

**Etablierung adenoviraler Genexpression
zum antifibrotischen Einsatz bei der Leberfibrose**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Jens Kneifel
aus
Eschweiler

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Prof. h.c. (RCH) Axel M. Gressner

Herr Professor Dr. med Carsten Garton

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2004

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.**

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Leber als größtes menschliches Stoffwechselorgan.....	1
1.2 Ursachen und Auswirkungen der Leberfibrose	1
1.3 Die Rolle des TGF- β in der Entstehung der Leberfibrose	4
1.4 Gentherapeutische Ansätze.....	5
1.5 Das adenovirale System.....	6
2 MATERIALIEN.....	9
2.1 Verbrauchsmaterial	9
2.2 Chemikalien.....	9
2.3 Enzyme	10
2.4 Sonstige molekularbiologische Reagenzien	11
2.5 Medien für Zellkultur und Bakterienaufzucht	11
2.6 Biologische Materialien.....	12
2.7 Lösungen.....	12
3 METHODIK	16
3.1 Allgemeine Arbeitsmethoden der Molekularbiologie	16
3.1.1 Isolation von Plasmid - DNA aus Bakterien	16
3.1.1.1 Plasmidminipräparation	16
3.1.1.2 Plasmidgroßpräparation	17

3.1.2	Isolation eukaryotischer RNA.....	18
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Photometrie)	19
3.1.4	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	19
3.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	19
3.1.6	Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
3.1.7	Aufbereiten von Restriktionsfragmenten zur Klonierung.....	20
3.1.7.1	Auffüllreaktion mittels Klenow – Fragment	20
3.1.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	21
3.1.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	21
3.1.8	Herstellung kompetenter Bakterien zur Plasmidtransformation	21
3.1.9	Transformation von Bakterien durch Plasmide	22
3.1.10	DNA – Sequenzierung	22
3.1.11	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarosegelen	23
3.1.12	Northern Blotting.....	23
3.1.13	Radioaktive Markierungstechnik (<i>Random Priming</i>)	24
3.1.14	G50-Gelfiltration zur Abtrennung von Nukleotiden.....	24
3.1.15	Filterhybridisierung von Northern Blots.....	25
3.1.16	Isolation von Proteinextrakten.....	25
3.1.17	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	26
3.1.18	Western Blotting	26
3.1.19	Detektion von Proteinen mit Antikörpern	26
3.1.20	Immunpräzipitation:Anfärben von Proteinen mit Coomassie Blue	27
3.2	Allgemeine Methoden in der Zellkultur	27
3.2.1	Kultur von HEK 293, HSC, MFB, CFSC, Cos-7	28
3.2.2	Trypsinisierung von Zellen.....	28
3.2.3	Einfrieren von Zellen.....	28
3.2.4	Proliferations-Assay.....	29
3.3	Etablierung und Methoden adenoviraler Expressionstechnik.....	29
3.3.1	Grundlegende Klonierstrategien	29
3.3.2	Homologe Rekombination: Erstellung rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren.....	29
3.3.3	Reinfektion zur Amplifizierung von Adenoviren.....	30
3.3.4	Aufreinigung und Aufkonzentration der Viruspartikel	31
3.3.5	Infektion von Zellen.....	31
3.3.6	Elektronenmikroskopischer Nachweis des Virions.....	32
4	ERGEBNISSE.....	33
4.1	Erstellung eines adenoviralen Reporterkonstruktes: Ad5-CMV-EGFP ...	33
4.1.1	Klonierung des <i>shuttle</i> -Vektors p Δ E1sp1A-CMV-EGFP	33
4.1.2	Erzeugung von Ad5-CMV-EGFP durch homologe Rekombination.....	35
4.1.3	Titration der Viruspartikel.....	38
4.1.4	Aufreinigung und Aufkonzentration der Viren	38

4.1.5	Nachweis der Infektiösität von Ad5-CMV-EGFP in HSC und MFB	40
4.1.6	Dokumentation der Integrität von Ad5-CMV-EGFP durch Elektronenmikroskopie	41
4.2.	Expression eines löslichen TGF-β Typ II-Rezeptors als Grundlage möglicher antifibrotischer Therapie	42
4.2.1	Klonierung des <i>shuttle</i> -Vektors p Δ E1sp1A-CMV-sT β RII	42
4.2.2	Nachweis der Expression von Ad5-CMV-sT β RII	45
4.2.2.1	Expression des adenoviralen Konstruktes auf mRNA-Ebene.....	45
4.2.2.2	Dokumentation der Translationsfähigkeit des adenoviralen Konstruktes.....	47
4.2.3	Immunpräzipitation zur Darstellung des Fusionsproteins	49
4.2.4	Nachweis der biologischen Aktivität von Ad5-CMV-sT β RII.....	52
5	DISKUSSION	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
8	ANHANG.....	67

Abkürzungsverzeichnis

abs	absolut
Ad5	Adenovirus Typ 5
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CFSC	<i>cirrhotic fat storing cells</i>
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>counts per minute</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle´s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E1	<i>early gene 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtdBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
GIT	Guanidinisothiocyanat
HBSS	<i>Hank´s buffered salt solution</i>
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFB	Myofibroblasten
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pfu	<i>plaque forming units</i>
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidon
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Stunde
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
VT	Volumenteile

1 Einleitung

1.1 Die Leber als größtes menschliches Stoffwechselorgan

Die Leber des Menschen nimmt als zentrales Organ des Stoffwechsels eine bedeutende Rolle ein. So ist sie an der Produktion und Ausscheidung von Galle beteiligt und stellt einen Hauptort für die Produktion von Cholesterin und Triglyceriden dar. Im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels kann sie ein Überangebot von Glucose im Blut in Form von Glykogen speichern und bei Glucosemangel durch Gluconeogenese Glucose herstellen. Ferner stellt die Leber den Hauptbildungsort körpereigener Proteine dar.

Neben der Bildung von Albuminen, α - und β -Globulinen werden hier die meisten plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Fibrinogen und das Prothrombin synthetisiert. Die Elimination von schädlichem Ammoniak in Form von Harnstoff wird durch den Harnstoffzyklus realisiert.

Auch die Speicherung von Vitaminen wie Vitamin B₁₂, Vitamin A oder Folsäure gehört zu den wichtigen Funktionen des Lebermetabolismus.

Die Verstoffwechslung und Entgiftung von körpereigenen oder über die Nahrung zugeführten Bestandteilen, insbesondere auch von Medikamenten, findet ihren Ausdruck im Vorgang der sogenannten Biotransformation des Leberorgans.

1.2 Ursachen und Auswirkungen der Leberfibrose

Der Begriff der Leberfibrose beziehungsweise ihr irreversibles Endstadium, die Leberzirrhose, ist definiert als bindegewebige Umwandlung der Leber infolge einer organischen Schädigung mit konsekutivem Parenchymuntergang unterschiedlicher Genese. Beispiele für diese Schädigungen sind virale Infektionen (Hepatitis B oder C), alkoholtoxische oder metabolische Erkrankungen wie der Morbus Wilson oder die Hämochromatose (Friedman, 1998).

Ihre klinischen Auswirkungen zeigen sich neben den allgemeinen Symptomen einer Leberkrankheit wie Müdigkeit, Übelkeit oder Abgeschlagenheit insbesondere im irreversiblen Endstadium der Leberzirrhose. Hier kann sich eine portale Hypertension mit Ösophagusvarizen oder auch eine hepatische Enzephalopathie manifestieren.

Auch die Verstoffwechslung sowie die Produktion von Proteinen wie Albumin und den Gerinnungsfaktoren werden durch den Prozess der Fibrose gestört und eingeschränkt. Erhöhte Blutungsneigung und Aszites stellen hier die möglichen Auswirkungen dar.

Anatomisch-pathologisches Merkmal für die Fibrose ist eine Zunahme des Bindegewebes, insbesondere eine Zunahme von Bestandteilen seiner extrazellulären Matrix, die auf ein Ungleichgewicht zwischen physiologisch vorhandenen fibrolytischen und fibrogenen Vorgängen zurückgeführt werden kann (Friedman, 1993; Gressner, 1991). In Abbildung 1 ist dieses Merkmal dargestellt.

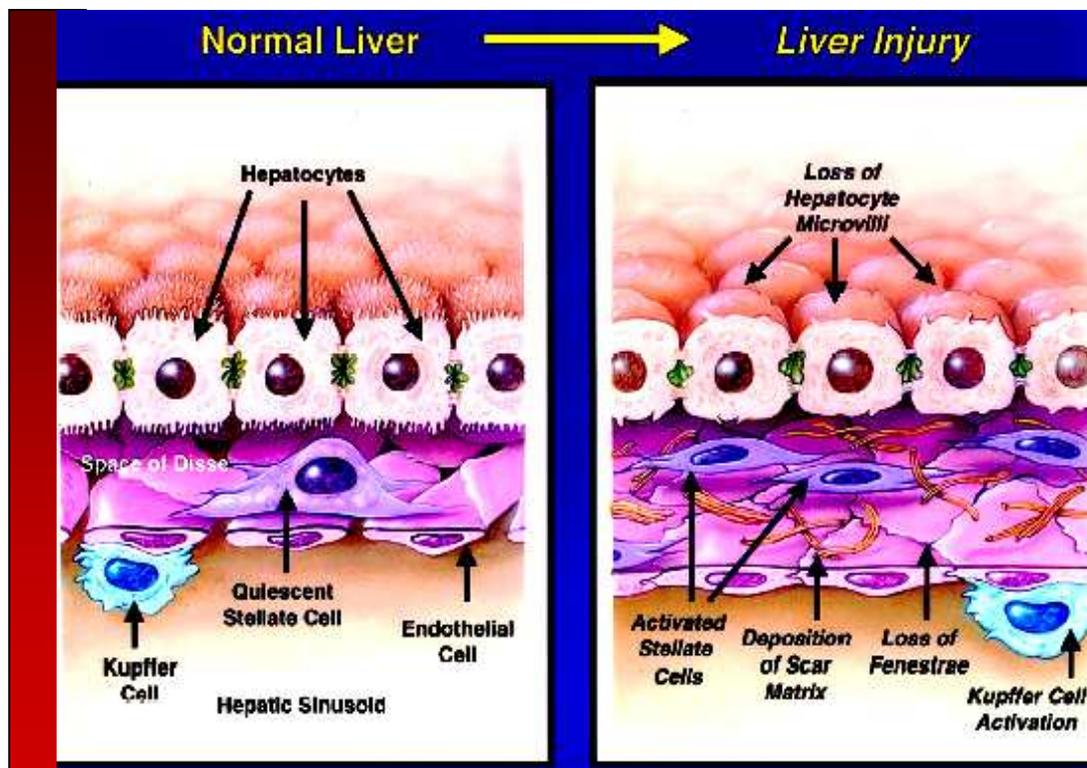


Abb. 1: **Veränderungen in den Lebersinusoiden während der Leberfibrogenese**

Fibrotische Umwandlungen im Dissé'schen Raum als Antwort auf eine Leberschädigung.

Die Aktivierung von hepatischen Sternzellen (*quiescent stellate cells*) führt zur Akkumulation von Komponenten der extrazellulären Matrix. Neben Verlust von Hepatozytenmikrovilli findet sich eine als Kapillarisation bezeichnete Umwandlung der Sinusendothelien, die nun kein poröses, fenestriertes Endothel mehr besitzen. Die Aktivierung der Kupferzellen trägt zur parakrinen Aktivierung der hepatischen Sternzellen bei.

(Die Abbildung wurde entnommen aus: Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000, **275**: 2247-2250)

Durch fibrogene Stimuli, die durch die Leberschädigung hervorgerufen werden, kommt es zu einer drei- bis sechsfach erhöhten Zunahme von Komponenten der extrazellulären Matrix, die neben den verschiedenen Typen von Kollagen auch Proteoglykane (Dermatan-, Chondroitinsulfat) und Glykoproteine (Fibronektin, Laminin) enthält (Gressner, 1994).

Klinisch bedeutsam ist dabei die Verteilung der Matrixkomponenten in den Lebersinusoiden. Im gesunden Lebergewebe findet sich ein poröses, fenestriertes Endothel, das den Stoffaustausch zwischen dem Blut in den Lebersinusoiden und den Hepatozyten erlaubt. Durch die Fibrose entsteht hier eine als Kapillarisierung bezeichnete Umwandlung der Sinusendothelien in eine basalmembranähnliche Struktur durch Ablagerung von Matrixkomponenten (Schaffner und Popper, 1963).

Diese Umwandlung führt nicht nur zu einer Störung der Mikrozirkulation, die für die normale Hepatozytenfunktion unerlässlich ist, sondern auch zu einem beeinträchtigten Austausch von Makromolekülen zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten (Bissell *et al.*, 1987; McGuire *et al.*, 1992).

Eine weitere Auswirkung der Fibrose ist die Aktivierung der Lebermakrophagen.

Diese Zellen, auch Kupffer-Zellen genannt, sind ebenso für die Produktion verschiedener Proteoglykane und Zytokine verantwortlich, unter ihnen das profibrogene TGF- β (Gressner und Zerbe, 1987; Matsuoka, 1990; Zerbe und Gressner, 1988; Gressner *et al.*, 2002).

Neben den Kupffer-Zellen sind es aber vor allem die hepatischen Sternzellen (HSC), deren Aktivierung durch fibrogene Stimuli verantwortlich für die Zunahme der extrazellulären Matrix ist (Friedman, 1999; Gressner und Bachem, 1995). Die hepatischen Sternzellen, früher auch Lipozyten, Ito-Zellen, Retinoid- oder Fettspeicherzellen genannt, finden sich als nicht-parenchymatöse Zellen der Leber im Dissé'schen Raum zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Lebersinusoiden. Diese Zellen, die im normalen Lebergewebe eine geringe mitotische Aktivität aufzeigen, werden durch den Prozess der Aktivierung zur Proliferation angeregt. Dabei ändern die hepatischen Sternzellen ihren Phänotyp von Vitamin A-speichernden Zellen über sogenannte Transitionalzellen zu Myofibroblasten, die die Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren (Friedman, 1993). Dieser Vorgang wird als Transdifferenzierung bezeichnet und bildet das Schlüsselereignis im Prozess der Fibrogenese (Gressner, 1996).

1.3 Die Rolle des TGF- β in der Entstehung der Leberfibrose

Zusammen mit den Aktivinen und Inhibinen bildet TGF- β eine Gruppe von regulierenden Peptidhormonen, die als inaktive Vorläuferproteine in verschiedenen Zellen synthetisiert werden (Massagué *et al.*, 1992). Dabei ist der *transforming growth factor- β* (TGF- β) neben anderen Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *epidermal growth factor* (EGF) Bestandteil einer Gruppe von Zytokinen, deren besondere Merkmale die Stimulation und die Regulierung des Zellwachstums sind (Lyons und Moses, 1990). Insbesondere das Peptid TGF- β zeigt in seinem Wirkungsspektrum verschiedene Aspekte wie die Steuerung des Zellwachstums oder die Zelldifferenzierung, der Zellmorphologie und seine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Komponenten der extrazellulären Matrix (Massagué, 1990; Laiho *et al.*, 1992; McCartney *et al.*, 1994).

TGF- β wird von den meisten Zellen als inaktives Zytokin in Form des sogenannten *latent TGF β -complex* sezerniert, der in dieser Form nicht in der Lage ist, an zelluläre Rezeptoren zu binden (Yingling *et al.*, 1995). Verantwortlich dafür ist die nicht-kovalente Bindung des als Dimer sezernierten TGF- β an das *latency-associated protein* (LAP) und die über Disulfidbrücken bewirkte Bindung dieses Komplexes an das *latent TGF- β binding protein* (LTBP) (Miyazono *et al.*, 1988).

Die aktive Form von TGF- β erscheint als 25 kDa großes Homodimer, nachdem es von dem 75 kDa großen TGF β -LAP-Komplex dissoziiert ist (Wakefield *et al.*, 1988; Gressner *et al.*, 2002).

Der Mechanismus dieser Aktivierung wird durch proteolytische Prozesse erklärt, wie es Proteasen wie Plasmin, Thrombin, Thrombospondin oder Leukozytenelastase gezeigt haben (Benezra *et al.*, 1993; Falcone *et al.*, 1993; Taipale *et al.*, 1995; Schultz-Cherry und Murphy-Ullrich, 1993; Lyons *et al.*, 1990).

In Säugetierzellen lassen sich insgesamt drei von fünf Isoformen nachweisen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 (Santos *et al.*, 1998).

Dabei interagiert freies TGF- β an den Zelloberflächen mit zwei von drei vorhandenen Arten der TGF- β - Rezeptoren Typ I, Typ II und Typ III. Freies TGF- β bindet mit hoher Affinität an den TGF- β Typ II-Rezeptor, der als transmembranäres Protein mit einer zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne vorliegt. Zunächst geht der Typ II-Rezeptor eine Komplexbildung mit dem Typ I-Rezeptor ein (Wrana, 1992). Diese

Heteromerisierung ist notwendig, um die Signalkaskade intrazellulär fortzusetzen, die über sogenannte SMAD-Proteine gewährleistet wird (Heldin, 1997; Massagué, 1998). Diese SMAD-Proteine stellen eine Familie intrazellulärer Signalmoleküle dar, die über Phosphorylierung durch die Zellmembranrezeptoren und anschließender Bildung heterooligomärer Komplexe verschiedener SMAD-Proteine in den Zellkern translozieren, um die Transkription der Zielgene von TGF- β zu regulieren (Hill, 1999). Neben der Bedeutung im Rahmen der Wundheilung für die Narbenbildung durch Fibroblastenrekrutement und Synthese der extrazellulären Matrix (Border *et al.*, 1992), stellt TGF- β darüber hinaus den Schlüsselfaktor für die Entwicklung von Fibrosen dar (Border und Noble, 1994), für deren Unterhaltung insbesondere autokrine und parakrine Prozesse verantwortlich gemacht werden (Friedman, 2000; Gressner, 1994; Wahl, 1994).

Aufgrund der bedeutenden Rolle des TGF- β für die Entwicklung der Leberfibrose ist es wünschenswert, einen klinisch anwendbaren TGF- β - Antagonisten als Mittel für eine potentielle antifibrotische Therapie zu besitzen, der die Signalkaskade an einer Stelle blockieren kann, so dass die weitere fibrogene Wirkung des TGF- β aufgehoben wird.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Konstruktion und der Nachweis eines löslichen, funktionellen TGF- β Typ II-Rezeptors, der extrazellulär frei vorhandenes TGF- β binden, jedoch die Signalkaskade dadurch eben nicht einleiten kann.

1.4 Gentherapeutische Ansätze

Unter Gentherapie versteht man im engeren Sinn eine Therapiemöglichkeit bei genetisch determinierten Erkrankungen, wobei ein funktionell defektes Gen durch Einbringen von genetischem Material in Körperzellen zur Ausschaltung gebracht werden kann oder durch ein neues, intaktes Gen ersetzt wird.

Erst das Verständnis der molekularen Mechanismen wie die genaue Kenntnis der genetischen Kodierung auf der DNA hat zur Erkennung der genetischen Grundlagen vieler Krankheiten geführt, wie zum Beispiel die familiäre Hypercholesterinämie, Bilirubinstoffwechselstörungen, der Morbus Wilson oder die Hämochromatose (Blum, 1999).

Im weiteren Sinn kann Gentherapie auch als therapeutische Intervention etwa im Rahmen einer erworbenen, pathologischen Überproduktion von Proteinen, wie sie beispielsweise bei der Entstehung der Leberfibrose durch TGF- β zu beobachten ist, verstanden werden.

Dabei kommt der Gentechnik, d.h. den *in vitro* - Rekombinationsmethoden, eine bedeutende Rolle zu, deren Ziel es ist, außerhalb des menschlichen Körpers in einem anderen Organismus wie Bakterien oder Zellen therapeutisch wirksame Produkte herzustellen (Burger, 1996).

Das Einschleusen von Fremdgenen in die Zielzellen kann dabei auf verschiedene Arten erfolgen. Heutzutage werden als Genfähren zumeist virale Vektoren gegenüber nicht-viralen Vektoren bevorzugt, da die Erstellung der letzteren zwar einfacher und sicherer, die Transfereffizienz hingegen aber wesentlich geringer ist (Cristiano *et al.*, 1998; Roth und Cristiano, 1997; Wivel und Wilson, 1998).

