

**Untersuchungen zur Steigerung der
rekombinanten Expression von FVIII auf transkriptioneller
und posttranskriptioneller Ebene**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe -Universität
in Frankfurt am Main

von
Stefan Heinz
aus Konstanz

Frankfurt am Main, 2007
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe -Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek
Prof. Dr. E. Seifried

Datum der Disputation:

Widmung

Ich widme diese Dissertation meiner liebevollen Frau und meinem kleinen süßen Töchterchen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Faktor VIII – Funktion in der Blutgerinnung.....	1
1.2	Hämophilie A	3
1.2.1	Klinik	3
1.2.2	Verlaufsformen.....	3
1.2.3	Therapie.....	4
1.2.4	Nebenwirkungen der Therapie	4
1.3	Struktur, Funktion und Lebenszyklus von FVIII	6
1.3.1	Das FVIII-Gen.....	6
1.3.2	Struktur des FVIII-Proteins	6
1.3.3	Biosynthese und Prozessierung von FVIII.....	7
1.3.4	Wirkungsweise von FVIII als Kofaktor	11
1.4	Rekombinante Expression von FVIII	12
1.4.1	Probleme bei der rekombinanten Herstellung von FVIII.....	12
1.4.2	Lösungsansätze für die Probleme bei der rekombinanten Expression	13
1.5	Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der Hämophilie A	15
1.5.1	Gentherapie-Verfahren	15
1.5.2	Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen der Gentherapie für Hämophilie A.....	17
1.5.3	Genstransfer in HSC	19
1.5.4	Lentivirale Vektoren	20
1.5.5	Nebenwirkungen von retroviralen Vektoren beim Einsatz in der Gentherapie und Ansätze zu deren Vermeidung	21
1.5.6	Physiologische Promotoren für die Expression von FVIII	24
1.6	Zielsetzung	26
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.2	Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten	28
2.1.3	Zellkulturreagenzien, Medien und Zusätze.....	30
2.1.4	Antikörper.....	31
2.1.5	Bakterienstämme	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Allgemeines zur Klonierung	31
2.2.2	Klonierung der FVIII-GFP-Konstrukte.....	32
2.2.3	Klonierung der FXIIIA-5'Untranslatierten Region (5'UTR).....	34
2.2.4	Klonierung des FXIIIA-enhancer.....	34
2.2.5	Klonierung des chimären β -Globin/IgG-Introns	35
2.2.6	Klonierung der physiologischen Promotoren in lentivirale Vektoren	35
2.2.7	Klonierung der physiologischen Promotoren in plasmidbasierte Vektoren	36
2.2.8	Zellkultur	37

2.2.8.1	Isolation, Kultur und Transfektion von CD14+ Monozyten.....	39
2.2.9	Produktion lentiviraler Partikel	39
2.2.10	Titerbestimmung	40
2.2.11	Transduktion und FACS Analyse von 293, HepG2, Hepa1-6 und SK-Hep Zellen.....	40
2.2.12	Detektion der EGFP-Expression in transduzierten Zellen	41
2.2.13	Transfektion	41
2.2.14	Blockierung der Expression von Transportproteinen mittels RNA-Interferenz.....	41
2.2.15	Detektion von FVIII auf Proteinebene.....	42
2.2.16	Konzentration von FVIII-Kulturüberstand durch Ultrafiltration	42
2.2.17	Quantifizierung von FVIII:C mit Einstufen-Gerinnungstest.....	43
2.2.18	Quantifizierung von FVIII:C mit chromogenem Assay.....	43
2.2.19	FVIII:Ag-ELISA.....	44
2.2.20	FVIII Detektion mittels FVIII-Westernblot-Analyse	44
2.2.21	FVIII-GFP Detektion mittels GFP-Westernblot-Analyse	45
2.2.22	Immunfluoreszenzanalysen von fixierten Zellen.....	45
2.2.23	Lebendzell-Fluoreszenzanalysen	46
2.2.24	RNA- und DNA-Quantifizierung mittels Realtime Analyse	46
2.2.25	Quantifizierung der integrierten Vektor DNA mittels genomischer Realtime-PCR.....	46
2.2.26	SYBR-Green Realtime PCR.....	47
2.2.27	Simulation des FVIII-GFP-Moleküls.....	47
2.2.28	Immortalisierung von Endothelzellen.....	48
2.2.29	Kultivierung und Transduktion von HUVEC und Endothelprogenitorzellen	48
2.2.30	Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP)	49
2.2.31	Statistik	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Untersuchungen zum Trafficking von FVIII	50
3.1.1	Charakterisierung der für die Analyse des FVIII-Traffickings verwendeten FVIII-GFP Fusionsproteine	50
3.1.1.1	ImmunoFluoreszenzaufnahmen von FVIII-GFP transfizierten HEK293T Zellen	50
3.1.1.2	Vergleich der FVIII-Aktivität zwischen FVIII-GFP-Fusionsproteinen und unfusionierten FVIII-Varianten	51
3.1.1.3	GFP fusioniertes FVIII wird intrazellulär prozessiert.	54
3.1.1.4	Simulation der Struktur von FVIII-GFP.....	55
3.1.1.5	Mikroskopische Untersuchungen zum Vergleich BDD und FL Trafficking	56
3.1.2	Analyse des intrazellulären Trafficking von FVIII-GFP in lebenden Zellen	58
3.2	Einfluss der Inhibition verschiedener am Transport von FVIII beteiligter Proteine auf die Sekretion von FVIII	61
3.2.1	Blockierung der Expression von Transportproteinen mittels siRNA.....	61
3.2.2	Rolle von MCFD2 als ER-Exit-Rezeptor zur Verpackung von FVIII.....	63
3.3	Versuch zur Immortalisierung von endothelialen Progenitorzellen durch konstitutive Expression der aktiven Telomerase-Untereinheit.	65

