	MW	103,0	329,4	55,3	21,2	272,9	54,1
		SD	5,2	29,0	12,4	2,3	43,9	12,2
	BMIG	MW	102,5	259,3	140,0	89,3	210,2	136,3
		SD	12,8	42,0	16,5	32,4	29,2	13,2
	BGIM	MW	411,0	652,3	225,7	162,1	620,6	178,1
		SD	74,4	78,5	45,7	25,0	78,8	30,3

Tabelle 3.5: Expressionsstärke des GFP bzw. MDR in FB, die mit unterschiedlichen bicistronischen, GFP- und MDR-kodierenden Vektoren transduziert wurden

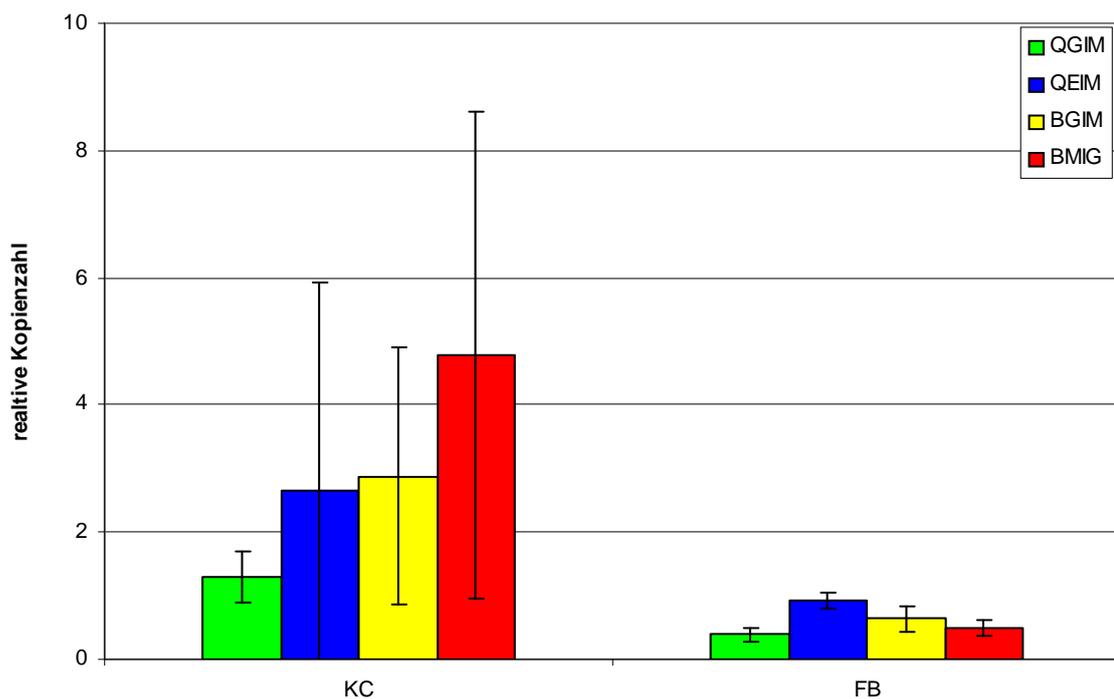


Abbildung 3.11: Relative Anzahl retroviraler Vektorkopien in transduzierten Zellen

3.2.1.2 Real-Time PCR

Mittels Real-Time PCR wurde die relative Anzahl der integrierten retroviralen Genkopien im Genom der transduzierten Zellen bestimmt. Dieser Wert gibt an, wie viele Kopien des retroviralen Vektors im Vergleich zu einem Standardgen in die Zelle integriert wurden. In dieser Arbeit wurde dafür das Verhältnis von Genkopien des MDR, das Bestandteil aller retroviralen Vektoren ist, mit der Anzahl an Genkopien des HCK-Gens, welches ausschließlich Bestandteil des Zellgenoms ist, bestimmt. In **Abbildung 3.11** sind die Ergebnisse bezogen auf alle transduzierten Zellen dargestellt. Es zeigt sich, dass in KC deutlich höhere Kopienzahlen vorzufinden sind als in FB. Während das Kopienverhältnis in den transduzierten FB für alle Vektoren relativ ähnliche Werte aufweist, gibt es in den KC einen Trend zunehmender Kopienzahl in Abhängigkeit vom für die Transduktion verwendeten Vektor mit den höchsten Werten nach Transduktion mit dem Vektor BMIG und den niedrigsten nach Transduktion mit dem Vektor QGIM.

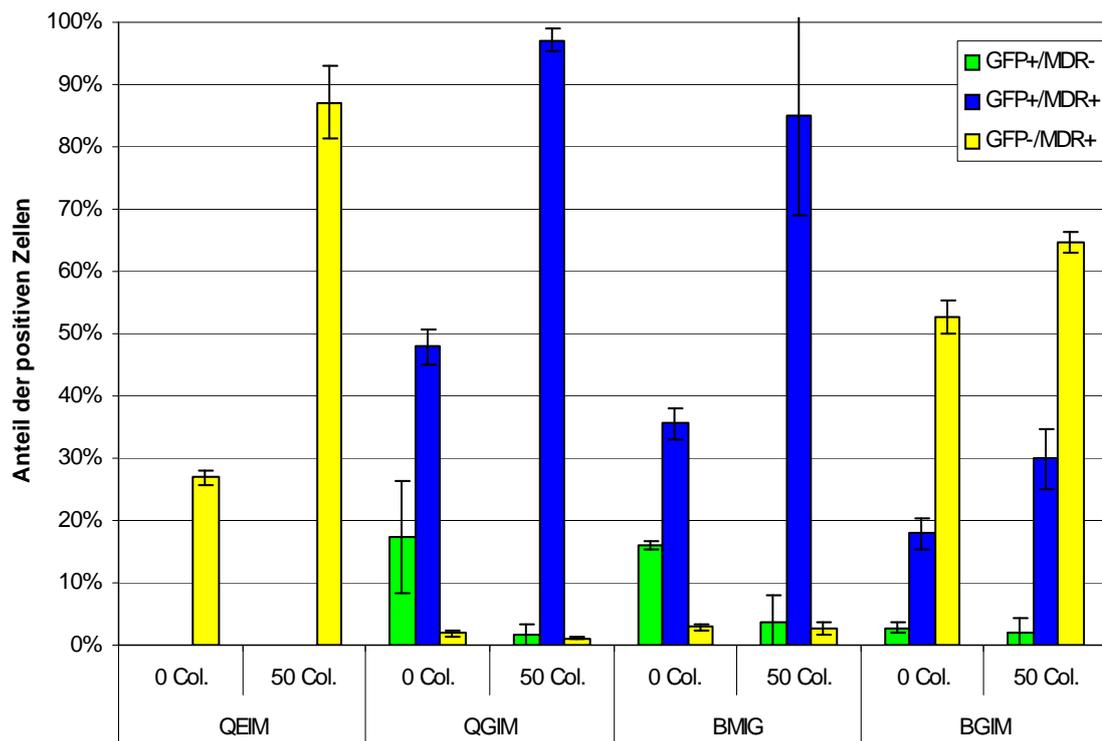


Abbildung 3.12: Vergleich der FACS-Ergebnisse Kolchizin (50 ng/ml)-selektierter (50 Col.) und unselektierter (0 Col.) KC nach Transduktion mit unterschiedlichen Vektoren

3.2.2 Vergleich mit Kolchizinselktion

KC und FB wurden mit den Überständen der retroviralen Verpackungszellen transduziert und als Monolayer mit oder ohne Zugabe von Kolchizin kultiviert. Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde dann das Ausmaß der MDR-, GFP- und EPO-Expression analysiert. Dabei ging darum, in welchem Maß die Kolchizinselktion in Abhängigkeit vom Transduktionsvektor oder der transduzierten Zelle die Expression der transduzierten Genelemente steigern kann.

3.2.2.1 FACS-Analyse

In **Abbildung 3.12** ist der Vergleich von selektierten und unselektierten transduzierten KC dargestellt. Es zeigt sich, dass die Selektion zu einer, z.T. sehr starken, Zunahme an MDR-positiven Zellen führte. Der Gesamtanteil MDR exprimierender Zellen reicht dabei von 81,1 % bei KC, die mit dem Vektor QEIM transduziert wurden, über 87,7 % BMIG-transduzierter und 94,6 % BGIM-transduzierter KC bis hin zu 98,2 % QGIM-transduzierter KC.

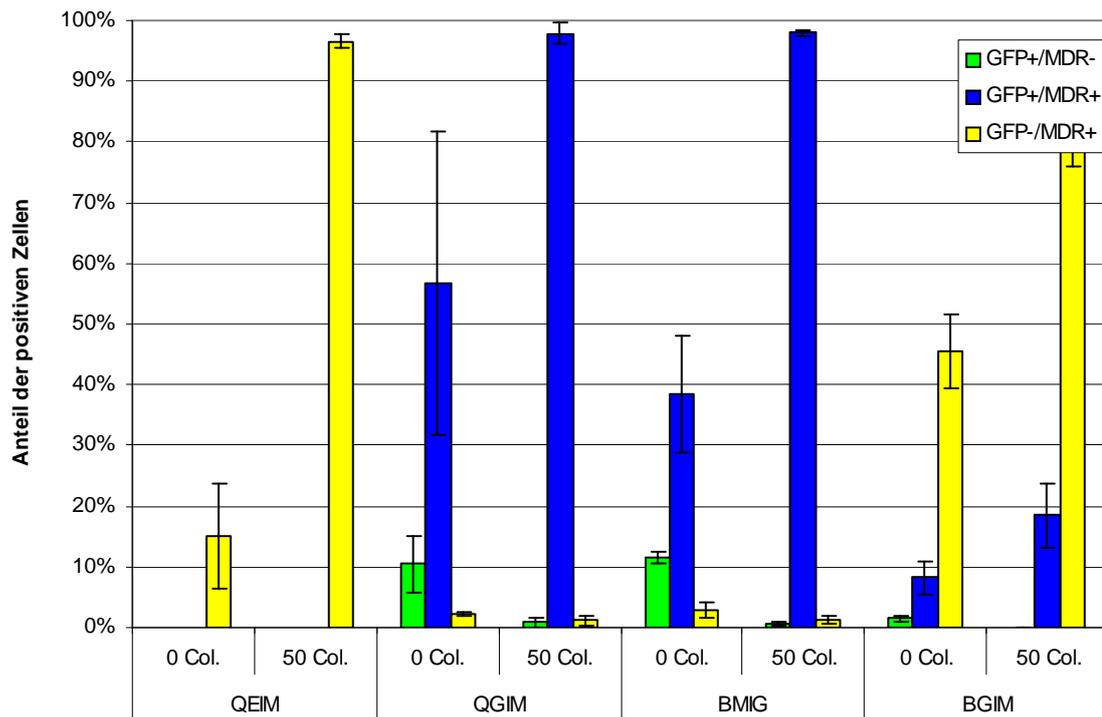


Abbildung 3.13: Vergleich der FACS-Ergebnisse Kolchizin (50ng/ml)-selektierter (50 Col.) und unselektierter (0 Col.) FB nach Transduktion mit unterschiedlichen Vektoren

In ähnlicher Weise kommt es nach Transduktion mit allen drei Vektoren, in denen das GFP-Gen an das MDR-Gen gekoppelt ist, durch Kolchizins Selektion zu einer Zunahme GFP+ Zellen. QGIM-transduzierte, selektierte KC weisen einen Anteil von 98,7%, BMIG-transduzierte, selektierte von 98,8% GFP+ KC auf. Selektion BGIM-transduzierter KC führt dagegen nur zu 31,8 % GFP+ KC, wenngleich der Anteil MDR+KC nahezu 100% beträgt. Trotz Kolchizinbehandlung bleibt die Effizienz von BGIM zur Expression des zweiten, vor das MDR gekoppelten Gens, also niedrig.

Die Resultate der Selektion von FB sind in **Abbildung 3.13** dargestellt. Sie entsprechen weitestgehend denen der Selektion von KC. Die Selektion QGIM- und BMIG-transduzierter FB ergibt einen Anteil von 98,7 % und 98,6 % GFP+. Zwar weisen BGIM-transduzierte FB nach Selektion auch einen sehr hohen Anteil MDR+ Zellen (98,8 %) auf, aber nur 18,7 % zeigen auch GFP-Expression.

In **Tabelle 3.6** und **Tabelle 3.7** sind die Ergebnisse noch einmal aufgeführt, auch unter Einschluss der durch Selektion mit 20 ng/ml Kolchizin ermittelten Werte, die denen für 50 ng/ml im Wesentlichen entsprechen.

Vektor	Nr.	0 ng/mL Colchicin				20 ng/mL Colchicin				50 ng/mL Colchicin			
		GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+
QEIM	MW	73,3%			26,9%	10,7%			88,9%	12,7%			87,1%
	SD	1,0%			1,1%	2,4%			2,6%	5,6%			5,8%
QGIM	MW	33,2%	17,3%	47,9%	1,9%	0,9%	4,1%	86,5%	7,8%	0,3%	1,6%	97,1%	1,1%
	SD	7,1%	9,1%	2,9%	0,6%	0,9%	5,2%	17,8%	11,0%	0,4%	1,8%	1,8%	0,1%
BMIG	MW	45,6%	16,1%	35,5%	2,9%					8,4%	3,8%	85,0%	2,7%
	SD	3,0%	0,7%	2,4%	0,4%					12,0%	4,1%	15,9%	0,9%
BGIM	MW	26,7%	2,8%	17,9%	52,7%					3,5%	1,9%	29,9%	64,7%
	SD	5,4%	0,8%	2,6%	2,7%					1,9%	2,4%	4,8%	1,7%

Tabelle 3.6: FACS-Ergebnisse Kolchizinselektierter und unselektierter KC, die mit unterschiedlichenbicistronischen Vektoren transduziert waren.

Vektor	Nr.	0 ng/mL Colchicin				20 ng/mL Colchicin				50 ng/mL Colchicin			
		GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+
QEIM	MW	85,0%			15,1%	6,4%			93,6%	3,3%			96,6%
	SD	8,8%			8,7%	2,8%			2,6%	0,9%			1,0%
QGIM	MW	30,6%	10,4%	56,7%	2,2%	0,1%	0,5%	97,8%	1,6%	0,2%	0,9%	97,8%	1,1%
	SD	20,5%	4,8%	25,0%	0,3%	0,1%	0,3%	0,8%	0,6%	0,2%	0,8%	1,7%	0,8%
BMIG	MW	47,4%	11,5%	38,4%	2,9%					0,1%	0,6%	98,0%	1,4%
	SD	11,2%	1,0%	9,5%	1,1%					0,0%	0,3%	0,4%	0,6%
BGIM	MW	45,2%	1,6%	8,3%	45,5%					1,1%	0,1%	18,6%	80,2%
	SD	9,0%	0,5%	2,8%	6,1%					1,0%	0,0%	5,3%	4,3%

Tabelle 3.7: FACS-Ergebnisse Kolchizinselektierter und unselektierter FB, die mit unterschiedlichen bicistronischen Vektoren transduziert waren.

3.2.2.1.1 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des GFP

In **Abbildung 3.14** sind die mittleren GFP-Fluoreszenzintensitäten von KC und FB, die mit unterschiedlichen Vektoren transduziert wurden, jeweils mit und ohne Selektion gegenübergestellt. In allen Zellen steigt die GFP-MFI durch Selektion an. Somit führt die Kolchizinbehandlung der Zellen nicht nur zu einem höheren Anteil GFP-exprimierender Zellen, sondern auch zu einer gesteigerten GFP-Expression in den einzelnen Zellen. Hierbei findet sich nach Kolchizinselktion (50 ng/ml) in BGIM-transduzierten KC und FB die stärkste GFP-Expression, gefolgt von QGIM- und dann BMIG-transduzierten Zellen. Beim Vergleich der durch Selektion erreichten Zunahmen der MFI zeigt sich allerdings, dass in KC und FB, die mit QGIM und BMIG transduziert wurden, eine relativ große Steigerung erreicht werden kann, während diese bei den BGIM-transduzierten Zellen eher gering ausfällt.

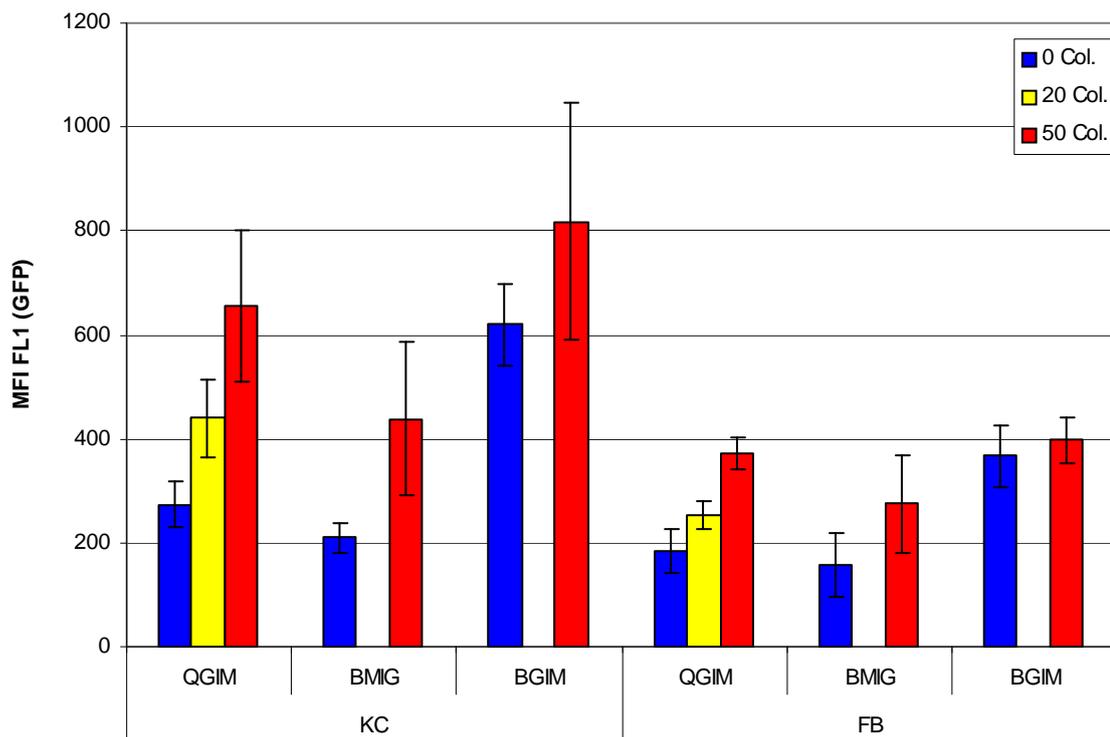


Abbildung 3.14: Vergleich der MFI des GFP von selektierten und unselektierten KC und FB

In **Abbildung 3.15** ist jeweils die GFP-MFI der mit unterschiedlichen Vektoren transduzierten KC und FB bei verschiedenen Kolchizindosierungen dargestellt. Dabei fällt auf, dass unabhängig von den verwendeten Vektoren und Kolchizindosierungen die GFP-Expression in FB niedriger ist als in KC. Transduzierte KC zeigen also sowohl vor als auch nach Selektion eine höhere Effizienz in Bezug auf die GFP-Expression.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Vektor QGIM als Modellvektor für den bicistronischen EPO-Vektor ausgewählt, in dem das GFP durch EPO ersetzt wurde. Entscheidend waren vor allem die deutlich höheren Transduktionseffizienzen mit hohen Raten GFP+/MDR+ KC und FB im Vergleich zu den anderen Vektoren. Zwar zeigten andere Vektoren z.T. höhere Genexpressionsstärken in den transduzierten Zellen, aber dies erbrachte - auch bei stärkerer MDR-Expression - keinen Selektionsvorteil bei der Anreicherung transduzierter Zellen durch Kolchizin, was ja die entscheidende Voraussetzung für den Einsatz des bicistronischen Vektors in der Haut sein sollte

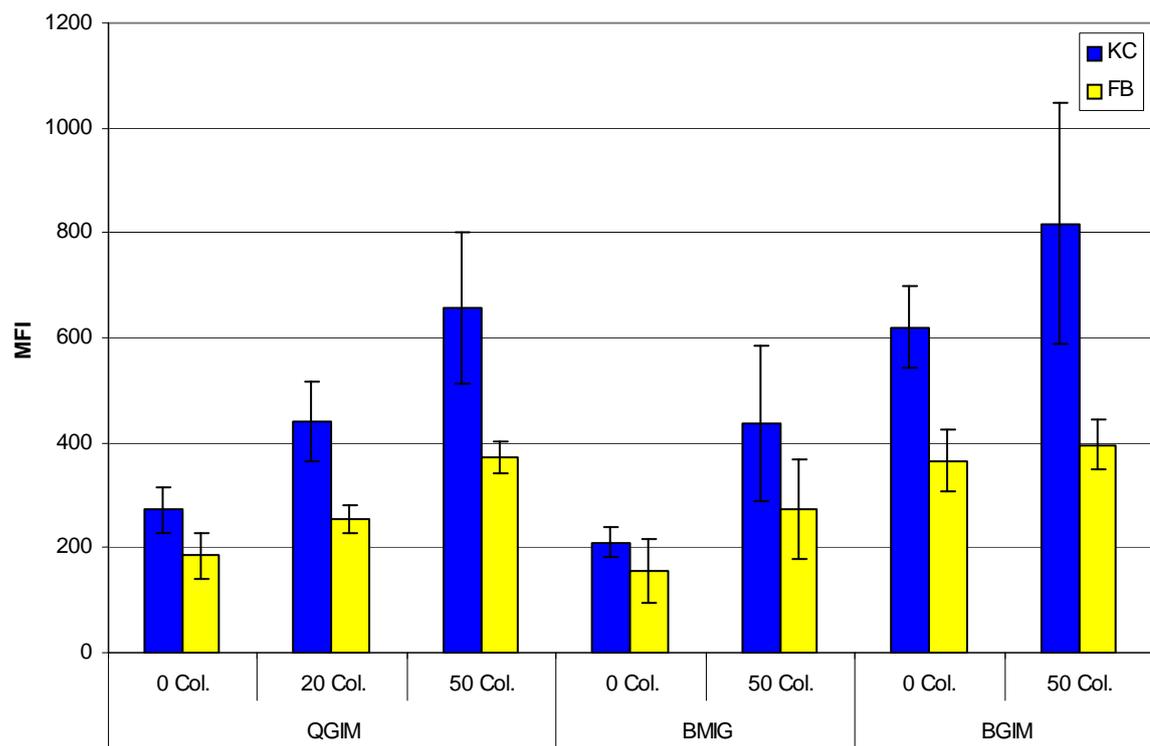


Abbildung 3.15: Vergleich der MFI des GFP von selektierten und unselektierten KC und FB

3.3 *In-vitro*-Untersuchungen zur EPO-Expression und Kolchizins Selektion genetisch modifizierter KC und FB

3.3.1 Untersuchungen in Monolayerkulturen

3.3.1.1 Bestimmung der EPO-Expression

3.3.1.1.1 Untersuchung ohne Kolchizins Selektion

In **Abbildung 3.16** sind die Ergebnisse der EPO-Bestimmung aus dem ELISA für die mit QEIM transduzierten Zellen dargestellt. Gezeigt sind Resultate für die drei einzelnen Versuche an Tag 0 und Tag 14. Sowohl die transduzierten KC als auch die FB produzieren in hohem Maße EPO. Das Ausmaß der EPO-Sekretion steigt dabei von Tag 0 zu Tag 14 leicht an. Anhand der Mittelwerte in **Abbildung 3.17** wird sofort deutlich, dass die EPO-Expression zu beiden Zeitpunkten in KC deutlich über der in FB liegt. In **Tabelle 3.8** sind die Ergebnisse noch mal zusammengefasst.