Für Lebererkrankungen kommt aufgrund ihrer hepatotropen Wirkung besonders der Gebrauch von adenoviralen Vektoren in Frage.

Darüber hinaus bleiben die Integrität der Leberzellen und ihre metabolischen Funktionen bei Gebrauch von adenoviralen Vektoren weitestgehend erhalten (Drazan *et al.*, 1995).

Als weitere antifibrotische Therapieansätze seien der Einsatz von TGF- β bindenden Proteinen wie Decorin oder das α_2 -Makroglobulin, die Anwendung von Antioxidantien wie Glutathion oder N-Acetylcystein und der Gebrauch von antifibrotisch wirksamen *antisense*-mRNA-Konstrukten genannt, um entweder die Synthese von TGF- β zu verhindern oder das Protein zu binden und somit die Signalkaskade zu unterbrechen.

1.5 Das adenovirale System

Adenoviren werden in zwei Gattungen unterteilt. Neben den Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind, handelt es sich bei den Mastadenoviren um Adenoviren, die Säugetiere infizieren können. Dabei kommt es zumeist zu banalen Infektionen der Atemwege, allerdings können auch Gastroenteritiden, Pneumonien oder Hepatitiden von ihnen ausgelöst werden.

Adenoviren sind unbehüllte, ikosaedrisch aufgebaute, doppelsträngige DNA-Viren, deren Genom eine Länge von etwa 36 kbp aufweist. Ihr Durchmesser beträgt etwa 60-90 nm (Günzburg und Salmons, 1997).

Der Vorteil gegenüber anderen viralen Vektorsystemen besteht neben der relativ einfachen Erstellung rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren über gängige Klonierungsverfahren etwa im Rahmen der homologen Rekombination auch in ihrer strukturellen Stabilität, der Produktion von Zellüberständen mit einem hohen Virustiter, der Infektiosität sowohl ruhender als auch sich teilender Zellen und der hohen Gentransfereffizienz; darüber hinaus integrieren Adenoviren ihr Genom nicht in das Genom ihrer Wirtszellen (Alemany *et al.*, 1999).

Die Expression adenoviraler Gene verläuft in zwei Phasen: Nach der Infektion der Zielzelle werden die sogenannten „frühen“ Ereignisse eingeleitet, wobei ein produktiver Infektionszyklus mit der Transkription des E1a-Gens beginnt (E = *early*).

Dieser Transaktivator bewirkt die Expression der anderen frühen viralen Gene (E1b, E2a, E2b, E3 und E4), die hauptsächlich für die regulatorischen Funktionen des Zellzyklus verantwortlich sind. Dieser frühen Transkription folgt die Phase der DNA-Replikation, mit der die „späte“ Phase eines Infektionszyklus eingeleitet wird.

Die L-Gene (L = *late*) kodieren im wesentlichen für die Strukturproteine des ikosaedrischen Viruspartikels, wobei letztlich neue Virionen entstehen. Ein produktiver Infektionszyklus führt zur Lyse der infizierten Zelle und somit zur Freisetzung neu entstandener Viruspartikel.

Für die Internalisierung von Adenoviren in die Zellen und damit die eigentliche Infektion werden verschiedene Integrine auf den Zelloberflächen als Rezeptoren für die Viren verantwortlich gemacht (Carloni *et al.*, 1996; Wickham *et al.*, 1993).

Aufgrund ihrer geringen Pathogenität und ihrer gut bekannten Struktur werden insbesondere Adenoviren vom Serotyp 5 für heterologen Gentransfer verwendet (Alemany *et al.*, 1999; Doerfler, 1996).

Das Adenovirion Typ 5 kann dabei bis zu 105 % der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken. Das bedeutet, dass bei einer Gesamtlänge von etwa 36 kbp eine weitere Aufnahmekapazität von 1,8 - 2,0 kbp fremder DNA erbracht werden kann. Durch Verwendung von Deletionsmutanten können entsprechend größere DNA-Fragmente eingebracht werden. Meist werden für den Gentransfer Mutanten verwendet, die Deletionen der E1-Region, teilweise auch der E3-Region aufweisen (Bett *et al.*, 1994).

Die wichtige Bedeutung der E1-Region für die virale Replikation entfällt nach ihrer Deletion; sie führt zu replikationsdefekten Adenoviren.

Die Erstellung replikationsdefekter, rekombinanter Adenoviren wird mittels homologer Rekombination durchgeführt. Dafür werden die zu übertragenden Gene zuerst in ein Rekombinationsplasmid eingebracht, wo sie von adenoviralen Sequenzen flankiert sind. Durch homologe Rekombination über diese flankierenden Bereiche können die heterologen Genabschnitte in das um die E1-Region deletierte Ad5-Genom, das Plasmid pJM17, eingeführt werden (McGrory *et al.*, 1988). Dieser Vorgang findet in der komplementierenden Zelllinie HEK 293 statt. Sie ist permissiv für die Replikation von Adenoviren und enthält die E1-Gene von Ad5 stabil in ihrem Genom integriert (Graham *et al.*, 1977). Durch konstitutive Expression der E1-Region kann diese Zelllinie Ad5-Deletionsmutanten in der essentiellen E1-Region komplementieren.

Das Rekombinationsplasmid mit dem zu übertragenden Gen wird nun als Kotransfektion mit dem Plasmid pJM17 in HEK 293-Zellen eingebracht.

Die Übertragung des gewünschten heterologen Gens in das um die E1-Region deletierte Ad5-Genom führt zur Freisetzung neuer rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren, die nach Isolierung als Vektoren dienen können.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung dieser adenoviralen Expressionstechnologie. Erstellte rekombinante, replikationsdefekte Adenoviren werden zur Infektion von hepatischen Sternzellen verwendet. Dieser adenovirale Gentransfer erfolgt zuerst *in vitro* in der Zellkultur, um dann in einem späteren Versuchsstadium auch *in vivo* in einem Tiermodell eingesetzt zu werden.

2 Materialien

2.1 Verbrauchsmaterial

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Chromatographiepapier 3 MM	Whatman,
Dialysierschläuche	Roth, Deutschland
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml	Falcon, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Falcon-Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon,
Greiner PP-Röhrchen 12 ml	Greiner, Deutschland
Hybond-N Nylon 0,45 Micron	Amersham, UK
Küvetten	Sarstedt
Nunc Cryotube 1,8 ml (Zellkultur)	Intermed, Dänemark
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	Faust
Perfusorspritze	Braun, Deutschland
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polyallomer Centrifuge Tubes	Beckman
Protran® (0,45 Micon)	Schleicher und Schuell, Deutschland
Skalpell	Braun Aesculap, Deutschland
Spin Columns (Sequenziersäulen)	Princeton, USA
Sterilfilter	Corning, USA
SuperSignal (Chemilumineszenz)	Pierce, USA
Tris-Glyzin Gele	Novex, Niederlande

2.2 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Agar-Agar	Sigma, Deutschland
Agarose	Sigma
Albumin (bovines)	Sigma
Ammoniumacetat	Merck, Deutschland
Ampicillin	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Cäsiumchlorid	ICN Biomedicals, USA
Chloroform	J. T. Baker, Niederlande
Coomassie Brilliant Blue	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA	Merck
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol abs.	Merck

Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia, Schweden
Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
Glucose	Sigma
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Guanidinisothiocyanat	Sigma
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Sigma
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Lithiumchlorid	Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Manganchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	Fluka, Deutschland
Methanol abs.	RWTH, Deutschland
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Natronlauge	Merck
Polyethylenglycol	Sigma
Polyvinyl-Pyrrolidon	Sigma
Ponceau-S-Lösung	Sigma
Roti-Phenol	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure 25%	Merck
SDS	Sigma
Sephadex G-50	Pharmacia Biotech, Schweden
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
TRIZMA® Base	Sigma
Tryptone (Bacto)	DIFCO, USA
Tween 20	Sigma

2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

<i>AsnI</i>	Roche, Deutschland
<i>BamHI</i>	Roche
<i>EcoRI</i>	Roche
<i>EcoRV</i>	Roche
<i>HindIII</i>	Roche
<i>NheI</i>	Roche
<i>SspI</i>	Roche
alkalische Phosphatase	Roche

Klenow-Enzym	Roche
DNA - Ligase	Roche
Lysozym	Sigma

2.4 Sonstige molekularbiologische Reagenzien

Antikörper:	Santa Cruz, Deutschland
TGFβRII (L-21) rabbit polyclonal IgG	sc - 400
anti-rabbit IgG-HRP-AK	sc - 2004
BenchMark Prestained Protein Ladder	Gibco BRL, Deutschland
DNA aus Heringssperma	Roche
FuGENE™ 6 Transfektionsreagenz	Roche
Lambda-DNA (<i>Hind</i> III Digest)	BioLabs
Protein G	Santa Cruz (sc - 2002)
Radionukleotid [α - ³² P]dCTP	Amersham
pΔE1sp1A-Vektor-Primer:	MWG-Biotech, Deutschland
5`-Primer (21-mer)	5`-d(GCGTAACCGAGTAAGAATTTG)-3`
3`-Primer (21-mer)	5`-d(GGCGACCATCAATGCTGGAG)-3`

2.5 Medien für Zellkultur und Bakterienaufzucht

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM	Bio-Whittaker Europe, Belgien
DMSO	EGA-Chemie, Deutschland
FKS	Biochrom KG, Deutschland
HBSS	PAA, Österreich
L-Glutamin (100 x)	PAA
Penicillin (100 x)	PAA
Trypsin-Lösung (10 x)	PAA
<i>non-essential</i> Aminosäuren (100 x)	Gibco BRL

Einfriermedium (2 x)

20 ml: 11 ml DMEM, 5 ml FKS und 4 ml DMSO wurden zusammengegeben.

LB-Medium

1 l: 10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden in 950 ml H₂O gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Auf 1 l wurde aufgefüllt und autoklaviert.

2 x TY-Medium

1 l: 16 g Tryptone, 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl wurden auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Trypsinlösung (1 x)

50 ml: 45 ml HBSS und 5 ml Trypsinlösung (10 x) wurden gemischt.

2.6 Biologische Materialien

Bakterien: E. coli - Stamm JM 105

Yanisch-Perron *et al.*, 1985

Plasmide: pEGFP-C1
pΔE1sp1A
pJM17

CLONTECH, USA
Microbix Biosystems, Kanada
Microbix Biosystems

Eukaryotische Zellen: HEK 293
CFSC
Cos7

ATCC, USA
Greenwel *et al.*, 1991
ATCC

Die Isolation von jeweils frischen HSC erfolgte nach der Pronase-Kollagenase-Perfusionsmethode (Knook *et al.*, 1982) von männlichen Sprague-Dawley Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland).

Auf Plastikoberflächen kultivierte hepatischen Sternzellen (HSC) werden nach 7 Tagen trypsinisiert und entwickeln sich nach weiteren 2 bis 3 Tagen zu Myofibroblasten (MFB), die *in vitro* als Untersuchungsmodell für die Leberfibrose dienen.

2.7 Lösungen

Ammoniumacetat (10 M)

20 ml: 15,42 g Ammoniumacetat wurden ad 20 ml H₂O gelöst und sterilfiltriert.

Blockierungslösung

100 ml: Zu 100 ml TBS wurden 5 g Magermilchpulver gegeben und gerührt.

CaCl₂ (1 M)

25 ml: 3,675 g CaCl₂ x 2 H₂O wurden im Endvolumen von 25 ml gelöst.

Cäsiumchlorid-Puffer (für RNA - Isolation)

25 ml: 23,99 g CsCl und 0,208 ml 3 M Natriumacetat pH 6,0 wurden in sterilem H₂O ad 25 ml gelöst und sterilfiltriert.

Coomassie-Lösung

250 ml: 1,25 g Coomassie Brilliant Blue, 125 ml Methanol, 25 ml Eisessig und 100 ml Aqua dest. wurden zusammengegeben und vermischt.

Denhardt`s-Lösung (50 x)

50 ml: 0,5 g Ficoll, 1 g Polyvinyl-Pyrrolidon und 0,5 g BSA wurden ad 50 ml H₂O gelöst, sterilfiltriert und in 25 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

EDTA (500mM, pH 8,0)

500 ml: 93,06 g Titriplex III wurden in 350 ml H₂O unter Zugabe von ca. 10 g NaOH-Plätzchen gelöst. Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und mit H₂O auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt.

Entfärbelösung

500 ml: 150 ml Methanol, 50 ml Eisessig und 300 ml Aqua dest. wurden zusammenpipettiert.

Enzympuffer

a) **alkalischer Phosphatasepuffer (10 x)**
500 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA

b) **Restriktionsenzympuffer**

B-Puffer (10 x) für *AsnI*, *BamHI*, *EcoRV* und *HindIII*

10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol

H-Puffer (10 x) für *EcoRI* und *SspI*

50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTE

M-Puffer (10 x) für *NheI*

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTE

c) **DNA-Ligasepuffer (10 x)**

660 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 10 mM ATP

GIT-Puffer

100 ml: 47,27 g Guanidinisothiocyanat und 0,84 ml 3 M Natriumacetat pH 6,0 wurden in sterilem H₂O ad 99,17 ml gelöst. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 0,835 % Mercaptoethanol eingestellt.

Heringssperma (10 mg/ml)

20 ml: 200 mg Heringssperma-DNA wurden in 20 ml sterilem H₂O 8 Std im Kühlraum auf einem Rührer gerührt. Die Lösung wurde zu je 1 ml aliquotiert, bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch 5 min aufgeköcht.

Hybridisiermix

250 ml: 125 ml Formamid, 75 ml 20 x SSC, 2,5 ml 500 mM EDTA, 25 ml Denhardt's-Lsg. und 6,25 ml 20 % SDS wurden gemischt. Mit HCl wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und auf 245 ml mit H₂O aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde hitzedenaturierte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugesetzt.

Kaliumacetat (5M)

500 ml: 245,38 g Kaliumacetat wurden ad 500 ml H₂O gelöst.

Lösung I

100 ml: 5 ml 1 M Glucose, 2 ml 500 mM EDTA, 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,9) und 90,5 ml steriles H₂O wurden gemischt und die Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Lösung II

100 ml: 10 ml 2 M NaOH und 5 ml 20 % SDS wurden in 85 ml sterilem H₂O gelöst. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Lösung III

200 ml: 120 ml 5 M Kaliumacetatlösung, 23 ml Eisessig und 57 ml steriles H₂O wurden gemischt und bei 4 °C gelagert.

Lysozymlösung (10 mg/ml)

5 ml: 50 mg Lysozym wurden in 5 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

MEN-Puffer (10 x)

500 ml: 20,9 g MOPS, 2,05 g Natriumacetat und 1,9 g EDTA wurden in 450 ml sterilem H₂O gelöst und mit NaOH ein pH von 7,0 eingestellt. Mit H₂O wurde auf 500 ml aufgefüllt und die Lösung dunkel bei 4 °C gelagert.

MnCl₂ (1 M)

20 ml: 3,96 g MnCl₂ x 4 H₂O wurden ad 20 ml gelöst, sterilfiltriert und die Lösung bei -20 °C gelagert.

MOPS (1 M)

100 ml: 20,93 g MOPS wurden in 60 ml H₂O gelöst, mit NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt, mit sterilem H₂O auf 100 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

NaCl (1,6 M)/PEG (13% (w/v))

100 ml: 13 g PEG und 9,35 g NaCl wurden ad 100 ml sterilem H₂O gelöst.

NaP-Puffer (1 M, pH 7,0)

NaH₂PO₄ (1 M) und Na₂HPO₄ (1 M) wurden unter pH Kontrolle gemischt, wobei eine Lösung vorgelegt und die andere solange zugesetzt wurde, bis sich ein pH-Wert von 7,0 ergab.

1 x Proteinlaufpuffer

2 l: 2 g SDS, 6 g Tris-Base und 28,75 g Glycin wurden mit H₂O ad 2 l gelöst.

RNA-Probenpuffer

2 ml: 0,33 ml Formaldehydlösung, 1,4 ml Formamid, 0,12 ml Bromphenolblaulösung, 0,2 ml MEN-Puffer und 0,02 g Ficoll 400 wurden gemischt und bei -20 °C gelagert.

RNase-A-Lösung

5 ml: 50 mg RNase A wurden in 5 ml sterilem H₂O gelöst, 10 min aufgekocht und zu 1 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

RbCl (4 M)

20 ml: 9,67 g RbCl wurden ad 20 ml H₂O gelöst und sterilfiltriert.

1 x SDS-gel-loading-Puffer

10 ml: 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 1 ml 20 % SDS, 1 ml 1 % Bromphenolblaulösung und 1 ml Glycerin wurden mit H₂O ad 9 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde je nach Experiment 1 ml DTT zugegeben.

SSC (20 x)

1 l: 175,32 g NaCl und 88,2 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat wurden ad 1 l gelöst.

STE-Puffer

1 l: 20 ml 5 M NaCl, 2 ml 500 mM EDTA und 10 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 wurden in 968 ml H₂O gelöst.

TBE (10 x)

1 l: 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure und 7,44 g Titriplex III wurden ad 1 l H₂O gelöst.

TBS

1 l: 1,21 g Tris-Base und 8,766 g NaCl wurden in 950 ml H₂O gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,6 eingestellt. Auf 1 l wurde mit H₂O aufgefüllt.

TBST

1 l: 1,21 g Tris-Base, 8,766 g NaCl und 1 ml Tween 20 wurden in 950 ml H₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,6 eingestellt und mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

TE (pH 8,0)

100 ml: 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 und 0,2 ml 500 mM EDTA pH 8,0 wurden in 98,8 ml H₂O gelöst.

TFB I

100 ml: 2,5 ml 4 M RbCl, 5 ml 1 M MnCl₂, 1 ml 1 M CaCl₂, 0,6 ml 3 M Kaliumacetat pH 6,0 und 15 ml Glycerin wurden in 75,9 ml sterilem H₂O gemischt. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

TFB II

100 ml: 1 ml 1 M MOPS pH 7,0, 7,5 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 1 M NaCl und 15 ml Glycerin wurden in 75,5 ml sterilem H₂O gelöst. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Transferpuffer

1 l: 5,82 g Tris-Base, 2,93 g Glycin, 1,875 ml 20% SDS-Lösung und 200 ml Methanol wurden vermischt und auf 1 l mit H₂O aufgefüllt.

Tris-HCl (1 M)

1 l: 121,1 g Tris wurden in 800 ml H₂O gelöst, mit HCl auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und auf 1 l mit H₂O aufgefüllt.

Trocknungspuffer

500 ml: 50 ml Glycerin und 100 ml Ethanol wurden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

Waschlösung I

100 ml: 10 ml 20 x SSC, 0,2 ml 500 mM EDTA, 0,5 ml 20 % SDS und 83 ml steriles H₂O wurden gemischt.

Waschlösung II

200 ml: 4 ml 20 x SSC, 0,4 ml 500 mM EDTA, 1 ml 20 % SDS und 194,6 ml steriles H₂O wurden gemischt.

3 Methodik

3.1 Allgemeine Arbeitsmethoden der Molekularbiologie

3.1.1 Isolation von Plasmid - DNA aus Bakterien

3.1.1.1 Plasmidminipräparation

Diese Art der Minipräparation (Birnboim und Doly, 1979) ermöglicht eine zügige Gewinnung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke und ist daher gut zur Identitätsprüfung klonierter DNA geeignet. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C in der Laborzentrifuge (12000 x g) durchgeführt.

Bakterienkolonien, die einer Plasmidminipräparation unterzogen wurden, wurden mit einer sterilen Pasteurpipette in 3 ml LB-Medium gebracht und Antibiotikum in der erforderlichen Konzentration zugegeben (bei Ampicillin 100 µg/ml). Die Bakterien wurden in 10 ml Greinerröhrchen mindestens 5 Std bei 225 UpM und 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 2 ml der Bakterienkultur in 2 ml Eppendorfhütchen gebracht und für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 100 µl kalter Lösung I aufgenommen. Nachdem das Pellet durch Vortexen resuspendiert war, wurden 200 µl frisch angesetzte Lösung II zugegeben. Beide Lösungen wurden durch kurzes Schütteln gemischt. Auf Eis wurde 2 min inkubiert, dann 150 µl Lösung III zugegeben und kurz auf kleinster Stufe gevortext. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 3 min folgte eine Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und mit 500 µl Phenol/Choroform (1:1) versetzt und 2 min gevortext. Die Phasentrennung wurde durch 5minütige Zentrifugation erreicht. Dem Überstand (ca. 400 µl) wurde 1 ml EtOH_{abs.} zugesetzt. Nachdem die Ansätze 2 min bei RT standen, wurden sie 10 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 150 µl kaltem 70 %igem EtOH gewaschen. Eine erneute Zentrifugation schloss sich an, der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in der *speed vac* getrocknet und in 20 µl TE aufgenommen. Für analytische Plasmid-DNA-Verdaus wurden 3 µl eingesetzt.