3.4	Optimierung der FVIII-Expressionsvektoren auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene	69
3.4.1	Konstruktion transkriptioneller und posttranskriptioneller Elemente des FXIII A Gens zur Steigerung der hämatopoetischen Expression von FVIII	69
3.4.2	Untersuchung des Effektes eines chimären Introns auf die Expression von FVIII.....	73
3.5	Die Abhängigkeit der FVIII-Expression von physiologischen Promotoren im Vergleich zum viralen CMV-Promotor	74
3.5.1	Untersuchung physiologischer Promotoren im Plasmidsystem zur Expression von FVIII in HEK293T, Hepa1-6 und CHO Zelllinien	74
3.5.2	Analyse der physiologischen Promotoren im lentiviralen System zur Expression von FVIII in HEK293T Zellen und Leberzelllinien.	75
3.5.3	Lentivirale FVIII-kodierende Vektoren führen zu einer effizienten und stabilen Transduktion von Leberzelllinien.	75
3.5.4	FVIII ist stark exprimiert in Leberzelllinien nach FACS Anreicherung.	77
3.5.5	Bewertung der Promotor-Aktivität durch Messung der FVIII Expression im Verhältnis zur Anzahl der integrierten Vektorkopien.	78
4	Diskussion.....	82
4.1	Untersuchungen zum Trafficking von FVIII	82
4.1.1	Verwendung von FVIII-GFP Fusionsproteinen zur Analyse des sekretorischen Wegs von FVIII	82
4.1.2	Einfluss verschiedener Transportproteine auf die Sekretion von FVIII	85
4.2	Endothelprogenitorzellen lassen sich durch hTERT-Transduktion alleine nicht immortalisieren	87
4.3	Optimierung der FVIII-Expressionsvektoren durch Verwendung einer 5'-untranslatierten Region.....	87
4.4	Verwendung von physiologischen Promotoren für Gentherapievektoren	89
4.5	Ausblick	91
	Zusammenfassung.....	93
	Literaturverzeichnis	95
	Publikationen und Kongressbeiträge	110
	Lebenslauf.....	113
	Danksagung	114

1 Einleitung

1.1 Faktor VIII – Funktion in der Blutgerinnung

Faktor VIII (FVIII) ist ein Glykoprotein, das eine wichtige Rolle im intrinsischen Gerinnungsprozess beim Menschen spielt (Kaufman 1992). Es ist essentiell an der Thrombin- bzw. Fibrinbildung und der daraus resultierenden Stabilisierung des Thrombozytenaggregats nach einer Gefäßverletzung beteiligt (Monroe et al. 2006). Faktor VIII ist ein Protein ohne eigene enzymatische Aktivität, und wird auf der Thrombozytenmembran von Thrombin und aktiviertem Faktor IX (FIXa) proteolytisch aktiviert. Aktivierter FVIII (FVIIIa) bewirkt als Hilfsfaktor im Komplex mit FIXa (auch Tenase-Komplex genannt) die Aktivierung von Faktor X (FXa), welcher wiederum zusammen mit aktiviertem Faktor V (FVa) als Prothrombinase-Komplex Prothrombin zu Thrombin umwandelt und damit auch weiteres FVIII aktiviert. FVIII ist also in einer positiven Rückkopplungsreaktion eingebunden, die zur stark vermehrten Bildung von Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche führt. Das gebildete Thrombin wiederum setzt eine Reihe von Prozessen in Gang, die zur Ausbildung eines dauerhaften und stabilen Thrombus und somit Verschlusses der Gefäßverletzung führen (Schenone et al. 2004).