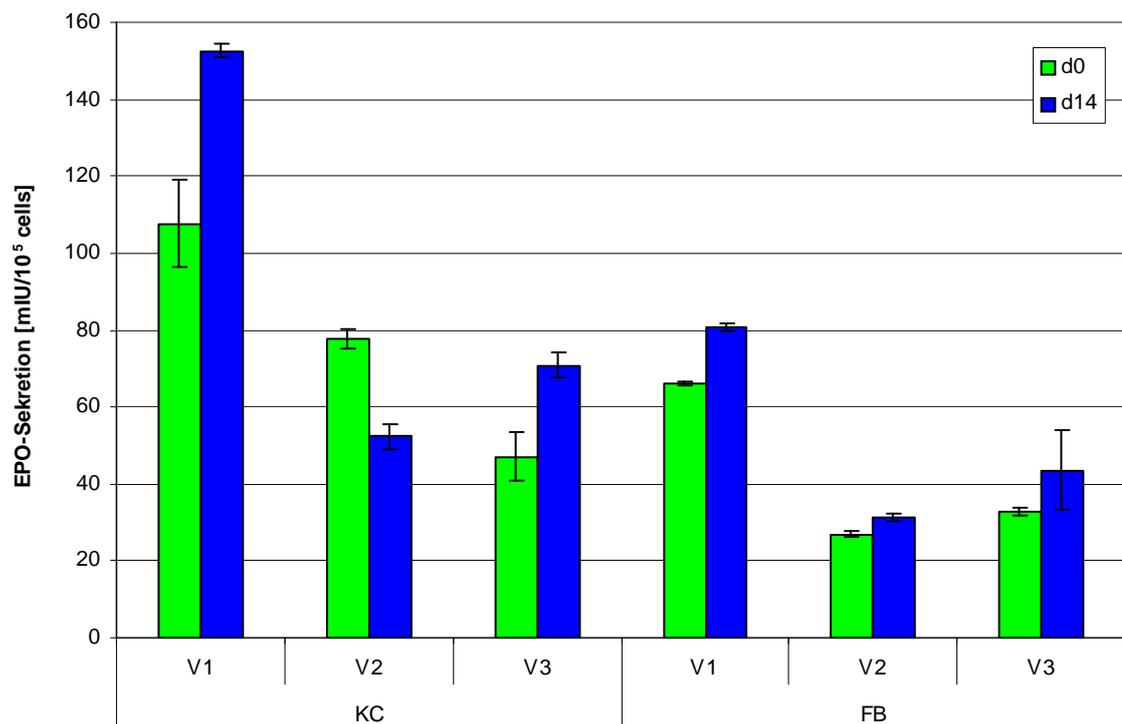


Abbildung 3.16: EPO-Sekretion QEIM-transduzierter KC und FB an Tag 0 und 14 (Versuche V 1-3)

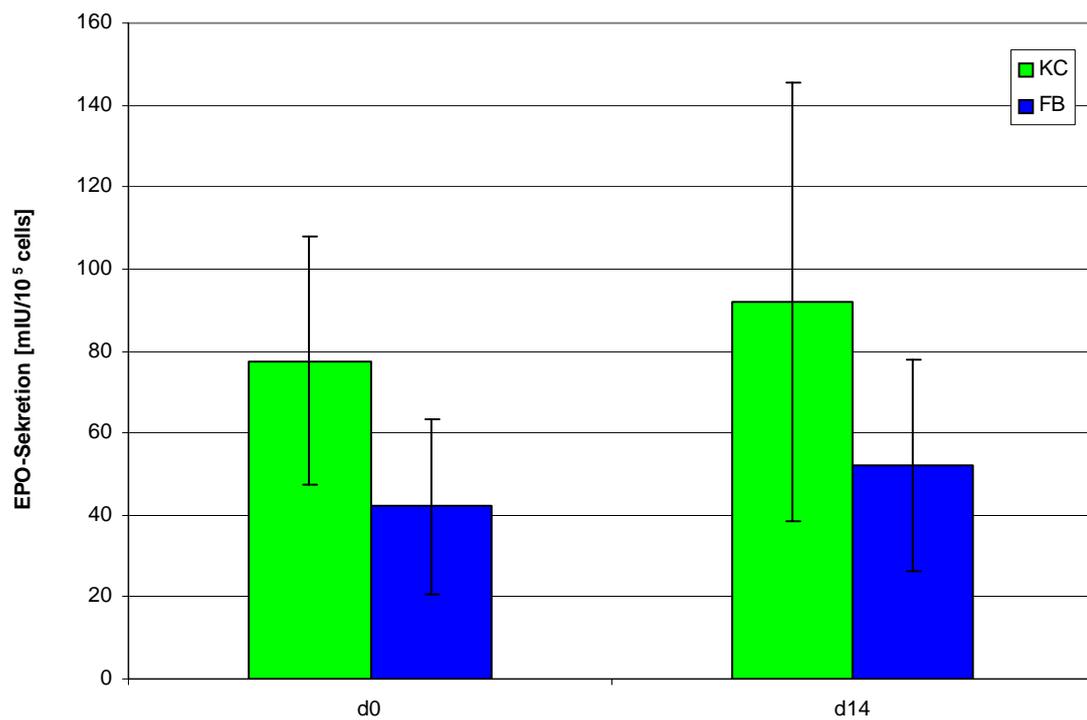


Abbildung 3.17: Mittelwerte der EPO-Expression QEIM-transduzierter KC und FB an Tag 0 und 14

		d0		d14	
			SD		SD
KC	V1	108	11,5	153	1,7
	V2	77,7	2,3	52,3	3,5
	V3	47,1	6,4	70,9	3,4
	MW	77,5	30,3	91,9	53,3
FB	V1	66,3	0,53	80,9	1,06
	V2	26,8	0,72	31,3	1,00
	V3	32,9	0,95	43,6	10,32
	MW	42,0	21,3	51,9	25,8

Tabelle 3.8: EPO-Sekretion transduzierter KC und FB (in mIU/10⁵ Zellen/4h)

3.3.1.1.2 Untersuchung mit Kolchizinselektion

Der Vergleich der EPO-Sekretion selektierter und unselektierter Zellen ist in **Abbildung 3.18** dargestellt. Dabei lässt sich sowohl in KC als auch in FB eine Zunahme der EPO-Expression durch die Kolchizinselektion feststellen. Während sich bei einer Kolchizindosis von 20 ng/ml der durchschnittliche EPO-Wert für KC mit 181 mIU/10⁵ Zellen auf gleichem Niveau wie für FB (171 mIU/10⁵ Zellen) bewegt, liegt er bei 50 ng/ml mit 545 mIU/10⁵ KC ein Vielfaches über dem für FB (228 mIU/10⁵ Zellen).

Die einzelnen Werte sind in **Tabelle 3.9** aufgeführt.

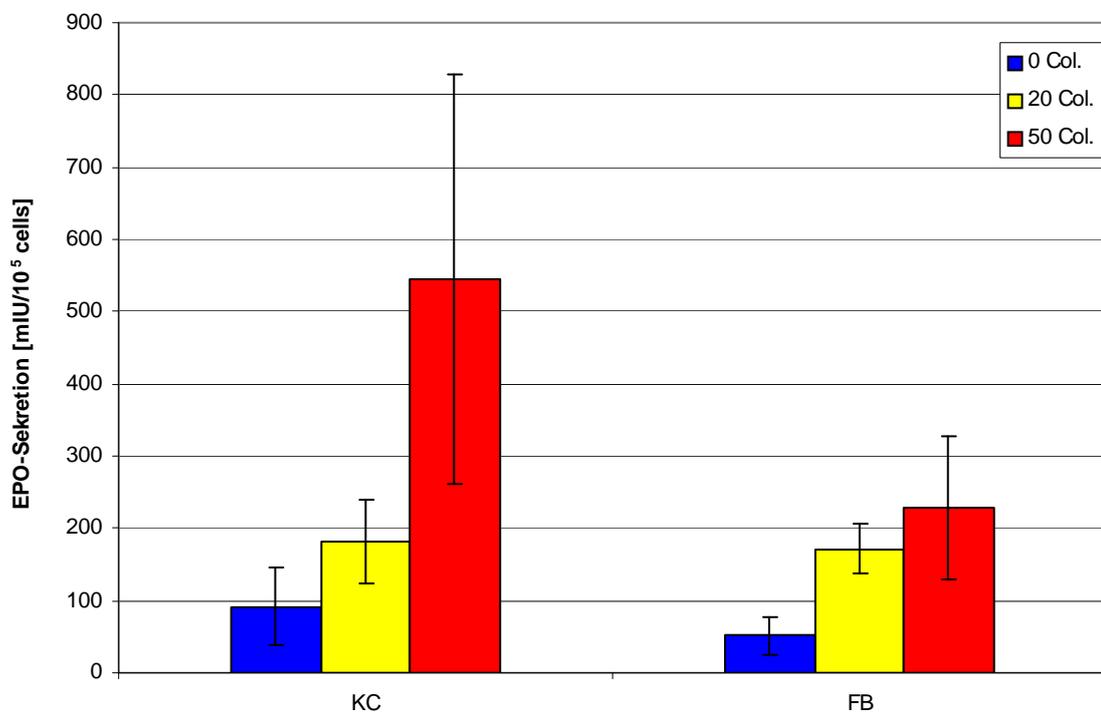


Abbildung 3.18: EPO-Sekretion QEIM-transduzierter Zellen, kultiviert mit unterschiedlichen Kolchizikonzentrationen (0-50ng/ml)

		0 Col.	20 Col.	50 Col.
KC	V1	153	124	871
	V2	52,3	237	369
	V3	70,9	184	394
	MW	91,9	181	545
	SD	53,3	56,7	283
FB	V1	80,9	193	338
	V2	31,3	131	148
	V3	43,6	190	200
	MW	51,9	171	228
	SD	25,8	34,8	98,1

Tabelle 3.9: Einzel- und Mittelwerte der EPO-Sekretion transduzierter KC und FB

3.3.2 Untersuchungen in Dermis-Hautkonstrukten

3.3.2.1 Bestimmung der EPO-Expression mit und ohne Kolchizinselektion

Nach den Bestimmungen in Monolayerkulturen wurde die EPO-Sekretion von transduzierten KC bestimmt, die auf Schweinedermis ausgesät waren. Dieses Modell gab einen Anhalt für die Sekretionsleistung der KC in einer stratifizierten Epidermis. In **Abbildung 3.19** sind die Mittelwerte der EPO-Sekretion aus drei Ansätzen dargestellt.

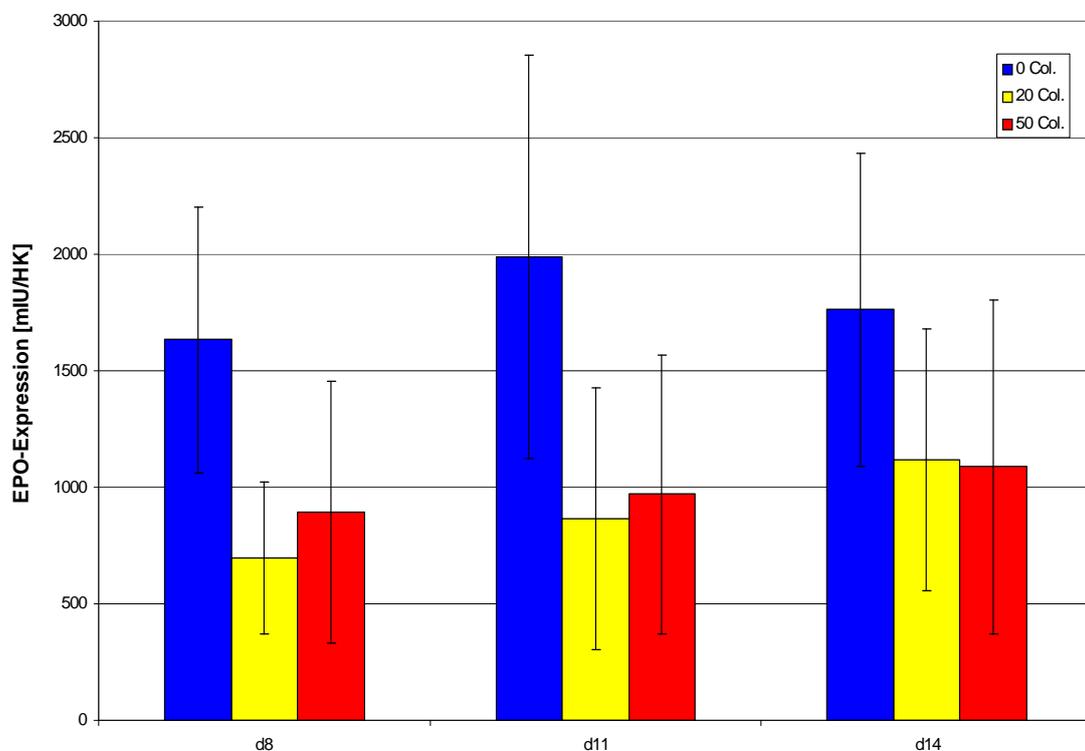


Abbildung 3.19: EPO-Expression von QEIM-transduzierten KC, die auf Schweinedermis ausgesät waren, unter verschiedenen Kolchizinkonzentrationen (0-50ng/ml) an Tag 8, 11, 14 (n=3)

Zunächst einmal lässt sich feststellen, dass die KC auch nach Ausbildung einer stratifizierten Epidermis zu allen Analysezeitpunkten EPO produzieren. Außerdem wird deutlich, dass die Selektion mit Kolchizin zu keiner Zunahme, sondern teilweise sogar zu einer Abnahme der EPO-Expression in der Epidermis führt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur Überprüfung drei weitere Folgeexperimente durchgeführt, diesmal mit humaner anstatt Schweinedermis. Die Resultate sind in **Abbildung 3.20** dargestellt. Auch hier lässt sich durch Kolchizins Selektion keine Steigerung der EPO-Sekretion erreichen.

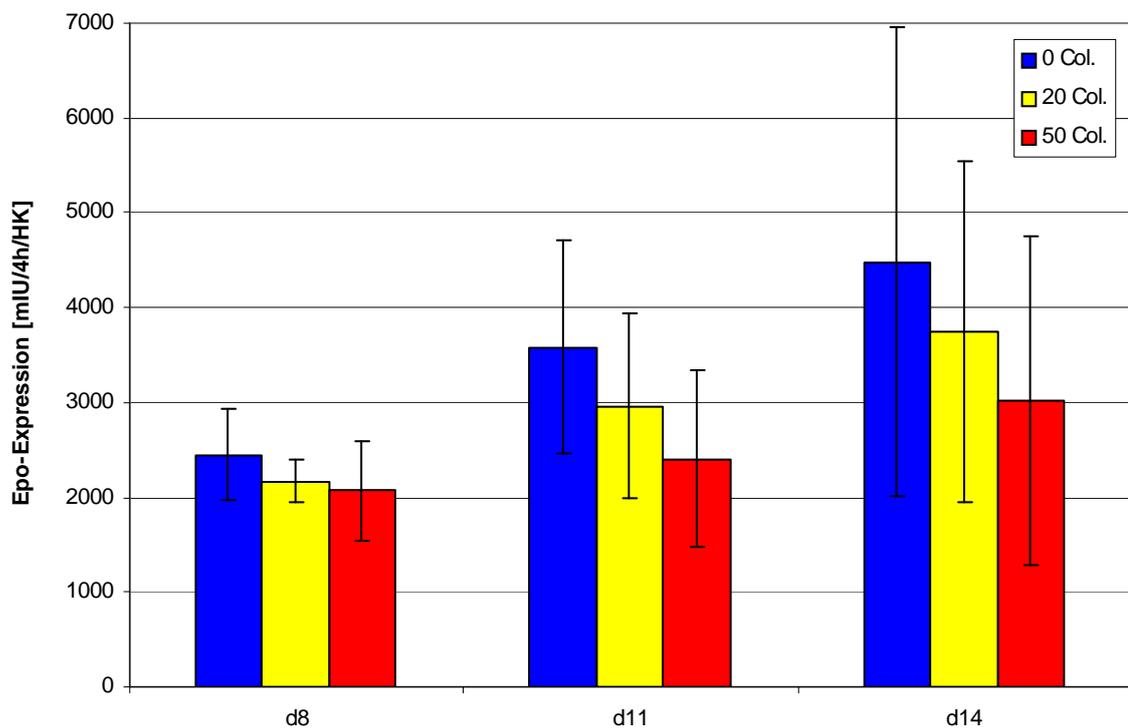


Abbildung 3.20 EPO-Expression QEIM-transduzierter KC, auf humane Dermis ausgesät, unter unterschiedlichen Kolchizinkonzentrationen (0-50ng/ml) an Tag 8, 11, 14 (n=3)

3.3.2.2 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse der KC, welche von den aus Schweinedermis hergestellten Hautkonstrukten geerntet wurden, ist in **Abbildung 3.22** (QGIM-transduzierte KC) und **Abbildung 3.21** (QEIM-transduzierte KC) dargestellt. Dabei werden die Ergebnisse für verschiedene Kolchizinkonzentrationen (0-50 ng/ml) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 11 und Tag 14) miteinander verglichen. Beim QGIM-transduzierten

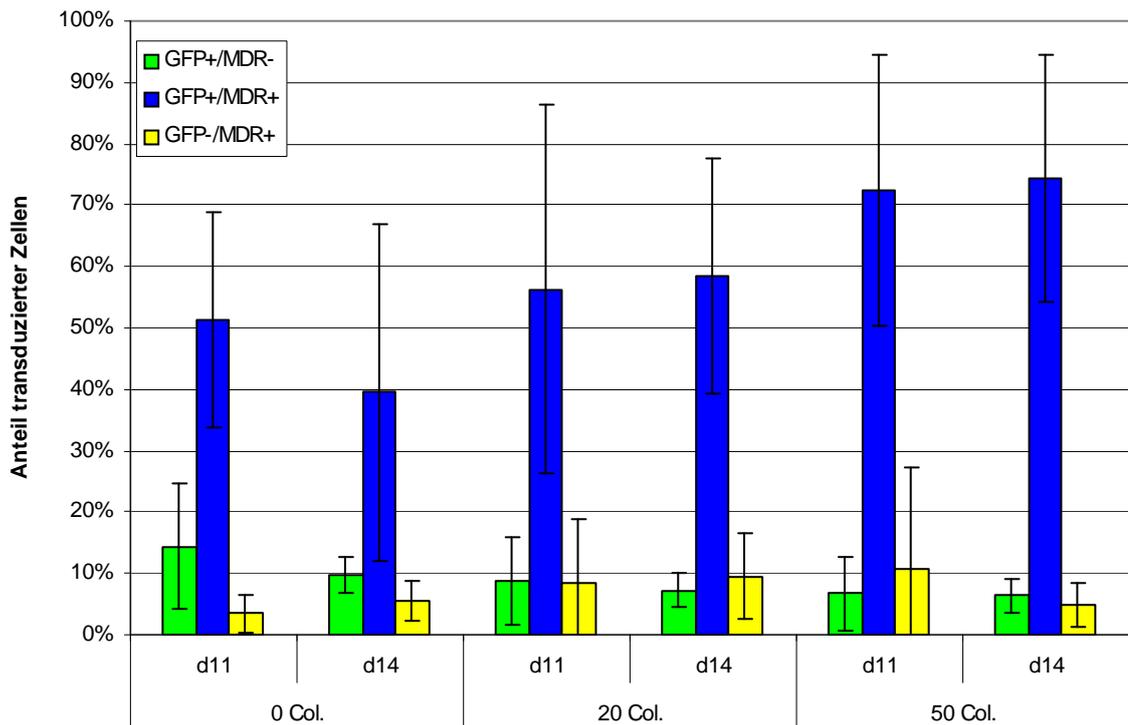


Abbildung 3.22: Anzahl QGIM-transduzierter KC aus HK von Tag 11 und 14 nach Kolchizins Selektion (0-50ng/ml)

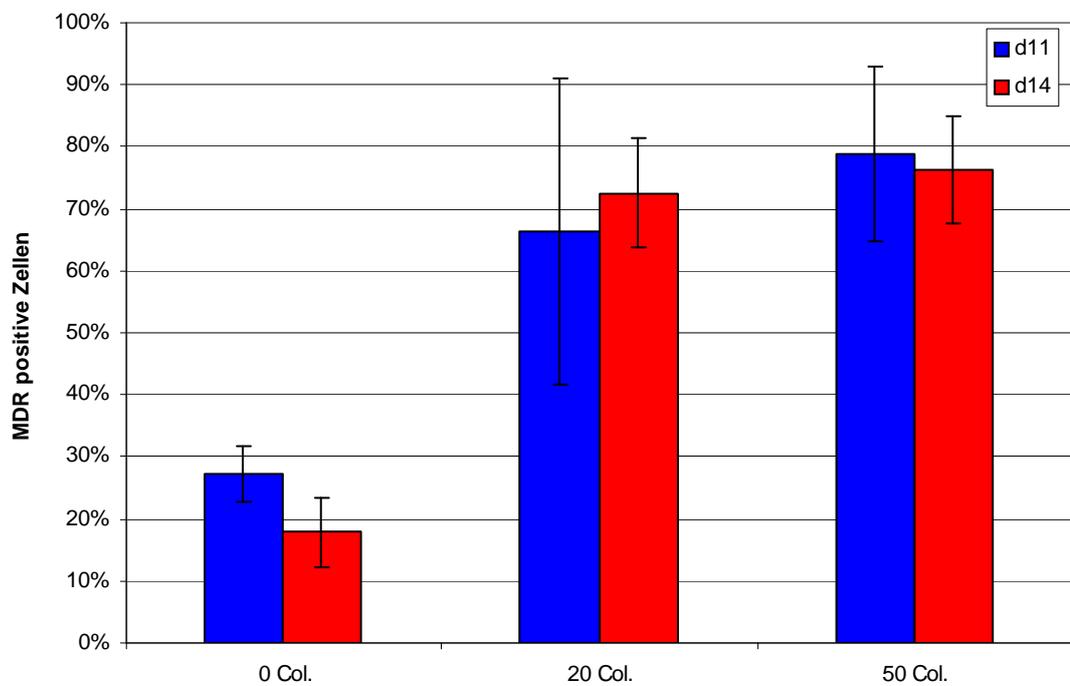


Abbildung 3.21: Anzahl QEIM-transduzierter KC aus HK von Tag 11 und 14 nach Kolchizinelektion (0-50ng/ml)

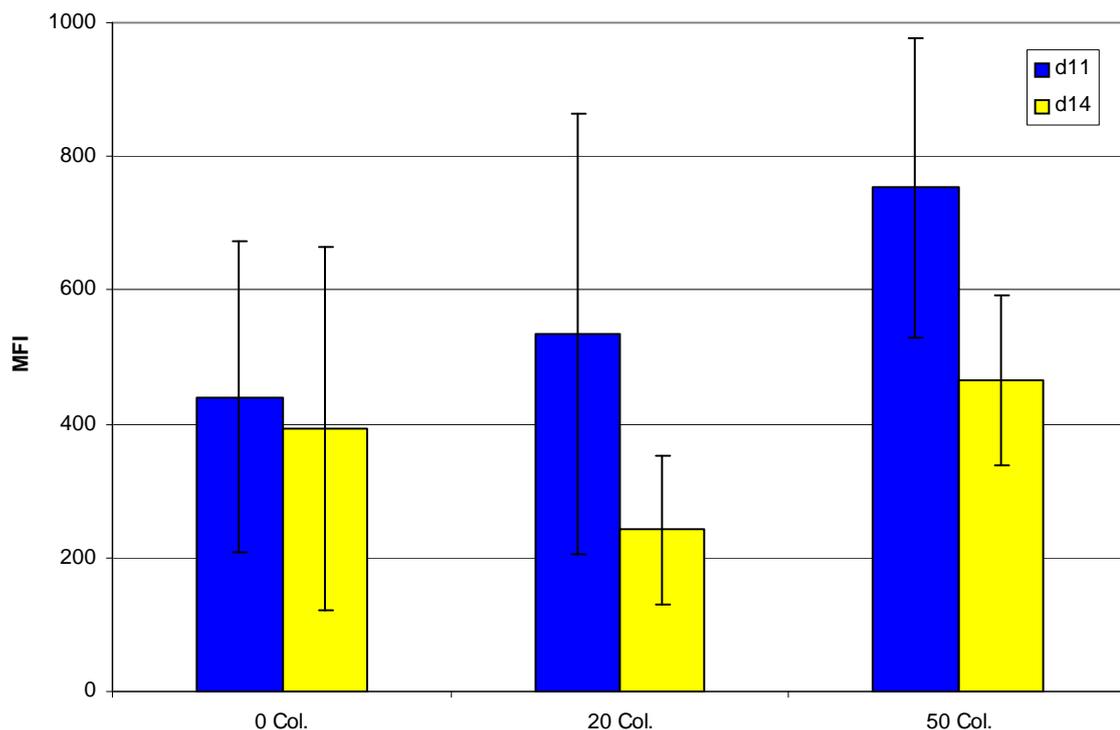


Abbildung 3.23: GFP-Expression in QGIM-transduzierten KC aus Kolchizinselektierten (0-50ng/ml) HK an Tag 11 und 14

KC zeigt sich, dass die KC ohne Selektion am Tag 11 noch vergleichbar hohe Anteile an GFP+/MDR- und GFP+/MDR+ Zellen aufweisen wie in Monolayerkultur. Zum Tag 14 hin ist jedoch ein deutlicher Abfall von 51,2% auf 39,5% bei den GFP+/MDR+ zu verzeichnen, wobei histologische Beurteilungen der HK zeigten, dass die Qualität der Epidermis zu diesem Zeitpunkt durch vermehrtes Absterben der KC keine aussagekräftigen Schlüsse mehr erlaubt.