3.1.1.2 Plasmidgroßpräparation

Die DNA, die mit diesem Protokoll erzeugt wird, eignet sich zum Einsatz für Klonierungen, Fragmentisolationen und Sequenzierungen. Für die Plasmidgroßpräparation wurden in einem Erlenmeyerkolben 10 µl einer Glycerinkultur oder 200 µl einer Übernachtskultur in 250 ml LB-Medium gegeben und 250 µl erforderliches Antibiotikum (Ampicillin bzw. Kanamycin; 100 mg/ml) zugesetzt. Der Kolben wurde für mindestens 12 Std bei 37 °C und 225 UpM auf einem Luftschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in GSA-Becher überführt und in einem JLA-10.500 - Rotor bei 4 °C für 15 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml STE-Puffer resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung I aufgenommen und gut resuspendiert, 1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde zugegeben und auf Eis 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml frisch angesetzter Lösung II wurde gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden 15 ml Lösung III zugeführt und auf Eis weitere 10 min inkubiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 8000 UpM und 4 °C zentrifugiert, der Überstand durch drei Lagen Mullbinden in einen neuen GSA-Becher überführt. 30 ml 2-Propanol wurden zugegeben (1. Propanolfällung), der Ansatz gemischt und 10 min bei RT belassen. Es schloss sich eine Zentrifugation an (4500 UpM, 15 min). Das entstandene Pellet wurde in 70 %igem EtOH gewaschen und in 3 ml TE pH 8,0 aufgenommen. 3 ml 5 M LiCl wurden zugegeben und im JA-25.50 - Rotor zentrifugiert (10000 UpM, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in 6 ml 2-Propanol (2. Propanolfällung) gegeben. Einer 10minütigen Inkubation bei RT folgte eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wurde in 70 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE aufgenommen. 20 µl RNase A-Lösung wurden zugesetzt und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. 520 µl 1,6 M NaCl/13 % PEG-Lösung wurden zugefügt, kurz gevortext und in der Laborzentrifuge 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl TE pH 8,0 aufgenommen und zum besseren Lösen der DNA 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Phenol zugegeben und mindestens 1 min gevortext. Nach Zentrifugation für 5 min in der Laborzentrifuge wurde der Überstand zu 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) gegeben und gevortext. Wieder wurde zentrifugiert, der Überstand zu 400 µl Chloroform gegeben und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 100 µl 10 M Ammoniumacetat und 1 ml EtOH_{abs} versetzt. 10 min wurde bei RT inkubiert, dann bei 4 °C in der

Laborzentrifuge für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl 70 %igem EtOH gewaschen und in 500 µl TE pH 8,0 aufgenommen. Die gewonnene DNA wurde standardmäßig photometrisch quantifiziert und gelelektrophoretisch qualifiziert.

3.1.2 Isolation eukaryotischer RNA

Grundlage dieser RNA-Isolation ist die Guanidinisothiocyanat - Methode (GIT) mit anschließender Dichtegradienten - Reinigung (adaptiert nach Chirgwin *et al.*, 1979).

Bevor die Zellen abgeerntet wurden, wurde eine Platte trypsinisiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, um später Aussagen über die Zelldichte und RNA - Ausbeute machen zu können. Am Vortag der Isolation wurde das Medium gewechselt.

Zur Isolation wurde zuerst das Medium abgezogen und die Zellen mit HBSS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Anschließend wurde die Zelllyse mit ca. 2,5 ml GIT - Puffer pro Platte durchgeführt. Die Platten wurden mit 2 ml GIT - Puffer nachgewaschen und das Zelllysats dreimal durch eine Kanüle geschert. Hierauf folgte die vorsichtige Überschichtung des Zelllysats auf die CsCl - Lösung (2 ml vorgelegt) in einem Polyallomerröhrchen. Dabei war zu beachten, dass das CsCl - Kissen nicht mit dem Zelllysats verwirbelt werden durfte. Das Austarieren der UZ-Röhrchen wurde mit Zellaufschluss durchgeführt. Nach der Ultrazentrifugation (SW41-Rotor, 25000 UpM, 21 Std, 21 °C) wurde der Puffer über dem CsCl-Kissen mit einer Pasteurpipette entfernt, das CsCl-Kissen umgekippt und die Röhrchen in inverser Position für 2 min stehen gelassen. Die Kappe des Röhrchens wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und das klare, gelatineartige Pellet in 3 x 100 µl 0,3 M NaAc (pH 6,0) gelöst und in ein Eppendorfhütchen überführt. Nach 1 min Vortexen wurde die RNA durch Zugabe von 800 µl $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$ ausgefällt. Nach 15 min Inkubation bei -80 °C wurde die RNA pelletiert (Zentrifugation bei 12000 x g, 15 min) und in sterilem H_2O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch quantifiziert und die Qualität gelelektrophoretisch bestimmt.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Photometrie)

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung kann daher als Maß zur Quantifizierung bei dieser Wellenlänge herangezogen werden. Dabei entspricht ein OD_{260} - Wert von 1 einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml.

Proteine hingegen besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Aussagen über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung können daher aus dem Quotienten der gemessenen optischen Dichte bei 260 nm zu der bei 280 nm gemacht werden. Für dsDNA-Lösungen sollte der Quotient bei 1,6 - 2 liegen, für RNA-Lösungen bei 1,9 - 2.

3.1.4 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA sequenzspezifisch schneiden können. Mit ihnen ist es möglich, definierte DNA-Sequenzen herzustellen.

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden standardmäßig in 100 µl durchgeführt. Für analytische Verdau von Plasmid-DNA wurde jeweils 1 µg eingesetzt und in einem Volumen von 10 µl verdaut. Durch anschließende Fällung wurde die verdaute DNA aufkonzentriert.

3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Gelelektrophorese ermöglicht es, bereits mit Restriktionsenzymen behandelte DNA nach ihrer Größe aufzutrennen. Als Trägermaterial diente Agarose, deren Konzentrationen je nach den zu erwartenden DNA-Fragmentgrößen variierten. Sie lagen in einem Bereich von 0,7 - 1,2 % .

Plasmidverdau wurden für 16 Std bei 30 Volt auf 24 x 16 cm großen Gelen aufgetrennt. Analytisch Verdau wurden für 1 Std bei 60 Volt auf 6 x 8 cm großen Gelen aufgetrennt. Auf jedem Gel wurde ein Größenstandard aufgetragen. EtdBr wurde direkt mit in die Gelmatrix gegeben, wodurch die DNA unter UV - Licht sichtbar gemacht werden konnte. Zur Dokumentation wurde jedes Agarosegel fotografiert.

3.1.6 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Ziel dieser Methode ist es, DNA - Fragmente aus Agarosegelen zu reisolieren.

Dazu wurde das Stück Agarosegel, in dem sich die zu eluierende DNA befand, mit einem Skalpell herausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch gebracht. Diese wurden zuvor in einer 2 %igen Na_2CO_3 (w/v) /1 mM EDTA-Lösung für 10 min gekocht, in dest. H_2O gewaschen, 10 min in 1 mM EDTA (pH 8,0) gekocht und auf Vorrat bei 4 °C gelagert.

Der Schlauch wurde für den Gebrauch mit 0,1 x TBE gefüllt, an beiden Enden mit Schlauchklammern verschlossen, in eine Gelapparatur in 0,1 x TBE eingelegt und für 1 Std in ein elektrisches Feld von 200 V gebracht. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus dem Schlauch entnommen, mit 0,1 VT 3 M NaAc (pH 6,8) und 3 VT EtOH_{abs} versetzt und für 30 min bei -80 °C gelagert. Die DNA wurde bei 4 °C in einer Laborzentrifuge (15 min, 12000 x g) pelletiert, mit 70 %igem EtOH gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. So gewonnene DNA wurde zuerst auf analytischen Gelen quantifiziert, bevor sie für Versuche eingesetzt wurde.

3.1.7 Aufbereiten von Restriktionsfragmenten zur Klonierung

3.1.7.1 Auffüllreaktion mittels Klenow - Fragment

Einige Fragmente besaßen nach einem Restriktionsverdau sogenannte 5'-überhängende Enden (*sticky ends*). Um sie nun in Vektoren mit glatten Enden (*blunt ends*) einzuklonieren, ist es erforderlich, diese überhängenden Enden zuerst mit freien Nukleotiden aufzufüllen.

In TE gelöste Fragmente wurden mit 1 VT Phenol/Chloroform (1:1) behandelt, in EtOH präzipitiert, mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 30 µl sterilem H_2O aufgenommen. Es wurden 4 µl M-Restriktionspuffer (10 x), 4 µl Nukleotidmix und 2 µl Klenowfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die aufgefüllten Fragmente wurden anschließend durch Ethanolfällung von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.

3.1.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Eine unerwünschte Nebenreaktion bei der Einklonierung eines Restriktionsfragmentes in einen geschnittenen Vektor ist die Rezirkularisierung desselben. Da die Ligase - Reaktion gegenüberliegende 5`-Phosphat - und 3`-Hydroxy-Enden benötigt, kann diese intramolekulare Reaktion durch Behandlung des linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase verhindert werden. Vektoren wurden nach erfolgtem Restriktionsverdau mit 1 VT Phenol/Chloroform (1:1) behandelt, mit EtOH_{abs} präzipitiert, mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 25 µl H₂O aufgenommen. Zugegeben wurden 0,1 VT µl alkalischer Phosphatasepuffer (10 x) und 6 µl alkalische Phosphatase (1 U/µl). Der Ansatz wurde 1 Std bei 37 °C inkubiert.

3.1.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Damit fremde DNA-Fragmente in sogenannte Vektoren eingebracht werden können, müssen die beiden DNAs kovalent verknüpft werden. Sogenannte DNA-Ligasen stellen die dazu erforderlichen Enzyme dar. Ligationen waren erforderlich zur Konstruktion von *shuttle*-Vektoren. Standardmäßig wurden die Ligationen in kleinen Volumina in 20 µl durchgeführt. Dabei wurde der Vektor und das Fragment in 16 µl sterilem H₂O vorgelegt und mit 2 µl Ligationspuffer (10 x) und 2 µl Ligase (1 U/µl) versetzt und für mindestens 12 Std bei 16 °C inkubiert.

3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien zur Plasmidtransformation

Damit Plasmid-DNA in Bakterien transformiert werden kann, ist es nötig, die Bakterienwand permeabel zu machen. Die nach den angegebenen Protokoll (adaptiert nach Hanahan, 1985) hergestellten transformationskompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Eine Übernachtskultur (in LB) des Bakterienstammes JM105 wurde 1:100 in 2 x TY Medium (+ 1/100 VT 1 M KCl, + 1/50 VT 1 M MgSO₄) verdünnt und bis zu einer

OD₆₀₀ von 0,5 (ca. 2 Std) bei 37 °C und 225 UpM geschüttelt. Alle anschließenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt, in sterile Falconröhrchen überführt und bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 50 ml kalter TFB I-Lösung pro 100 ml Kultur vorsichtig resuspendiert und auf Eis 10 min inkubiert. Erneut wurde wie oben zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 4 ml kalter TFB II-Lösung pro 100 ml Kultur aufgenommen.

200 µl Aliquots wurden in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt und bei -80 °C gelagert. Jede hergestellte Charge eingefrorener Bakterien wurde zur Kontrolle mit pUC19-DNA transformiert und die sogenannte Kompetenz bestimmt (Kolonien/µg DNA).

3.1.9 Transformation von Bakterien durch Plasmide

Für jede Transformation wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Bakterien eingesetzt. Diese wurden auf Eis aufgetaut (ca. 15 min) und auf die zur Transformation bestimmte DNA (10 µl) in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Auf Eis wurde 30 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 42 °C) wurde erneut für 2 min auf Eis inkubiert. 600 µl LB-Medium wurden zugegeben und die Ansätze bei 37 °C und 225 UpM für 1 Std geschüttelt.

Verschiedene Verdünnungen der Kultur wurden auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1.10 DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung der Übergangsstellen von Klonierungen wurde mit dem ABI PRISM BigDye[®] Reaktionskit durchgeführt (PE Applied Biosystems, Deutschland).

Jeder Sequenzieransatz setzte sich zusammen aus 1 µg der zu sequenzierenden DNA, 8 µl BigDye[®] Reaktionsmix und 2 µl Sequenzierprimer. Mit sterilem H₂O wurde auf 20 µl aufgefüllt. Der Sequenzierzyklus begann mit einer Denaturierung für 5 min bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen zu je 30 sec bei 95 °C, 20 sec bei 55 °C und 4 min

bei 60 °C. Zur Aufreinigung der eingebauten Nukleotide wurden die Sequenzierungsprodukte auf Centri-Sep *spin columns* gegeben, wobei das Vorquellen des Säulenmaterials zuvor mit 800 µl H₂O pro Säule durchgeführt wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in der *speed vac* getrocknet, in 20 µl TSR (*template suppression reagent*) aufgenommen und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Danach konnten die Proben dem automatischen Sequenzierer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) übergeben werden.

3.1.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarosegelen

Zur Vermeidung unerwünschter RNA - Sekundärstrukturen wurde die Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen durchgeführt. Zum Schutz vor RNAsen wurde die Gelapparatur mit 1 %iger SDS - Lösung behandelt.

Standardmäßig wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 2 g Agarose in 146 ml H₂O aufgeköcht und auf 65 °C abgekühlt. Zugegeben wurden 20 ml MEN - Puffer und 34 ml Formaldehydlösung. Das Gemisch wurde geschüttelt und unter dem Abzug in den Gelschlitten gegeben, wobei man mindestens 45 min bis zum Beginn der Elektrophorese wartete. Der Laufpuffer bestand aus 1720 ml H₂O, 80 ml Formaldehyd und 200 ml MEN - Puffer. Die aufzutrennende RNA wurde dann mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl RNA - Probenpuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 70 °C, anschließend wurde auf Eis 2 µl EtdBr - Lösung zugesetzt. Die Proben wurden aufgetragen und bei 30 V über Nacht aufgetrennt.

3.1.12 Northern Blotting

Das Gel wurde nach einer Kontrollphotographie mittels Kapillartransfer geblottet. Dazu wurden drei in 6 x SSC vorgeässte Whatman-Papiere (16 x 24 cm) nacheinander über eine Glasplatte, die über eine mit 20 x SSC gefüllte Plastikwanne gelegt wurde, aufgelegt. Luftblasen wurden mit einer Pipette herausgerollt und die Enden der Papiere in die Flüssigkeit eingetaucht. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gedreht und mit den Geltaschen nach unten auf die Whatman-Papiere

gelegt. Danach wurde das Gel mit 20 x SSC benetzt und eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran aufgelegt. Die Ränder wurden mit Parafilm abgedeckt und erneut drei in 6 x SSC vorgelegte Whatman-Papiere aufgelegt. Ein Stapel saugfähiger Einmalhandtücher und eine Glasplatte wurden aufgelegt, wobei ein 1 kg - Gewicht auf die Glasplatte gestellt wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach dem Abbau des Blots wurden die Geltaschen auf die Membran eingezeichnet, diese für 15 min luftgetrocknet und die RNA anschließend durch Backen (2 Std, 80 °C) kovalent an die Membran gebunden. Das Gel wurde unter UV-Licht auf die Güte des Transfers überprüft.

3.1.13 Radioaktive Markierungstechnik (*Random Priming*)

Die für diese Methode (nach Feinberg und Vogelstein, 1984) hierfür erforderliche Primer- und Pufferlösung sowie das Klenow-Fragment wurden in Form eines Reagenziensystems bezogen. 100 ng zu markierende DNA wurde mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Probe wurde in einem Wasserbad für 2 min aufgeköcht und auf Eis abgekühlt.

5 µl Primerlösung, 10 µl Pufferlösung, 18 µl H₂O, 5 µl [α -³²P]dCTP und 2 µl Klenowfragment wurden zupipettiert. Der Ansatz wurde 1 Std bei 37 °C inkubiert und zur Trennung von eingebauten und freien Nukleotiden auf einer G50-Sephadex-Säule aufgereinigt.

3.1.14 G50-Gelfiltration zur Abtrennung von Nukleotiden

Um unterschiedlich große Moleküle voneinander zu trennen, kann man das Prinzip des umgekehrten Molekularsiebeffektes nutzen, wobei kleinere Moleküle in dem Gelmaterial zurückgehalten werden. Zur Trennung von freien und eingebauten Nukleotiden wurde das Säulenmaterial in eine kurze Pasteurpipette gegeben, die nach unten mit einer Glaskugel versehen war. Als Laufmittel wurde stets TE verwendet. Der Ansatz wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und mit TE nachgespült, wobei jeweils 200 µl Fraktionen gesammelt wurden.

3.1.15 Filterhybridisierung von Northern Blots

Komplementäre Gensonden können an Membranen fixierte, einzelsträngige Nukleinsäuren nachweisen. Während der Hybridisierung lagern sich diese komplementären Nukleinsäuren aneinander. In anschließenden Waschvorgängen werden Hybride mit geringem Basenpaarungsgrad zerstört, perfekt gepaarte bleiben erhalten.

Die gebackenen Filter wurden 15 min in 6 x SSC geschwenkt und im Anschluss mit 1 ml Heringssperma-DNA in 100 ml Hybridisiermix gegeben. Zuvor wurde 1 ml Heringssperma-DNA (10 mg /ml) 5 min aufgekocht. Die Filter wurden mindestens 3 Std bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert (Vorhybridisierung).

Die Flüssigkeit wurde durch erneuten Hybridisiermix ersetzt, Heringssperma-DNA und die hitzedenaturierte Gensonde zugegeben und die Filter mindestens weitere 16 Std geschüttelt. Die Filter wurden gewaschen (1 x 20 min Waschlösung I bei 55 °C, 2 x 20 min Waschlösung II bei 50 °C) und einer Autoradiographie auf Kodak X-OMAT AR Film bei -80 °C unterzogen.

3.1.16 Isolation von Proteinextrakten

Zur Erstellung von Zellextrakten und damit der Isolation von Proteinen wurde das Medium abgezogen und die Zellen auf der Platte kurz mit HBSS gewaschen.

Anschließend wurden pro Platte 400 µl 1 x SDS-gel-loading-Puffer zugegeben. Nach 5 Minuten wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und die Zellextrakte mindestens fünfmal durch eine Kanüle geschert. Diese Zellextrakte wurden zu 100 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Nicht verworfenes, abgezogenes Medium wurde mit 2 x SDS-gel-loading-Puffer versetzt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Vor Weiterverarbeitung wurden die Aliquots 10 min bei 95 °C erhitzt, daraufhin zentrifugiert (10 min, RT), das Pellet verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorfhütchen gebracht. Je nach Experiment wurde zur Reduktion 10 µl DTT zu 90 µl Probe zugeführt.

3.1.17 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Kurz vor der Auftrennung wurden die Proben nochmals für 10 min bei 95 °C erhitzt. Als Gele wurden gekaufte 12 %ige Tris-Glyzin-Gele verwendet und die Gelkammer mit 1 x Proteinlaufpuffer gefüllt. Die Proben und ein Größenmarker wurden aufgetragen und bei 25 mA für 1,5 Std aufgetrennt.

3.1.18 Western Blotting

Diese Art von Blot wurde nach dem *semi-dry* - Verfahren durchgeführt. Dazu wurde zuerst das Gel vorsichtig aus der Gelhalterung freigelegt. Zuvor wurden 6 Whatman-Papiere (8 x 6,5 cm) in Transferpuffer und die Nitrocellulosemembran in bidest. H₂O vorgeässt.