Eine Hauptfunktion von Thrombin ist die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, das daraufhin spontan aggregiert und ein Fasergeflecht zwischen den Thrombozyten und Erythrozyten ausbildet. Weiterhin aktiviert Thrombin Thrombozyten vollständig über Spaltung der Rezeptoren PAR-1 und PAR-4, macht das gebildete Fibrin über TAFI resistent gegen Fibrinolyseprozesse und sorgt über Faktor XIII-Aktivierung für die Quervernetzung des Fibringeflechts. Außerdem ist Thrombin im Thrombus auch wesentlich an Entzündungs- und Wundheilungsprozessen beteiligt, die sich an die primäre Blutstillung anschließen (Walsh 2004). Schließlich wirkt an Thrombomodulin gebundenes Thrombin auf intakten Endotheloberflächen auch antikoagulatorisch, indem es Protein C aktiviert, welches wiederum zusammen mit Protein S die Faktoren Va und VIIIa inaktiviert (Espana et al. 2005).

Vermutlich ist FVIII nicht nur ein essentieller Bestandteil der Gerinnung, sondern verhindert auch eine spontane Gerinnung in normalen unverletzten Gefäßen. Aufgrund seiner enormen Größe im Komplex mit von Willebrand Faktor (VWF), an das inaktives FVIII im Blut gebunden vorliegt, kann FVIII nämlich anders als beispielsweise die Faktoren X und IX die Endothelschicht nicht durchdringen. Erst wenn es zu

einer Verletzung kommt, kann FVIII in das Subendothel eindringen und die Fibrinbildung im Thrombus ermöglichen.

Der Gerinnungsprozess ist grob schematisch in Abbildung 1 dargestellt und im Abbildungstext erläutert.

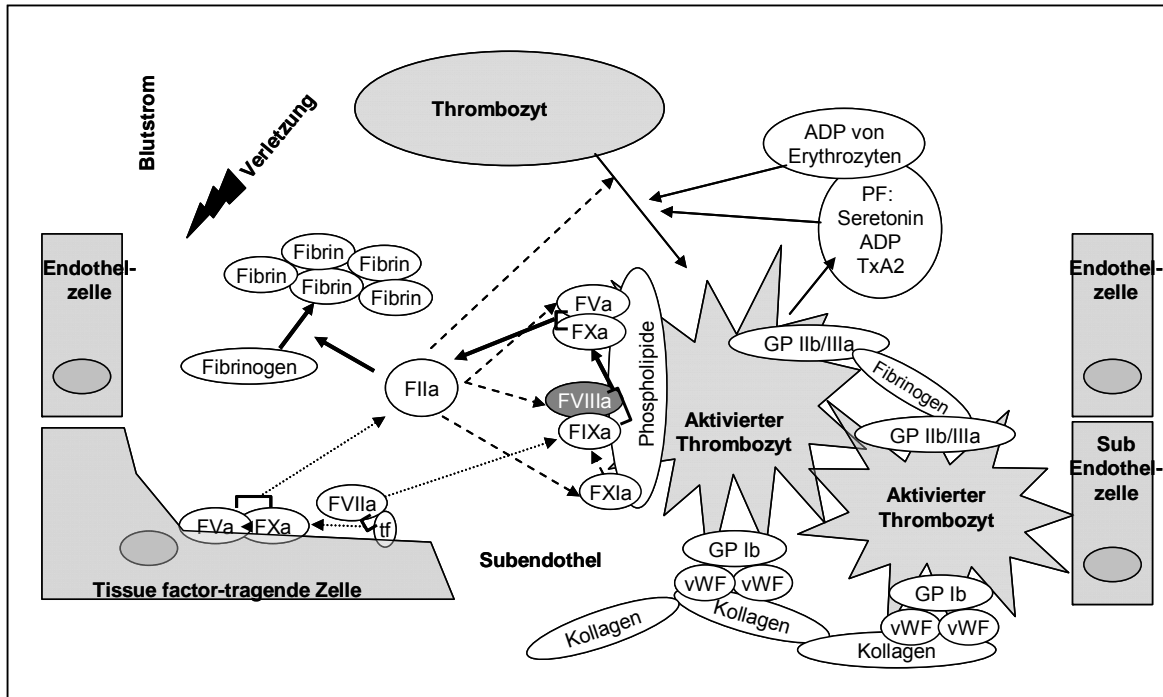


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Blutgerinnungsprozesses.