Durch Kolchizinselektion werden die GFP+/MDR+ Zellen angereichert, wobei ein dosisabhängiger Unterschied zwischen den beiden Kolchizinkonzentrationen besteht. So wird mit 20 ng/ml ein Anteil von 56,2%, mit 50 ng/ml sogar von 72,3% GFP+/MDR+ Zellen erzielt. Auch der Anteil aller MDR+ KC kann von 45,1 % mit 20 ng/ml auf 68,0 % und mit 50 ng/ml auf 79,2 % erhöht werden. Bei den Hautkonstrukten mit QEIM-transduzierten KC werden die MDR+KC durch Selektion ebenfalls angereichert, und zwar von 17,8% auf 72,5% bzw. 76,2% nach Selektion mit 20 bzw. 50ng/ml

Bei Betrachtung der GFP-MFI der QGIM-transduzierten KC der Hautkonstrukte in **Abbildung 3.23** zeigt sich, dass mittels Selektion nach 11 Tagen bei beiden

Kolchizindosierungen eine Zunahme der GFP-Expression erreicht werden kann. So führt die Kolchizins Selektion mit 50 ng/ml zur einer Zunahme der GFP-Expressionsstärke um 71 % am Tag 11. Nach 14 Tagen ist diese Steigerung nicht mehr so deutlich, allerdings erlaubt - wie oben bereits erwähnt - die abnehmende Qualität der HK zu diesem Zeitpunkt keine eindeutigen Aussagen mehr.

Tag	Nr.	0 ng/mL Colchicin				20 ng/mL Colchicin				50 ng/mL Colchicin			
		GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+	GFP- MDR-	GFP+ MDR-	GFP+ MDR+	GFP- MDR+
d11	1	37,8%	26,1%	34,8%	1,0%	41,7%	16,9%	39,1%	2,1%	13,3%	13,6%	72,0%	1,1%
	3	19,5%	8,0%	69,8%	2,6%	2,3%	4,0%	90,9%	3,0%	1,0%	3,7%	94,5%	0,8%
	4	34,7%	9,1%	49,1%	7,0%	35,5%	5,6%	38,7%	20,3%	17,2%	2,8%	50,4%	30,0%
	MW	30,7%	14,4%	51,2%	3,5%	26,5%	8,8%	56,2%	8,5%	10,5%	6,7%	72,3%	10,6%
	SD	9,8%	10,2%	17,6%	3,1%	21,2%	7,1%	30,0%	10,2%	8,5%	6,0%	22,1%	16,7%
d14	1	70,4%	12,8%	8,8%	8,1%	41,3%	5,2%	36,3%	17,4%	30,6%	9,3%	51,2%	8,9%
	3	27,4%	9,2%	61,4%	1,9%	15,8%	10,3%	69,8%	4,4%	5,1%	6,1%	86,9%	1,9%
	4	38,0%	7,1%	48,4%	6,6%	18,0%	6,1%	69,4%	6,6%	7,8%	3,7%	84,9%	3,9%
	MW	45,3%	9,7%	39,5%	5,5%	25,0%	7,2%	58,5%	9,5%	14,5%	6,3%	74,3%	4,9%
	SD	22,4%	2,9%	27,4%	3,3%	14,1%	2,8%	19,2%	7,0%	14,0%	2,8%	20,1%	3,6%

Tabelle 3.10: Ergebnisse der FACS-Analyse von HK mit QGIM-transduzierten KC, die mit unterschiedlichen Kolchizinkonzentrationen (0-50 ng/ml) behandelt wurden

	0 ng/mL		20 ng/mL		50 ng/mL	
	d11	d14	d11	d14	d11	d14
V1	30,0%	12,6%	37,9%	69,1%	62,8%	77,1%
V3	29,4%	23,7%	79,3%	65,9%	88,2%	67,1%
V4	21,9%	17,2%	81,7%	82,7%	85,6%	84,4%
MW	27,1%	17,8%	66,3%	72,5%	78,9%	76,2%
Stabw	4,5%	5,6%	24,6%	8,9%	14,0%	8,7%

Tabelle 3.11: Anteil GFP+KC aus der FACS-Analyse von QGIM-transduzierten KC aus Kolchizins selektierten (0-50ng/ml) HK

3.3.2.3 Histologische Untersuchung

In **Abbildung 3.24** sind jeweils ein H&E-Schnitt von HK aus Schweinedermis mit QGIM-transduzierten bzw. QEIM-transduzierten KC an Tag 11 nach Aussaat der KC dargestellt. Es ist eine voll ausgebildete, differenzierte Epidermis mit mehreren Lagen KC zu erkennen. Morphologische Unterschiede sind zwischen den QGIM-HK und QEIM-HK nicht auszumachen. Die Produktion von EPO hat also keinen störenden Einfluss auf die Ausbildung einer differenzierten Epidermis.

Der Einfluss der Kolchizineselektion auf die HK ist in **Abbildung 3.25** (HK mit QGIM-transduzierten KC) und **Abbildung 3.26** (HK mit QEIM-transduzierten KC) für Tag 11

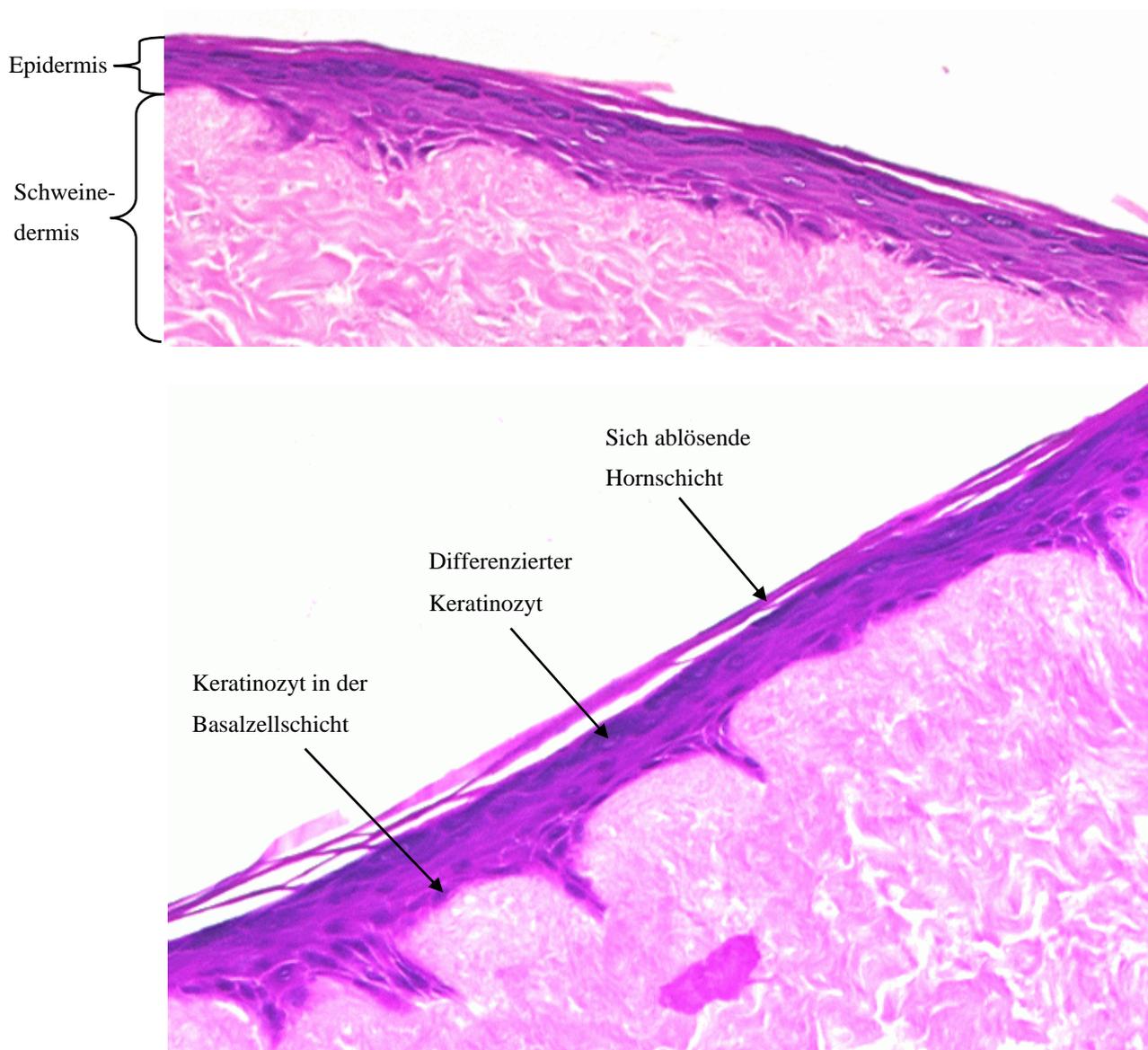


Abbildung 3.24: H&E-Färbungen von Schweinedermis-HK, auf die QGIM-transduzierte (oben) oder QEIM-transduzierte (unten) KC ausgesät waren (Tag 11)

nach Aussaat der KC zu sehen. Deutlich erkennbar ist neben der Abnahme der Epidermisdicke auch das Auftreten von toten KC (hellrosa). Vereinzelt sind auch noch KC zu erkennen, die sich gerade in der Phase der Zellteilung befanden und vom Kolchizin gehemmt wurden (hellrosa Zellen mit großem schwarzem Zellkern). An Tag 14 (**Abbildung 3.27** und **Abbildung 3.28**) sind die toten und mitosegehemmten Zellen größtenteils in die obere Epidermisschicht verlagert, während gleichzeitig eine Erneuerung der Basalzellschicht festzustellen ist. Diese weist trotz Kolchizinbehandlung keine pathologischen Veränderungen mehr auf, was darauf schließen lässt, dass die Basalzellschicht nun durch die Kolchizinselktion (größtenteils) MDR positiv ist (siehe Immunhistochemische Analyse, **Kapitel 3.3.2.4**).

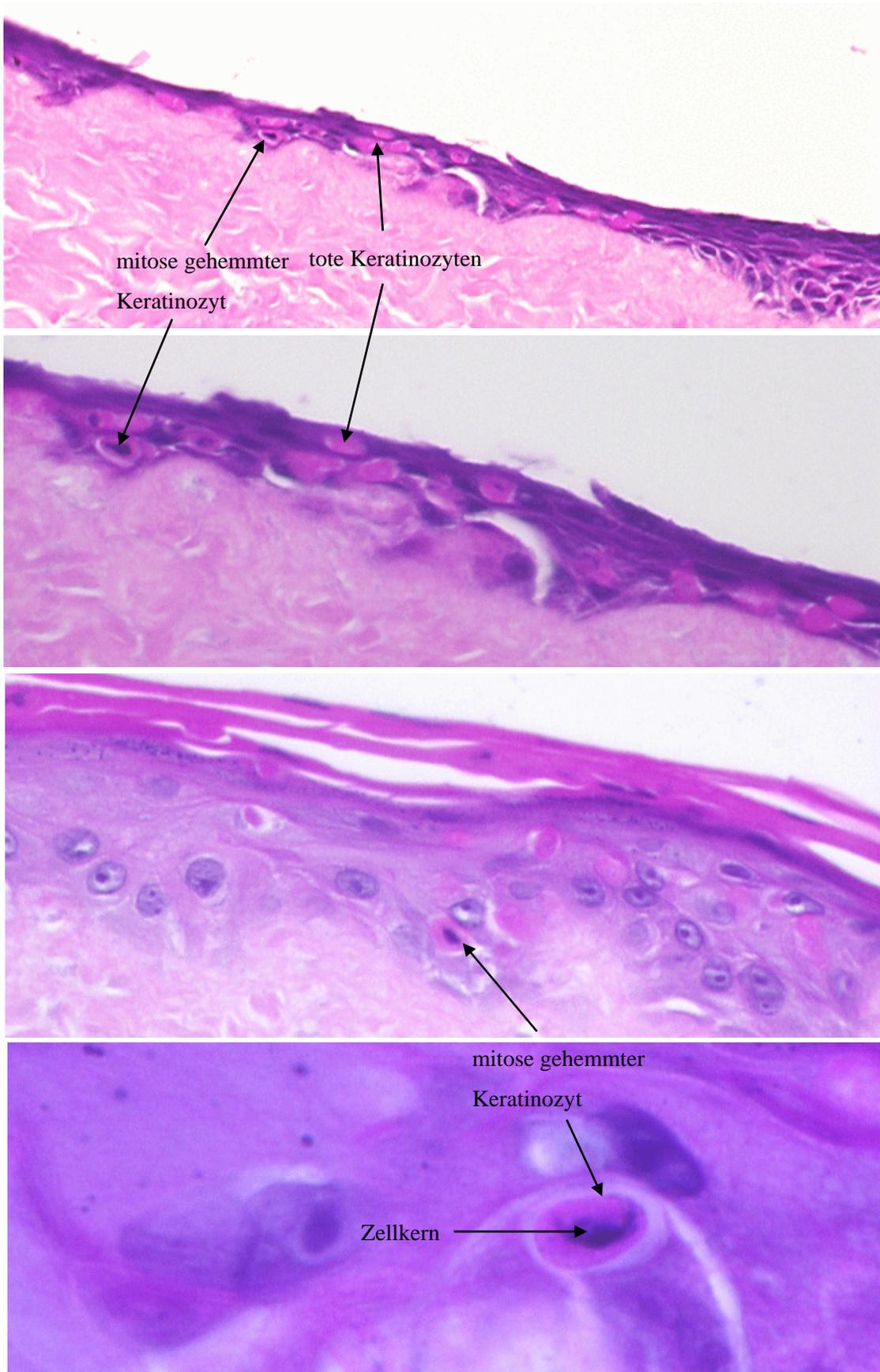


Abbildung 3.25: HK mit QGIM-transduzierten KC unter Kultivierung mit folgenden Kolchizinkonzentrationen (d11; von oben nach unten): 20 ng/ml (10x), 20 ng/ml (20x), 50 ng/ml (20x), 50 ng/ml (63x)

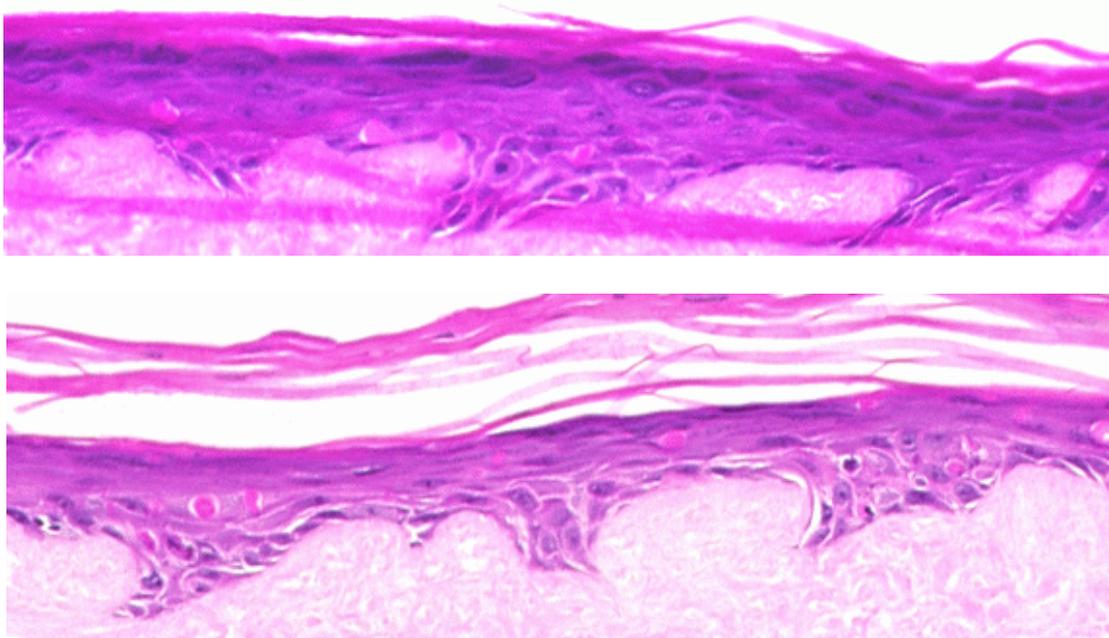


Abbildung 3.26: HK mit QEIM-transduzierten KC unter Kultivierung mit folgenden Kolchizinkonzentrationen (d11; von oben nach unten): 20 ng/ml (10x) und 50 ng/ml (10x)

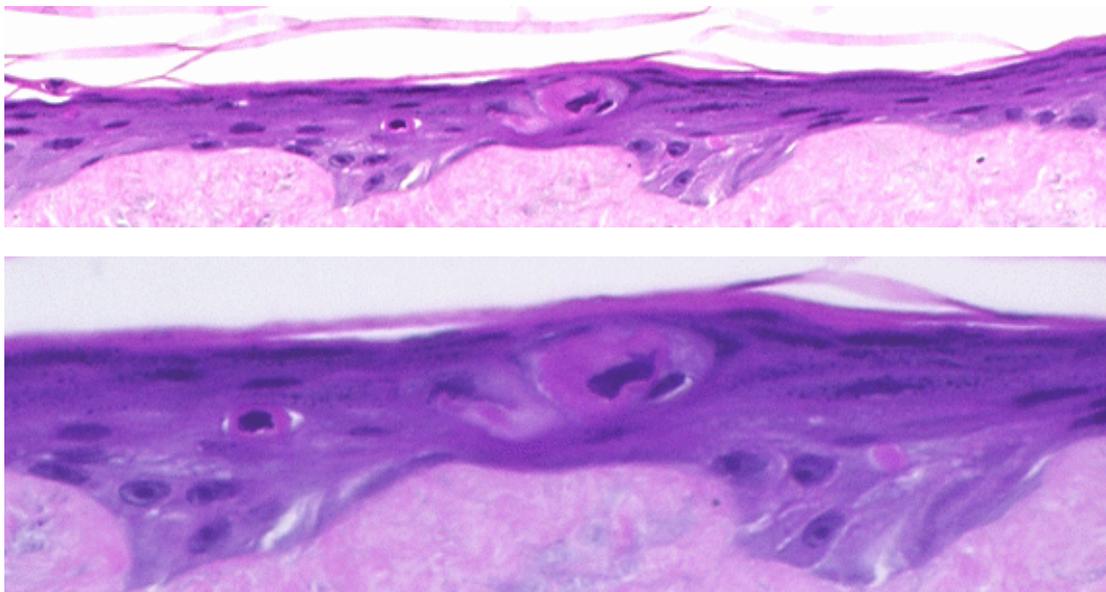


Abbildung 3.27: HK mit QEIM-transduzierten KC unter Kultivierung mit folgenden Kolchizinkonzentrationen (d14; von oben nach unten): 50 ng/ml (10x) und 50 ng/ml (20x)

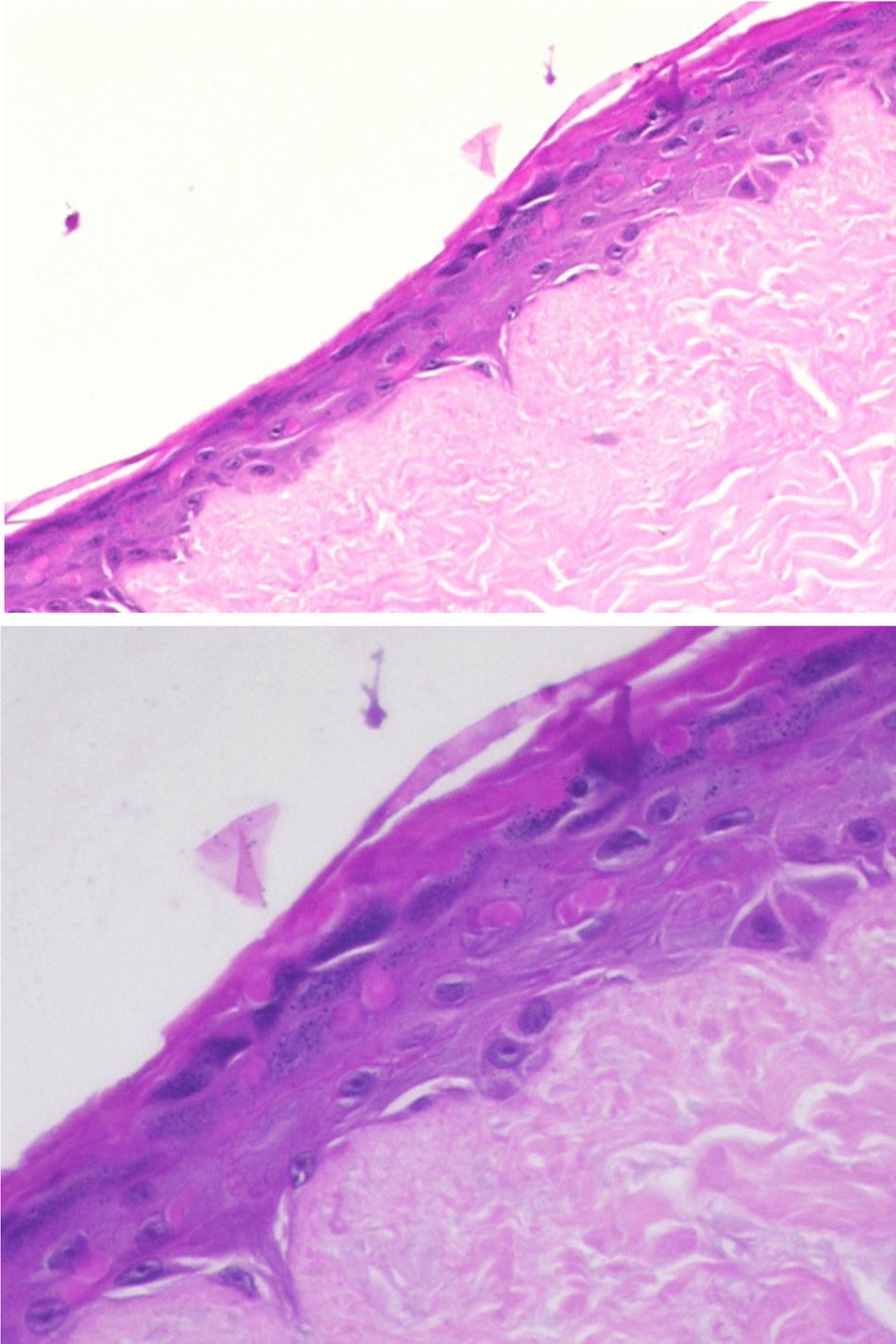


Abbildung 3.28: HK mit QGIM-transduzierten KC unter Kultivierung mit folgenden Kolchizinkonzentrationen (d14; von oben nach unten): 50 ng/ml (10x) und 50 ng/ml (20x)

3.3.2.4 Immunhistochemische Untersuchung

Die folgenden Abbildungen zeigen immunhistochemische Färbungen der transduzierten Schweinedermis-HK, die mit unterschiedlichen Kolchizinkonzentrationen inkubiert waren. Bei den QGIM-transduzierten HK wurde das GFP gefärbt, während es bei den QEIM-transduzierten HK das MDR war. Eine Färbung für das EPO wäre für den Vergleich mit dem GFP-transduzierten HK besser, allerdings gelang dies trotz Austestens mit verschiedenen AK nicht. Die roten Flächen kennzeichnen die GFP- (Abbildung 3.30) oder MDR- (Abbildung 3.29) exprimierenden KC. Unter der Kolchizineselektion mit 50 ng/ml zeigt sich bei den QEIM-HK eine deutliche Zunahme MDR-positiver Zellen und bei den QGIM-HK eine Zunahme GFP-positiver Zellen.