Drei Lagen Whatman-Papiere wurden dann unter ständiger Benetzung und Ausrollen von Luftblasen auf die Blotapparatur gelegt, daraufhin das Gel, gefolgt von der Membran, die vorher kurz durch den Transferpuffer gezogen wurde. Zuletzt wurden nochmals drei Lagen Whatman-Papiere aufgelegt. Der Blot lief für 2 Std bei 42 mA. Eine Kontrollfärbung der Membran nach dem Blot zeigte die Effizienz des Transfers. Dabei wurde die Membran für 5 min in Ponceau-S-Lösung gegeben, wobei sich bei Erfolg eine Rotfärbung der vorhandenen Proteine nachweisen ließ. Die Membran wurde im Anschluss wieder solange mit TBS entfärbt, bis die TBS-Lösung wieder klar war. Über Nacht wurde die Membran in Blockierungspuffer gelegt, um die Membran abzusättigen.

3.1.19 Detektion von Proteinen mit Antikörpern

Um die spezifischen Proteine auf der Membran nachzuweisen, müssen diese mit einer zweifachen Antigen-Antikörper-Reaktion und einer anschließenden Lumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran in 3 ml Blockierungspuffer und 7 ml 1 x TBST vorgelegt. 20 µl des ersten Antikörpers (rabbit polyclonal IgG) wurden zugegeben und die Membran 2 Std geschwenkt. Nicht

gebundene Antikörper wurden in einem ersten Waschschrift entfernt (4 x 5 min mit 1 x TBST). Erneut wurde die Membran in Blockierungspuffer und 1 x TBST vorgelegt, 10 µl des zweiten Antikörpers (anti-rabbit IgG-HRP) zupipettiert und 1,5 Std geschwenkt. Ein zweiter Waschschrift schloss sich an (3 x 5 min mit 1 x TBST, 2 x 5 min mit 1 x TBS). Anschließend wurde 1 ml Chemilumineszenzlösung auf die Membran gebracht, diese in eine Folie gelegt und die Proteine mit Hilfe des *Lumi-Imager™* (Roche Diagnostics, Deutschland) sichtbar gemacht.

3.1.20 Immunpräzipitation: Anfärben von Proteinen mit Coomassie Blue

Zum Nachweis von Proteinen mittels einer Coomassie-Färbung wurden die Zellen und das Zellmedium komplett von der Petrischale heruntergenommen und anschließend 10 min bei 4 °C und 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und 40 µl Protein G hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann bei 4 °C für 2 Std über Kopf geschüttelt. Anschließend fand eine erneute Zentrifugation statt (3000 UpM, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 100 µl 2 x SDS-gel-loading-Puffer aufgenommen und die Proben bei -20 °C gelagert.

Die Auftrennung der Proteine in einem Glyzingel erfolgte analog zum Western Blot. Das Gel wurde danach 20 min mit Coomassie-Lösung auf einem Schüttler gefärbt und anschließend über Nacht in eine Entfärbelösung gebracht. Zur Trocknung des Gels wurde dieses im nächsten Schritt kurz mit H₂O gewaschen und darauf zweimal für 30 min in Trocknungspuffer gelegt; hierauf erfolgte die eigentliche Trocknung bei 60 °C mit einem Vakuumtrockner für 2 Std, wobei das Gel zwischen Whatman-Papieren und einer handelsüblichen Frischhaltefolie lag.

3.2 Allgemeine Methoden in der Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter einer Werkbank (Heraeus *Laminar-Air*) durchgeführt. Den verwendeten Medien wurde das antibiotisch wirkende Penicillin sowie Glutamin zugesetzt, bei der Kultur von CFSC zusätzlich auch nicht essentielle Aminosäuren.

3.2.1 Kultur von HEK 293, HSC, MFB, CFSC, Cos-7

Die für die Versuchsreihen in Kultur gehaltenen HEK 293-Zellen, HSC, MFB, CFSC und Cos7-Zellen wurden bei 37 °C unter CO₂-Begasung (5%) aufbewahrt. Je nach Verbrauch wurde alle 2 bis 3 Tage das Medium (12 ml) erneuert. Waren die Platten zu etwa 90 % bewachsen („konfluent“), so wurden die Zellen gesplittet und auf neuen Platten weiter kultiviert.

3.2.2 Trypsinisierung von Zellen

Zur Trypsinisierung der Zellen wurde zuerst das Medium abgezogen und dann die Zellen auf der Platte mit 2 ml HBSS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Auf jede Platte wurde anschließend 2 ml 1 x Trypsinlösung gegeben. Nach einer 2minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit einer Pipette abgestrahlt und in bereitgestelltes Medium gegeben und je nach Zellzahl erneut ausplattiert.

3.2.3 Einfrieren von Zellen

Damit entstehende Kristalle beim Einfrieren die Zellen nicht irreversibel schädigen, müssen diese speziell vorbehandelt werden. Dazu wurde das Medium von den Platten abgezogen, die Zellen trypsinisiert und diese in 30 ml Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (4 min, 2000 UpM, 4 °C) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet erneut in frisches Medium aufgenommen. Ein gleiches Volumen Einfriermedium wurde zugegeben und vorsichtig untermischt. In jedes Nunc-Einfrierrohrchen (2 ml) wurde 1 ml dieser Lösung pipettiert und die Röhrchen bei -80 °C gelagert.

Um die Zellen aufzutauen, wurde zuerst 15 ml Medium in eine Petrischale gegeben, das Einfrierrohrchen auf Eis rasch aufgetaut und die Zellen vorsichtig in das Medium pipettiert. Die Petrischale wurde sofort in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen konnten nun weiter kultiviert werden.

3.2.4 Proliferations-Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die Zellen in 10 %igem FKS in Kultur gehalten. Am zweiten Tag nach erfolgter Ausplattierung wurde das Medium auf 5 %iges, hitzeinaktiviertes FKS reduziert und die Zellen mit dem adenoviralen Konstrukt infiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen für weitere 24 Std mit jetzt 0,5 %igem FKS in Kultur gehalten. Darauf wurden die infizierten Zellen erneut für 24 Std einem 75 kBq/ml [³H]-Thymidin - Label (NEN Life Science Products, Deutschland) ausgesetzt. Die hier eingebaute Radioaktivität konnte im Anschluss gemessen werden.

3.3 Etablierung und Methoden adenoviraler Expressionstechnik

3.3.1 Grundlegende Klonierstrategien

Um Fremdgene in das adenovirale System einzubringen und damit die gewünschten Gene durch erstellte Adenoviren zu exprimieren, ist es notwendig, gängige Plasmide und die einzuklonierende DNA mit Restriktionsenzymen vorzubehandeln. Dabei enthält ein Plasmid bestimmte adenoviralen Sequenzen; dieses Plasmid wird auch *shuttle*-Vektor genannt. In dieses Plasmid wird die gewünschten DNA-Sequenz mit gängigen Verfahren einkloniert. Die Konstruktion dieses *shuttle*-Vektors ist Voraussetzung für alle weiteren Schritte.

3.3.2 Homologe Rekombination: Erstellung rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren

Die Erstellung rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren durch *in vitro* homologe Rekombination beginnt mit einer Kotransfektion des erstellten *shuttle*-Vektors und des Plasmids pJM17 in HEK 293-Zellen. Dazu wurden 5×10^5 HEK 293-Zellen in six-well Platten mit 2 ml 10 % FKS in Kultur gehalten, bis sie zu ca. 40-50 %

konfluent waren. Eine Stunde vor der Kotransfektion wurde das Medium nochmals gewechselt.

Transfiziert wurden jeweils 2 µg des *shuttle*-Vektors und 2 µg des Plasmids pJM17 mit je 5 µl FuGENE™6 Reagenz. 5 µl FuGENE™6 Reagenz wurden in je 100 µl Basismedium ohne Zusatz in der erforderlichen Anzahl von Eppendorf-Reaktionsgefäßen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend gab man dieses Produkt in die jeweilige Probe der zu transfizierenden DNA. Erneut wurde für 15 min bei RT inkubiert, dann konnten die Proben tröpfchenweise auf die Zellen gegeben werden. Die Zellen wurden bei 37 °C in Kultur gehalten.

Nach 16 Std wurde das Medium mit dem enthaltenden Transfektionsreagenz entfernt und durch 2 ml frisches Medium pro well ersetzt. Die Zellen wurden unter nachfolgender Zugabe von frischem Medium für 12-15 Tage in Kultur gehalten.

Die Gewinnung von rekombinanten Viruspartikeln konnte im Mikroskop anhand der viralen Fokusbildung beobachtet werden.

3.3.3 Reinfektion zur Amplifizierung von Adenoviren

Nach 12-15 Tagen wurden die Zellen von den Platten geerntet, durch Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C, 10 min) die Zellen vom Medium getrennt und das Pellet in Basalmedium ohne Zusatz aufgenommen. Die Viruspartikel wurden durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und anschließendem Auftauen bei 37 °C aus den Zellen freigesetzt. Durch anschließende Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand mit den Viruspartikeln vom Zelldetritus getrennt.

Um einen höheren Virustiter zu erreichen, wurden HEK 293-Zellen mit der erstellten Virusstocklösung reinfiziert. Dazu wurden die HEK 293-Zellen auf 7-10 Petrischalen in Kultur gehalten, bis sie zu ca. 60 % konfluent waren. Eine Stunde vor der Reinfektion wurde das Zellmedium gewechselt, dann 500 µl der Virussuspension langsam auf die Zellen gegeben. Nach 3-4 Tagen in Kultur konnten die Zellen erneut abgenommen und Viruspartikel geerntet werden. Diese Virusstocklösung konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.3.4 Aufreinigung und Aufkonzentration der Viruspartikel

Zur Aufreinigung und Aufkonzentration der Viren wurden zur Virusamplifikation erneut HEK 293-Zellen mit 500 µl Virusstocklösung infiziert. Nach 3 Tagen konnten die Zellen abgeerntet werden, wobei der Erfolg der Infektion am sogenannten zytopathischen Effekt gesehen werden konnte. Dieser zeigte sich in Änderungen der Zellmorphologie und einem Ablösen der Zellen von der Plastikoberfläche der Petri-Schalen. Nach Abernten der Zellen und anschließender Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C, 10 min) wurde das Pellet in HBSS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) resuspendiert. Es folgte ein dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei 37 °C, und nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der resultierende Überstand auf 0,5 g CsCl/ml Basalmedium gegeben und in einer UZ (SW60 Rotor, 40000 UpM, 4 °C, 21 Std) zentrifugiert.

Nach der Ultrazentrifugation konnte die Virusbande mit einer Pipette entnommen, in DMEM aufgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

Die Konzentration der so erstellten Viruslösung wurde mittels Photometrie bei einer OD₂₆₀ gemessen.

3.3.5 Infektion von Zellen

Zur Infektion von Zellen mit Viren wurden 2 x 10⁶ der gewünschten Zellen in Petrischalen mit je 12 ml Medium in Kultur gehalten. Eine Stunde vor der Infektion wurde das Medium stets erneuert. Die Infektion erfolgte pro Petrischale mit je 500 µl der jeweiligen Virusstocklösung unter tröpfchenweiser Zugabe auf die Zellen. Nach einem Tag wurde das Medium entfernt und jetzt nur noch 4 ml frisches Medium pro Schale zugegeben.

Nach 2-3 Tagen konnten die Zellen geerntet und weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

3.3.6 Elektronenmikroskopischer Nachweis des Virions

Das Arbeitsprotokoll zur elektronenmikroskopischen Darstellung von Adenoviren basiert auf der Technik des *negative staining*. Zur Durchführung dieses Protokolls wird hier verwiesen auf:

Hayat MA: Principles and Techniques of Electron Microscopy: 5 Negative Staining. *Biological Applications* 1989, **3**: 328-346.

4 Ergebnisse

4.1 Erstellung eines adenoviralen Reporterkonstruktes: Ad5-CMV-EGFP

Um ein Fremdgen in das adenovirale System einzubringen, ist es notwendig, dieses zuerst in einen Austauschvektor, einen sogenannten *shuttle*-Vektor, einzuklonieren. Dieser *shuttle*-Vektor ist in seinen heterologen Genabschnitten von adenoviralen Sequenzen flankiert. Dieses ermöglicht später die homologe Rekombination mit den entsprechenden adenoviralen Sequenzen des Plasmids pJM17. Dieses Plasmid fungiert als Rückgrat und enthält das um die E1-Region deletierte adenovirale Genom.

Sämtliche Plasmide wurden im *E. coli* Bakterienstamm JM105 amplifiziert und die DNA aufgereinigt.

Enhanced Green fluorescent protein (EGFP) dient bei den etablierten Verfahren als Reporter und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

4.1.1 Klonierung des *shuttle*-Vektors p Δ E1sp1A-CMV-EGFP

Der Vektor pEGFP-C1 (CLONTECH) ist ein eukaryotischer Vektor mit einer Größe von 4,7 kbp und exprimiert das als Reporter gen dienende *enhanced green fluorescent protein* EGFP unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiv aktiven humanen Cytomegalievirus-Promotors. Konstitutiv aktiv bedeutet, dass der Promotor das Gen universal exprimiert.

Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AsnI* und *SspI* geschnitten, das CMV-EGFP-Fragment isoliert und mit Klenow-Enzym aufgefüllt.

Der *shuttle*-Vektor p Δ E1sp1A wurde an seiner *multiple cloning site* mit *EcoRI* geschnitten und ebenfalls mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Nach seiner Linearisierung konnte nun das isolierte CMV-EGFP-Fragment *blunt end* einkloniert werden. Der so erstellte Vektor kodiert nun, flankiert von adenoviralen Sequenzen, das *enhanced green fluorescent protein* EGFP als Reporter gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors.

Die Orientierung dieses Reporterkonstruktes und die Integrität der Übergänge der Klonierstellen wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft. Ein Ausschnitt aus der Sequenz mit den Übergängen der einklonierten Kasette ist in Abbildung 2 dargestellt.

A

```

1  CATNCACANT  CTGNCGCACC  CCGGCCCATG  GGGGCATGCG  CGTTGTCAAA  TATGAGCTCA  60
61  CAATGCTTCC  ATCAAACGAG  TTGGTGCTCA  TGGCGGCGGC  GGCTGCTGCA  AAACAGATAC  120
121 AAAACTACAT  AAGACCCCCA  CCTTATATAT  TCTTTCCAC  CCTTAACCAC  GCCCAGATCT  180
181 TCGAGTCGAC  AAGCTTGAAT  TTAATAGTAA  TCAATTACGG  GGTCATTAGT  TCATAGCCCA  240
241 TATATGGAGT  TCCGCGTTAC  ATAACTTACG  GTAAATGGCC  CGCCTGGCTG  ACCGCCAAC  300
301 GACCCCGCC  CATTGACGTC  AATAATGACG  TATGTTCCCA  TAGTAACGCC  AATAGGGACT  360
361 TTCCATTGAC  GTCAATGGGT  GGAGTATTTA  CGGTAAACTG  CCCACTTGGC  AGTACATCAA  420
421 GTGTATCATA  TGCCAAGTAC  GCCCCCTAT  GACGTCAATG  ACGGTAATG  GCCCGCTGG  480
481 CATTATGCC  AGTACATGAC  CTTATGGGAC  TTTCTACTT  GGCAGTACAT  CTACGTATTA  540
541 AGTCATCGCT  ATTACCATGG  TGATGCGGTT  TGGCAGTACA  TCAATGGGCG  TGGATAGCGG  600
601 NTTGACTACG  GGGATTTCOA  GTCTCACCCA  TGACGTAATG  GGAGTTTGTT  TGGCACCAAA  660
661 TCAACGGGAC  TTCAAATGNC  GAACACTCCG  CCATTGACCA  ATGGCGGTAG  GCNTGTCCGT  720
721 GGGAGTTTA  TAACAAC  780

```

B

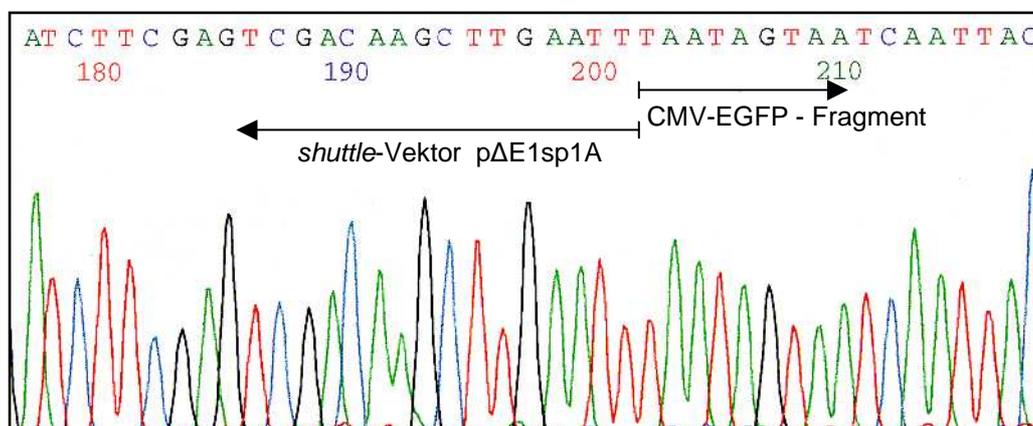


Abb. 2: **Ausschnitt der Sequenz mit der Klonierstelle von pΔE1sp1A-CMV-EGFP und Teil der Originalsequenz**

(A) Dargestellt ist ein Ausschnitt des Einzelstranges in 3' → 5'. Die Sequenzierung erfolgte mit 5'-d(GGCGACCATCAATGCTGGAG)-3' - Primer. Die Übergangsstelle von pΔE1sp1A zum einklonierten CMV-EGFP - Fragment ist unterstrichen.

Die Gesamtsequenz des 8,07 kbp großen Plasmids wurde in die GenBank unter der Accession-Nr. AF288620 eingetragen.

(B) Ausschnitt der Originalsequenz von pΔE1sp1A-CMV-EGFP. Der Übergang des *shuttle*-Vektors zum einklonierten CMV-EGFP - Fragment ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.1.2 Erzeugung von Ad5-CMV-EGFP durch homologe Rekombination

Die Einbringung dieses Expressionskonstruktes in das adenovirale System erfolgte mittels homologer Rekombination. Dabei findet ein Austausch der heterologen Genabschnitte von p Δ E1sp1A-CMV-EGFP und des Plasmids pJM17 statt. Dieser Vektor enthält die um die E1-Region deletierte Gesamt-DNA des Adenovirus vom Serotyp 5. Dazu wurden p Δ E1sp1A-CMV-EGFP und pJM17 durch eine Kotransfektion in HEK 293-Zellen gebracht, die ihrerseits die Fähigkeit besitzen, die E1-Proteine des Adenovirus zu komplementieren. Es entstehen so durch homologe Rekombination in den HEK 293-Zellen rekombinante, replikationsdefekte Adenoviren.

Dazu wurden ungefähr 5×10^5 HEK 293-Zellen in six-well Platten mit 2 ml 10 % FKS in Kultur gehalten, bis sie zu ca. 40-50 % konfluent waren. Transfiziert wurden jeweils 2 μ g des *shuttle*-Vektors p Δ E1sp1A-CMV-EGFP und 2 μ g des Plasmids pJM17 mit je 5 μ l FuGENE™6 Reagenz. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C in Kultur gehalten.

Nach 16 Std wurde das Medium mit dem enthaltenden Transfektionsreagenz entfernt und durch 2 ml frisches Medium pro well ersetzt. Die Zellen wurden unter nachfolgender Zugabe von frischem Medium für 21 Tage in Kultur gehalten.

Bereits 24 Std nach der Kotransfektion waren ca. 40 % der HEK 293-Zellen positiv für das *enhanced green fluorescent protein*. Nach 8-9 Tagen waren mittels Fluoreszenzmikroskopie die typischen viralen Foci zu sehen, die zeigten, dass rekombinante, replikationsdefekte Adenoviren Ad5-CMV-EGFP produziert wurden. Abbildung 3 (S. 36) lässt die entstehenden Foci erkennen.

Nach 21 Tagen in Kultur waren alle HEK 293-Zellen durchinfiziert und es konnten rekombinante, replikationsdefekte Adenoviren geerntet werden.

Die Viruspartikel wurden durch dreimaliges Einfrieren bei - 80 °C und anschließendem Auftauen bei 37 °C aus den Zellen freigesetzt.