Die Hämostase umfasst Wechselwirkungen zwischen dem Gefäßendothel, den Thrombozyten sowie den zum Großteil aus dem Plasma stammenden Gerinnungsfaktoren. Nach Anlagerung und Aktivierung der ersten Thrombozyten an das im Subendothel freigelegte Kollagen, verläuft die sekundäre Hämostase in drei Phasen (Schenone et al. 2004; Monroe et al. 2006):

Bei der Initialisierungsphase (.....➔) bindet zunächst FVIIa an tissue factor (TF) das von Zellen unterhalb der Endothelschicht auf der Zellmembran vorhanden ist. Dieser Komplex aktiviert geringe Mengen an Faktoren IX und X. Faktor Xa wiederum bindet an FVa und bildet so auf der Membran der TF-exprimierenden Zelle den Prothrombinase Komplex der wiederum geringe Mengen an aktiven Thrombin freisetzt. Faktor IXa kann sich von der Membran der TF-tragenden Zelle lösen und an die Membran von Thrombozyten anlagern.

Die Amplifikationsphase (----➔) ist geprägt durch die Aktivität der bei der Initialisierungsphase gebildeten Menge an Thrombin. Thrombin aktiviert Thrombozyten, die Hilfsfaktoren FVIII und FV sowie FXI auf der Thrombozytenmembran und bereitet so die gesteigerte Thrombingeneration in der Propagationsphase vor.

Die Propagationsphase (—➔) findet auf der Oberfläche von Thrombozyten statt. Über FXIa generierter und aus der Initialisierungsphase stammender Faktor IXa bindet FVIIIa und aktiviert als Tenase Komplex Faktor X. Faktor Xa bildet erneut mit FVa den Prothrombinase Komplex nur dieses mal auf der Oberfläche von Thrombozyten. Dieser Komplex führt durch positive Rückkopplung zu einer gesteigerten Thrombinaktivierung die unter anderem eine ausreichende Fibringenerierung am benötigten Ort (Thrombozyten) bewirkt.

Neben dem Phasenmodell unterteilt man außerdem den Gerinnungsprozess in das extrinsische und das intrinsische System. Das extrinsische System besteht aus dem FVIIa/TF und dem Prothrombinase Komplex (FXa/Va) während der Initialisierungsphase. Der intrinsische Weg beinhaltet FXIa, den Tenase und Prothrombinase Komplex und findet bei der Propagationsphase auf der Thrombozytenmembran statt. Es sind beide Wege notwendig für eine physiologisch wirksame Gerinnung. Abkürzungen: a = aktiviert; F = Faktor; GP = Glykoprotein; TxA2 = Thromboxan A2; VWF = von Willebrand Faktor.

Ist die Expression von FVIII im Organismus unzureichend, liegt eine Expression von nicht- oder vermindert funktionalem FVIII vor oder ist die Funktion von FVIII z. B. durch Antikörper blockiert, führt dies zur Störung der Gerinnung. Es bilden sich bei Gefäßverletzungen zwar nach wie vor Thromben die mit Fibrin aus der Initialisierungsreaktion am Subendothel befestigt werden. Die Vernetzung der Thrombozyten und von Thrombozyten mit Erythrozyten ist allerdings - abhängig vom Schweregrad des FVIII-Mangels – schwächer, was zu einer verminderten Stabilität des Thrombus führt. Die Folge ist eine erhöhte Blutungsneigung, die je nach FVIII-Mangel unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Diese Erkrankung wird Hämophilie A genannt.

1.2 Hämophilie A

Die Hämophilie A wird X-chromosomal-rezessiv vererbt, was im Normalfall nur bei Männern klinische Auswirkungen zeigt. Mit einer Häufigkeit von 1 in 5000 männlichen Neugeborenen ist die Hämophilie A der häufigste Blutungserkrankung der sekundären Hämostase (Nathwani et al. 1992).

1.2.1 Klinik

Bei Neumutationen, die bei etwa 50% der Hämophilie A Patienten auftreten, fällt die Erkrankung klinisch meist erst nach der Säuglingszeit auf. Typischerweise treten lang andauernde Blutungen und ausgedehnte Blutergüsse (Hämatome) vor allem im Bereich der Extremitäten und des Kopfes auf. Blutungen entstehen fast immer traumatisch, häufig nach banalen Mikrotraumen durch Stoßen, Zahnextraktionen und ähnlichem. Mit zunehmender motorischen Aktivität der Kinder treten Gelenkblutungen (Hämarthrosen), besonders des Ellbogen- und Kniegelenkes, in den Vordergrund und führen zum so genannten Blutergelenk mit erheblichen Bewegungseinschränkungen und Deformierungen. Weitere Symptome sind Nachblutungen nach Operationen und Traumata, Muskelblutungen, Weichteilblutungen und seltene aber lebensbedrohliche zerebrale Blutungen an denen über 10% der Hämophiliepatienten versterben (World Federation of Hemophilia, 2006).