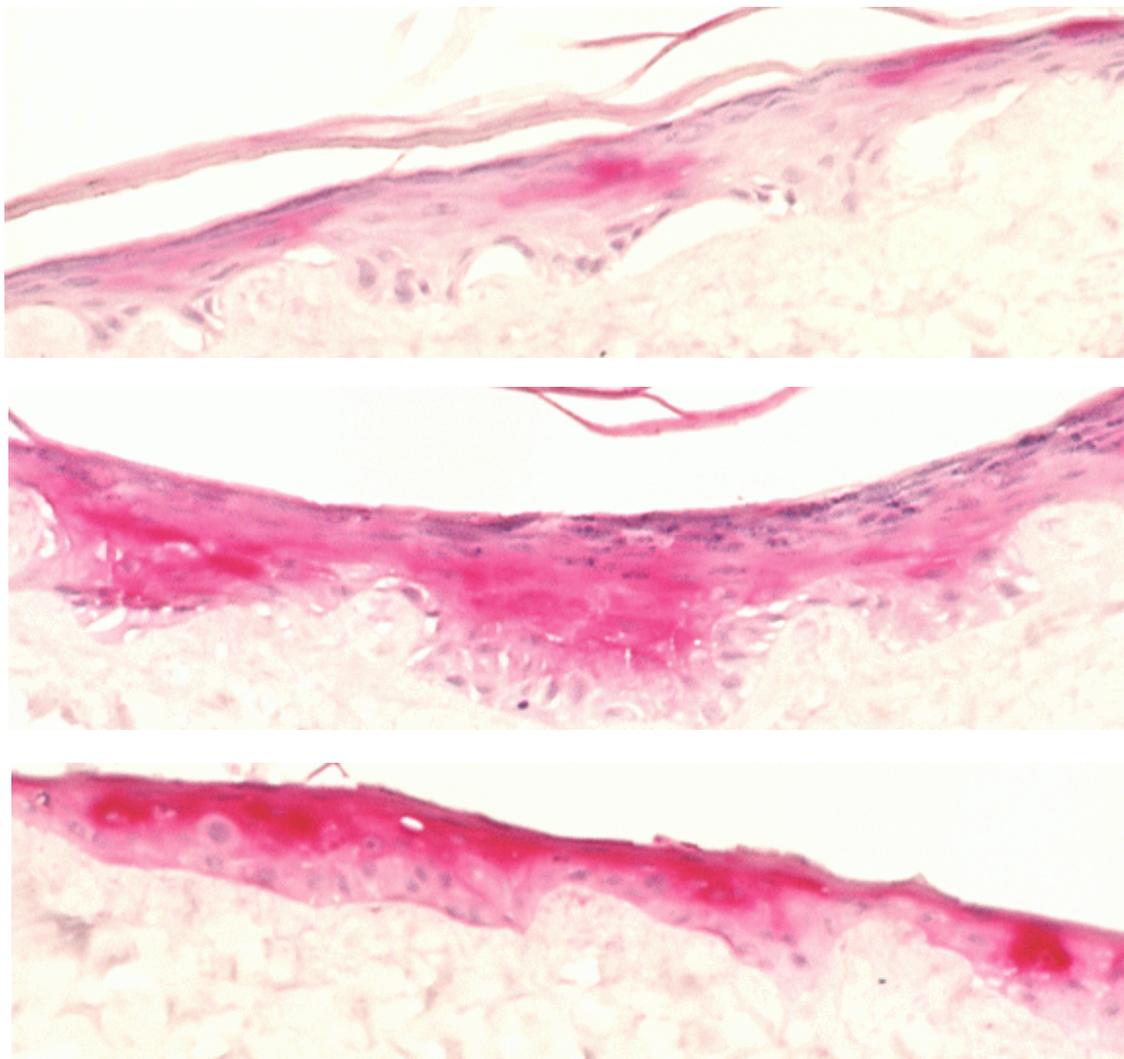


Abbildung 3.29: MDR-Färbung von QEIM-transduzierten HK, die unter folgenden Kolchizinkonzentrationen kultiviert wurden (d11; von oben nach unten): 0 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml

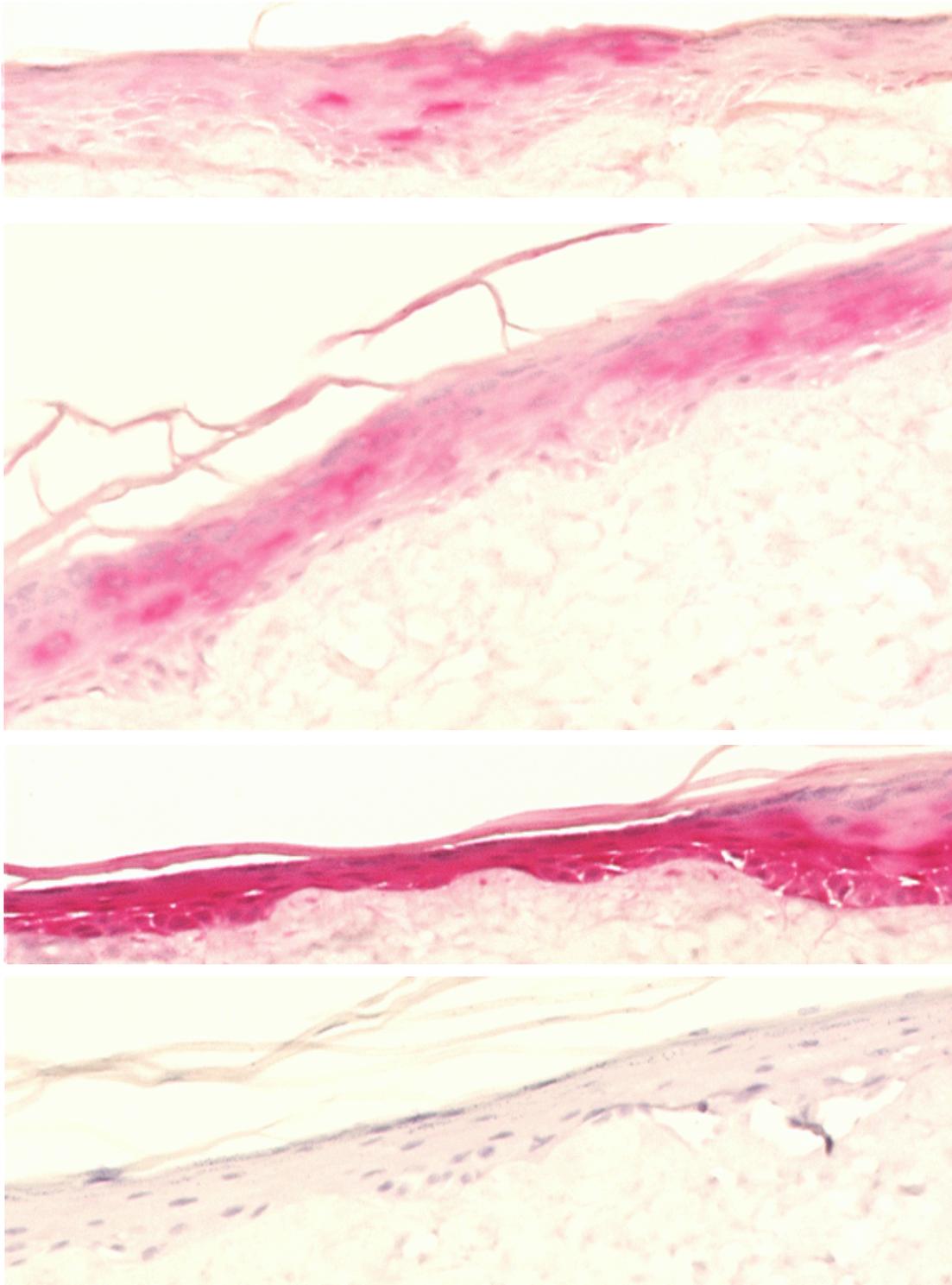


Abbildung 3.30: GFP-Färbung von QGIM-transduzierten HK, die unter folgenden Kolchizinkonzentrationen kultiviert wurden (d11; von oben nach unten): 0 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml; ganz unten Isotypenkontrolle 50 ng/ml

3.3.3 Untersuchungen in Gel-Hautkonstrukten

3.3.3.1 Bestimmung der EPO-Expression

Nach den Hautkonstrukten mit der avitalen Dermis, welche nur KC enthielten, wurden weitere Hautkonstrukte angefertigt, welche neben den KC noch FB, die in eine Dermis, bestehend aus einem Kollagen-Gel, eingebettet waren. Dabei wurden vier Varianten mit unterschiedlich transduzierten Zellen hergestellt, und zwar alle Kombinationen EPO/MDR- und GFP/MDR-transduzierter KC und FB. So konnte der unterschiedliche Beitrag der KC und FB zur EPO-Sekretion der HK ermittelt werden (**Abbildung 3.31**; die Ergebnisse für die HK mit ausschließlich kontrolltransduzierten Zellen sind nicht dargestellt, da hier keine EPO-Sekretion nachgewiesen werden konnte).

Betrachtet man zunächst die Resultate ohne Selektion (-col), zeigt sich, dass die HK mit QEIM- (EPO-) transduzierten KC und FB (FB-E/KC-E) die 2,5 (Tag 8) bis 3,5 fach (Tag 11 und 14) höhere Menge EPO exprimieren als die, in denen nur die FB mit QEIM transduziert sind (FB-E/KC-G). Gegenüber den HK, in denen nur die KC mit QEIM transduziert wurden (FB-G/KC-E) ist die EPO-Sekretion immer noch 1,2 bis 1,5 mal höher. Beim Vergleich der HK FB-G/KC-E mit den HK FB-E/KC-G ergibt sich für erstere eine um 1,7 bis 3,1 fach stärkere EPO-Sekretion. Somit exprimierte die Epidermis in den Hautkonstrukten mehr EPO als die Dermis (wie schon in Monolayerkultur transduzierte KC mehr EPO als FB sezernierten).

Ebenfalls in **Abbildung 3.31** sind die Resultate für die Selektion der HK mit Kolchizin (+col; 20 ng/ml) dargestellt. Der Vergleich mit den unselektierten HK zeigt, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Monolayer-Kulturen durch Kolchizins Selektion der QEIM-transduzierten HK keine Steigerung der EPO-Sekretion erreicht werden kann. Bei den FB-G/KC-E HK ist sogar ein starker und bei den FB-E/-KC-E bzw. FB-E/KC-G HK ein geringer Abfall der EPO-Sekretion zu verzeichnen. Bei den in einer stratifizierten, differenzierten Epidermis angeordneten KC führt die Selektion somit zu einem negativen Effekt, während bei den dermalen FB kein nennenswerter Effekt erkennbar ist.

3.3.4 Einfluss der Differenzierung von KC auf die EPO-Sekretion

Unter den in den HK vorliegenden Umgebungsbedingungen (hohe Konfluenz der KC, erhöhte Ca^{2+} -Konzentration, Luftexposition der HK) beginnen KC sich zu differenzieren, was unter den Standardbedingungen der Monolayerkultur nicht der Fall ist. Der Einfluss dieses Faktors auf die EPO-Sekretion wurde in zwei Experimenten untersucht, in denen die KC in Monolayerkultur entweder bei 100% iger Konfluenz (**Abbildung 3.32**) oder erhöhter Ca^{2+} -Konzentration (**Abbildung 3.33**) kultiviert wurden. Dabei ist bei 100% iger Konfluenz ein Rückgang der EPO-Sekretion auf $54,8\pm 19,6\%$ (nach 48h), $53,4\pm 18,7\%$ (nach 72h) und $66,7\pm 24,8\%$ (nach 96h) des Ausgangswertes (70 % Konfluenz, ohne CaCl_2) feststellbar, während unter erhöhter Ca^{2+} -Konzentration ebenfalls ein Rückgang auf $61,0\pm 29,7\%$ (nach 48h), $50,0\pm 21,5\%$ (nach 72h) und $74,8\pm 27,5\%$ (nach 96h) des Ursprungswertes zu verzeichnen ist. Somit führen sowohl eine 100% ige Konfluenz der Zellen als auch die Zugabe von CaCl_2 , also Bedingungen, die zu einer Differenzierung der KC in Monolayerkulturen führen, zu einem Rückgang der EPO-Expression in QEIM-transduzierten KC.

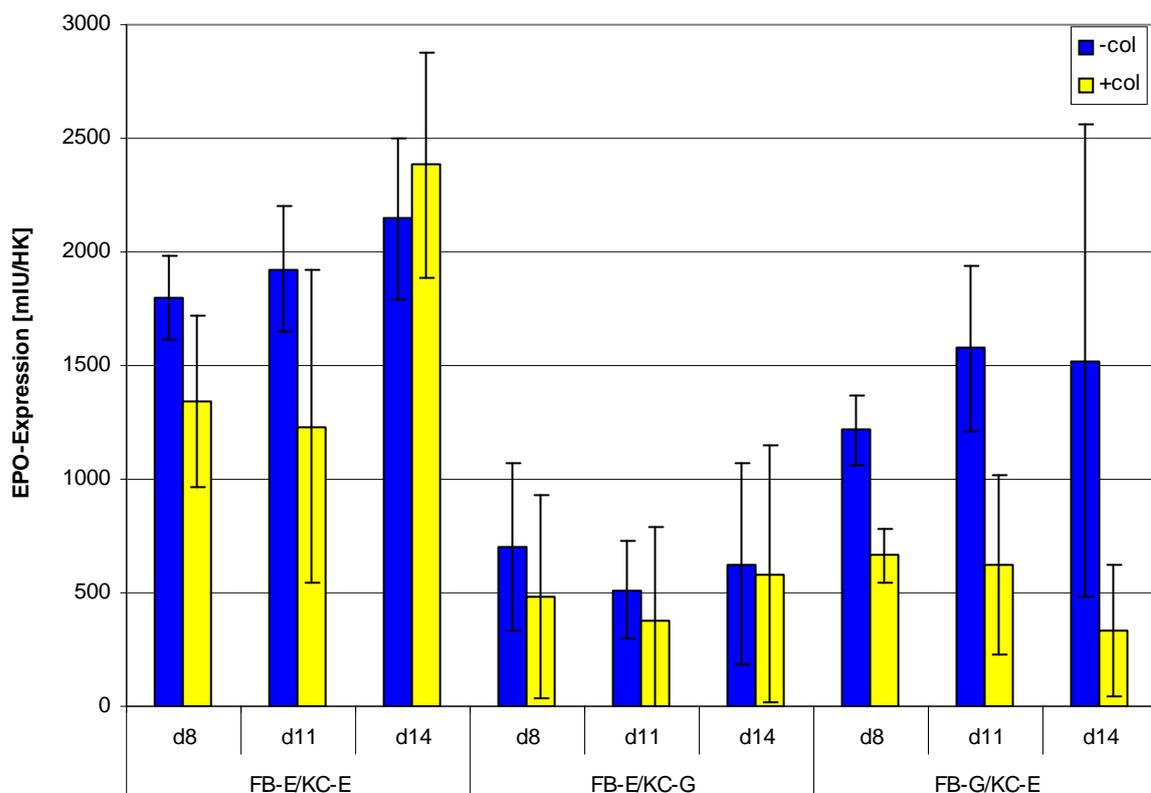


Abbildung 3.31: EPO-Sekretion Kolchizinselktierter (20ng/ml) und nichtselektierter Gel-HK aus unterschiedlichen Kombinationen EPO/MDR-(E) und GFP/MDR-(G) transduzierter KC und FB

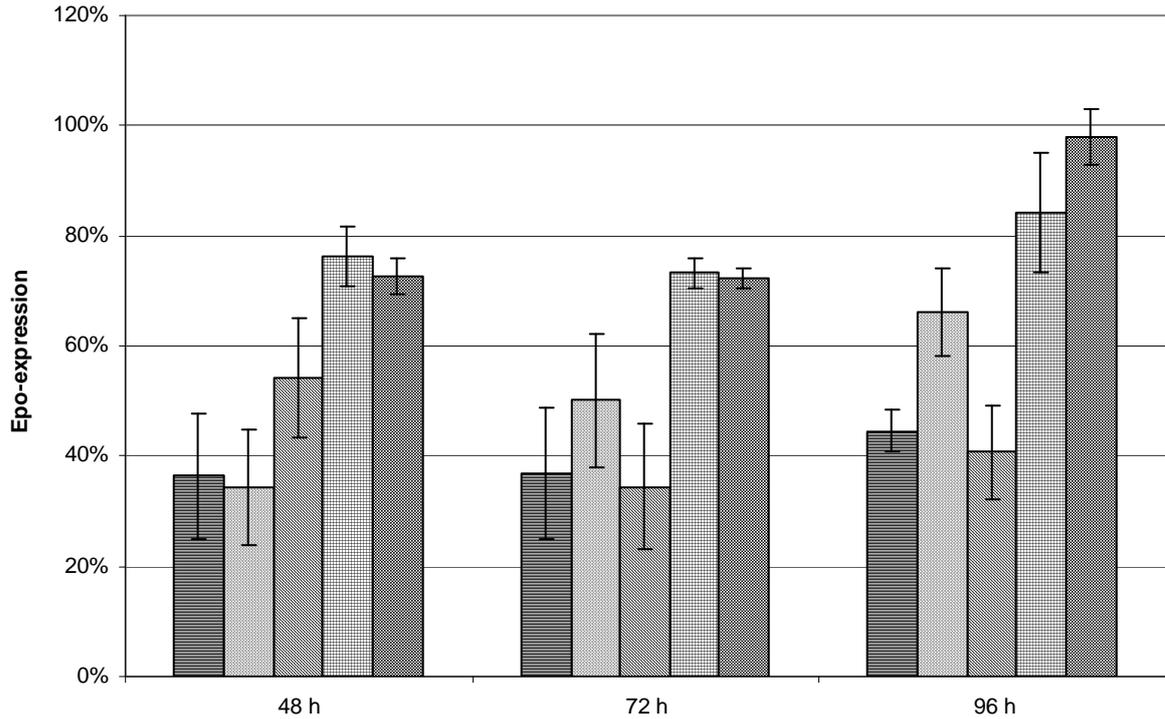


Abbildung 3.32: EPO-Sekretion QEIM-transduzierter KC-Monolayerkulturen 48-96h nach Erreichen von 100% Konfluenz (in % der EPO-Sekretion bei 70% Konfluenz)

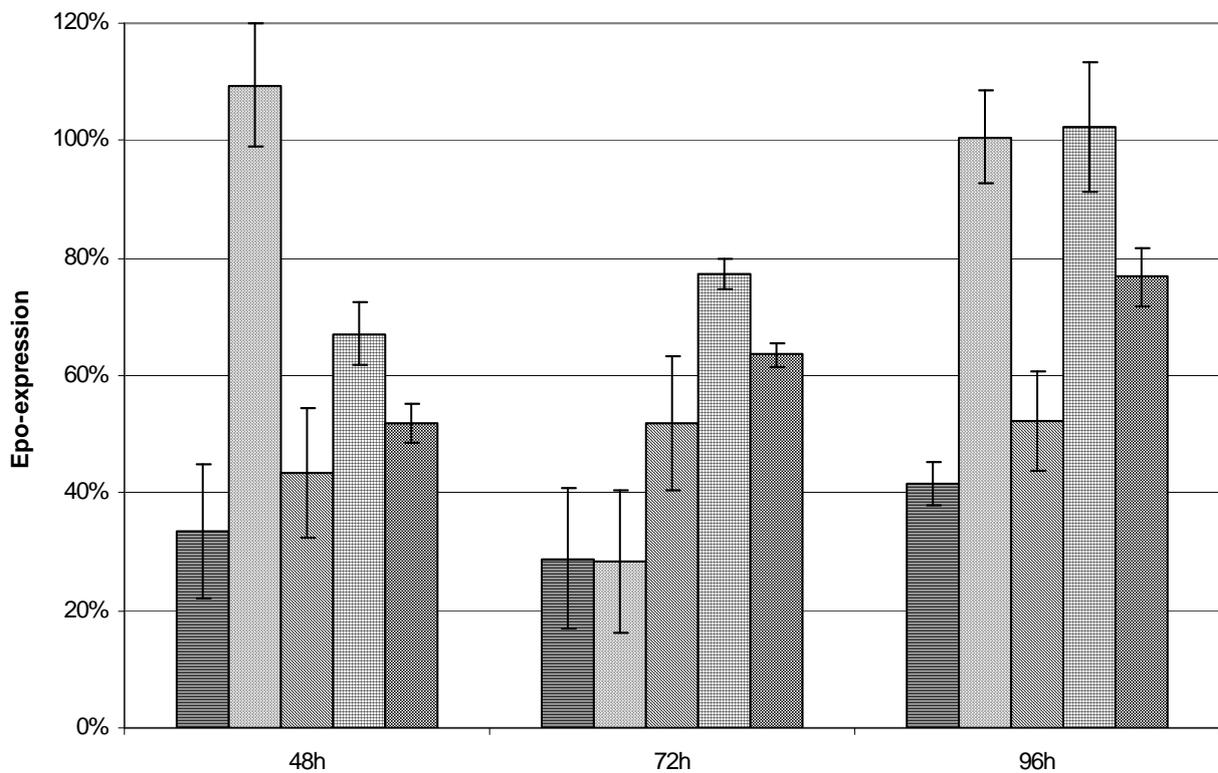


Abbildung 3.33: EPO-Sekretion von QEIM-transduzierten KC-Monolayerkulturen 48-96h nach Zugabe von CaCl₂ bei 70% Konfluenz (in % der EPO-Sekretion bei 70% Konfluenz ohne CaCl₂)

3.4 *In-vivo*-Untersuchungen zur EPO-Expression in genetisch modifizierter Haut

Nach den *In-vitro*-Analysen an Monolayer-Kulturen und HK wurden *In-vivo*-Analysen an einem Mausmodell durchgeführt. In diesem Modell wurden die schon in den *In-vitro*-Experimenten verwendeten Gel-HK aus transduzierten KC und FB auf immundefekte Nacktmäuse transplantiert. Nach erfolgreichem Anwachsen wurden die Transplantate regelmäßig mit Kolchizin- bzw. Kontroll-Creme behandelt. Folgende Fragen waren hierbei von Interesse: 1. Kommt es durch die Kolchizinselektion zu einer Zunahme transduzierter Zellen in den HK? 2. Wird aus den transduzierten HK EPO freigesetzt und führt dies zu einer Zunahme des Hämokrits? 3. Kann die EPO-Sekretion durch Kolchizinselektion transduzierter Zellen gesteigert werden?