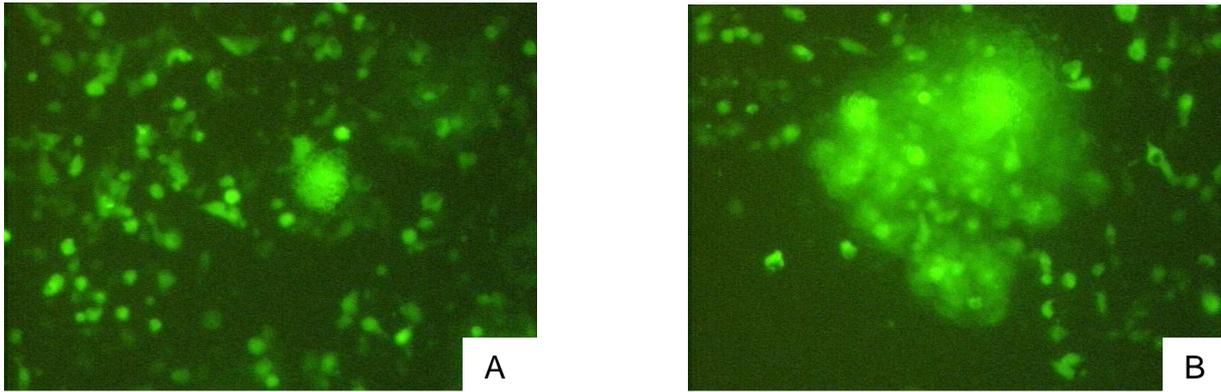


Abb. 3: **Virale Fokusbildung während der homologen Rekombination**

(A) Deutlich erkennbarer Fokus am 8. Tag nach Kotransfektion
 (B) Multiple Foci am 15. Tag nach der Kotransfektion

Um einen höheren Virustiter zu erreichen, wurden HEK 293-Zellen mit der erstellten Virusstocklösung reinfiziert. Dazu wurden die HEK 293-Zellen auf 7-10 Petrischalen in Kultur gehalten, bis sie zu ca. 60 % konfluent waren. Zur Reinfektion wurden 500 µl der Virussuspension langsam auf die Zellen gegeben. Nach 3-4 Tagen in Kultur konnten die Zellen erneut abgenommen und Viruspartikel geerntet werden. Mit dieser Virusstocklösung konnte nun die Aufreinigung und Aufkonzentration der Viruspartikel durchgeführt werden.

Abbildung 4 (S. 37) zeigt das durchgeführte Protokoll mit den verwendeten Plasmiden.

Abb. 4: **Konstruktion rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren, die das Reportergen GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren.**

(A) Der Vektor pEGFP-C1 exprimiert das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}).

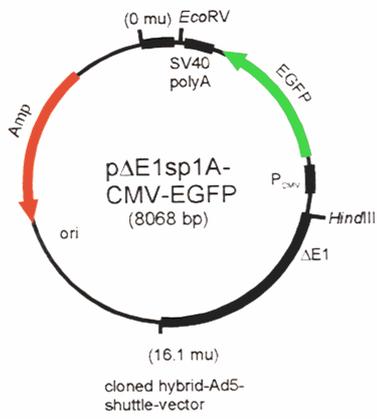
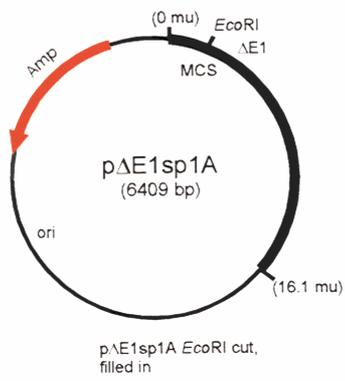
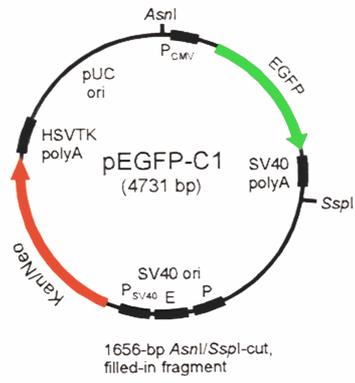
Kan/Neo, Kanamycin/Neomycin Resistenzgen; Amp, Ampicillin Resistenzgen; pUC ori, *E. coli* origin of replication; SV40 ori, simian virus 40 origin of replication; SV40 poly A, Simianvirus Polyadenylierungssignal; HSVTK poly A; Herpes Simplex Thymidinkinase Polyadenylierungssignal.

Der *shuttle*-Vektor pΔE1sp1A enthält die Sequenzen von Ad5 von bp 22 (0 mu) bis bp 5790 (16.1 mu) mit der E1-Deletion (ΔE1) von bp 342 bis bp 3523 (1.0 – 9.8 mu). MCS, multiple cloning site. Zur Konstruktion des *shuttle*-Vektors pΔE1sp1A-CMV-EGFP wurde das 1656 bp *Asnl/Sspl*-Fragment von pEGFP-C1 in pΔE1sp1A inkloniert, welcher zuvor mit *EcoRI* geschnitten wurde.

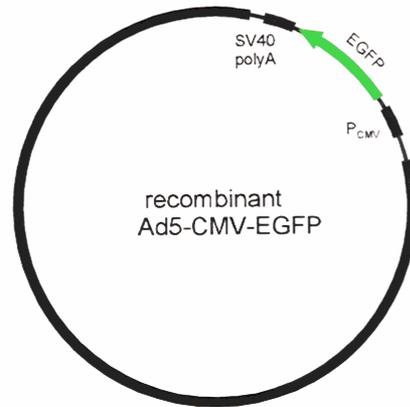
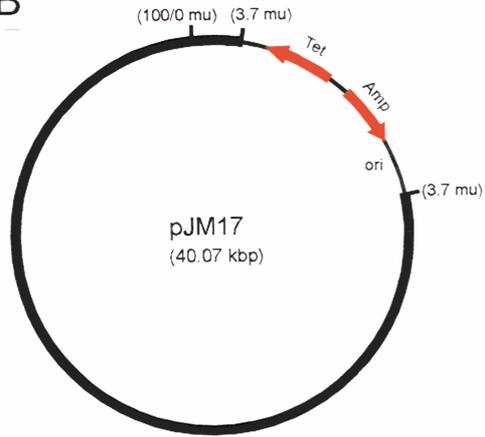
(B) Die Integration der Reporter-Kassette von pΔE1sp1A-CMV-EGFP in den adenoviralen Vektor pJM17 erfolgte mittels Kotransfektion in HEK 293-Zellen durch homologe Rekombination über die gemeinsamen Ad5-Regionen.

(C) Schematische Struktur der erzeugten rekombinanten, replikationsdefekten Viruspartikel, die die Zielzellen mit der CMV-EGFP Kasette infizieren können.

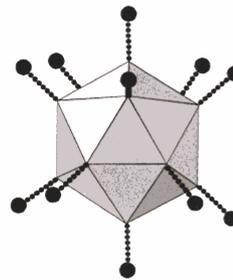
A



B



C



Ad5-CMV-EGFP

4.1.3 Titration der Viruspartikel

Für eine *in vivo* Testung der biologischen Funktionalität des adenoviralen Konstruktes ist es notwendig, den Titer der Virusstocklösung zu bestimmen, da für eine *in vivo* Infektion ein hoher Virustiter bei einem kleinen Volumen für das Inokulat notwendig ist. Die Bestimmung des Titers erfolgte mittels Plaque Assay, wobei HEK 293-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Virusstocklösung infiziert wurden. Als Plaque bezeichnet man die unter dem Mikroskop aufgrund der Infektion sichtbare Lyse der Zellen, die als durchsichtiger Bereich („Loch“) im Zellrasen erscheint. Die Einheit des Virustiters wird in *plaque-forming units* pro ml angegeben (pfu/ml).

Die erstellte Virusstocklösung von Ad5-CMV-EGFP hatte einen Titer von ungefähr 10^6 pfu/ml.

Der MOI-Index (*multiplicity of infection*, d. h. Infektionsmultiplizität) gibt die Anzahl der Viruspartikel an, die nötig sind, um eine Zelle zu infizieren. Dieser betrug in den durchgeführten Experimenten ca. 10.

4.1.4 Aufreinigung und Aufkonzentration der Viren

Zur Reamplifikation und anschließender Aufreinigung und Aufkonzentration der Viren wurden ungefähr 2×10^6 HEK 293-Zellen in Petrischalen mit je 12 ml Medium in Kultur gehalten. Vor der Infektion wurde stets das Medium erneuert. Die Infektion erfolgte pro Petrischale mit je 500 μ l der jeweiligen Virusstocklösung unter tröpfchenweiser Zugabe auf die Zellen. Einen Tag später wurde das Medium gewechselt und nach 3 Tagen konnten die Zellen geerntet werden, wobei der Erfolg der Infektion am sogenannten zytopathischen Effekt gesehen werden konnte. Er zeigte sich in Änderungen der Zellmorphologie und einem Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischale. Im Anschluss konnten die Viruspartikel nach Standard aus den HEK 293-Zellen isoliert und auf einen CsCl-Gradienten gegeben werden (siehe 3.3.4). In Abbildung 5 (S. 39) ist die Virusbande nach erfolgter Ultrazentrifugation in einem SW60 Rotor (40000 UpM, 4 °C, 18-21 Std) zu erkennen.

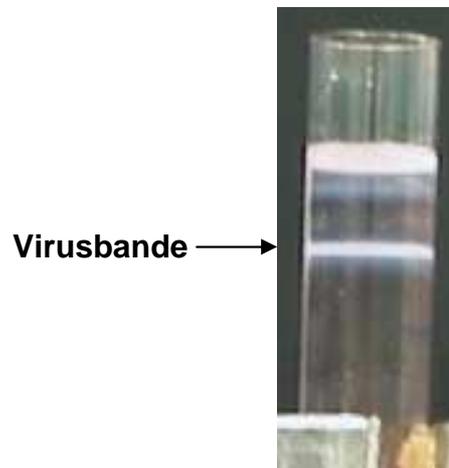


Abb. 5: Virusbande nach CsCl-Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung und Aufkonzentration von Adenoviren.

Die Viruspartikel wurden in DMEM-Basalmedium resuspendiert und die Konzentration dieser Viruslösung mittels Photometrie bei einer OD_{260} gemessen. Mit diesen aufgereinigten und aufkonzentrierten Viren konnten nun die weiteren Experimente durchgeführt werden.

4.1.5 Nachweis der Infektiösität von Ad5-CMV-EGFP in HSC und MFB

Um die Funktionalität des klonierten Promotor-Genproduktes in den Zellen zu testen, wurden jeweils ca. 10^5 HSC (*hepatic stellate cells*) und MFB (Myofibroblasten) pro six-well Platte in 2 ml Medium in Kultur gehalten. Zwei Tage später wurden die Zellen mit je 100 μ l der Virusstocklösung bei einer MOI von 10 infiziert. Nach 24 Stunden waren 100 % der Zellen mit Ad5-CMV-EGFP infiziert.

Dieses konnte mit Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Abbildung 6 zeigt die phasenkontrastmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen 48 Std nach Infektion von HSC und MFB mit Ad5-CMV-EGFP.

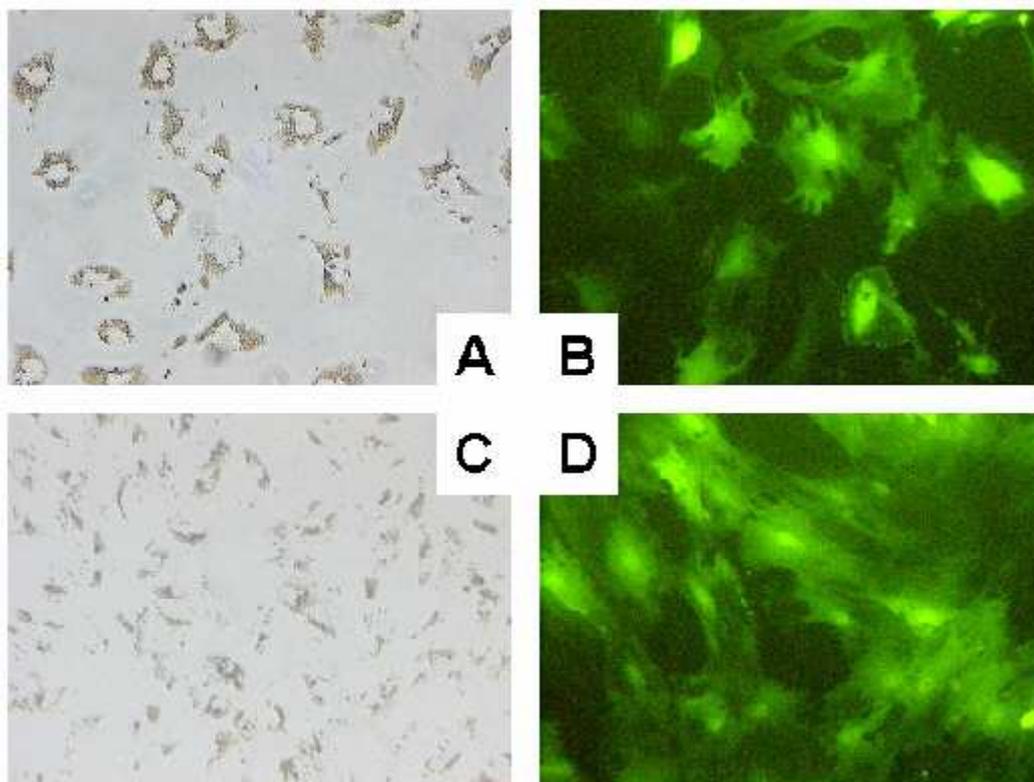


Abb. 6: **Infektion von HSC und MFB mit Ad5-CMV-EGFP**

Für die Infektion von HSC/MFB wurden jeweils 10^5 Zellen in je 2ml Medium vorgelegt und 2 Tage später mit 100 μ l Virusstocklösung infiziert.

Abgebildet sind die phasenkontrastmikroskopischen (A,C) und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (B,D) 48 Std nach Infektion mit Ad5-CMV-EGFP. A,B = HSC; C,D = MFB

4.1.6 Dokumentation der Integrität von Ad5-CMV-EGFP durch Elektronenmikroskopie

Die morphologische Integrität des einzelnen Adenovirions Ad5-CMV-EGFP wurde durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Grundlage für die Darstellung ist die Methode des *negative staining*.

In Abbildung 7 sind deutlich sechs der zwölf Ecken des einzelnen Viruspartikels zu erkennen, das die Form eines Ikosaeders besitzt. Die Oberfläche des Virions wird neben den Pentonbasisproteinen, die mit sogenannten Fiberproteinen assoziiert sind, von Hexonproteinen gebildet. Diese sind als multiple, geordnete weisse Strukturen erkennbar.

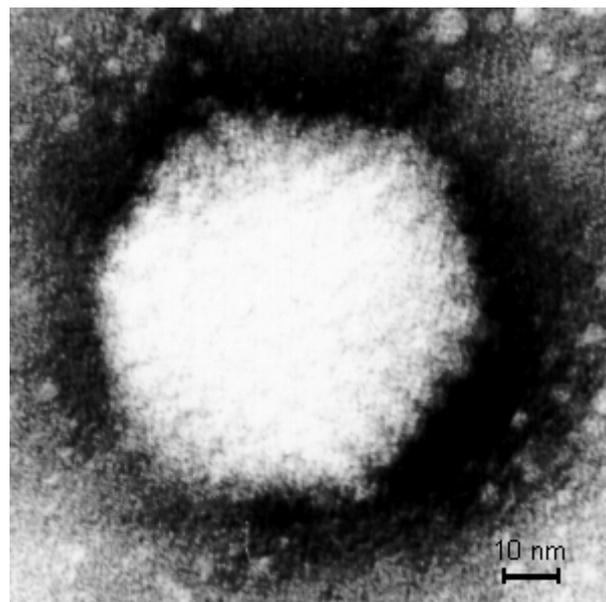


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ad5-CMV-EGFP - Virions mittels *negative staining*

4.2 Expression eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors als Grundlage möglicher antifibrotischer Therapie

Durch die Expression eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors soll in die TGF- β - Signalkaskade interveniert werden, so dass durch eine Blockade dieser Signalkaskade der progrediente Verlauf der Fibrose verhindert werden kann. Dabei bindet dieser *in vitro* in das Zellmedium sezernierte lösliche Rezeptor freies TGF- β , so dass TGF- β selbst nicht mehr an den Typ II-Rezeptor der Zellmembranoberfläche binden kann, um die Signalkaskade einzuleiten.

4.2.1 Klonierung des *shuttle*-Vektors p Δ E1sp1A-CMV-sT β RII

Die Klonierungsstrategien des *shuttle*-Vektors p Δ E1sp1A-CMV-sT β RII geschah analog zu den Methoden der Klonierung des *shuttle*-Vektors p Δ E1sp1A-CMV-EGFP. Zusätzlich musste hier das EGFP-Fragment aus dem *shuttle*-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *NheI* herausgeschnitten und durch das sT β RII-F_c(IgG₁) - Fragment aus dem Plasmid plg, das mit *NcoI* geschnitten wurde, passend einkloniert werden. Es entstand so ein *shuttle*-Vektor, der unter der konstitutiven Kontrolle des CMV-Promotors die Information für einen löslichen TGF- β Typ II-Rezeptor besitzt, der mit dem F_c-Teil des humanen Immunglobulins IgG₁ fusioniert ist.

Abbildung 8 (S. 43) macht die zugrundeliegende Plasmidstruktur von plg erkenntlich. Der cysteinreiche F_c-Teil ist notwendig für die Dimerisierung des löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors. Wegen des Fehlens der intrazellulären Serin/Threonin - Kinase - Domäne des Typ II-Rezeptors wird dieser Rezeptor auch als trunkierter TGF- β Typ II-Rezeptor bezeichnet.

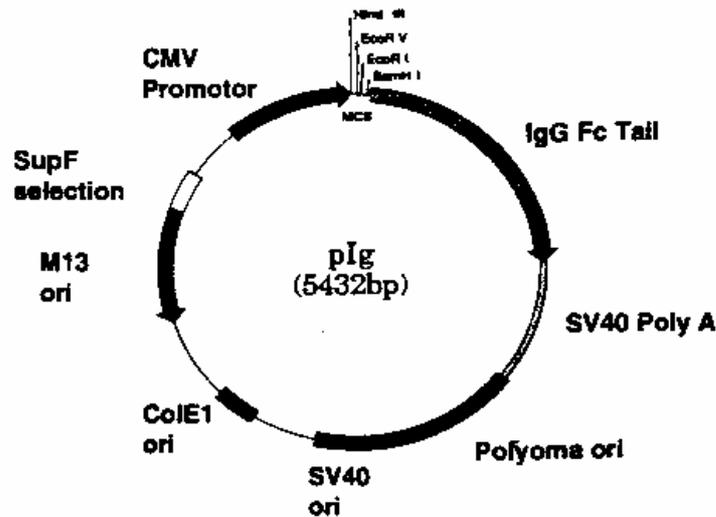


Abb. 8: **Struktur des Plasmids pIg**

Die extrazelluläre Domäne des humanen T β RII wurde in die MCS (multiple cloning site) von pIg inkloniert. Durch Restriktion dieses Plasmids mit *NcoI* konnte das sT β RII-Fc(IgG₁) – Fragment ausgeschnitten und in den zuvor mit *EcoRV* und *NheI* behandelten und um das EGFP-Fragment deprivierten, adenoviralen *shuttle* Vektor p Δ E1sp1A-CMV-(EGFP) inkloniert werden.

(Die Abbildung wurde entnommen aus: Komesli S, Vivien D, Dutartre P: Chimeric extracellular domain of type II transforming growth factor (TGF)- β receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF- β antagonist. *Eur J Biochem* 1998, **254**: 505-513)

In Abbildung 9 ist das Arbeitsprotokoll anhand eines Flussdiagrammes dargestellt.