1.2.2 Verlaufsformen

Je nach Restaktivität des FVIII und der damit einhergehenden klinischen Manifestation spricht man von schwerer (Aktivität < 1% FVIII-Aktivität), mittelschwerer (1-5%) oder leichter (5-15%) Hämophilie bzw. von Subhämophilie (15-35%) (Antonarakis 1998); World Federation of Hemophilia, 2006). Während bei der

schweren Hämophilie (etwa die Hälfte der Patienten) Gelenk- und Weichteilblutungen häufig und spontan auftreten, kommt es bei der mittelschweren Verlaufsform (etwa bei 10 % der Patienten) nur noch selten zu Spontanblutungen. Es besteht nach wie vor eine erhebliche Blutungsneigung nach Traumata und Operationen. Bei der leichten Hämophilie (30 – 40 % der Patienten) kommt es nicht mehr zu Spontanblutungen. Hämatome und Nachblutungen entstehen nur nach schweren Traumata und Operationen. Menschen mit Subhämophilie zeigen meist keine bzw. nur nach großen Verletzungen Symptome.

Bei weiblichen heterozygoten Merkmalsträgern (Konduktorinnen), liegt die Aktivität meist bei ca. 50 %. Sie erkranken in der Regel nicht, haben jedoch in ca. 30 % der Fälle Gerinnungsstörungen unterschiedlicher Ausprägung (Kasper 1999).

Das Leitdiagnostikum ist die isoliert verlängerte partielle Thromboplastinzeit (PTT) bei normaler Blutungszeit und Quickwert. Die Bestimmung der spezifischen FVIII-Aktivität durch Mangelplasma-Assay und Zwei-Phasen-chromogener Assay sichern die Diagnose.

1.2.3 Therapie

Die derzeitige Therapie besteht in der Infusion von FVIII-Konzentraten, die aus Spenderplasma oder rekombinant hergestellt werden.

Eine Einheit FVIII-Konzentrat pro Kilogramm Körpergewicht erhöht den FVIII-Spiegel um 1-2%. Da die Halbwertszeit des FVIII im Blut etwa acht bis zwölf Stunden beträgt, sind zur Prophylaxe bei Patienten mit schwerer Hämophilie A mehrfache Infusionen pro Woche nötig, um einen ausreichenden Gerinnungsstatus sicherzustellen.

1.2.4 Nebenwirkungen der Therapie

Eine schwerwiegende Nebenwirkung der Infusion von FVIII-Konzentraten besteht in der Ausbildung von inhibitorischen Allo-Antikörpern (Inhibitoren) gegen FVIII-Epitope durch den Empfänger. Die Inhibitorbildung tritt bei etwa 20-30 % bei Patienten mit schwerer Hämophilie A auf (Ehrenforth et al. 1992; Lusher et al. 1993; Scharrer et al. 1999), wobei die Inzidenz von verschiedenen Faktoren wie der Art der zugrunde liegenden Mutation des FVIII-Gens und somit vom Schweregrad der Hämophilie abhängt. Bei Patienten mit Inhibitoren ist die Effizienz der FVIII-Substitutionstherapie mit zunehmendem Inhibitortiter deutlich erschwert. In solchen Fällen müssen entweder erhebliche Mengen an FVIII gegeben werden, um den FVIII-Plasmaspiegel merklich zu erhöhen, oder man muss auf FVIII-unabhängige Therapiemöglichkeiten zurückgreifen (By-pass Therapie). Wichtige Therapieoptionen bei akuten Blutungen

von Patienten mit hohem Inhibortiter bestehen in der Gabe von aktivierten Prothrombin-Komplex-Konzentraten aus Human-plasma (Sjamsedin et al. 1981; Roberts 1999), porcinem FVIII (Gatti et al. 1984; Kernoff 1984), hoch dosierter Immunglobulingabe, Immunsuppression oder Immunadsorptionspherese oder rekombinatem FVIIa (Ingerslev et al. 1999; Roberts 1999; Brackmann et al. 2000).

In etwa 60-80% der Patienten kann eine Immuntoleranz durch wiederholte hochdosierte FVIII-Konzentrat-Gabe (Immuntoleranz-Therapie) induziert werden, so dass der Inhibitor eliminiert wird (Mariani et al. 1994; Ghirardini et al. 1996; DiMichele et al. 1998).