3.4.1 FACS-Analyse

Die Ergebnisse der *In-vivo*-Selektion transplantiert, EPO/MDR-transduzierter HK sind in **Abbildung 3.34** (QEIM) gezeigt. Dargestellt ist jeweils der Anteil der transduzierten, MDR+ KC an den humanen, HLA+ KC der am Ende des Experiments entnommenen. Transplantate. Dies ist notwendig, da bei der Transplantatentnahme zwangsläufig auch nicht zum humanen Transplantat zugehörige Maushaut mit

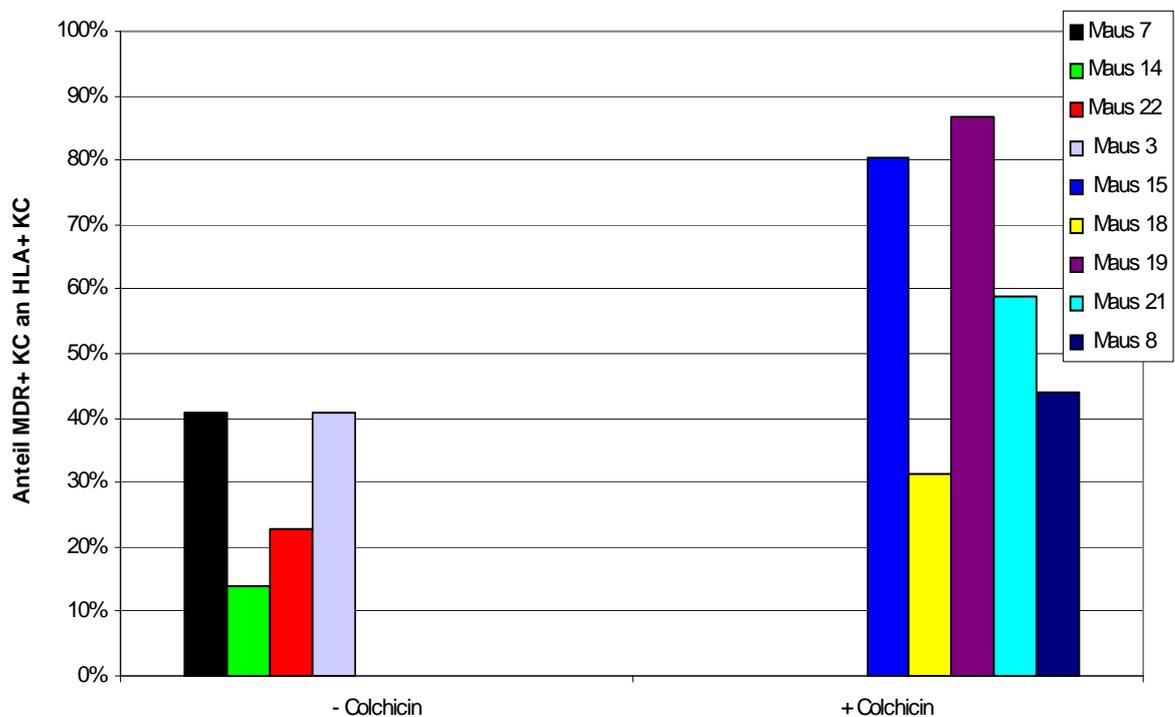


Abbildung 3.34: Anteil EPO/MDR-transduzierter humaner KC in den für 130 Tage mit oder ohne Kolchizin behandelten Transplantaten (FACS-Analyse, 165 Tage nach Transplantation)

entnommen wird. Zur Analyse kamen insgesamt 9 Transplantate, die nach 165 Tagen explantiert wurden (zwar waren ursprünglich deutlich mehr HK transplantiert worden, einige waren jedoch nicht dauerhaft angewachsen). 35 Tage nach Transplantation war mit der Kolchizincremebehandlung der einen Mausgruppe begonnen worden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass der Anteil QEIM-transduzierter, MDR+ KC in den für 130 Tage mit Kolchizincreme behandelten Transplantaten auf $60,2 \pm 23,5\%$ gegenüber $29,0 \pm 12,0\%$ in den mit Kontrollcreme behandelten Transplantaten gesteigert werden konnte, die Kolchizinselektion also wirksam war. Betrachtet wurden hier nur die KC, die im Vergleich zu den FB problemlos durch enzymatischen Verdau aus den Transplantaten separiert werden konnten. Da die Dermis mit den Fibroblasten im Gegensatz zur Epidermis mit den KC jedoch kein proliferierendes Gewebe darstellt, ist eine entsprechende, selektive Anreicherung EPO/MDR-transduzierter FB durch die antimitotische Potenz des Kolchizins nicht zu erwarten.

3.4.2 Bestimmung des Serum-EPO-Spiegels sowie des Hämatokrits

Die Ergebnisse der Bestimmung von humanem EPO mittels spezifischem ELISA Mausserum zeigt **Abbildung 3.35**. Die Bestimmung erfolgte in regelmäßigen 4-wöchentlichen Abständen, es sind allerdings nur die beiden letzten Analysezeitpunkte aufgeführt, da vorher kein humanes EPO nachweisbar war. Die mit Abstand höchsten Werte finden sich bei der Maus 3 aus der mit Kontrollcreme behandelten Gruppe mit $23,7 \pm 2,0$ mIU/ml bzw. $28,1 \pm 0,3$ mIU/ml. Dies ist auch die einzige Maus, bei der zu beiden Zeitpunkten EPO nachgewiesen wurde, während bei Maus 22 nur einmal und den restlichen Mäusen, die mit der Kontrollcreme behandelt wurden, kein humanes EPO nachweisbar war. Bei der Gruppe, deren Transplantate mit Kolchizincreme behandelt worden waren, wurde am letzten Entnahmezeitpunkt (Tag 165) bei 3 Mäusen humanes EPO im Serum nachgewiesen. Die Werte lagen jeweils unter 15 mIU/ml, der Mittelwert bei $6,3 \pm 5,8$ mIU/ml. Bei Mäusen, die mit dem Kontrollvektor QGIM transduzierte humane Transplantate trugen, lies sich zu keinem Zeitpunkt humanes EPO nachweisen, was die Spezifität der EPO-Analyse unterstreicht. Daher läßt sich feststellen, dass in einzelnen Mäusen die transduzierten Zellen durchaus humanes EPO aus den Transplantaten in die Blutzirkulation freisetzen, allerdings in äußerst geringem Ausmaß. Ferner lassen die vorliegenden Daten darauf schließen, dass die Kolchizinselektion trotz Anreicherung der transduzierten KC in den Transplantaten

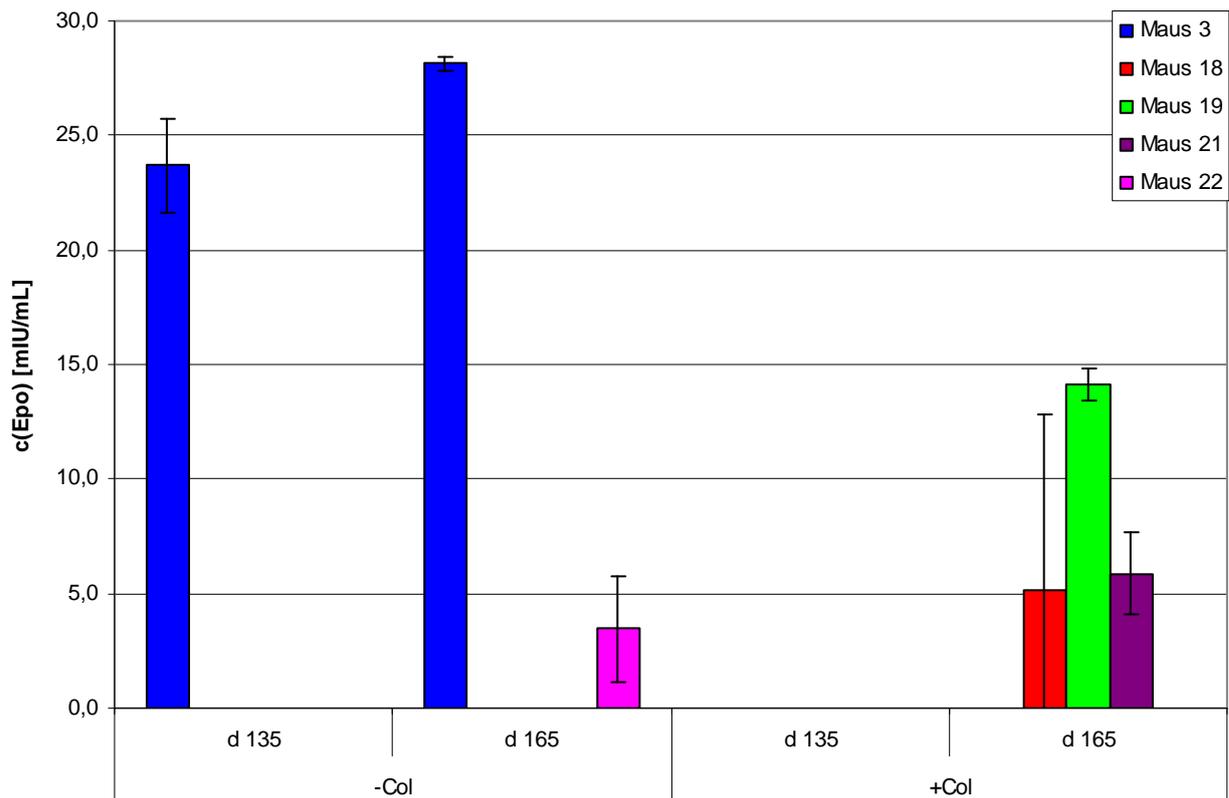


Abbildung 3.35: Konzentration an humanem EPO im Serum transplantierter Mäuse (Transplantat = EPO/MDR-transduziertes HK) nach 135 bzw. 165 Tagen Kolchizin- (n=5) bzw. Kontrollcremebehandlung (n=4)

keine Steigerung der EPO-Sekretion bewirkt, auch wenn aufgrund des Verlustes mehrerer Transplantate in beiden Untersuchungsgruppen nur eine kleine Zahl an Mäusen ausgewertet werden konnte..

In **Tabelle 3.12** sind die Hämatokritwerte (HKT) der transplantierten Mäuse aufgeführt. Eine vermehrte Freisetzung von EPO in das Blut würde sich in einem zeitlich ansteigenden HKT widerspiegeln. Eine solche Tendenz ist weder in der Gruppe mit noch in der ohne Kolchizinbehandlung vorhanden. Vergleichend wurde auch der HKT in Mäusen bestimmt, die mit dem Kontrollvektor QGIM-transduzierte Transplantate trugen. Es fanden sich ähnliche Werte für den HKT, so dass sich zusammenfassend sagen lässt, dass kein systemisch messbarer Effekt des von den Transplantaten produzierten EPO erkennbar ist.

Nach der Transplantatentnahme wurden die Explantate in Kultur gehalten, um nach 24h und 48h jeweils Medium für eine EPO-Bestimmung zu gewinnen. Hierdurch sollte überprüft werden, ob trotz fehlendem bzw. nur geringem Nachweis systemischer EPO-

		d 110	d 165	d 195
QEIM (-Col)	MW	48,1%	38,9%	41,6%
	SD	4,0%	2,3%	2,1%
QEIM (+Col)	MW	43,4%	46,4%	41,2%
	SD	5,7%	4,9%	3,6%
QGIM	MW	42,6%	42,3%	42,7%
	SD	2,7%	1,9%	2,2%

Tabelle 3.12: Mittelwerte und Standardabweichung der HKT von Mäusen mit unterschiedlichen Transplantaten (QEIM- oder QGIM-transduziert), die von Tag 35 bis 165 mit Kontrollcreme (-Col) oder Kolchizincreme (+Col) behandelt wurden

Sekretion im Mausserum eine lokale EPO-Sekretion der EPO/MDR-transduzierten Transplantate detektierbar war. Die Resultate sind in **Abbildung 3.36** dargestellt. Von den neun analysierten Explantaten exprimierte eins (Maus 19) kein und eins (Maus 15) nur sehr wenig EPO, beides waren Kolchizinbehandelte Transplantate. Alle anderen exprimierten deutliche Mengen an EPO, wobei die unselektierten, mit Kontrollcreme behandelten Transplantate (-Col) mit durchschnittlich $86,1 \pm 8,0$ mIU/HK deutlich mehr EPO sezernierten als die selektierten, mit Kolchizincreme behandelten (+Col). Diese produzierten durchschnittlich nur $49,4 \pm 30,7$ mIU EPO/HK.

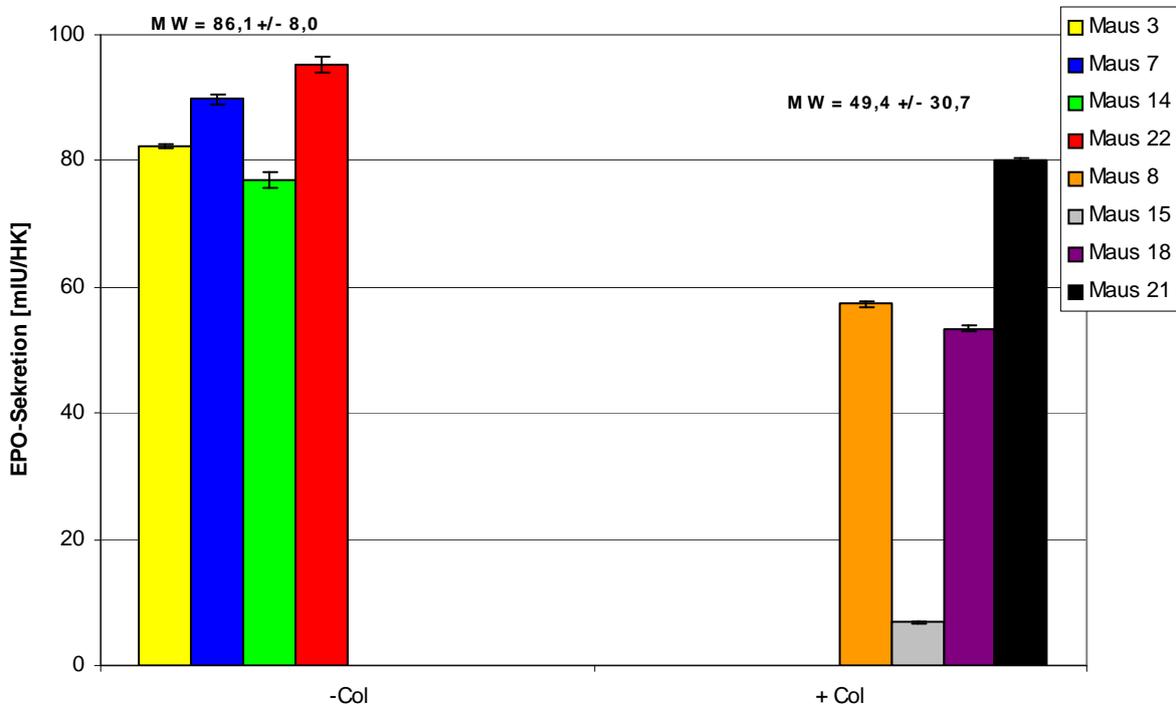


Abbildung 3.36: EPO-Sekretion der QEIM-transduzierten Explantate, in Kultur nach 24 h bestimmt (jeweils n=4; -Col = Kontrollcreme behandelt, +Col = Kolchizincreme behandelt)

In **Abbildung 3.37** sind die Ergebnisse der FACS-Analyse (Bestimmung des Anteils EPO/MDR-transduzierter humaner KC in den Explantaten) zusammen mit der ELISA-Messung (Bestimmung des von den Explantaten in-vitro sezernierten EPO) der einzelnen Maus-Explantate dargestellt. Dabei zeigt sich, dass eine erhöhte Anzahl (EPO)/MDR+KC keinesfalls mit erhöhtem Nachweis an sezerniertem EPO korreliert.

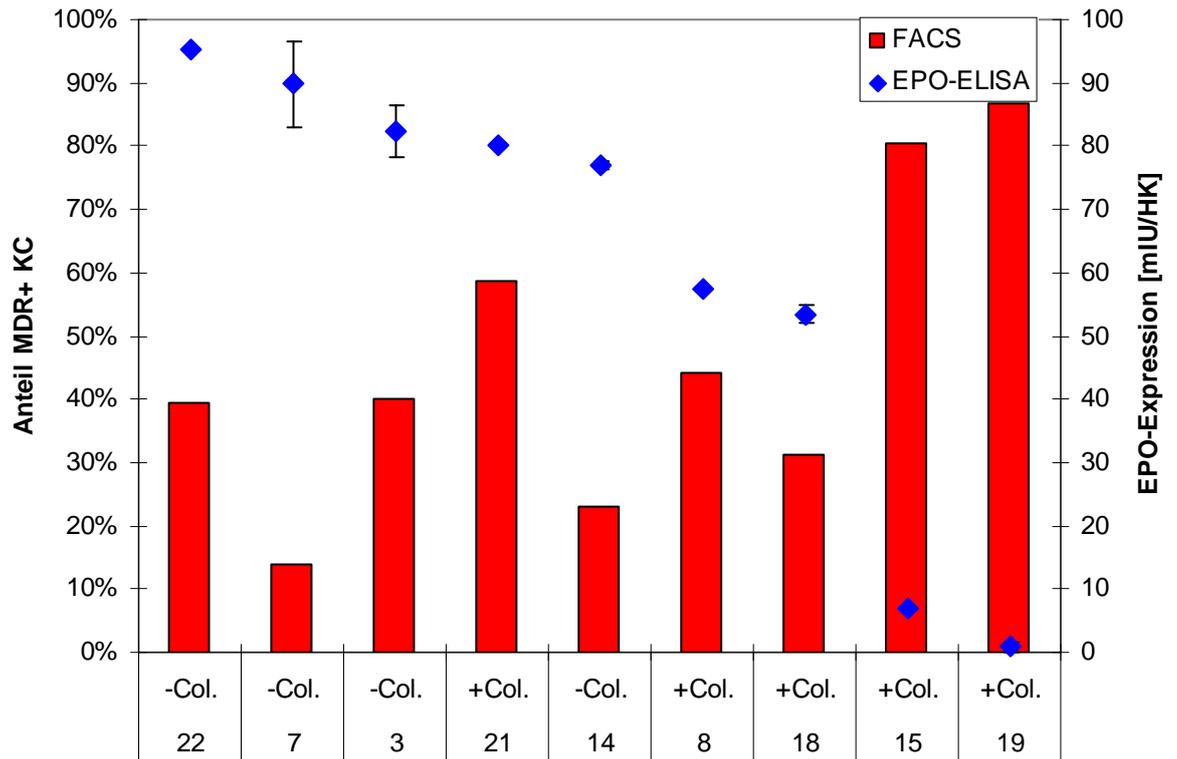


Abbildung 3.37: Korrelation zwischen dem Anteil MDR+ KC sowie der EPO-Expression der einzelnen Mausexplantate

3.4.3 Histologische Untersuchung

Die folgenden Bilder zeigen die H&E-Schnitte der entnommenen Maustransplantate. In **Abbildung 3.38** ist ein erfolgreich angewachsenes, QGIM-transduziertes Transplantat zu sehen, welches deutlich an der im Vergleich zur Mausepidermis wesentlich dickeren humanen Epidermis zu erkennen ist (Pfützner et al. 2002). **Abbildung 3.39** zeigt das gleiche Transplantat sowie ein QEIM-transduziertes Transplantat in 10x Vergrößerung. Besonders bei letzterem ist der geschichtete Aufbau der Epidermis gut zu erkennen. Ebenso deutlich ist das Vorhandensein der dermalen Papillen, ein weiteres Kennzeichen natürlicher menschlicher Haut, zu erkennen, welche in den *In-vitro*-HK nicht angelegt waren.