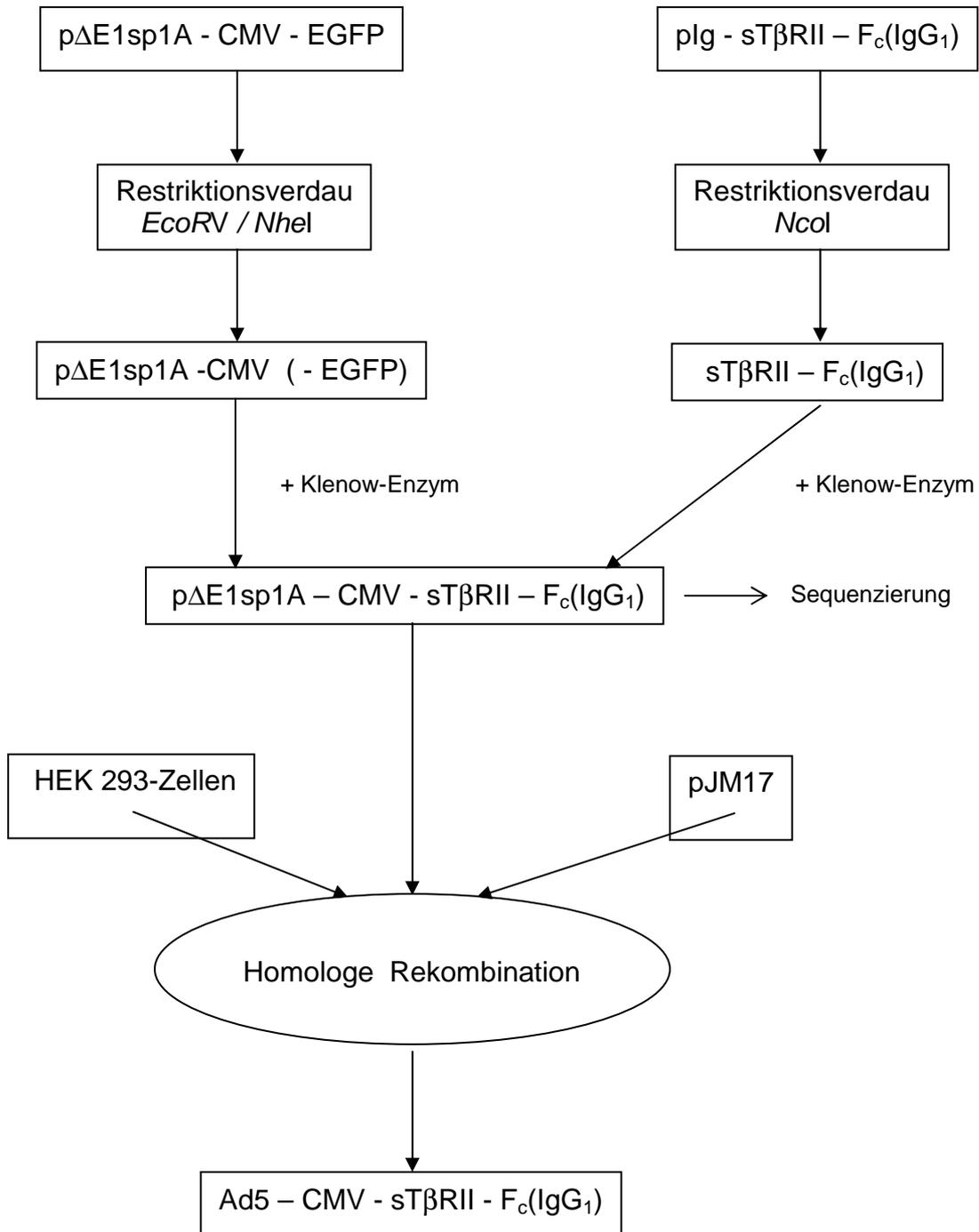


Abb. 9: Flussdiagramm zur Erstellung replikationsdefekter, rekombinanter Adenoviren, die einen löslichen TGF-β Typ II-Rezeptor unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren.

4.2.2 Nachweis der Expression von Ad5-CMV-sTβRII

4.2.2.1 Expression des adenoviralen Konstruktes auf mRNA-Ebene

Zum Nachweis der Transkriptionsfähigkeit des adenoviralen Konstruktes wurden 2×10^6 CFSC in je zwei Petrischalen jeweils mit 500 µl der Virusstocklösungen von Ad5-CMV-sTβRII und des als Kontrollkonstrukt dienenden Ad5-CMV-EGFP infiziert.

CFSC (*cirrhotic fat storing cells*) sind eine myofibroblastenähnliche Zelllinie, die aus einer mit CCl₄-induzierten Rattenleberzirrhose etabliert wurde (Greenwel *et al.*, 1993). Wie MFB synthetisieren sie TGF-β und sind *in vitro* verantwortlich für die Zunahme von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin. Anhand des Kontrollkonstruktes konnte der Erfolg der Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie nachvollzogen werden. Bereits 24 Std nach Infektion waren 100 % der Zellen infiziert. Zwei Tage nach der Infektion konnte die RNA isoliert werden. Der Northern Blot wurde mit einer [α -³²P]dCTP markierten cDNA hybridisiert, die spezifisch für die extrazelluläre Domäne des TGF-β Typ II-Rezeptors ist. Das Elutionsprofil der Labelaufreinigung mit der G50 - Gel - Sephadexsäule ist in Abbildung 10 dargestellt. Der erste Peak entspricht mit ca. 80 % den radioaktiv markierten, eingebauten Nukleotiden (1) der für das Experiment verwendeten Sonde, im zweiten Peak sind die 20 % nicht eingebauten, freien Nukleotide (2) dargestellt.

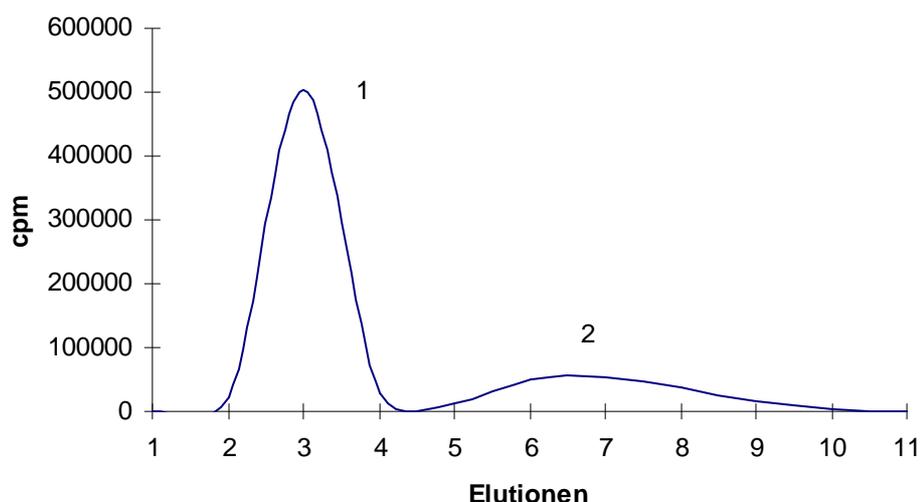


Abb. 10: Elutionsprofil des verwendeten Labels einer [α -³²P]dCTP markierten cDNA-Sonde, die spezifisch für die extrazelluläre Domäne des TβRII ist, mit einer G50 - Gel - Sephadexsäule. 1 = inkorporierte Nukleotide; 2 = freie Nukleotide

Tabelle 1 gibt die entsprechenden cpm - Werte wieder.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
cpm	247	21620	502029	26586	2578	11949	49372	53714	38936	14578	2226	247

Tab. 1: **counts per minute (cpm) - Werte der eluierten Proben des verwendeten Labels.**

Dazu wurde je 1 μl einer 200 μl - Probe gemessen. Die Gesamtaktivität errechnet sich aus den Proben 2, 3 und 4 zu $3,67 \times 10^7$ cpm/100 ng DNA, woraus sich die spezifische Aktivität von $3,67 \times 10^8$ cpm/ μg DNA ergibt.

Zu detektieren waren bei der Probe Ad5-CMV-sT β RII zwei mRNAs mit einer ungefähren Länge von 2750 nt und 2380 nt, wohingegen bei dem Kontrollkonstrukt Ad5-CMV-EGFP nichts zu detektieren war. Die Größenbestimmung erfolgte dabei mit Hilfe von halblogarithmischem Papier. Abbildung 11 (B) zeigt das Ergebnis des Northern Blots.

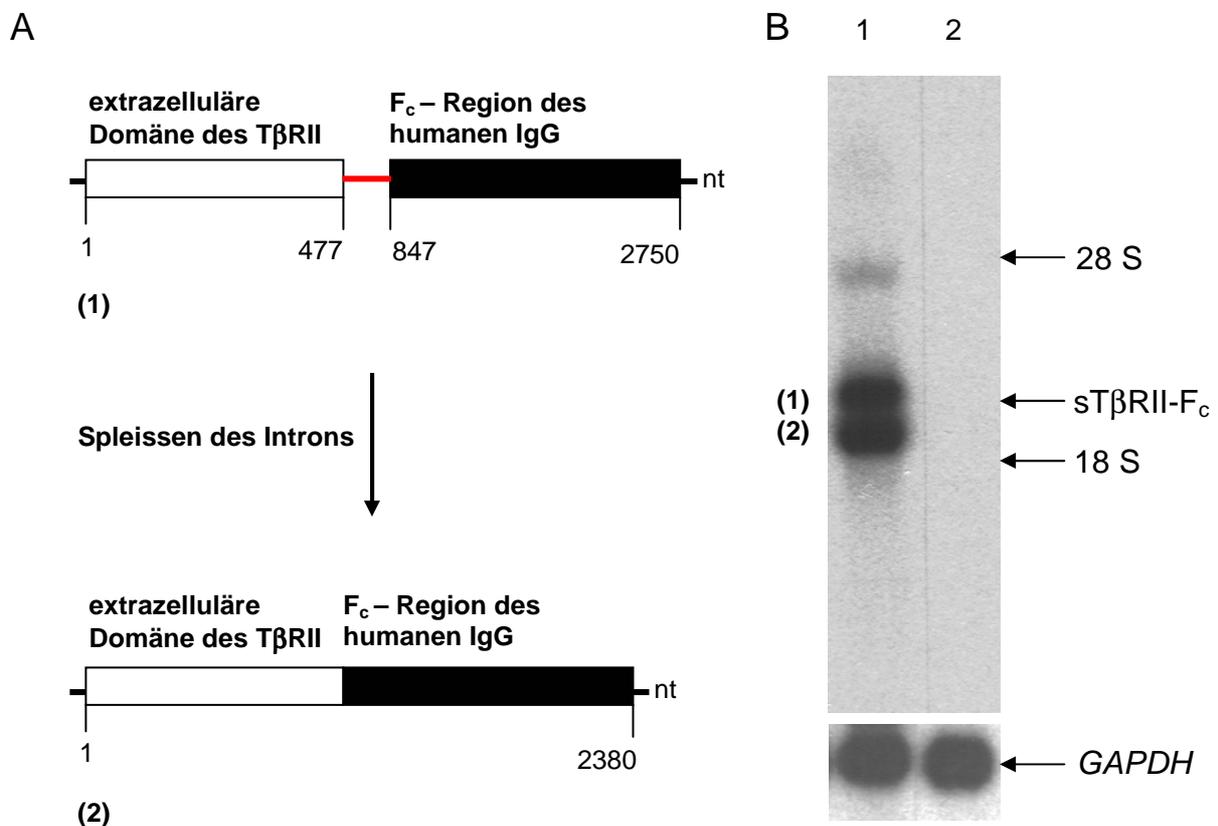


Abb. 11: **Spleissvorgang und Northern Blot-Analyse zum Nachweis der Transkriptionsfähigkeit des löslichen T β R II**

(A) Skizzierung des Spleissens eines 370 nt großen Introns.

(B) Zwei Tage nach der Infektion von CFSC mit Ad5-CMV-sT β R II (1) und Ad5-CMV-EGFP (2) wurde Gesamt-RNA isoliert und einer Northern Blot-Analyse unterzogen. Hybridisiert wurde mit $3,67 \times 10^8$ cpm/ μg DNA einer cDNA, die spezifisch für die extrazelluläre Domäne des T β R II ist. Der Blot wurde als interner Kontrollstandard zum Beweis gleichmäßiger Spurenbeladung mit einer radioaktiv markierten GAPDH-spezifischen cDNA - Sonde rehybridisiert.

Der Nachweis zweier Banden bei der Probe Ad5-CMV-sTβRII ist durch das Vorhandensein einer noch nicht gespleissten mRNA zu erklären: Die erwartete Größe der reifen, gespleissten mRNA für das Fusionsprotein sTβRII-F_c(IgG₁) besitzt eine Länge von ungefähr 2380 nt. Die noch nicht gespleisste mRNA enthält allerdings noch ein Intron von ca. 370 nt und erreicht somit eine Länge von 2750 nt.

4.2.2.2 Dokumentation der Translationsfähigkeit des adenoviralen Konstruktes

Der Beweis für die letztliche Synthese des Fusionsproteins wurde mittels Western Blot erbracht. Dazu wurden 2×10^6 CFSC in je zwei Petrischalen sowohl mit Ad5-CMV-sTβRII als auch mit dem als Kontrollkonstrukt dienenden Ad5-CMV-EGFP mit 500 µl der jeweiligen Virusstocklösung infiziert. Der Erfolg der Infektion konnte auch hier anhand des Kontrollkonstruktes mit Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Dabei waren im Kontrollkonstrukt die CFSC nach 24 Std zu 100 % positiv für EGFP. Nach zwei Tagen wurden Zellysate erstellt und sowohl das Medium vor Lysaterstellung als auch das Zellysat als Proben einer Western Blot-Analyse unterzogen. Es liegt nahe, dass der lösliche Fusionskonstrukt, der extrazellulär seine Wirkung entfalten soll, auch bereits während der Zellkultur von den mit diesem Konstrukt infizierten CFSC bereits in das Zellmedium sezerniert worden ist.

Dieses auch als chimär bezeichnete Fusionsprotein besitzt in der *hinge*-Region der F_c-Region zwei Cysteinreste, die jeweils Disulfidbrücken zwischen den beiden sTβRII-F_c(IgG₁) – Molekülen bilden. Dabei kann die F_c-Domäne jeweils zwei Moleküle sTβRII-F_c(IgG₁) binden.

Das Fusionprotein sTβRII-F_c(IgG₁) wurde mit einem ersten polyklonalen Antikörper, der gegen den TGF-β Typ II-Rezeptor gerichtet ist (TGFβRII rabbit polyclonal IgG), und mit einem zweiten Antikörper, der gegen das IgG gerichtet ist (anti-rabbit IgG), detektiert.

Untersucht wurden im Western Blot die Zellüberstände aus der Zellkultur vor Erstellung der Lysate der jeweiligen Proben Ad5-CMV-sTβRII und Ad5-CMV-EGFP, die jeweils erstellten Zellysate der Proben und reines Basalmedium ohne Zusatz von FKS als weitere Kontrolle, um mögliche Effekte in den für die Zellkultur verwendeten Medien durch die Antigen-Antikörper-Reaktion besser beurteilen zu können.

Das theoretische errechnete Molekulargewicht beträgt für das reine Monomer etwa 44 kDa. Bei den Zellüberständen von CFSC, die mit Ad5-CMV-sT β RII infiziert wurden, zeigt sich eine starke Proteinexpression bei etwa 130 kDa und bei 68 kDa. Bei der Detektion der Zelllysateproteine stellen sich zwei Banden bei einem Molekulargewicht von 130 - 140 kDa dar. Die Größenbestimmung erfolgte dabei auch hier mit Hilfe von halblogarithmischem Papier.

In den anderen Spuren sind keine Detektierungen zu erkennen.

Der Versuch legt dar, dass das Fusionsprotein sT β RII-F_c(IgG₁) von den infizierten CFSC in der Zelllysatefraktion als Dimer mit etwa 130 kDa sezerniert wird. Die untere Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 68 kDa weist auf das Vorliegen des Monomers.

Die vermehrte Anzahl von Banden bei den Zelllysaten und auch Zellüberständen deutet dabei auf Glykosilierungserscheinungen der Proteine hin. Die Abbildung 12 stellt das Ergebnis der Western Blot-Untersuchung dar.

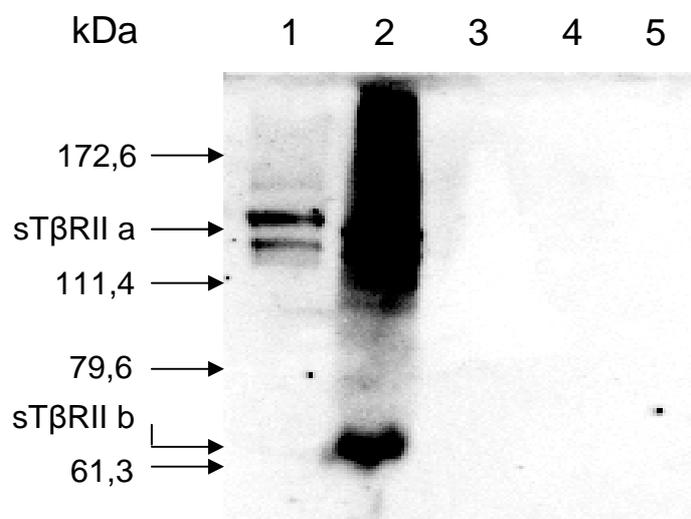


Abb. 12: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Translationsfähigkeit des löslichen T β RII

Zwei Tage nach der Infektion von CFSC mit Ad5-CMV-sT β RII und Ad5-CMV-EGFP wurden Zelllysate erstellt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Zelllysate, die Zellüberstände und reines Medium als Kontrolle wurden mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den löslichen T β RII gerichtet ist, inkubiert und detektiert.

1 = sT β RII aus Zelllysate, 2 = sT β RII aus Zellüberstand, 3 = EGFP aus Zelllysate, 4 = EGFP aus Zellüberstand, 5 = Basalmedium

sT β RII a = löslicher TGF- β Typ II-Rezeptor als Dimer, sT β RII b = löslicher TGF- β Typ II-Rezeptor als Monomer

4.2.3 Immunpräzipitation zur Darstellung des Fusionsproteins

Um das gewünschte Fusionsprotein neben den anderen im Zellüberstand vorkommenden Proteinen gezielt nachzuweisen und zu zeigen, dass dieses Fusionsprotein bivalent und in einer antikörperähnlichen Struktur vorliegt, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, die die spezifische Affinität zwischen dem F_c -Teil des IgG und dem Protein G ausnutzt.

Dazu wurden je zwei Platten Petrischalen mit etwa 10^6 Cos7 - Zellen mit dem Konstrukt Ad5-CMV-sT β RII und dem Kontrollvirus Ad5-CMV-EGFP infiziert.

Der Vorteil der Cos7-Zellen liegt in ihrer hohen Transkriptions- und Translationsrate von in die Zellen infizierten DNA-Konstrukten und ihrer hohen Expression, wobei sie auch große Mengen von Fremd-DNA aufnehmen. Cos7 - Zellen entstammen dem Nierengewebe der grünen Meerkatze.

Einen Tag nach der Infektion wurde das Medium entfernt und frisches, jetzt aber nur noch 2 %iges FKS-Medium zugeführt. Die Reduktion des FKS wurde durchgeführt, um den Gehalt von im FKS enthaltenen Immunglobulinen im Medium zu reduzieren, da dies unter Umständen den Nachweis der spezifischen Banden für die F_c -Domäne des Fusionproteins im weiteren Verlauf der Untersuchung erschweren könnte. Nach zwei Tagen konnten die Überstände der jeweiligen Proben verarbeitet werden, wobei auch hier der Erfolg der Infektion mit Fluoreszenzmikroskopie des Reporterkonstruktes Ad5-CMV-EGFP kontrolliert wurde. Auch hier waren 100 % der Cos7-Zellen bereits nach 24 Std positiv für EGFP.

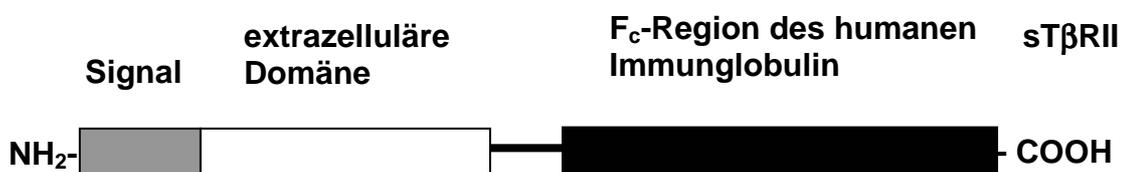
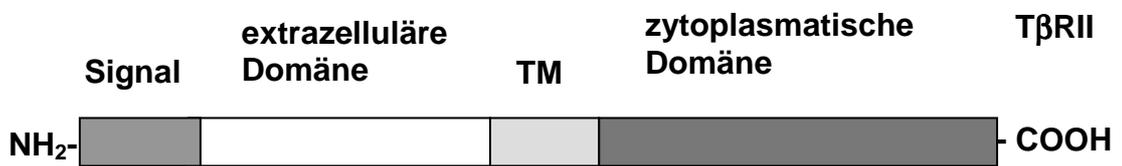
Der Überstand, in dem der von den Cos7-Zellen sezernierte Fusionskonstrukt vermutet wurde, wurde daraufhin mit Protein G versetzt. Auch dem Überstand des Kontrollkonstruktes Ad5-CMV-EGFP wurde Protein G zugegeben.