Das Infektionsrisiko der Virusübertragung mit Erregern wie HIV, HAV, HBV, HCV u. a. durch FVIII-Konzentrate, die aus Plasma gewonnen werden, ist durch sorgfältige Spenderauswahl und effektive Virusinaktivierungsverfahren in den Industrieländern heute weitgehend eliminiert (Teitel 2000; Evatt 2002). Dass durch Albumin in FVIII-Konzentraten aus Plasma oder in rekombinanten Produkten spongiforme Enzephalopathien wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung übertragen werden können, ist zurzeit noch nicht nachgewiesen (Evatt 2002; Farrugia 2002). Anders sieht die Situation in Entwicklungs- und Schwellenländern aus, in denen die mangelnde finanzielle Ausstattung der nationalen Gesundheitssysteme eine optimale Versorgung der Patienten mit FVIII-Konzentraten unmöglich macht. Vielfach werden hier noch Kryopräzipitate und Frischplasma eingesetzt (Srivastava et al. 1998). Gerade angesichts der oft hohen Prävalenzen von HBV, HCV und HIV ist das Risiko einer Infektion des Patienten hier deutlich höher.

Durch den allgemeinen Gebrauch von rekombinanten FVIII-Präparaten, die keine menschlichen und auch keine oder nur noch Spuren von tierischen Proteinen enthalten, sollte es möglich sein, das Restrisiko der Übertragung bekannter oder noch nicht charakterisierter human-pathogener Erreger weiter zu minimieren (Mannucci et al. 2000).

Ein weiterer Nachteil der Substitutionstherapie ist die extrem aufwendige und teure Herstellung der FVIII-Präparate. Die Kosten bei einem durchschnittlichen Patienten mit schwerer Hämophilie A liegen bei etwa 100.000 US\$ pro Jahr (Bohn et al. 2004). Bei Patienten mit inhibitorischen Antikörpern können die Kosten für eine Immuntoleranzinduktion sogar etwa eine Million Euro erreichen (Colowick et al. 2000). Dies führt derzeit noch dazu, dass nur etwa 25% der Hämophilie A-Patienten weltweit adäquat behandelt werden können (Srivastava et al. 1998).

1.3 Struktur, Funktion und Lebenszyklus von FVIII

1.3.1 Das FVIII-Gen

Die FVIII-cDNA konnte bereits 1984 kloniert werden (Gitschier et al. 1984; Toole et al. 1984): Das Gen ist ungewöhnlich groß und besetzt etwa 0,1% der Länge des X-Chromosoms. Der FVIII-Genlocus liegt etwa 1 Mb entfernt vom distalen Ende des langen Arms des X-Chromosoms (Xq28). Er umfasst 186 kb mit 26 Exons, die in der Länge von 69 bis 3106 bp variieren. Das mRNA-Transkript besteht aus etwa 9010 Nukleotiden und enthält eine kurze 5'-untranslatierte Region (150 Basen), ein offenes Leseraster mit Stopcodon (7056 Basen) und eine lange 3'-untranslatierte Region.

Zu dem Intron 22 gibt es zwei zu 98% identische Sequenzen mit einer Länge von 9,5 kb außerhalb des FVIII-Locus, die homologe Rekombinationen und chromosomale Inversionen ermöglichen (Levinson et al. 1990; Lakich et al. 1993; Naylor et al. 1995).

Aufgrund dieser Konstellation und der Größe und damit der erhöhten Wahrscheinlichkeit von Mutationen des FVIII-Gens, sowie aufgrund der Tatsache, dass fast jede Mutation mit einer Verringerung von Expression und/oder Aktivität von FVIII-Protein einhergeht, ist diese Erkrankung deutlich häufiger als beispielsweise die Hämophilie B.

1.3.2 Struktur des FVIII-Proteins

Das primäre Translationsprodukt der FVIII-mRNA ist ein Polypeptid mit 2351 Aminosäuren (AS). Die ersten 19 Aminosäuren besitzen die Funktion eines Signalpeptids für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Export aus der Zelle (Toole et al. 1984).

Aufgrund von Sequenzhomologien lässt sich die Struktur des FVIII-Proteins in sechs Domänen aufteilen (Abbildung 2), die zum Teil interne Homologie aufzeigen. Zwischen den Domänen A1 (AS 1-329), A2 (AS 380-711) und A3 (AS 1649-2019) gibt es Sequenzhomologien von etwa 30%. Weitere Homologien bestehen unter anderem zu Domänen der Proteine Ceruloplasmin und Faktor V (Vehar et al. 1984; Kane et al. 1986; Koschinsky et al. 1986). Die A-Domänen werden an den Carboxyl- bzw. Aminotermi durch je eine saure Region mit einer hohen Dichte der negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu flankiert (a1-a3). Zwischen den Domänen A2 und A3 liegt die B-Domäne (AS 740-1648), die komplett durch das Exon 14 kodiert wird. Zu ihr sind keine homologen Domänen bekannt. Sie hat auch keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die FVIII-Funktion in der Gerinnung (Toole et al. 1986).