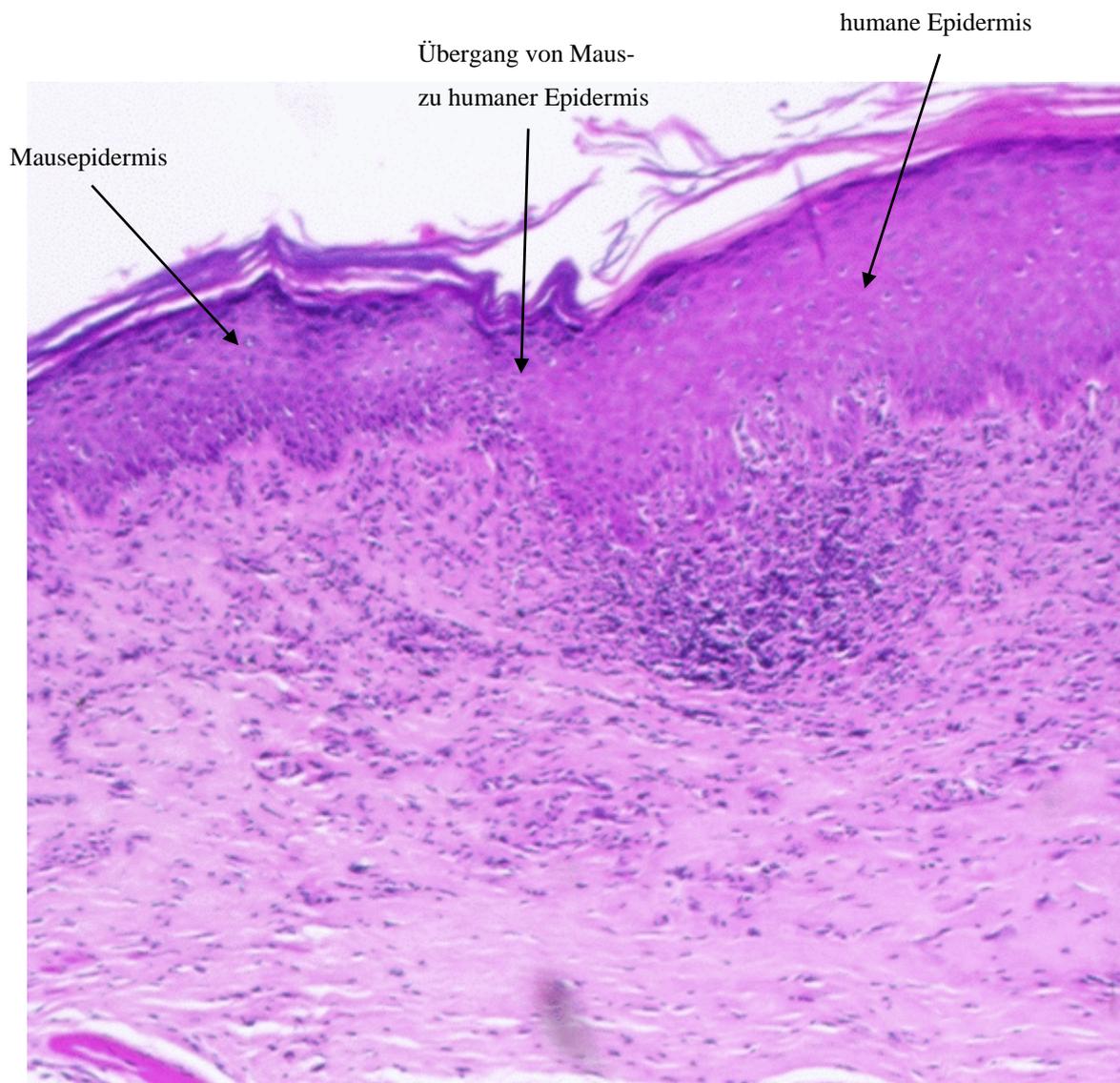


Abbildung 3.38: Maus-Explantat (QGIM-transduziert) in 5x Vergrößerung

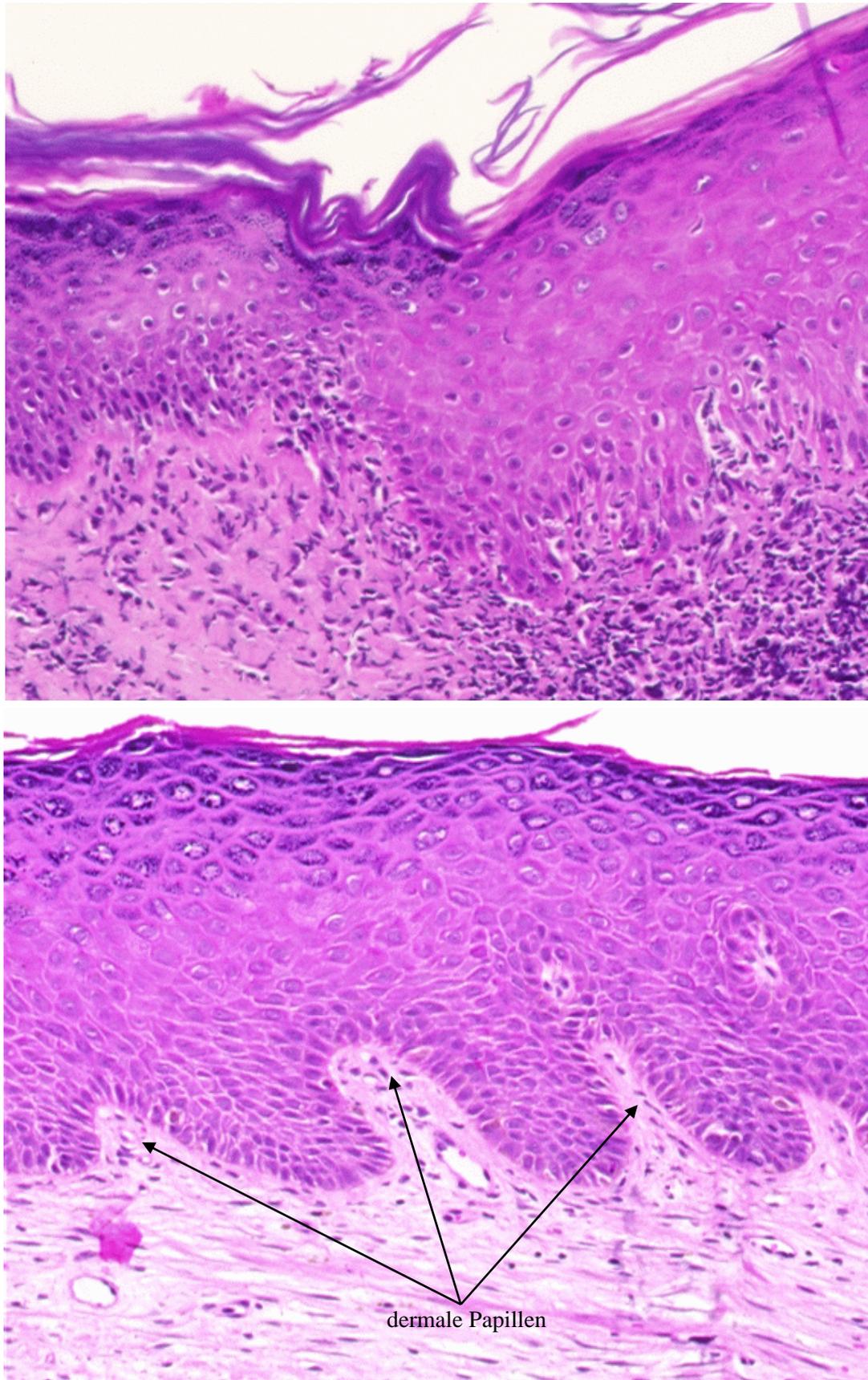


Abbildung 3.39: Maus-Explantat (QGIM-transduziert, oben; QEIM-transduziert, unten) in 10x Vergrößerung

4 Diskussion

4.1 Vergleich bicistronischer GFP/MDR Vektoren

4.1.1 Vergleich ohne Kolchizins Selektion

In dieser Arbeit wurden verschiedene retrovirale bicistronische Vektoren verglichen, welche das GFP-Gen und das MDR-Gen, gekoppelt über die ECMV-IRES Sequenz, in unterschiedlicher Reihenfolge enthalten. Sie wurden zum einen hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienz sowie der Expressionsstärke des GFP- und MDR-Gens in KC und FB untersucht. Der optimale Vektor sollte eine möglichst hohe Expression des Therapiegens, welches hier zunächst durch das Markergen GFP repräsentiert wurde, in einer hohen Anzahl transduzierter Zielzellen aufweisen. Hierfür sollte auch die MDR-Expression ausreichend hoch sein, um mittels Selektion eine Anreicherung der transduzierten Zellen und damit eine Erhöhung der Expression des Therapiegens zu ermöglichen.

Die Expressionsrate der beiden Gene eines bicistronischen Vektors hängt dabei unter anderem von der Reihenfolge der Gene ab. Die Ursache liegt darin, dass die Translation der beiden Gene unterschiedlich gesteuert wird. Während die Translation des Gens vor der IRES von der 5'-CAP Struktur der mRNA initialisiert wird, erfolgt dies bei dem zweiten Gen durch die IRES. Frühere Arbeiten haben eine, teilweise sogar sehr deutlich, verringerte Expression des Gens an zweiter Position gegenüber der ersten Position bzw. monocistronischen Vektoren gezeigt (Adam et al. 1991; Kaufman et al. 1991; Sugimoto et al. 1994; Mizuguchi et al. 2000). Dies wurde anhand verschiedener Gene, unter anderen auch unter Verwendung des GFP- (Zhu et al. 1999) und MDR-Gens (Sugimoto et al. 1994; Sugimoto et al. 1995; Suzuki et al. 1997; Suzuki et al. 1998; Zhou et al. 1998) als auch in Kombination dieser beiden Gene (Metz et al. 1998), in unterschiedlichen Zelltypen untersucht. In einer besonders umfassenden Auseinandersetzung mit dem Thema (Hennecke et al. 2001) wurde anhand bicistronischer Vektoren mit den beiden Luciferasevarianten Rluc und Fluc gezeigt, dass der Effekt der IRES vermittelten schwachen Expression des zweiten Gens jedoch nicht immer auftritt. So fand sich nur bei Verwendung des Rluc-Gens in der hinteren Position eine deutlich schwächere Expressionsstärke, nicht jedoch bei Fluc. Dieses

Ergebnis war unabhängig vom verwendeten Zelltyp, dem Promotor sowie der IRES-Variante. Detaillierte Untersuchungen mit anderen Genkombinationen zeigten einen negativen Einfluss der DNA-Sequenz des Fluc als erstes Cistron auf die Expressionsstärke des zweiten Cistron Rluc aber auch anderer Gene. In einer weiteren Publikation mit bicistronischen MDR/MGMT-Vektoren wies das MGMT in beiden Positionen eine ähnlich hohe Aktivität auf (Suzuki et al. 1998). Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die durch IRES vermittelte Translation des zweiten Cistrons in vielen Fällen ineffektiv ist, es jedoch im Einzelfall Ausnahmen geben kann, die von den verwendeten Genen und ihrer Reihenfolge abhängen. Daher muss für jeden Anwendungszweck die optimale Anordnung der Gene im Vektor individuell ermittelt werden, was das erste Ziel dieser Arbeit war.

Die Ergebnisse der drei bicistronischen MDR/GFP-Vektoren weisen keinen einheitlichen negativen oder positiven Effekt des IRES auf die Expression des zweiten Gens auf. So zeigt zwar der Vektor QGIM für das GFP als erstes Cistron sowohl in FB als auch in KC die höchste Transduktionseffizienz, jedoch zeigt der Vektor BGIM mit der gleichen Genanordnung die niedrigste Effizienz bei der Generierung GFP+ KC oder FB. Eine Ursache dafür könnte am unterschiedlichen Vektorgrundgerüst der beiden Vektoren liegen (siehe Kapitel 2.4.1 und 2.4.1). So enthält der Vektor QGIM eine hybride 5' LTR, bestehend aus einem CMV und einem MSV Promotor, welche zudem noch an einen zusätzlichen CMV IE Promotor gekoppelt ist. Diese Kopplung führt zu einer gesteigerten Virus-RNA Produktion in den Verpackungszellen (Naviaux et al. 1996; Julius et al. 2000), die dann in einer höheren Transduktionseffizienz resultieren könnte. Für das MDR-Gen weist der Vektor BGIM bei der Transduktion von KC und FB die höchste Effizienz auf, die auf ähnlich hohem Niveau wie beim Vektor QGIM liegt. Die unterschiedlichen Vektorgrundgerüste der beiden Vektoren mit gleicher Genanordnung haben offensichtlich keinen großen Einfluss auf die IRES vermittelte Translation des MDR-Gens als 2. Cistron.

Die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), welche ein Maß für die gebildete Proteinmenge darstellt, weist für das GFP als erstes Cistron höhere Werte auf als als zweites Cistron. Für das MDR ist das Bild insgesamt uneinheitlich, aber der Vektor BMIG zeigt zumindest in KC eine höhere Expressionsstärke als der Vektor BGIM auf, und bestätigt die Resultate für das GFP. Dies deckt sich mit den Ergebnissen

der Literatur, in der ebenfalls für das GFP (Zhu et al. 1999) oder das MDR (Suzuki et al. 1997; Suzuki et al. 1998) als erstes Cistron höhere Expressionsraten gefunden werden als als zweites Cistron. Vergleicht man die Werte der Transduktionseffizienz (Anzahl der transduzierten Zellen) mit denen der MFI (Expressionsstärke), ergibt sich erwartungsgemäß eine Korrelation zwischen beiden, d.h. ein hoher Anteil an transduzierten Zellen ist auch mit hoher Expressionsstärke verbunden. Der Vektor BGIM fällt in dieser Hinsicht allerdings heraus, denn er weist nur eine geringe Transduktionseffizienz, aber mit Abstand die höchste GFP-Expression auf. Er ist auch der einzige der drei GFP-Vektoren, bei der die transduzierten Zellen einen höheren Anteil an MDR+ als an GFP+ Zellen aufweisen. Dies ist ebenfalls ungewöhnlich, denn aufgrund der deutlich geringeren Größe des GFP-Gens (750bp gegenüber 4100bp beim MDR) sollte es ohne äußere Einflüsse, wie z.B. Selektion, vermutlich stärker exprimiert werden. Ein möglicher Grund könnte eine Instabilität der von den retroviralen Verpackungszellen gebildeten Virus-RNA sein, was zu einem Verlust des GFP-Gens in dem Großteil der gebildeten RNA-Moleküle und folglich auch zu einem hohen Anteil GFP negativer KC und FB bei der Transduktion führen würde, während die mit der vollständigen Virus-RNA transduzierten Zellen trotzdem mit hoher Effizienz GFP exprimieren könnten.

Bezieht man den Vektor QEIM mit ein, so ergibt sich das interessante Resultat, dass das MDR hier deutlich schwächer als im QGIM exprimiert wird. Da auch die Transduktionseffizienz für das QEIM niedriger liegt, scheint hier ein negativer Effekt des EPO-Gens auf die MDR-Expression vorzuliegen. Für diesen Effekt finden sich in der Literatur mit anderen Genen zwei Beispiele. Neben den bereits oben erwähnten (Hennecke et al. 2001) gibt es noch eines, in dem das GFP-Gen an mittlerer Position eines tricistronischen Vektors einen negativen Effekt auf das endständige neo-Gen hat (Metz et al. 1998). Ob das hier jedoch tatsächlich zutrifft, können nur weitere Untersuchungen des Vektors mit umgekehrter Genreihenfolge (QMIE), sowie Vektoren basierend auf anderen Plasmidgrundgerüsten (z.B. BEIM und BMIE) zeigen. Durch Kombinationen des EPO mit anderen Genen als MDR ließe sich auch feststellen, ob das ein generelles Phänomen ist oder nur auf die Genkombination EPO/MDR zutrifft. In der Literatur finden sich bisher keine Untersuchungen von bicistronischen EPO-Vektoren.

4.1.2 Vergleich unter Kolchizin-Selektion

Das zweite Ziel war der Vergleich der Vektoren nach Selektion der mit ihnen transduzierten Zellen mit Kolchizin. Primäre Fragestellung war, ob die Selektion eine Anreicherung erfolgreich transduzierter Zellen und somit eine Steigerung der MDR- und GFP-Expression ermöglicht und welcher Vektor die besten Resultate liefert. Entscheidend war hierbei die Steigerung der GFP-Expression, da das GFP als Markergen ein späteres Therapiegen repräsentiert. Weiterhin von Interesse war auch die Frage, ob die Effizienzunterschiede zwischen IRES- oder CAP-abhängiger Translation weiterhin auftreten.

Die Ergebnisse zeigen nach 14 Tagen Selektion mit 50 ng/ml für alle Vektoren in beiden Zelltypen, KC und FB, neben einem erwartungsgemäßen Anstieg der MDR+ Zellen auf Werte von ~90% oder mehr auch einen Anstieg der GFP+ Zellen. Auch dies entspricht den Erwartungen, denn vor der Selektion gab es, zumindest nach Transduktion mit den Vektoren QGIM und BMIG, kaum GFP-/MDR+ Zellen. Dafür jedoch einen nicht unerheblichen Anteil nur GFP exprimierender Zellen, welche die Selektion nicht überlebt haben. Daher waren nach der Selektion - wie erwünscht - fast ausschließlich GFP+/MDR+ Zellen vorhanden. Allerdings wiesen als Ausnahme BGIM-transduzierte Zellen, wie schon vor der Selektion, nur einen geringen Anteil GFP+ bzw. GFP+/MDR+ Zellen auf. Hier waren vor Selektion viele ausschließlich MDR exprimierende (GFP-/MDR+) Zellen vorhanden, die auch nach Selektion kein GFP exprimieren (dies ist auch nicht zu erwarten, da es für die Zellen unter Selektionsdruck kein Überlebensvorteil bietet, zusätzlich noch GFP zu exprimieren). Damit stellte dieser Vektor, anders als vielleicht erwartet, da ja in der Regel das erste Genelement stärker exprimiert wird, keinen geeigneten Modellvektor für die Generierung eines bicistronischen EPO-Vektors dar.

Bei der MFI des GFP zeigt sich bei den selektierten Zellen ein Anstieg gegenüber den unselektierten. Dies lässt sich damit erklären, dass die MFI vor Selektion in den GFP+/MDR+ Zellen am höchsten war und nur diese die Selektion überlebt haben. Es wurden also vor allem Zellen mit hoher Expressionsstärke des an das MDR-Gen gekoppelten GFP durch Selektion angereichert - eine wichtige Information für die geplante Expression von EPO in der Haut durch einen bicistronischen Vektor. Der in den HK beobachtete Abfall der GFP-Expression nach 14 Tagen lässt auf eine

abnehmende Vitalität der KC in den Konstrukten in Kultur und damit allmählichen Verlust der GFP-Expression schließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Selektion QGIM- und BMIG-transduzierter KC und FB in beiden Zelltypen zu einem sehr hohen Anteil sowohl GFP als auch MDR exprimierender Zellen führt, und sowohl der QGIM- als auch der BMIG-Vektor sich daher ähnlich gut als Modellvektoren für weitere Untersuchungen eignen sollte, während der Vektor BGIM als eher ungeeignet erscheint. Das GFP war in diesen Vektoren stellvertretend für ein gewünschtes Therapiegen als Markergen eingefügt, um durch quantitative Bestimmung der Anzahl GFP+ Zellen und der GFP-Expressionsstärke beurteilen zu können, in welchem Ausmaß ein Therapiegen (hier: EPO-Gen) durch den jeweiligen Vektor im gewünschten Gewebe (hier: Haut bzw. KC und FB) exprimiert werden würde. Zwar zeigte der Vektor BGIM eine sehr hohe GFP-Expressionsstärke in den transduzierten Zellen, die niedrige Anzahl an GFP+ Zellen, die nach Kolchizinselektion sogar weiter sank, sprach jeden gegen die Verwendung dieses Vektors zur Konstruktion eines EPO-Vektors.

In der Literatur finden sich ansonsten keine Untersuchungen, welche verschiedene bicistronische Vektoren vor und nach Selektion miteinander verglichen. Es wurde entweder nur mit (Suzuki et al. 1997; Metz et al. 1998; Suzuki et al. 1998; Zhou et al. 1998) oder nur ohne Selektion (Zhu et al. 1999; Mizuguchi et al. 2000; Hennecke et al. 2001) untersucht. Letztlich wurde somit der QGIM- anstatt des BMIG-Vektors als Vorlage für den zu konstruierenden bicistronischen EPO-Vektor ausgewählt, da wie gesagt das zweite Cistron zumeist geringer exprimiert wird, und somit die größte Wahrscheinlichkeit für eine hohe EPO-Expression in KC und FB unter Kolchizinselektion bei der Gensequenz EPO-IRES-MDR zu erwarten war.

4.2 *In-vitro*-Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB

4.2.1 EPO-Sekretion und Kolchizin-Selektion in Monolayerkulturen

Es zeigte sich, dass sowohl KC als auch FB nach Transduktion in der Lage sind EPO zu exprimieren. Dies wurde in der Literatur bereits für FB ((Schwenter et al. 2003; Kakeda et al. 2005)) und HeLa-Zellen (Descamps et al. 1996) gezeigt. Es gibt keine Daten, die

die EPO-Expression transduzierter KC *in-vitro* quantifizieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass primäre KC nach *In-vivo*-Transduktion EPO exprimieren (Hengge et al. 2000; Baek et al. 2001; Siprashvili et al. 2004). Der Vergleich mit der Literatur ergibt ähnliche Größenordnungen für die EPO-Expression, wie sie hier für FB ermittelt wurden. So fanden sich in einer Studie mit FB, die einen EPO-exprimierenden Human Artificial Chromosome (HAC) Vektor enthalten, Werte zwischen ca. 8-80 mIU/10⁵ Zellen/4h (Kakeda et al. 2005), was den hier gefundenen 52 mIU/10⁵ Zellen/4h in etwa entspricht.

Durch Kolchizinselktion ließ sich die EPO-Expression von KC und FB steigern. Somit konnte bei zwei unterschiedlichen Genen gezeigt werden, dass sich in Zellen, die mit bicistronischen Vektoren transduziert wurden, mittels Selektion nicht nur eine Expressionssteigerung des Selektionsmarkers, sondern auch des gewünschten, an das Selektionsgen gekoppelten Therapiogens erreichen lässt. In einer anderen Studie, in der FB mit einem retroviralen MoMLV-EPO Vektor, der das neo-Gen als Selektionsgen enthält, transduziert und anschließend mit G418 selektiert wurden (Schwenter et al. 2003), ließ sich ein durchschnittlicher EPO-Wert von 86,7 mIU/10⁵ Zellen/4h erzielen. Dieser liegt unter der Expressionssteigerung, die in der hier vorgelegten Untersuchung mit dem MDR-Gen als Selektionsgen und Kolchizin als Selektionsagens erreicht wurde (von 52 mIU/10⁵ Zellen/4h in unselektierten auf 171-228 mIU/10⁵ Zellen/4h in selektierten FB). Ein möglicher Grund und damit Vorteil der Verwendung von Kolchizin zur Anreicherung MDR-transduzierter Zellen könnte in der hohen Zytotoxizität von G418 liegen, die beispielsweise der proliferative Kapazität und Fähigkeit zum Aufbau einer stratifizierten Epidermis von neo-transduzierten KC stark beeinträchtigt (Stockschlaeder et al. 1991; Ghazizadeh et al. 1998).

4.2.2 EPO-Sekretion und der Kolchizin-Selektion in Hautkonstrukten

Die Ergebnisse der Untersuchungen in Monolayerkulturen lassen sich nicht ohne weiteres auf den Einsatz in der Haut übertragen, da die biochemische Aktivität der KC in der stratifizierten Epidermis Veränderungen unterliegt, die in Monolayerkulturen nicht auftreten (Eckes et al. 1993; Heise et al. 2006). So kommt es zur Differenzierung der KC, was zu einer geänderten Stoffwechsellage der Zellen führt (Houben et al. 2007). Um daher das Modell einer „Bio-Fabrik“ in einer Hautkultur zu simulieren, wurden zwei verschiedene Arten von Hautkonstrukten getestet. Das eine HK beinhaltete

lediglich transduzierte KC, welche auf deepidermalisierte Dermis ausgesät und kultiviert wurden (Pfützner et al. 1999). Es erlaubt auf einfache Art und Weise eine Analyse des Verhaltens transduzierter KC – auch unter Selektion – bei der Expression transduzierter Gene in einer stratifizierten, differenzierten und ausgereiften Epidermis. In einem zweiten Hautmodell wurden KC auf einem Kollagengel, das darin eingebettete FB enthielt, aufgebracht (Kolodka et al. 1998; Pfützner et al. 2002). Dies ermöglicht die separate Bewertung der Sekretionsleistung von FB und KC in der Haut, die Beurteilung einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Zellpopulationen im Rahmen der Transgen-Expression in der Haut und die Analyse möglicher additiver Effekte hierbei.