Die Besonderheit dieses Proteins ist seine spezifische Affinität zur F_c -Region des Immunglobulins IgG₁, der Bestandteil des Fusionsproteins sT β RII- F_c (IgG₁) ist. Somit ist es möglich, unter mehreren vorhandenen Proteinbanden die spezifisch zu erwartende Bande zu detektieren.

Die so erstellten Präzipitate der Überstände wurden analog zum Verfahren des Western Blots aufgetrennt, und zwar sowohl unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von DTT als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Zugabe von DTT), um hier Aussagen über eine antikörperähnliche Struktur, nämlich die eines Dimers (s. 4.2.2.2), zu machen. Die genaue Antikörperstruktur und die Konstruktion

dieses löslichen, dominant - negativen TGF- β Typ II Rezeptors ist in Abbildung 13 aufgezeigt.

A



B

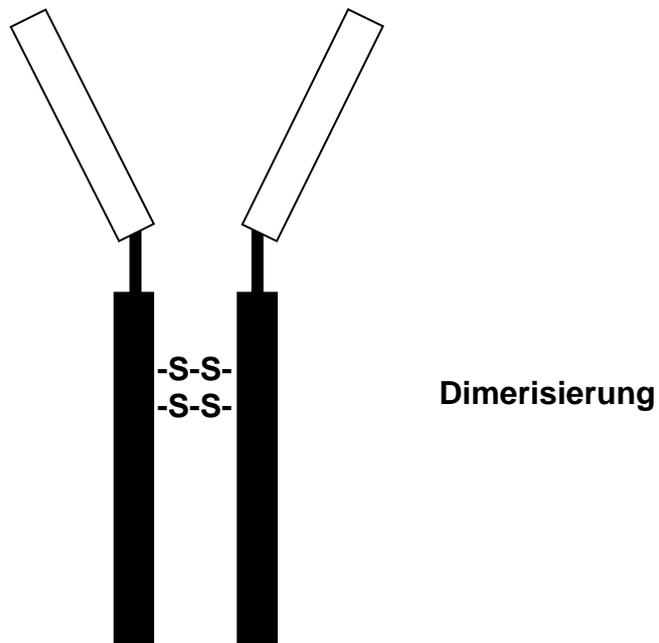


Abb. 13: **Konstruktion eines löslichen, dominant - negativen T β RII**

(A) Schematische Struktur eines T β RII und eines löslichen T β RII (sT β RII), TM = transmembranäre Domäne

(B) Antikörperähnliche Struktur des sT β RII durch Dimerisierung.

Dieser wird als Dimer von den infizierten Zellen sezerniert, bindet extrazelluläres, freies TGF- β und inhibiert somit die TGF- β Signalkaskade.

Anschließend wurden die Gele zur Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Coomassie Blue gefärbt.

Das Resultat der Auftrennung und Färbung zeigt, dass sich unter nicht reduzierenden Bedingungen das präzipitierte Fusionsprotein als zwei vorhandene Banden mit einer Molekularmasse von ungefähr 130-150 kDa darstellt.

Unter reduzierenden Bedingungen ist das Protein als eine dicke Bande mit einer Molekularmasse von ca. 68 kDa nachzuweisen.

Diese Ergebnisse machen auch hier deutlich, dass das Fusionsprotein sTβRII-F_c(IgG₁) von den infizierten Cos7 - Zellen als Dimer in antikörperähnlicher Struktur sezerniert wird. Die Disulfidbrücken des chimären Fusionsproteins können unter reduzierenden Bedingungen, also der Zugabe von DTT in den Proben, zerstört werden, so dass statt eines Dimers zwei Monomere vorliegen. Die mit Hilfe von halblogarithmischem Papier ermittelten Molekulargewichte des Fusionsproteins zeigen eine Übereinstimmung mit den ermittelten Molekulargewichten des Western Blots. Abbildung 14 demonstriert das Ergebnis der Immunpräzipitation.

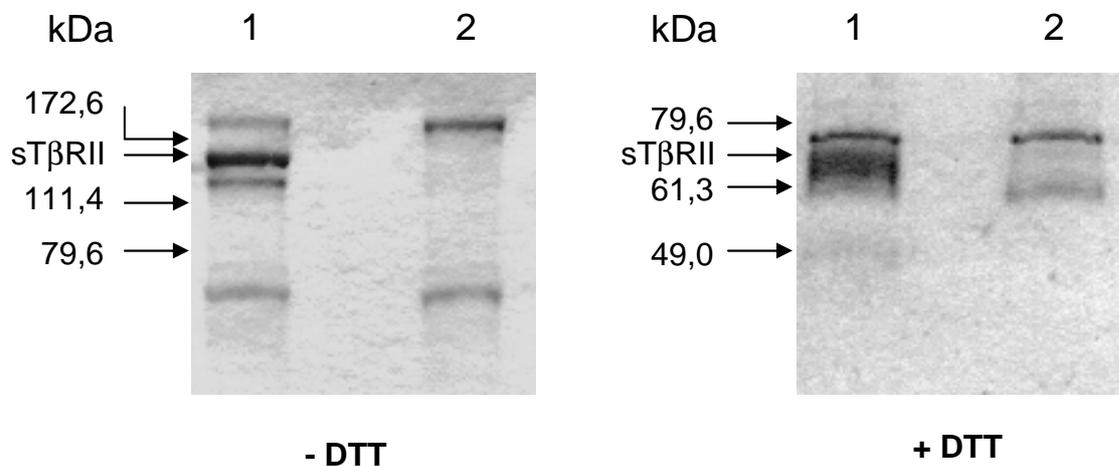


Abb. 14: **Immunpräzipitation zur Darstellung des chimären Fusionsproteins sTβRII-F_c(IgG₁)**
Zellüberstände von Cos7 - Zellen, die mit Ad5-CMV-sTβRII (1) oder Ad5-CMV-EGFP (2) infiziert wurden, wurden mit Protein G präzipitiert. Die Präzipitate wurden unter nichtreduzierenden (-DTT) und reduzierenden (+DTT) Bedingungen wie bei einem Western Blot aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Blue gefärbt. sTβRII = löslicher TGF-β Typ II-Rezeptor.

4.2.4 Nachweis der biologischen Aktivität von Ad5-CMV-sTβRII

Um die biologische Aktivität des exprimierten, löslichen TGF-β Typ II Rezeptors nachzuweisen, wurde ein Zellproliferationsassay mit beiden erstellten adenoviralen Konstrukten von HSC/MFB durchgeführt. Dabei ist zu erwarten, dass es durch Antagonisierung von TGF-β als antiproliferatives Zytokin durch Infektion von HSC mit Ad5-CMV-sTβRII zu einer Proliferationssteigerung kommt. Dazu wurden HSC für 11 Tage in 10 %igem FKS in Kultur gehalten. Für weitere 2 Tage erfolgte die Kultur unter denselben Bedingungen in 12 well Platten ($4,5 \times 10^5$ Zellen/well). Anschließend wurde das Medium durch 5 %iges hitzeinaktiviertes FKS ersetzt, die Zellen mit den adenoviralen Konstrukten Ad5-CMV-GFP und Ad5-CMV-sTβRII infiziert und für 24 Std einem [³H]-Thymidin-Label unterzogen. Die hierbei inkorporierte Radioaktivität konnte nun gemessen werden. Nicht infizierte Zellen dienten der Kontrolle.

Das Ergebnis des Proliferationsassays macht sichtbar, dass die [³H]-Thymidin Inkorporation bei den mit dem Konstrukt Ad5-CMV-sTβRII infizierten HSC/MFB signifikant ist, wohingegen der wachstumstimulierende Effekt des Konstruktes Ad5-CMV-GFP nur moderat ist. In Abbildung 15 ist die Auswertung des Proliferationsassays dargestellt.

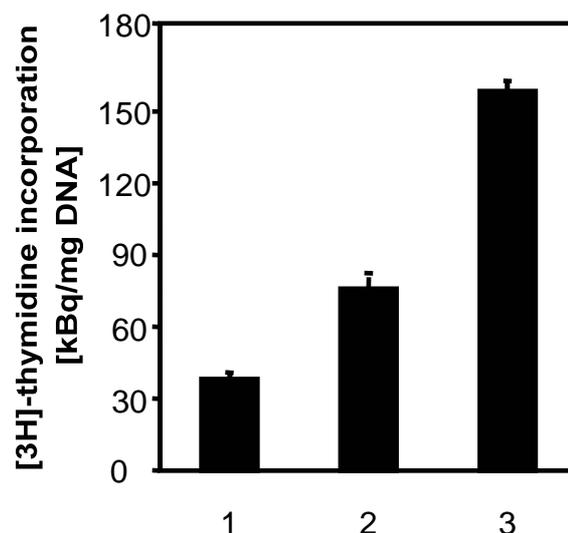


Abb. 15: **Stimulation von HSC/MFB mit Ad5-CMV-sTβRII**

HSC wurden bei 10 %igem FKS 11 Tage in Kultur gehalten, dann für weitere 2 Tage auf 12 well Platten unter denselben Bedingungen umgesetzt. Daraufhin wurde das Medium auf 5 %iges FKS reduziert, die Zellen mit den adenoviralen Konstrukten infiziert und für 24 Std einem [³H]-Thymidin-Label unterzogen und die eingebaute Radioaktivität gemessen.

1 = nicht infizierte Zellen, 2 = infizierte Zellen mit Ad5-CMV-GFP, 3 = infizierte Zellen mit Ad5-CMV-sTβRII

5 Diskussion

Unabhängig von der Ätiologie einer Lebererkrankung stellt die Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) den Schlüsselprozess für die Entwicklung einer Leberfibrose dar. Diese Aktivierung äußert sich in einem Übergang von HSC zu Myofibroblasten (MFB), die durch Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix gekennzeichnet ist. Der Erwerb eines kontraktiven Phänotyps und der Verlust von Vitamin A-Speichern sind weitere Kennzeichen dieses auch Transdifferenzierung genannten Vorgangs (Friedman, 1998).

Viele dieser morphologischen und metabolischen Veränderungen, die mit der Aktivierung von HSC *in vivo* zusammenhängen, können auch *in vitro* in der Kultur von HSC auf Plastikoberflächen beobachtet werden. Hier transdifferenzieren nach erfolgter Trypsinisierung nach einigen Tagen HSC zu MFB. Dieses Modell für die Entwicklung einer Leberfibrose liegt den durchgeführten Untersuchungen zugrunde.

Da die Leber wichtige metabolische Funktionen für den Organismus besitzt, haben viele vererbte als auch erworbene Krankheiten ihre pathophysiologischen Ursachen innerhalb der Leber, die damit ein wichtiges Ziel für gentherapeutische Verfahren darstellt (Ghosh *et al.*, 2000).

Dabei sind die MFB die hauptsächlichen Zielzellen für antifibrotisch wirksame Konstrukte, stellen sie doch die primären Produzenten von Kollagen und Proteinen der extrazellulären Matrix im Rahmen der Fibrose dar (Davern und Bissell, 2001).

In dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt die adenovirale Expressionstechnologie im hiesigen Labor etabliert. Der Gebrauch von adenoviralen Vektoren ist in vielen Bereichen anzutreffen, neben dem Einsatz bei Lebererkrankungen werden sie auch in der Erforschung von Therapiemöglichkeiten bei Gefäßerkrankungen und Malignomen eingesetzt (Alemany *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1997). Die Vorteile des adenoviralen Systems wurden bereits in 1.5 erläutert. Hervorzuheben ist noch einmal die relativ einfache Erstellung dieser rekombinanten, replikationsdefekten Adenoviren durch homologe Rekombination (He *et al.*, 1998).

Obwohl sich Adenoviren nur transient in den infizierten Zellen aufhalten, werden sie aber auch deshalb zur Gentherapie eingesetzt, da sie sowohl ruhende wie auch sich teilende Zellen infizieren können (Günzburg und Salmons, 1997).

Um die Effizienz des hier durchgeführten adenoviralen Gentransfers für einen Einsatz in hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten zu beurteilen, wurde in

einem ersten Schritt ein Reporterplasmid konstruiert, dass das EGFP unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors exprimiert (Thomsen *et al.*, 1984). Die Infektion von HSC und MFB mit Ad5-CMV-EGFP zeigte, dass nach zwei Tagen 100 % der HSC und MFB positiv für das EGFP waren und somit der Gebrauch von adenoviralen Vektoren effizient für das Einbringen von Genen in diese Zellen sind (Weiskirchen *et al.*, 2000).

Infizierte HSC und MFB exprimierten das EGFP um etwa weitere zwei Wochen. Das Nachlassen der Genexpression über diesen Zeitraum hinaus basiert wahrscheinlich auf dem Verlust des episomal vorliegenden Transgenes, da es nicht in das Wirtsgenom integriert wird und mit steigender Anzahl an Zellteilungen verloren geht (Ghosh *et al.*, 2000). Verantwortlich für die morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen in einem späteren Stadium ist die mögliche Zytotoxizität des EGFP oder auch die Überproduktion viraler Proteine (Liu *et al.*, 1999).

Die oben beschriebene transiente Natur der adenoviralen Infektion erfordert bei therapeutischem Einsatz an einem Patienten allerdings eine häufige Wiederholung der Anwendungen, wodurch Probleme mit dem Immunsystem auftreten können. Zu nennen wären hier wegen der erforderlichen hohen Dosierungen Entzündungsreaktionen sowie die gegen Adenoviren gerichtete Produktion von Antikörpern (Günzburg und Salmons, 1997).

Die in dieser Arbeit beschriebene adenovirale Expressionstechnik eignet sich somit zwar zur Konstruktion von rekombinanten, replikationsdefekten Adenoviren und die Gentransfereffizienz dieses Systems liegt bei 100 %, allerdings müssen in Zukunft zur Vermeidung von immunologischen Problemen bei Anwendung am Patienten *in vivo* weitere Voraussetzungen und eventuelle Änderungen bezüglich des adenoviralen Vektors getroffen werden.

Da das adenovirale System die Möglichkeit bietet, bei der Erstellung dieser Viren gewünschte Proteine gemäß einer in den *shuttle*-Vektor einklonierten Proteinkassette zu exprimieren, wurde in einem zweiten Schritt nun das als Reporter gen dienende EGFP durch ein Protein mit antifibrotischem Potential ersetzt, wobei der CMV-Promotor beibehalten wurde. Dieses Protein ist ein löslicher, dominant-negativer TGF- β Typ II - Rezeptor, der wegen des Fehlens der intrazellulären Serin/Threonin Kinase - Domäne auch als trunkiert bezeichnet wird. Stattdessen ist er als chimäres Protein mit der F_c-Domäne des humanen Immunglobulin IgG fusioniert. Diese F_c-Region ist notwendig zur Dimerisierung des Rezeptors.

Von den drei vorhandenen Rezeptortypen Typ I (T β RI), Typ II (T β RII) und Typ III (T β RIII) kann nur der TGF- β Typ II-Rezeptor den Liganden TGF- β frei binden, wohingegen der Typ I-Rezeptor erst den Komplex T β RII-Ligand erkennen kann (Wrana *et al.*, 1994).

Durch die Expression eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors soll derart in die TGF-Signalkaskade antagonistisch interveniert werden, dass durch eine Blockade des TGF- β - Signalweges der fortschreitende Verlauf einer Fibrose verhindert werden kann. Dabei bindet dieser *in vitro* in das Zellmedium sezernierte lösliche Rezeptor freies TGF- β , so dass TGF- β selbst nicht mehr an den Typ II-Rezeptor der Zellmembranoberfläche binden und somit die Signalkaskade einleiten kann.

Untersuchungen mit einem ähnlichen Konstrukt ergaben, dass durch adenoviralen Gentransfer die anschließende Expression eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors nicht nur die Entwicklung der Leberfibrose bei Ratten verhindern kann, sondern dass auch Hornhauttrübungen, zerebrale Ischämien und die Auswirkungen von TGF- β in den Zellen der Gefäßwand positiv durch die Blockade des TGF- β beeinflusst werden können (George *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 1999, Ruocco *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2000; Ueno *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des adenoviralen Systems dieses Fusionsprotein konstruiert und der Nachweis über seine Expression erbracht.

Zum Nachweis der Transkriptionsfähigkeit dieses Konstruktes wurden CFSC mit dem Konstrukt Ad5-CMV-sT β RII infiziert. CFSC sind eine myofibroblastenähnliche Zelllinie, die aus einer CCl₄-induzierten Leberzirrhose der Ratte etabliert wurde (Greenwel *et al.*, 1991a; Greenwel *et al.*, 1993b).

Die Northern Blot - Analyse erbrachte den Beweis für die Transkription dieses Proteins: Der erwartete Umfang der reifen mRNA für das Fusionsprotein sT β RII-F_c(IgG₁) besitzt eine Länge von ungefähr 2380 nt. Die noch nicht gespleisste mRNA enthält allerdings noch ein Intron von ca. 370 nt und erreicht somit eine Länge von etwa 2750 nt.

Zum Erweis der Translationsfähigkeit wurden erneut CFSC mit Ad5-CMV-sT β RII infiziert.

Das Ergebnis der Western Blot - Analyse legt dar, dass das Fusionsprotein sT β RII-F_c(IgG₁) von den infizierten CFSC als Dimer mit einem Molekulargewicht von 130 kDa sezerniert wird, zumal dies mit der Tatsache übereinstimmt, dass die erwartete

Struktur die eines chimären Proteins ist. Als Monomer liegt das Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa vor.

Dieses chimäre Fusionsprotein besitzt nämlich in der *hinge*-Region des F_c -Teils zwei Cysteinreste, die jeweils Disulfidbrücken zwischen den beiden $sT\beta RII-F_c(IgG_1)$ – Molekülen bilden, nämlich so, wie es die Struktur eines IgG-Moleküls vorgibt.

Ueno *et al.* ermittelten für einen ähnlichen löslichen Rezeptor ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa (2000).

Die Immunpräzipitation diente dem Nachweis des gewünschte Fusionsproteins neben den anderen im Zellüberstand vorkommenden Proteinen und dem Nachweis einer antikörperähnlichen Struktur. Sie nutzt dabei die spezifische Affinität zwischen dem F_c -Teil des IgG und dem Protein G.

Verwendet wurden dazu Cos7-Zellen. Ihr Vorteil liegt neben einer hohen Amplifikationsrate von in die Zellen infizierten DNA-Konstrukten auch in ihrer hohen Expressionsrate, wobei sie ebenso große Mengen von Fremd-DNA aufnehmen können. Cos7-Zellen entstammen dem Nierengewebe der grünen Meerkatze.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen (- DTT) zeigt sich das präzipitierte Fusionsprotein mit einer Molekularmasse von ungefähr 130 - 150 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen (+ DTT) ist das Protein mit einer Molekularmasse von ca. 68 kDa nachzuweisen.

Der Nachweis dieser Molekularmassen für das Fusionsprotein $sT\beta RII-F_c(IgG_1)$ wurde auch in Untersuchungen von Komesli *et al.* (1998) erbracht, und zwar lag unter nicht reduzierenden Bedingungen das Molekulargewicht bei 90 - 130 kDa, unter reduzierenden Bedingungen bei 45-65 kDa. Die in dieser Arbeit etwas höher ermittelten Proteingrößen lassen sich durch Glykosilierungseffekte des Proteins erklären.

Diese Ergebnisse machen auch hier deutlich, dass das Fusionsprotein $sT\beta RII-F_c(IgG_1)$ von den infizierten Cos7-Zellen als Dimer in antikörperähnlicher Struktur sezerniert wird. Die Disulfidbrücken des chimären Fusionsproteins können unter reduzierenden Bedingungen, also der Zugabe von DTT in den Proben, zerstört werden, so dass statt eines Dimers zwei Monomere vorliegen.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation stimmen dabei mit den Ergebnissen zum Nachweis der Translationsfähigkeit überein.