Am Carboxylende des FVIII befinden sich die homologen Domänen C1 (AS 2020-2172) und C2 (2173-2332), die ebenfalls Homologie zum Faktor V und zu Ketten des Discoidin I aufweisen (Vehar et al. 1984).

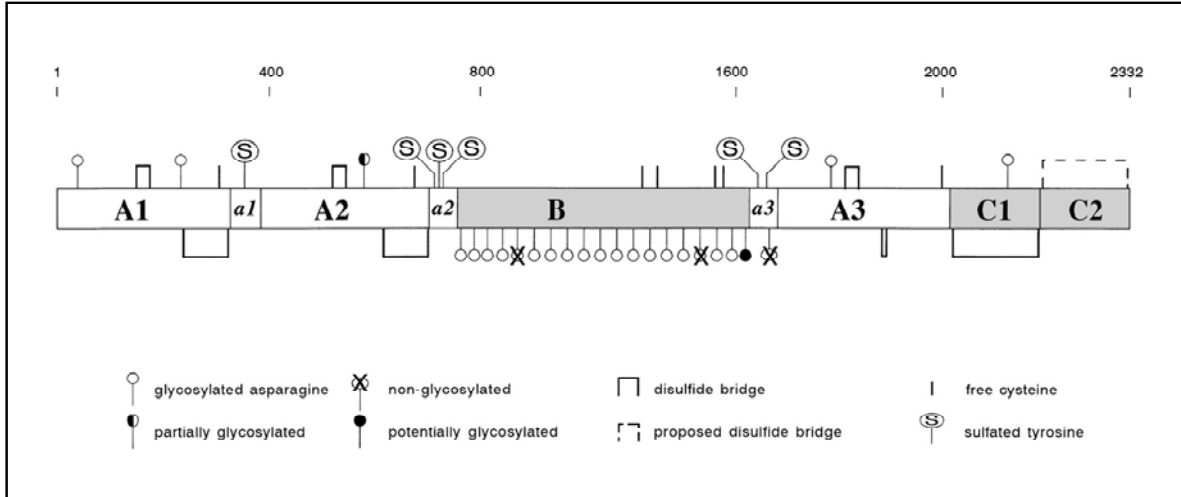


Abbildung 2: Domänenstruktur des FVIII-Proteins mit den Regionen der posttranslationalen Modifikationen.

Die Positionen der Aminosäuren sind in der obersten Reihe angegeben.

1.3.3 Biosynthese und Prozessierung von FVIII

Innerhalb der Zelle und nach der Sekretion durchläuft das FVIII-Protein mit der Domänenstruktur A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 zahlreiche posttranslationale Modifikationsschritte, bevor es als aktiver Kofaktor zur Gerinnung beitragen kann (Lenting et al. 1998a).

Da es keine natürlichen Zelllinien gibt, die FVIII sezernieren, stammen die Erkenntnisse über die posttranslationale Prozessierung von nicht humanen Säugerzelllinien, die entweder mit Wildtyp- oder B-Domäne deletierter FVIII-cDNA in einem Expressionsplasmid mit viralem Promotor transfiziert wurden oder von Untersuchungen des Traffickings bei primären Hepatozyten (Kaufman 1989b; Pittman et al. 1993; Lind et al. 1995; Becker et al. 2004).

Nach Translokation des primären FVIII-Translationsprodukts ins ER und dabei erfolgreicher Abspaltung des Signalpeptides, liegt das FVIII-Protein zunächst als Protein mit 2332 AS und einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa (265 kDa ohne Glykosylierungsanteil und 170 kDa ohne B-Domäne) vor (Vehar et al. 1984).

Nachfolgend werden Oligosaccharide mit hohem Mannoseanteil an einige der 25 potentiellen N-Glykosylierungsstellen gebunden, von denen sich 19 in der B-Domäne befinden (Toole et al. 1984; Moussalli et al. 1999). Die Glykosylierung im ER ist Voraussetzung für die Interaktion von FVIII mit zahlreichen am intrazellulären

Transport von FVIII beteiligten Proteinen sowie für die Funktion bei der Blutgerinnung. Außerdem wird vermutlich über den Glykosylierungsstatus die korrekte FVIII-Faltung überprüft (Abbildung 3) (Pipe et al. 1998a).