4.2.2.1 Dermis-Hautkonstrukte

Zunächst mal lässt sich feststellen, dass die KC auch in einer differenzierten Epidermis in der Lage sind, retrovirale Vektorgene wie das MDR- und GFP- bzw. EPO-Gen zu exprimieren. Die unter Kolchizins Selektion gewonnenen Resultate bestätigen zudem die Ergebnisse aus Monolayerkulturen mit einem deutlichen Anstieg der MDR/GFP-(QGIM)-transduzierten bzw. der MDR- (QEIM)-transduzierten Zellen. Dies entspricht den Resultaten einer früheren Studie, die zeigte, dass eine Anreicherung monocistronischer MDR+ KC in HK durch Kolchizins Selektion möglich ist (Pfützner et al. 1999).

Allerdings werden in der hier vorgelegten Arbeit durch die Kolchizins Selektion nicht so hohe Raten an transduzierten KC (über 90% MDR+KC in der früheren Studie) erreicht. Ein Grund dafür könnten Gap-junctions (Zell-Zell-Kanäle) zwischen den KC innerhalb des epidermalen Zellverbandes sein, welche den Austausch kleiner Moleküle ermöglichen (Loewenstein 1987; Salomon et al. 1988; Mothersill et al. 1997). So könnte das Kolchizin von MDR-negativen KC durch diese Kanäle in MDR-exprimierende KC weitergeleitet und dann aus diesen durch das MDR-Protein herausgepumpt werden. Dies könnte ein Überleben MDR-negativer KC ermöglichen und so den gewünschten Selektionseffekt aufheben. Ein zweite Möglichkeit wäre, dass bei niedriger Anzahl transduzierter MDR+ KC in der Epidermis (die in den hier durchgeführten Experimenten relativ niedrig war, was eher einer klinischen *In-vivo*-Situation beim Patienten entsprechen dürfte) eine längere Selektionsdauer nötig ist, da die Zellen sich dort langsamer als in Monolayerkultur teilen und die differenzierten, also nicht mehr proliferierenden KC durch die verwendeten Kolchizinkonzentrationen

vermutlich nicht so stark beeinträchtigt werden. Das wichtigste Ziel der Selektion, eine Steigerung der EPO-Sekretion, konnte in den HK trotz Anreicherung der MDR+KC in der Epidermis im Gegensatz zu den KC-Monolayerkulturen nicht erreicht werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die Selektion aufgrund des geringen Anteils an EPO/MDR+ KC zunächst relativ viele Zellen sterben, und sich die Zellpopulation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums noch nicht vollständig erholt hat. Dies würde bedeuten, dass die EPO-Sekretion wegen der initial noch sehr niedrigen Zahl an EPO/MDR+ KC anfänglich nur sehr langsam ansteigt. Ob dies der Fall ist, kann nicht eindeutig beurteilt werden, da dazu eine genaue Quantifizierung vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten erforderlich wäre, welche jedoch schwierig durchzuführen ist. Allerdings zeigten die H&E-Färbungen der selektierten HK im Gegensatz zu den unselektierten vermehrt tote sowie Mitose-gehemmte Zellen. Auch wiesen die selektierten HK in den H&E-Schnitten eine dünnere Epidermis auf als die unselektierten HK. Bei einer längeren Kultivierung und Selektion der HK sollte sich dann doch noch eine Steigerung erreichen lassen, was bei den *In-vitro*-Ansätzen jedoch nicht möglich ist, da mit zunehmender Kultivierungsdauer die Qualität und Vitalität der HK abnimmt. Allerdings sprechen auch die Ergebnisse der *In-vivo*-Selektion (siehe **Kapitel 4.3**) gegen diese Vermutung, da trotz sehr langer Durchführung der topischen Kolchizinbehandlung keine Steigerung der EPO-Sekretion erbracht werden konnte.

Da in Monolayerkulturen eine Kolchizinbehandlung der EPO/MDR-transduzierten KC und FB zu einer Steigerung der EPO-Produktion durch die Hautzellen führt, könnten veränderte zellphysiologische Vorgänge für die fehlende Steigerung der EPO-Sekretion in den HK unter Kolchizinselektion verantwortlich sein. Denkbar wäre beispielsweise eine Hemmung der EPO-Freisetzung durch das Kolchizin. So ist bekannt, dass Kolchizin, neben Proliferationshemmung auch negative Einflüsse auf den Zellmetabolismus (z.B. Inhibierung des intrazellulären Transports und der Prozessierung und Freisetzung von Proteinen (Thyberg et al. 1980; Weckmann et al. 1997)) hat. Wichtige Zellorganellen im Rahmen der Proteinsekretion sind die Golgi-Vesikel. Neben der Zellmembran stellt sie die zweite wichtige zelluläre Struktur dar, in deren Hülle in den normalerweise MDR-tragenden Zellen MDR exprimiert wird. Es ist keineswegs sicher, dass nach retroviraler MDR-Transduktion der KC und FB von diesen im Golgiapparat gleichermaßen wie in den Zellmembranen MDR exprimiert

wird. So könnte eine verminderte MDR-Expression der Golgivesikel mit einer intravesikulären Kolchizinanreicherung und zytotoxischen Auswirkungen auf die EPO-Sekretion einhergehen.

4.2.2.2 *Gel-Hautkonstrukte*

Die Selektionsergebnisse in den Gel-HK bestätigten die Resultate der Dermis-HK. Auch in den Gel-HK konnte keine Steigerung der EPO-Sekretion durch Kolchizineselektion erreicht werden, obwohl hier neben den EPO/MDR+ KC auch noch EPO/MDR+ FB vorhanden sind. Somit liegt die fehlende EPO-Sekretionssteigerung nicht an dem ausgesuchten Hautmodell oder gar dem Fehlen von (möglichen wichtigen parakrinen Stimulantien durch) FB. Schaut man sich die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze (KC-QEIM/FB-QEIM, nur KC-QEIME/FB-QGIM und KC-QGIM/FB-QEIM) im Detail an, so zeigt sich, dass die EPO-Sekretion in den KC durch Selektion deutlich abnimmt, während sie in FB annähernd gleich bleibt. Dass durch Kolchizineselektion keine wesentliche Zunahme der EPO-Expression in den FB der Dermis erreicht werden kann, ist allerdings nicht verwunderlich, da diese im Kollagengel die Proliferation einstellen (Mauch et al. 1988; Hatamochi et al. 1989), und das Kolchizin über eine Hemmung der Mitose somit keine Wirkung mehr hat. Nachdem Kolchizin in höheren Dosen auch toxische Auswirkungen auf den Zellmetabolismus hat, wäre zwar denkbar, dass höhere Kolchizinkonzentrationen auch einen selektiven Einfluss auf EPO/MDR+FB ausüben können, allerdings steigt dann auch das Risiko genereller zytotoxischer Nebenwirkungen auf die Haut (Thyberg et al. 1980; Weckmann et al. 1997).

4.2.3 **Vergleich von KC und FB**

Eine interessante wichtige Frage war, welche Zielzelle in der Haut eine höhere Leistung bei der EPO-Expression und -Sekretion zeigt, KC oder FB. Dazu gibt es in der Literatur aktuell nur zwei Studien. Eine vergleicht die Expression des Kollagen VII nach Transduktion von KC und FB mit retroviralen Vektoren (Goto et al. 2006), in der anderen wird die Expression von PAH (Phenylalanin Hydroxylase), ebenfalls nach retroviraler Transduktion der Hautzellen, verglichen (Christensen et al. 2002).

4.2.3.1 *Vergleich in Monolayerkulturen*

Der Vergleich der beiden Zelltypen zeigt, dass sowohl die GFP- als auch die EPO-Expression in KC höher ausfällt als in FB. Dies deckt sich mit den Resultaten, welche in der Literatur für das PAH gefunden wurden. Dort wurde für das PAH in KC eine höhere Enzymaktivität, welche auf eine höhere PAH-Expressionsrate schließen lässt, ermittelt (Christensen et al. 2002). Dagegen fand sich für das transgene Kollagen VII zwischen KC und FB kein Unterschied in der Expressionsstärke, welche durch Westernblotanalyse des Zellkulturmediums ermittelt wurde (Goto et al. 2006).

Vermutlich beruht die höhere Rate an (EPO-)Transgen-Proteinsekretion auf einer erhöhten Transduktionsrate, also Aufnahme von Genvektorkopien in KC im Vergleich zu FB. So war die Anzahl der integrierten retroviralen Genkopien, welche mittels Real-Time PCR ermittelt wurde, für alle Vektoren in KC größer als in FB. Dies zeigt wiederum eine Übereinstimmung mit den Resultaten der vergleichenden Studie zur Transduktion von KC und FB mit dem PAH-Gen, in der mittels Southern Blot Analyse eine höhere Gen-Kopienzahl in KC als in FB gefunden wurde (Christensen et al. 2002). In der Untersuchung mit dem retroviralen Kollagen VII-Vektor fand sich für die Kopienzahl, wie schon bei der Expressionsstärke, kein Unterschied zwischen KC und FB. Hieraus wird deutlich, dass KC und FB in Abhängigkeit vom benutzten retroviralen Vektorsystem unterschiedlich starke Genexpression zeigen können. Ein wesentlicher Faktor scheint somit die jeweilige Transduktionseffizienz des genutzten Vektorsystems in den jeweiligen Zielzellen zu sein. KC sind im Vergleich zu FB stark proliferierende Zellen (Leigh et al. 1994) und weisen somit als Zielzelle für eine genetisch modifizierte „Biofabrik“ vermutlich bessere Voraussetzungen auf.

4.2.3.2 *Vergleich in Hautkonstrukten*

Der Vergleich der EPO-Expression pro Zelle von KC und FB in Hautkonstrukten ist nicht direkt möglich, da hierfür die genauen Zellzahlen bekannt sein müssen. Für die Abschätzung einer klinischen Anwendung beim Menschen ist jedoch wichtiger, wie hoch der Beitrag der Epidermis (also der Gesamtheit an KC) oder Dermis (also der Gesamtheit an FB) zur EPO-Expression ist, und weniger die Expressionsstärke pro einzelner Zelle.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Hauptanteil der EPO-Sekretion in den HK von den KC kommt. Sie exprimieren insgesamt das 1,7 - 3,1-fache mehr an EPO als die FB. Dies

war nach den Ergebnissen in Monolayerkultur zu vermuten. Denn dort wiesen die KC eine höhere EPO-Expression als die FB auf. Und da die Anzahl der KC pro HK größer ist als die der FB, ergibt sich auch in der Summe der Zellen eine höhere Expressionsleistung für die KC. Somit zeigt sich, dass KC ein wesentlich höheres Potential als FB zur Sekretion von EPO nach retroviraler Transduktion aufweisen. Allerdings ist dabei zu beachten, dass im epidermalen Zellverbund die KC-Sekretionsleistung in Abhängigkeit von der KC-Differenzierung steht.

Wurde in Monolayerkulturen eine Differenzierung der KC induziert, so kam es zum deutlichen Abfall der EPO-Sekretion. Da die EPO-Expression in den genetisch modifizierten KC und FB über einen konstitutiv aktiven retroviralen Promoter erfolgt, sind hierfür vermutlich Änderungen des Sekretionsverhaltens verantwortlich. Für verschiedene physiologische Sekretionsproteine von KC ist eine Abnahme der Freisetzung im Rahmen der KC-Differenzierung bekannt (Barra et al. 1994; Taichman 1999). Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrazelluläre Kalzium-Spiegel die physiologische EPO-Sekretion hemmen können (McGonigle et al. 1987; Sherwood et al. 1987; Fisher 2003), so dass die erhöhten Kalziumwerte in differenzierten KC eine reduzierte EPO-Freisetzung bedingen könnten.

4.3 *In-vivo*-Untersuchungen zur EPO-Expression genetisch modifizierter KC und FB

4.3.1 FACS-Analyse

In den Transplantaten aus KC und FB, die mit dem QEIM-Vektor transduziert wurden, konnte durch topische Kolchizinbehandlung eine deutliche Anreicherung der MDR+ KC erzielt werden. Dies bestätigt frühere *In-vivo*-Ergebnisse mit Transplantaten aus humanen KC und FB, die mit einem monocistronischen MDR-Vektor transduziert und selektiert worden waren (Pfützner et al. 2002). Topische Kolchizins Selektion von Hautzellen, die mit einem bicistronischen MDR-Vektor transduziert wurden, ist also prinzipiell möglich.

4.3.2 Bestimmung des Hämatokrits sowie des Serum-EPO-Spiegels

Der wichtigste Aspekt bei dem *In-vivo*-Mausmodell war die Frage, ob das von den Transplantaten sezernierte EPO auch in den Blutkreislauf gelangt und dort eine physiologische Wirkung zeigt, welche sich in einem ansteigenden Hämatokrit widerspiegeln würde. Humanes EPO war jedoch nur vereinzelt und in geringen Mengen im Serum nachweisbar. In Übereinstimmung hiermit ließ sich auch kein erhöhter Hämatokrit außerhalb des Normbereichs (also >50 %) feststellen. Zwei Erklärungen wären denkbar: Entweder exprimieren die Zellen der Transplantate kein oder nur sehr wenig EPO, oder das EPO gelangt trotz ausreichender Expressionsleistung nicht oder nur in zu geringem Umfang in den Blutkreislauf. Um dies zu überprüfen, wurden am Ende des Versuchs die Transplantate entnommen und nach zweitägiger Kultivierung unter Zellkulturbedingungen auf eine nach wie vor vorhandene EPO-Sekretion in das Medium untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass nahezu alle Transplantate deutliche Mengen an EPO exprimieren. Die Werte liegen jedoch um den Faktor 10-20 unter denen der *in-vitro* untersuchten Hautkonstrukte. Das lässt vermuten, dass aufgrund einer zu niedrigen Sekretionsleistung der Transplantate nicht ausreichend EPO in den Blutkreislauf gelangt.

Ein Grund für den starken Rückgang der EPO-Expression könnte ein „Gene Silencing“, also die Inhibierung der Transkription des EPO-Gens sein, welche vermutlich durch DNA-Methylierung des LTR-Promotors im retroviralen Vektor ausgelöst wird (Brenner et al. 2003). In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für Rückgang oder Verlust der *In-vivo*-Transgenexpression in KC (Gerrard et al. 1993; Fenjves et al. 1996) und FB (Palmer et al. 1991; Scharfmann et al. 1991).

Auffallend war allerdings, dass die Sekretionsleistung der Transplantate aus der Kolchizin-behandelten Gruppe nach der Explantation bei den meisten Proben unter den Werten der Kontrollgruppe lag. Ein hoher Anteil MDR+ KC korrelierte nicht mit der Höhe der EPO-Expression der explantierten HK. Durch die Kolchizineselektion wird somit nur der Anteil MDR+ Zellen sowie die MDR-Expression gesteigert, nicht jedoch die EPO-Sekretion. Diese nimmt ähnlich wie in den Hautkonstrukten ab, so dass vermutet werden kann, dass auch *in-vivo* die Kolchizineselektion trotz Steigerung der EPO/MDR+Zellen hemmende Auswirkungen auf die EPO-Sekretion hat (siehe **Kapitel 4.2.2**).

4.4 Die Haut als „Bio-Fabrik“: Ausblick

In der Literatur finden sich verschiedene *In-vivo*-Studien, in denen die Haut als „Bio-Fabrik“ zur Sekretion eines Proteins getestet wird. So konnte nach Transduktion humaner KC mit verschiedenen retroviralen Vektoren, unter anderem für das human Growth Hormon (hGH) (Bellini et al. 2003), das Leptin (Larcher et al. 2001) und den Blutgerinnungsfaktor IX (White et al. 1998), eine *In-vivo*-Expression und -Sekretion der Proteine im Blut von Mäusen, denen die transduzierten Zellen transplantiert worden waren, erfolgreich nachgewiesen werden. Beim hGH und Leptin zeigte sich sogar ein physiologischer Effekt. In einer weiteren Studie wurden Plasmide, welche jeweils ein Gen für verschiedene humane Zytokine (Interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Monocyte Chemotactic and Activating Factor (MCAF), Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ)) enthielten, subkutan in Ratten injiziert (Meng et al. 2002). Dabei wurde bei allen Zytokinen eine Expression in den KC der Injektionsstelle gefunden, vier davon (IL-4, IL-6, IL-10 und TGF- β 1) konnten auch im Serum nachgewiesen werden. Auch bei mit retroviralen Vektoren transduzierten FB konnte für verschiedene Proteine (z.B. humanes Transferrin (hTF) (Petersen et al. 1995)) oder einen monoklonalen Antikörper gegen Thyroglobulin (Noel et al. 2000) eine systemische Sekretion der Genprodukte in das im Blutplasma nachgewiesen werden. Prinzipiell ist also der gentherapeutische Einsatz einer genetisch modifizierten Haut als „Biofabrik“ denkbar. Auch für das Genprodukt Erythropoietin gibt es hier bereits verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen.

Allerdings finden sich keine Studien, die das Modell dieser Arbeit, die Transplantation von Hautkonstrukten aus *ex-vivo* transduzierten KC und FB, benutzen, um die genetisch modifizierte Haut als „Bio-Fabrik“ zu nutzen, so dass keine direkten Vergleichsmöglichkeiten vorhanden sind. Es konnte jedoch an mehreren anderen *In-vivo*-Modellen gezeigt werden, dass mit genetisch modifizierten Hautzellen eine systemische Freisetzung von EPO möglich ist (Baek et al. 2001; Schwenter et al. 2003; Sibrashvili et al. 2004; Brill-Almon et al. 2005). In zwei Studien wurden hierfür lentivirale EPO-Vektoren in humane Vollhaut, welche zuvor auf Mäuse transplantiert wurde, injiziert (Baek et al. 2001; Sibrashvili et al. 2004). Da intraepidermale Injektionen aufgrund der extrem dünnen Epidermis nicht möglich sind, wird wohl

sämtliches injiziertes Vektormaterial in die Dermis gegeben und somit nicht von den KC, sondern von FB oder sogar in die systemische Zirkulation aufgenommen. Die direkte *In-vivo*-Applikation lentiviraler Vektoren ist zudem mit einem Risiko verbunden, da durch Rekombination der Virusgene replikationskompetente Viren entstehen können (Chong et al. 1998). Bei der in dieser Arbeit verwendeten *ex-vivo* Transduktion lassen sich die transduzierten Zellen vor der Anwendung auf replikationskompetente Viren testen. Das ist bei der *In-vivo*-Transduktion nicht möglich.

In einer anderen Untersuchung wurden Biopsien humaner Dermis *ex-vivo* mit Adeno- oder AAV-Vektoren transduziert und anschließend subkutan auf Mäuse transplantiert (Brill-Almon et al. 2005). Die Verwendung von Adenoviren hat jedoch den Nachteil, dass sie Immunreaktionen beim Menschen hervorrufen und keine langfristige Genexpression ermöglichen, da sie sich nicht in das Genom integrieren. Zudem zeigen neueste Studienergebnisse dieses ansonsten vielversprechenden Vektorsystems, dass AAV-Vektoren möglicherweise onkogenes Risikopotential besitzen (Donsante et al. 2007). Ein weiteres *In-vivo*-Modell besteht in der subkutanen Transplantation von Mikrokapseln, welche mit einem MoMLV-Vektor transduzierte FB enthalten (Schwenter et al. 2003). Allerdings ist ein wesentlicher Nachteil dieser Methode, dass dauerhaft Fremdkörper im Organismus verbleiben. Außerdem zeigte sich, dass die EPO-Sekretion der FB nach dem Einschluss in die Mikrokapseln deutlich verringert war, so dass diese Methode für den Einsatz am Patienten ungeeignet erscheint.

Zu überlegen ist somit, ob auch das hier vorgestellte Modell so optimiert werden kann, dass ein klinischer Einsatz denkbar ist. Hierfür bieten sich mehrere Ansätze an: Zunächst einmal sollte die Expressionsrate des EPO in den Zellen der HK schon vor der Transplantation auf ein möglichst hohes Niveau gesteigert werden. Dafür kommen mehrere Möglichkeiten, eventuell auch in Kombination, in Frage: zum einen die Gewinnung von Klonen der retroviralen Verpackungszellen, die eine sehr hohe EPO- und MDR-Expression zeigen, also hohe Virustiter sezernieren. Eine gesteigerte Transduktionseffizienz der KC und FB ist aber auch mit der Gefahr verbunden, dass das Risiko onkogener Mutationen in den Zielzellen ansteigt (Baum et al. 2003; Modlich et al. 2005). Zum anderen die Steigerung der EPO-Expression der Zellen vor Herstellung der HK durch Kolchizinselektion und Anreicherung der transduzierten Zellen in den

Monolayerkulturen. Zu bedenken ist hierbei, dass die Vitalität der transduzierten KC und FB mit anhaltender *In-vitro*-Kultivierung, wie es bei einer längeren Selektion ja der Fall wäre, abnimmt.

Eine ganz andere Option wäre die Generierung und Testung weiterer Vektoren, die eine verbesserte Transduktionseffizienz für das EPO besitzen. Neben anderen Vektorgrundgerüsten sowie anderer Reihenfolge des EPO- und MDR-Gens gibt es hier noch weitere Möglichkeiten. So ermöglicht die Verwendung eines posttranskriptionalen Regulierungselements aus dem Woodchuck Hepatitis Virus (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE)) die Steigerung der Transgenexpression in MoMLV- sowie HIV- basierenden retroviralen Vektoren, indem es den Export der Transgen-mRNA aus dem Zellkern sowie ihre 3'-Prozessierung und Polyadenylierung erleichtert. Dieser Effekt ist dabei unabhängig vom Zelltyp, dem Zellteilungsstadium sowie dem verwendeten Promotor (Zufferey et al. 1999; Ramezani et al. 2000). In Kombination mit der Verwendung der Kozak-Konsensus-Sequenz, welche für die Initiierung der Translation wichtig ist (Kozak 1989), konnte in humanen FB, die mit einem retroviralen MoMLV-EPO-Vektor transduziert wurden, eine Steigerung der EPO-Expression um mehr als das siebenfache gegenüber dem unmodifizierten Vektor erzielt werden.

5 Zusammenfassung

Als Oberflächenorgan stellt die Haut eine vielversprechende Zielstruktur für gentherapeutische Anwendungen dar. Mögliche Einsatzbereiche sind die Behandlung lokaler, kutaner (z.B. blasenbildende Genodermatosen) und auch systemischer Erkrankungen. So können die Zellen der Haut durch genetische Modifizierung zur Sezernierung von Proteinen gebracht werden, die dann über die Blutgefäße der Dermis in den Blutkreislauf gelangen. Zudem eignet sich die Haut sehr gut für die Steigerung der Effizienz der kutanen Genexpression durch eine Selektion der genetisch modifizierten Zellen mittels eines topisch (also lokal) aufgetragenen Selektionsagens.