Der sowohl bei dem Reporterkonstrukt Ad5-CMV-EGFP als auch bei dem Konstrukt mit antifibrotischen Potential (Ad5-CMV- $sT\beta RII$) genutzte CMV-Promotor ist

konstitutiv aktiv und exprimiert die Gene universal. In dieser Arbeit ließen sich mit den jeweiligen Konstrukten HSC, MFB, CFSC und Cos7-Zellen infizieren. In Hinblick für einen möglichen Einsatz bei der Behandlung chronischer Lebererkrankungen bedeutet das, dass sowohl die ruhenden HSC als auch die sezernierenden MFB die jeweiligen Gene exprimieren. Für die therapeutische Nutzung wäre es allerdings wünschenswert, dass antifibrotisch wirksame Proteine nur in der jeweils gewünschten Zielzelle synthetisiert werden. Das Problem ließe sich durch den Einsatz von leberspezifischen Promotoren anstelle des CMV-Promotors umgehen. Dabei gilt besonders dem TIMP-Promotor Aufmerksamkeit, der nur in Myofibroblasten, nicht aber in hepatischen Sternzellen die antifibrotischen Proteine aktiv exprimieren könnte (Bahr *et al.*, 1999). Ein zweiter Ansatz wäre die Wahl eines geeigneten Promotors, dessen Gene die Transdifferenzierung von HSC zu MFB verhindern können, der also primär in HSC die Konstrukte exprimiert.

Neben der Wahl eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors zur antifibrotischen Therapie ist auch der Gebrauch der *antisense*-Technik mit antifibrotisch wirkenden Konstrukten erwähnenswert. Ihr liegt die Synthese einer komplementären mRNA oder DNA zugrunde, die das primäre RNA-Transkript komplexiert, so dass es zu einer Behinderung der Prozessierung, der Stabilität oder der Translation kommen kann (Arias *et al.*; 2002; Mao *et al.*, 1995).

Neuere Untersuchungen haben allerdings auch deutlich gemacht, dass der Eingriff in die geregelte Signalkaskade des TGF- β auch Gefahren birgt. TGF- β spielt nicht nur eine wichtige Rolle für die Entwicklung maligner Prozesse, in deren späteren Stadien das Zytokin aktiv von den Tumorzellen sezerniert wird; auch feinste Änderungen oder Manipulationen im Ablauf der TGF- β Signalkaskade können zur Entwicklung von Krebs beitragen (de Caestecker *et al.*, 2000; Pasche, 2001).

Rowland-Goldsmith *et al.* (2001) haben jedoch auch beschrieben, dass der Einsatz eines löslichen TGF- β Typ II-Rezeptors *in vitro* dennoch in der Lage ist, das Fortschreiten eines Pankreaskarzinoms durch Blockade des TGF- β -Signalweges aufzuhalten.

Die Etablierung und Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionstechnik erweisen sich somit als eine Methode, mit der gewünschte Fremdgene in die verantwortlichen Zielzellen für die Entwicklung einer Leberfibrose, nämlich HSC und MFB, eingebracht werden können, insbesondere dann, wenn hohe Gentransferraten erwünscht sind.

Die Expression eines Proteins mit potentieller antifibrotischer Wirkung wie der lösliche TGF- β Typ II-Rezeptor lässt sich mit den gängigen Methoden der Molekularbiologie nachweisen. Hier stehen in Zukunft noch die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der Effekte dieses löslichen Rezeptors auf die HSC respektive MFB aus, besonders die Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Bestandteile der extrazellulären Matrix.

Ausgehend von den beschriebenen Untersuchungen werden derzeit im hiesigen Labor experimentelle Arbeiten durchgeführt, bei denen der konstitutiv aktive CMV-Promotor durch die regulatorischen Einheiten des TIMP-Promotors ausgetauscht wird.

Ferner finden zur Zeit experimentelle Arbeiten über die Reinigung des Fusionsproteins sT β RII - F_c(IgG₁) statt.

Die *in vivo* Überprüfung der Infizierbarkeit und der möglichen antifibrotischen Wirkung der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte, insbesondere Ad5-CMV-sT β RII, wird ebenfalls im hiesigen Labor mit dem Modellsystem einer durch Gallengangsligatur induzierten Leberfibrose der Ratte untersucht.

6 Zusammenfassung

Die Leberfibrose ist zurückzuführen auf ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix unterschiedlichster Pathogenese wie Virushepatitiden, Alkoholabusus oder Stoffwechselerkrankungen.

Dem Zytokin TGF- β kommt dabei eine entscheidende Rolle zu, indem es bei Leberschädigung in die transkriptionelle Regulation von Genen eingreift, die für die Produktion und für den Abbau von Matrixproteinen verantwortlich sind.

Ein Modellsystem zur *in vitro* Untersuchung der Leberfibrose ist die spontane Aktivierung von kultivierten hepatischen Sternzellen (HSC) auf einer Plastikoberfläche zu Myofibroblasten (MFB), den Syntheszellen der Bindegewebskomponenten. Dieser Vorgang der Transdifferenzierung stellt das Schlüsselereignis für die Entwicklung der Leberfibrose dar.

Für die Unterbindung einer fortschreitenden Entwicklung der Leberfibrose ist es wünschenswert, gezielt in die Genexpression der HSC und MFB eingreifen zu können.

Durch den Einsatz der adenoviralen Expressionstechnik konnte bewiesen werden, dass heterologe Gene in diese Zellen eingebracht werden können. Dabei wird eine Proteinkassette mittels homologer Rekombination in das um die E1-Region deletierte Genom des Adenovirus Typ 5 gebracht, wobei rekombinante, replikationsdefiziente Adenoviren entstehen. Als Reporterkonstrukt diente das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), das unter transkriptioneller Kontrolle des humanen Cytomegalievirus - Promotors (CMV) in HSC und MFB exprimiert wurde. Beide Zellen waren in Kultur vollständig mit dem adenoviralen Konstrukt infizierbar.

Die morphologische Integrität der Adenoviren erfolgte durch Elektronenmikroskopie.

Um dieses Gentransfersystem nun *in vitro* gegen die Leberfibrose einzusetzen, wurde das Reportergen GFP durch ein Protein mit antifibrotischem Potential ersetzt, ein löslicher TGF- β Typ II-Rezeptor, der mit der F_c-Domäne des humanen Immunglobulin IgG fusioniert vorliegt. Der CMV - Promotor wurde beibehalten.

Durch Expression dieses Rezeptors soll die Signalkaskade von TGF- β unterbrochen werden, so dass die weitere fibrotische Wirkung von TGF- β aufgehoben wird.

Der Nachweis der Expression dieses chimären Fusionsproteins wurde sowohl auf Transkriptions- und Translationsebene als auch durch Immunpräzipitation erbracht, die biologische Aktivität durch einen Proliferationsassay bestimmt.

7 Literaturverzeichnis

1. Alemany R, Gomez-Manzano C, Balague C, Yung WKA, Curiel DT, Kyritsis AP, Fueyo J: Gene Therapy for gliomas; Molecular targets, adenoviral vectors and oncolytic adenoviruses. *Experimental Cell Research* 1999, **252**: 1-12
2. Arias M, Lahme B, van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R: Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of the TGF- β 1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ* 2002, **13**(6): 265-273
3. Bahr MJ, Vincent KJ, Arthur MJP, Fowler AW, Smart DE, Wright MC, Clark IM, Benyon RC, Iredale JP, Mann DA: Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotor in culture-activated rat hepatic stellate cells: Regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. *Hepatology* 1999, **29**: 839-848
4. Benezra M, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-Shavit R: Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 1993, **81**: 3324-3331
5. Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL: An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**: 8802-8806
6. Birnboim HC & Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 1979, **7**: 1513-1523
7. Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ: Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* 1987, **79**: 801-812
8. Blum HE: Molekulare Revolution. *DMW Zukunft der Medizin* 1999, **124**: 1550-1552
9. Border W & Noble N: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 1994, **331**: 1286-1292
10. Border W & Noble N: TGF- β . *Scientific American Science & Medicine* 1995: 2-11
11. Burger KJ: Gentherapie - die neue kausale Behandlungsmöglichkeit. *Sandorama Novartis* 1996, **3**: 1-10
12. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB: Role of transforming growth factor-beta signalling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**: 1388-1402

13. Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P: Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996, **110**: 1127-1136
14. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979, **18**: 5294-5299
15. Cristiano RJ, Xu B, Nguyen D, Schumacher G, Kataoka M, Spitz FR, Roth JA: Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer Detect Prev* 1998, **22**: 445-454
16. Davern TJ, Bissell DM: The feasibility of antifibrotic gene therapy. In: Gressner AM, Heinrich PC, Matern S (Hrsg.): Progress in gastroenterology and hepatology: Cytokines in liver injury and repair. *Kluwer Academic Publications*, Dordrecht, The Netherlands 2002: 317-332
17. Derynck R, Feng XH: TGF- β receptor signalling. *Biochim Biophys Acta* 1997, **1333**: F105-F150
18. Doerfler W: A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1288**: F79-F99
19. Drazan KE, Csete ME, Da Shen X, Bullington D, Cottle G, Busuttill RW, Shaked A: Hepatic function is preserved following liver directed, adenovirus-mediated gene transfer. *J Surg Res* 1995, **59**: 299-304
20. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Vergilio JA, Nicholson AC: Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1993, **268**: 11951-11958
21. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1984, **137**: 266-267
22. Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000, **275**: 2247-2250
23. Friedman SL: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *New Engl J Med* 1993, **328**: 1828-1835
24. Friedman SL: Symposium: Update on Hepatic Fibrosis: Cellular Networks in Hepatic Fibrosis. *Digestion* 1998, **59**: 368-371
25. Friedman SL: The Virtuosity of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology* 1999, **117**: 1244-1246
26. Friedman SL, Yamasaki G, Wong L: Modulation of transforming growth factor- β receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. *J Biol Chem* 1994, **269**: 10551-10558

27. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM: In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor β type II receptor: A potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**: 12719-12724
28. Ghosh SS, Takahashi M, Thummala NR, Parashar B, Chowdhury NR, Chowdhury JR: Liver-directed gene therapy: promises, problems and prospects at the turn of the century. *Journal of Hepatology* 2000, **32**: 238-252
29. Günzburg WH & Salmons B: Gentransfer in Säugetierzellen. *Spektrum Akademischer Verlag* 1997, 85-114
30. Graham FL, Smiley J, Rusell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977, **36**: 59-74
31. Graham FL & van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973, **52**: 456-467
32. Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M: Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest* 1991, **65**: 644-653
33. Greenwel P, Rubin J, Schwartz M, Hertzberg EL, Rojkind M: Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* 1993, **69**:210-216
34. Gressner AM: Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut* 1994, **35**: 1331-1333
35. Gressner AM & Bachem MG: Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 1995, **56**: 335-346
36. Gressner AM: Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991, **29**: 293-311
37. Gressner AM: Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996, **54**: S39-S45
38. Gressner AM, Zerbe O: Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. *J Hepatol* 1987, **5**: 299-310
39. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S: Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Frontiers in Biosciences – special issue. Hepatic fibrosis and targeting therapy* 2002, **7**: d793-807

40. Hanahan D: Techniques for transformation of E. coli .DNA cloning **Vol.I-a** practical approach. *IRL Press Oxford* 1985: 109-135
41. Hayat MA: Principles and Techniques of Electron Microscopy: 5 Negative Staining. *Biological Applications* 1989, **3**: 328-346
42. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**: 2509-2514
43. Heldin CH, Miyazono K, ten Diike P: TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997, **390**: 465-471
44. Hill CS: The Smads. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**: 1249-1254
45. Kim S, Lin H, Barr E, Chu L, Leiden JM, Parmacek MS: Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells *in vivo*. *J Clin Invest* 1997, **100**: 1006-1014
46. Knook DL ,SeffelaarAM, de Leeuw AM: Fat-storing cells of the rat liver.Their isolation and purification. *Exp Cell Res* 1982, **139**: 468-471
47. Komesli S, Vivien D, Dutartre P: Chimeric extracellular domain of type II transforming growth factor (TGF)- β receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF- β antagonist. *Eur J Biochem* 1998, **254**: 505-513
48. Laiho M, Keski-Oja J: Transforming growth factors-beta as regulators of cellular growth and phenotype. *Crit Rev Oncog* 1992, **3**: 1-26
49. Liu HS, Jan MS, Choub CK, Chen PH, Ke NJ: Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **260**: 712-717
50. Louis N, Evelegh C, Graham FL: Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 1997, **233**: 423-429
51. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL: Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990, **110**: 1361-1367
52. Lyons RM, Moses HL: Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990, **187**: 467-473
53. Mao JR, Shimida M, Inouye S, Inouye M: Gene regulation by antisense DNA produced *in vivo*. *J Biol Chem* 1995, **270**: 19684-19687
54. Massagué J: TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998, **67**: 753-791
55. Massagué J: The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990, **6**: 597-641

56. Massagué J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FMB: Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 1992, **12**: 81-103
57. Matsuoka M & Tsukamoto H: Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990, **11**: 599-605
58. McCartney FN & Wahl SM: Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* 1994, **55**: 401-409
59. McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL: A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 1988, **163**: 614-617
60. McGuire RF, Bissell DM, Boyles J, Roll FJ: Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 1992, **15**: 989-997
61. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH: Latent high molecular complex of transforming growth factor-beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988, **263**: 6407-6415
62. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border W: Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor β 1. *Kidney Int* 1992, **41**: 1213-1221
63. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H: Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000, **32**: 247-255
64. Pasche B: Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001, **186**: 153-168
65. Polyak K: Negative regulation of cell growth by TGF- β . *Biochim Biophys Acta* 1996, **1242**: 185-199
66. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H: Blockage of type β transforming growth factor signalling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**: 2345-2349
67. Roth J & Christiano R: Gene therapy for cancer. What have we done and where are we going? Review. *J Natl Cancer Inst* 1997, **89**: 21-39
68. Rowland-Goldsmith MA, Maruyama H, Kusama T, Ralli S, Korc M: Soluble type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor inhibits TGF-beta signalling in COLO-357 pancreatic cancer cells in vitro and attenuates tumor formation. *Clin Cancer Res* 2001, **7**: 2931-2940

69. Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazaviel L, Komesli S, Yablonsky F, Roussel S, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A: A transforming growth factor- β antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cer Blood Flow Met* 1999, **19**: 1345-1353
70. Sakamoto T, Ueno H, Sonoda K, Hisatomi T, Shimizu K, Ohashi H, Inomata H: Blockade of TGF-beta by in vivo gene transfer of a soluble TGF-beta type II receptor in the muscle inhibits corneal opacification, edema and angiogenesis. *Gene Ther* 2000, **7**: 1915-1924
71. Santos RM, Norton P, Degli Esposti S, Zern MA: TGF-beta isoforms in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol* 1998, **33**: 383-389
72. Schaffner F & Popper H: Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963, **44**: 239-242
73. Schultz-Cherry S & Murphy-Ullrich JE: Trombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 1993, **22**: 923-932
74. Stefanovic B, Hellerbrand C, Brenner DA: Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen α 1(I) mRNA. *Mol Cell Biol* 1999, **19**: 4334-4342
75. Taipale J, Koli K, Keski-Oja J: Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol Chem* 1992, **267**: 25378-25384
76. Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J: Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 1995, **270**: 4689-4696
77. Thomson DR, Stenberg RM, Goins W, Stinski MF: Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, **81**: 659-663
78. Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H: A soluble transforming growth factor β receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000, **11**: 33-42
79. Wahl S: Transforming growth factor- β : the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994, **180**: 1587-1590
80. Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB: Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 1988, **263**: 7646-7654

81. Weiskirchen R, Abriss B, Arias M, Kneifel J, van de Leur E, Weiskirchen S, Gressner AM: Experimental approaches to antifibrotic strategies using gene transfer. In: Gressner AM, Heinrich PC, Matern S (Hrsg.): Progress in gastroenterology and hepatology: Cytokines in liver injury and repair. *Kluwer Academic Publications*, Dordrecht, The Netherlands 2002: 333-351
82. Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Gressner AM: Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biol* 2000, **1**:4, 1-9
83. Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR: Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993, **73**: 309-319
84. Wivel NA & Wilson JM: Methods of gene delivery. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998, **12**: 483-501
85. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Denella J, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J: TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992, **71**: 1003-1014
86. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994, **370**: 341-347
87. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985, **33**: 103-109
88. Yamamoto H, Ueno H, Ooshima A, Takeshita A: Adenovirus-mediated transfer of a truncated transforming growth factor- β (TGF- β) type II receptor completely and specifically abolishes diverse signaling by TGF- β in vascular wall cells in primary culture. *J Biol Chem* 1996, **271**: 16253-16259
89. Yingling JM, Wang XF, Bassing CH: Signaling by the transforming growth factor-beta receptors. *Biochim Biophys Acta* 1995, **1242**: 115-136
90. Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC: Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000, **105**: 741-748
91. Zerbe O & Gressner AM: Proliferation of fat storing cells is stimulated by secretions of Kupffer cells from normal and injured liver. *Exp Mol Pathol* 1988, **49**: 87-101

8 Anhang

Publikationen

Weiskirchen R, Abriss B, Arias M, Kneifel J, van de Leur E, Weiskirchen S, Gressner AM: **Experimental approaches to antifibrotic strategies using gene transfer.** In: Gressner AM, Heinrich PC, Matern S (Hrsg.): Progress in gastroenterology and hepatology: Cytokines in liver injury and repair. *Kluwer Academic Publications*, Dordrecht, The Netherlands 2002: 333-351

Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Gressner AM: **Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts.** *BMC Cell Biol* 2000, 1:4, 1-9

Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Gressner AM: **Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts.** *Abstract EASL Single Topic Conference*, Florence 2001: 66

Arias M, Kneifel J, van de Leur E, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R: **Antifibrotic therapy by adenoviral expression of an antisense TGF- β 1 mRNA and a soluble type II TGF- β receptor construct in cultured rat hepatic stellate cells** *Abstract Falk Symposium 125*, Hannover 2001: 8

Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Hollweg HG, Gressner AM: **Vergleichende Studie zum Gentransfer in primäre hepatische Sternzellen und Myofibroblasten der Ratte** *Abstract Z Gastroenterol* 2001, 39: 91

Die Gesamtsequenz des 8,07 kbp großen Plasmids p Δ E1sp1A-CMV-EGFP wurde in die GenBank unter der Accession-Nr. AF288620 eingetragen.

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. (RCH) A. M. Gressner für die Bereitstellung und Überlassung des Themas dieser Arbeit,

Herrn PD Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen für die Betreuung und Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit, für seine Ratschläge und seine Anstöße, ohne die ich diese Arbeit wohl nicht hätte zustande bringen können,

Mónica Arias-Kuhn und Bärbel Abriss für die vielen, vielen Hilfen im Laboralltag

sowie Stephan Franken und Stefanie Muckel für ihre Unterstützung bei den üblichen Computerproblemen (und davon gab es einige...!)

Lebenslauf:

Name: Jens Kneifel
Geburtsdatum; 30.11.1976
Geburtsort: Eschweiler
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1983 - 1987 Katholische Grundschule Ratheim
1987 - 1996 Gymnasium Hückelhoven, Abitur 1996

Zivildienst: 1996 - 1997 Alten-und Pflegeheim „Haus Berg“, Brachelen

Studium: 1997 - 2003 Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen
08/1999 Ärztliche Vorprüfung
08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

03/2000 *Institut für klinische Chemie u. Pathobiochemie - Zentrallaboratorium, Universitätsklinikum der RWTH Aachen*
03/2001 *Innere Medizin, St. Franziskus - Krankenhaus, Aachen*
08/2001 *Dermatologie, Universitätsklinikum der RWTH Aachen*
09/2001 *Orthopädie, Universitätsklinikum der RWTH Aachen*
03/2002 *Transplantationschirurgie, Semmelweis Universität Budapest, Ungarn*

Praktisches Jahr:

10/02 - 02/03 *Innere Medizin, St. Antonius - Hospital, Eschweiler*
02/03 - 06/03 *Chirurgie, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Spanien*
06/03 - 09/03 *Anästhesie, St. Antonius - Hospital, Eschweiler*