Ein besonders interessantes Therapie-Gen für eine systemische Gentherapie stellt das humane Erythropoietin (EPO)-Gen dar. Rekombinantes EPO wird zur klinischen Behandlung zahlreicher Erkrankungen verwendet. Die gentherapeutische Expression von EPO in der Haut ermöglicht einen Verzicht auf die kosten-, zeit- und arbeitsaufwändigen regelmäßigen EPO-Injektionen. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung kutaner Zellsysteme zur Expression und Sekretion von EPO *in-vitro* und *in-vivo* und der Möglichkeit, durch topische Selektion diese positiv beeinflussen zu können. Anhand verschiedener bicistronischer retroviraler Vektoren, die das GFP-Gen als Markergen stellvertretend für das EPO-Gen über ein IRES-Element an das MDR-Gen als Selektionsgen gekoppelt enthielten, sollte zunächst der geeignetste Vektor für die weiteren Analysen ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die Effizienz der Transduktion sowie der Genexpression eines Vektors von verschiedenen Faktoren wie Genpositionierung, Vektorgrundgerüst und Zielzellen abhängt.

Untersucht wurde zunächst die Transduktionseffizienz (mittels Messung des Anteils MDR- und/oder GFP-exprimierender Zellen im FACS sowie der Anzahl der integrierten retroviralen Vektorkopien im Zellgenom durch Real-Time PCR) sowie die Expressionsleistung (mittels Messung der mittleren Fluoreszenzintensität des GFP im FACS) vor und nach Kolchizins Selektion in Monolayerkulturen der beiden Zielzelltypen, den KC und FB. Dabei zeigte sich, dass die Transduktion mit drei verschiedenen Vektoren (BGIM, BMIG, QGIM) zu einem unterschiedlich hohen Anteil GFP- und/oder MDR-exprimierender Zellen führte. Der Vektor QGIM stellte sich als der

Effizienteste heraus, da er eine hohe Transduktionseffizienz sowie GFP-Expressionsstärke zeigte, welche nach Kolchizins Selektion über den Werten der anderen Vektoren lag. Daher wurde aufbauend auf dem Vektor QGIM der Vektor QEIM konstruiert, welcher anstatt des GFP-Gens das humane EPO-Gen enthält.

Nach Transduktion von KC und FB mit dem EPO-Vektor exprimierten beide Zelltypen humanes EPO. Zudem konnte durch Kolchizins Selektion die Expressionsrate, wie schon beim GFP, deutlich gesteigert werden. Außerdem zeigte sich, dass in KC die EPO-Expression deutlich höher ausfiel als in FB. Ebenso war die Anzahl der integrierten retroviralen Genkopien in den KC größer als in FB. Somit hängt die Effizienz eines Vektors auch von der gewählten Zielzelle ab.

Da sich das biologische Verhalten von KC und FB in Monolayerkulturen von dem in der Haut unterscheidet, wurden die Untersuchungen auch an Hautkonstrukten durchgeführt. Diese enthielten mit den Vektoren QGIM oder QEIM transduzierte Zellen und dienten als Modell für die menschliche Haut. Es kamen zwei verschiedene Modelle zum Einsatz. Eines bestand aus transduzierten KC, die auf avitaler Dermis ausgesät wurden, während im zweiten die Dermis aus einem Kollagengel bestand, in das transduzierte FB eingebettet waren. Die HK konnten dabei in beiden Modellen EPO in das sie umgebende Kulturmedium sezernieren. Die FACS-Analyse der KC zeigte, dass die Selektion mit Kolchizin auch in HK zu einer Anreicherung QGIM-transduzierter, MDR+/GFP+ KC bzw. QEIM-transduzierter, EPO/MDR+ KC führte. Allerdings konnte im Gegensatz zu den Monolayerkulturen bei beiden HK-Modellen keine Steigerung der EPO-Expression durch Kolchizins Selektion erreicht werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine reduzierte EPO-Expression in differenzierten KC. Somit zeigte sich, dass die Effektivität der EPO-Expression in genetisch modifizierter Haut nicht nur von dem gewählten Vektorsystem und den transduzierten Zielzellen abhängt, sondern auch den organspezifischen Besonderheiten.

Im Anschluss an die *In-vitro*-Analysen wurde ein tierexperimentelles *In-vivo*-Modell kutaner EPO-Sekretion untersucht. Dabei wurden Gel-HK aus QEIM-transduzierten KC und FB auf immundefekte Nacktmäuse transplantiert und nach erfolgreichem Anwachsen mit Kolchizin- oder Kontrollcreme behandelt. Bei der Analyse des zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Blutes mittels ELISA konnte allerdings in den meisten Fällen kein oder nur sehr wenig humanes EPO im Mausserum

nachgewiesen werden. Auch ein Anstieg des Hämatokrits, als Folge einer möglichen biologischen Wirkung des humanen EPO, wurde nicht festgestellt. Nach Entnahme der Transplantate am Ende des Versuchszeitraums ließ sich eine EPO-Sekretion der Explantate nachweisen. Diese lag jedoch deutlich unter den Ausgangswerten vor der Transplantation, wobei die kolchizinbehandelten Transplantate überraschenderweise eine geringere Menge an EPO freisetzen. Mittels FACS-Analyse konnte allerdings eine Zunahme MDR+ KC in den kolchizinselektierten Transplantaten festgestellt werden, so dass eine fehlende Wirkung der Kolchizinselektion ausgeschlossen werden konnte. Die Ursache der verminderten EPO-Sekretion aus der genetisch modifizierten Haut *in-vivo* unter Kolchizinbehandlung lag möglicherweise an einer reduzierten Vitalität der Zellen zum Untersuchungszeitpunkt. Möglichkeiten zur Optimierung für einen (prä-)klinischen Einsatz dieses Modells werden diskutiert. Zusammengefasst stellen die hier vorgestellten Ergebnisse die ersten Schritte für den Einsatz genetisch modifizierter Haut als „Bio-Fabrik“ zur systemischen Sekretion von EPO dar.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, M. A., Ramesh, N., et al. (1991). "Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions." J Virol **65**(9): 4985-90.
- Aran, J. M., Gottesman, M. M., et al. (1998). "Construction and characterization of bicistronic retroviral vectors encoding the multidrug transporter and beta-galactosidase or green fluorescent protein." Cancer Gene Ther **5**(4): 195-206.
- Baek, S. C., Lin, Q., et al. (2001). "Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue." Hum Gene Ther **12**(12): 1551-8.
- Barra, R. M., Fenjves, E. S., et al. (1994). "Secretion of apolipoprotein E by basal cells in cultures of epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **102**(1): 61-6.
- Baum, C., Dullmann, J., et al. (2003). "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells." Blood **101**(6): 2099-114.
- Bellini, M. H., Peroni, C. N., et al. (2003). "Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes." Faseb J **17**(15): 2322-4.
- Breckpot, K., Aerts, J. L., et al. (2007). "Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics." Gene Ther **14**(11): 847-62.
- Brenner, S. and Malech, H. L. (2003). "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy." Biochim Biophys Acta **1640**(1): 1-24.
- Brill-Almon, E., Stern, B., et al. (2005). "Ex vivo transduction of human dermal tissue structures for autologous implantation production and delivery of therapeutic proteins." Mol Ther **12**(2): 274-82.
- Bushman, F. D. (2002). "Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control." Curr Top Microbiol Immunol **261**: 165-77.
- Cereseto, A. and Giacca, M. (2004). "Integration site selection by retroviruses." AIDS Rev **6**(1): 13-21.
- Chen, M., Kasahara, N., et al. (2002). "Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa." Nat Genet **32**(4): 670-5.
- Chong, H., Starkey, W., et al. (1998). "A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences." J Virol **72**(4): 2663-70.

- Christensen, R., Guttler, F., et al. (2002). "Comparison of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts as potential target cells for somatic gene therapy of phenylketonuria." Mol Genet Metab **76**(4): 313-8.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., et al. (1997). Retroviruses. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Daemen, T., de Mare, A., et al. (2005). "Virosomes for antigen and DNA delivery." Adv Drug Deliv Rev **57**(3): 451-63.
- Dallinger, G., Puttaraju, M., et al. (2003). "Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases." Exp Dermatol **12**(1): 37-46.
- Dellambra, E., Prislei, S., et al. (2001). "Gene correction of integrin beta4-dependent pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa keratinocytes establishes a role for beta4 tyrosines 1422 and 1440 in hemidesmosome assembly." J Biol Chem **276**(44): 41336-42.
- Dellambra, E., Vailly, J., et al. (1998). "Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa." Hum Gene Ther **9**(9): 1359-70.
- Descamps, V., Blumenfeld, N., et al. (1996). "Keratinocytes as a target for gene therapy. Sustained production of erythropoietin in mice by human keratinocytes transduced with an adenoassociated virus vector." Arch Dermatol **132**(10): 1207-11.
- Ding, Z., Harding, C. O., et al. (2004). "State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy." Mol Genet Metab **81**(1): 3-8.
- Dobson, J. (2006). "Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery." Gene Ther **13**(4): 283-7.
- Donsante, A., Miller, D. G., et al. (2007). "AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma." Science **317**(5837): 477.
- Dropulic, B. and June, C. H. (2006). "Gene-based immunotherapy for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome." Hum Gene Ther **17**(6): 577-88.
- Eckes, B., Mauch, C., et al. (1993). "Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms." FEBS Lett **318**(2): 129-33.
- Eming, S. A., Krieg, T., et al. (2007). "Gene therapy and wound healing." Clin Dermatol **25**(1): 79-92.

- Fakharzadeh, S. S., Zhang, Y., et al. (2000). "Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin." Blood **95**(9): 2799-805.
- Felnerova, D., Viret, J. F., et al. (2004). "Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs." Curr Opin Biotechnol **15**(6): 518-29.
- Fenjves, E. S., Gordon, D. A., et al. (1989). "Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8803-7.
- Fenjves, E. S., Yao, S. N., et al. (1996). "Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes." J Invest Dermatol **106**(3): 576-8.
- Ferrari, S., Pellegrini, G., et al. (2006). "Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa." Expert Opin Biol Ther **6**(4): 367-78.
- Ferrari, S., Pellegrini, G., et al. (2005). "Gene therapy approaches for epidermolysis bullosa." Clin Dermatol **23**(4): 430-6.
- Fisher, J. W. (2003). "Erythropoietin: physiology and pharmacology update." Exp Biol Med (Maywood) **228**(1): 1-14.
- Flotte, T. R. (2004). "Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors." Gene Ther **11**(10): 805-10.
- Fritsch, P. (1998). Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas. Berlin; Heidelberg, Springer.
- Gache, Y., Baldeschi, C., et al. (2004). "Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa." Hum Gene Ther **15**(10): 921-33.
- Gagnoux-Palacios, L., Hervouet, C., et al. (2005). "Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors." J Gene Med **7**(9): 1178-86.
- Gerrard, A. J., Hudson, D. L., et al. (1993). "Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes." Nat Genet **3**(2): 180-3.
- Geurts, A. M., Yang, Y., et al. (2003). "Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system." Mol Ther **8**(1): 108-17.
- Ghattas, I. R., Sanes, J. R., et al. (1991). "The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos." Mol Cell Biol **11**(12): 5848-59.
- Ghazizadeh, S., Harrington, R., et al. (1998). "Retrovirus-mediated transduction of porcine keratinocytes in organ culture." J Invest Dermatol **111**(3): 492-6.

- Ghazizadeh, S. and Taichman, L. B. (2000). "Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy." Hum Gene Ther **11**(16): 2247-51.
- Ghosh, S. S., Gopinath, P., et al. (2006). "Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy." Appl Biochem Biotechnol **133**(1): 9-29.
- Goncalves, M. A. (2005). "Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector." Virology **2**: 43.
- Goto, M., Sawamura, D., et al. (2006). "Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa." J Invest Dermatol **126**(4): 766-72.
- Groth, A. C., Olivares, E. C., et al. (2000). "A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5995-6000.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., et al. (2003a). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., et al. (2003b). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hatamochi, A., Aumailley, M., et al. (1989). "Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation." J Biol Chem **264**(6): 3494-9.
- Heise, R., Mey, J., et al. (2006). "Skin Retinoid Concentrations Are Modulated by CYP26A1 Expression Restricted to Basal Keratinocytes in Normal Human Skin and Differentiated 3D Skin Models." J Invest Dermatol **126**(11): 2473-80.
- Hengge, U. R. and Mirmohammadsadegh, A. (2000). "Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis." Mol Ther **2**(3): 188-94.
- Hennecke, M., Kwissa, M., et al. (2001). "Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(16): 3327-34.
- Houben, E., De Paepe, K., et al. (2007). "A keratinocyte's course of life." Skin Pharmacol Physiol **20**(3): 122-32.
- Izsvak, Z. and Ivics, Z. (2004). "Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy." Mol Ther **9**(2): 147-56.
- Jelkmann, W. (1992). "Erythropoietin: structure, control of production, and function." Physiol Rev **72**(2): 449-89.

- Jozkowicz, A. and Dulak, J. (2005). "Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy." Acta Biochim Pol **52**(3): 589-99.
- Julius, M. A., Yan, Q., et al. (2000). "Q vectors, bicistronic retroviral vectors for gene transfer." Biotechniques **28**(4): 702-8.
- Kakeda, M., Hiratsuka, M., et al. (2005). "Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts." Gene Ther **12**(10): 852-6.
- Kaufman, R. J., Davies, M. V., et al. (1991). "Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus." Nucleic Acids Res **19**(16): 4485-90.
- Kolodka, T. M., Garlick, J. A., et al. (1998). "Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4356-61.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." J Cell Biol **108**(2): 229-41.
- Lacombe, C. and Mayeux, P. (1998). "Biology of erythropoietin." Haematologica **83**(8): 724-32.
- Larcher, F., Del Rio, M., et al. (2001). "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts." Faseb J **15**(9): 1529-38.
- Leigh, I. M., Lane, E. B., et al. (1994). The keratinocyte handbook. Cambridge, Cambridge University Press.
- Li, Z., Dullmann, J., et al. (2002). "Murine leukemia induced by retroviral gene marking." Science **296**(5567): 497.
- Licht, T., Haskins, M., et al. (2002). "Drug selection with paclitaxel restores expression of linked IL-2 receptor gamma -chain and multidrug resistance (MDR1) transgenes in canine bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3123-8.
- Loewenstein, W. R. (1987). "The cell-to-cell channel of gap junctions." Cell **48**(5): 725-6.
- Marshall, E. (2003). "Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia." Science **299**(5605): 320.
- Mauch, C., Hatamochi, A., et al. (1988). "Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel." Exp Cell Res **178**(2): 493-503.
- McGonigle, R. J., Brookins, J., et al. (1987). "Enhanced erythropoietin production by calcium entry blockers in rats exposed to hypoxia." J Pharmacol Exp Ther **241**(2): 428-32.

- McMillan, J. R., Akiyama, M., et al. (2003). "Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions." J Dermatol Sci **31**(3): 169-77.
- Mecklenbeck, S., Compton, S. H., et al. (2002). "A microinjected COL7A1-PAC vector restores synthesis of intact procollagen VII in a dystrophic epidermolysis bullosa keratinocyte cell line." Hum Gene Ther **13**(13): 1655-62.
- Medin, J. A., Tudor, M., et al. (1996). "Correction in trans for Fabry disease: expression, secretion and uptake of alpha-galactosidase A in patient-derived cells driven by a high-titer recombinant retroviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7917-22.
- Meng, X., Sawamura, D., et al. (2002). "Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin." Exp Dermatol **11**(5): 456-61.
- Metz, M. Z., Pichler, A., et al. (1998). "Construction and characterization of single-transcript tricistronic retroviral vectors using two internal ribosome entry sites." Somat Cell Mol Genet **24**(1): 53-69.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., et al. (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences." PLoS Biol **2**(8): E234.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., et al. (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." Mol Ther **1**(4): 376-82.
- Modlich, U., Kustikova, O. S., et al. (2005). "Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis." Blood **105**(11): 4235-46.
- Mothersill, C. and Seymour, C. (1997). "Survival of human epithelial cells irradiated with cobalt 60 as microcolonies or single cells." Int J Radiat Biol **72**(5): 597-606.
- Naviaux, R. K., Costanzi, E., et al. (1996). "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses." J Virol **70**(8): 5701-5.
- Ng, T., Marx, G., et al. (2003). "Recombinant erythropoietin in clinical practice." Postgrad Med J **79**(933): 367-76.
- Niidome, T. and Huang, L. (2002). "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors." Gene Ther **9**(24): 1647-52.
- Noel, D., Pelegrin, M., et al. (2000). "Sustained systemic delivery of monoclonal antibodies by genetically modified skin fibroblasts." J Invest Dermatol **115**(4): 740-5.

- Olivares, E. C., Hollis, R. P., et al. (2002). "Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice." Nat Biotechnol **20**(11): 1124-8.
- Ortiz-Urda, S., Lin, Q., et al. (2003a). "Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue." J Clin Invest **111**(2): 251-5.
- Ortiz-Urda, S., Lin, Q., et al. (2003b). "Sustainable correction of junctional epidermolysis bullosa via transposon-mediated nonviral gene transfer." Gene Ther **10**(13): 1099-104.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., et al. (2003c). "PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa." Hum Gene Ther **14**(9): 923-8.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., et al. (2002). "Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease." Nat Med **8**(10): 1166-70.
- Page, S. M. and Brownlee, G. G. (1997). "An ex vivo keratinocyte model for gene therapy of hemophilia B." J Invest Dermatol **109**(2): 139-45.
- Palmer, T. D., Rosman, G. J., et al. (1991). "Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1330-4.
- Pastan, I., Gottesman, M. M., et al. (1988). "A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4486-90.
- Petersen, M. J., Kaplan, J., et al. (1995). "Sustained production of human transferrin by transduced fibroblasts implanted into athymic mice: a model for somatic gene therapy." J Invest Dermatol **104**(2): 171-6.
- Pfützner, W., Hengge, U. R., et al. (1999). "Selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene in an in vitro skin model presents a strategy for enhancing gene expression in vivo." Hum Gene Ther **10**(17): 2811-21.
- Pfützner, W., Terunuma, A., et al. (2002). "Topical colchicine selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene (MDR1) can sustain and enhance transgene expression in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13096-101.
- Ponder, K. P. (2006). "Gene therapy for hemophilia." Curr Opin Hematol **13**(5): 301-7.
- Ramezani, A., Hawley, T. S., et al. (2000). "Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells." Mol Ther **2**(5): 458-69.
- Robbins, P. B., Lin, Q., et al. (2001). "In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5193-8.

- Salomon, D., Saurat, J. H., et al. (1988). "Cell-to-cell communication within intact human skin." J Clin Invest **82**(1): 248-54.
- Samson, S. L. and Chan, L. (2006). "Gene therapy for diabetes: reinventing the islet." Trends Endocrinol Metab **17**(3): 92-100.
- Scharfmann, R., Axelrod, J. H., et al. (1991). "Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4626-30.
- Schroder, A. R., Shinn, P., et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.
- Schwenter, F., Deglon, N., et al. (2003). "Optimization of human erythropoietin secretion from MLV-infected human primary fibroblasts used for encapsulated cell therapy." J Gene Med **5**(3): 246-57.
- Scimanti, C. R., Thyagarajan, B., et al. (2001). "Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence." Nucleic Acids Res **29**(24): 5044-51.
- Sherwood, J. B., Burns, E. R., et al. (1987). "Stimulation by cAMP of erythropoietin secretion by an established human renal carcinoma cell line." Blood **69**(4): 1053-7.
- Siprashvili, Z. and Khavari, P. A. (2004). "Lentivectors for regulated and reversible cutaneous gene delivery." Mol Ther **9**(1): 93-100.
- Stockschlaeder, M. A., Storb, R., et al. (1991). "L-histidinol provides effective selection of retrovirus-vector-transduced keratinocytes without impairing their proliferative potential." Hum Gene Ther **2**(1): 33-9.
- Sugimoto, Y., Aksenitjevich, I., et al. (1994). "Efficient expression of drug-selectable genes in retroviral vectors under control of an internal ribosome entry site." Biotechnology (N Y) **12**(7): 694-8.
- Sugimoto, Y., Aksenitjevich, I., et al. (1995). "Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human alpha-galactosidase A for gene therapy of Fabry disease." Hum Gene Ther **6**(7): 905-15.
- Suzuki, M., Sugimoto, Y., et al. (1997). "Retroviral coexpression of two different types of drug resistance genes to protect normal cells from combination chemotherapy." Clin Cancer Res **3**(6): 947-54.
- Suzuki, M., Sugimoto, Y., et al. (1998). "Efficient protection of cells from the genotoxicity of nitrosoureas by the retrovirus-mediated transfer of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase using bicistronic vectors with human multidrug resistance gene 1." Mutat Res **401**(1-2): 133-41.

- Taichman, L. B. (1999). "Systemic replacement therapy from genetically modified epidermal keratinocytes." Proc Assoc Am Physicians **111**(3): 206-10.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., et al. (2001). "Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase." Mol Cell Biol **21**(12): 3926-34.
- Thyberg, J., Piasek, A., et al. (1980). "Effects of colchicine on the Golgi complex and GERL of cultured rat peritoneal macrophages and epiphyseal chondrocytes." J Cell Sci **45**: 41-58.
- Weckmann, M. T., Grone, A., et al. (1997). "Regulation of parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression in normal human keratinocytes and a squamous carcinoma cell line." Exp Cell Res **232**(1): 79-89.
- Wells, D. J. (2004). "Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods." Gene Ther **11**(18): 1363-9.
- White, S. J., Page, S. M., et al. (1998). "Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo." Hum Gene Ther **9**(8): 1187-95.
- Woodley, D. T., Keene, D. R., et al. (2004). "Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo." Mol Ther **10**(2): 318-26.
- Wu, X. and Burgess, S. M. (2004). "Integration target site selection for retroviruses and transposable elements." Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2588-96.
- Wu, X., Li, Y., et al. (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.
- Yant, S. R., Meuse, L., et al. (2000). "Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system." Nat Genet **25**(1): 35-41.
- Young, L. S., Searle, P. F., et al. (2006). "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." J Pathol **208**(2): 299-318.
- Zhou, Y., Aran, J., et al. (1998). "Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector." Hum Gene Ther **9**(3): 287-93.
- Zhu, J., Musco, M. L., et al. (1999). "Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages." Cytometry **37**(1): 51-9.
- Zufferey, R., Donello, J. E., et al. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol **73**(4): 2886-92.

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Dr. W. Pfützner für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige fachliche Unterstützung danken.

Frau PD Dr. C. Berking danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Frau Ines Nachtigall für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit und die Einführung in neue Arbeitstechniken bedanken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen in den Forschungsabteilungen im 3. und 7. Stock der Dermatologischen Klinik danke ich für das freundliche Arbeitsklima sowie die Unterstützung bei meiner Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre ständige Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Scheidemann
Geburtstag: 06.06.1977
Geburtsort: Georgsmarienhütte

Ausbildung

1983 – 1987 Graf-Ludolf Grundschule Kloster Oesede
1987 – 1989 Orientierungsstufe Kloster Oesede
1989 – 1993 Realschule Georgsmarienhütte
1993 – 1996 Technisches Gymnasium Osnabrück
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/1996 - 09/2002 Chemiestudium an der Westfälischen Wilhelms
Universität Münster
Abschluss: Diplom Chemiker

03/2002 – 09/2002 Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr.
Johannes A. Eble am Institut für Physiologische Chemie und
Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster
Thema: Rekombinante Herstellung des löslichen $\alpha 6\beta 4$ Integrins
und seine Ligandenbindungs-eigenschaften

10/2003 - 02/2008 Promotion zum Doktor der Humanbiologie an der Klinik und
Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München
in der Arbeitsgruppe von Dr. Wolfgang Pfützner
Thema: Die Haut als „Bio-Fabrik“: Erythropoietinsekretion durch
retroviral transduzierte und anschließend selektierte
Keratinocyten und Fibroblasten