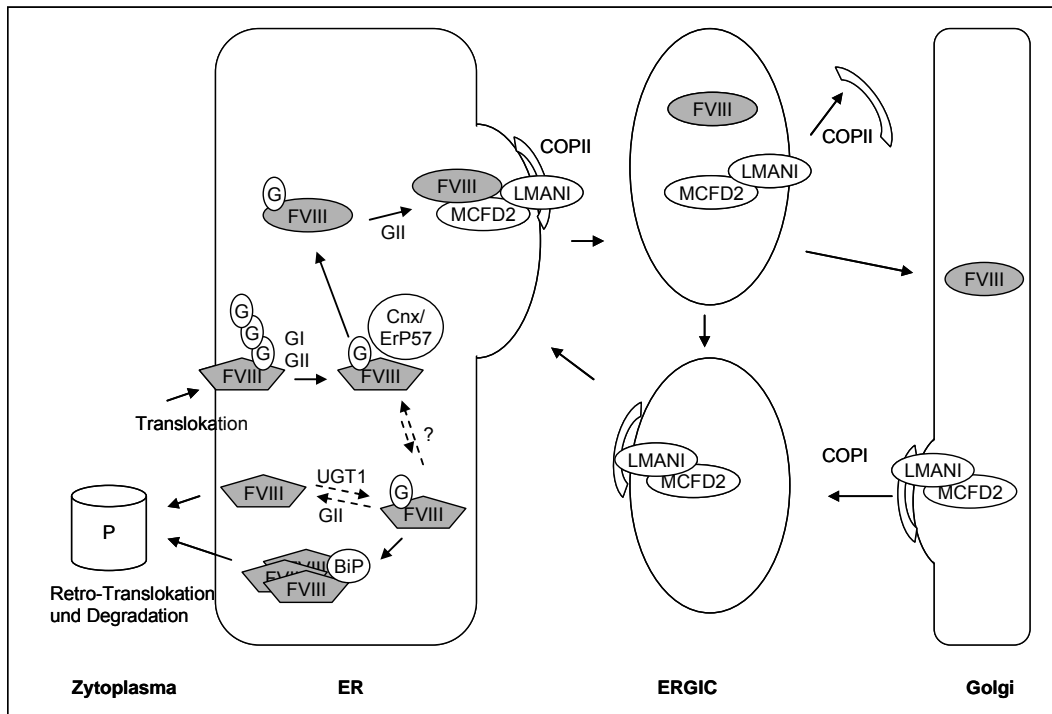


Abbildung 3: Modell zur Chaperon-Interaktionen bei Faltung und Transport von FVIII im frühen sekretorischen Weg.

Nach kotranslationeller Translokation ins ER und N-Glykosylierung, werden zunächst die zwei äußeren Glukose-Reste (G) vom un- bzw. noch falsch gefalteten Glykoprotein (dargestellt durch die eckige Form) durch die Glukosidasen I und II (GI und GII) abgespalten. Die monoglykosylierte Form bindet an die Faltungshelfer Calnexin/Calreticulin (Cnx) und der Oxidoreduktase ERp57. Sofern das System nicht überlastet ist, werden vermutlich die meisten Glykoproteine anschließend als native richtig gefaltete Proteine (dargestellt als Ellipse) entlassen und können schließlich das ER verlassen. Falsch gefaltete Proteine unterlaufen Zyklen der Bindung an und Dissoziation von Cnx (der sogenannte Calnexin-Zyklus dargestellt durch gestrichelte Pfeile). Dauert dieser Prozess zu lange wird er durch Demannosylierung beendet und die falsch gefalteten Proteine binden an BiP, aggregieren und werden zur proteasomalen Degradation (P) ausgeschleust.

Richtig gefaltetes FVIII wird über den MCFD2-LMAN1-Komplex in COPII umhüllte Vesikel rekrutiert, die sich vom ER abschnüren. FVIII dissoziiert von diesem Komplex im ERGIC und wird zum Golgi-Apparat weitertransportiert, während der LMAN1-MCFD2 Komplex zum ER über den retrograden Transport in COPI umhüllten Vesikeln zurückgeschleust wird.

Abkürzungen: ER = endoplasmatisches Retikulum; ERGIC = ER-Golgi Intermediate compartment; UGT = UDP-Glucose:Glykoprotein Glykosyltransferase; (Abbildung modifiziert nach (Zhang et al. 2004; Ruddock et al. 2006)

Glukosidasen und Glukosyltransferase erkennen den Faltungszustand neu gebildeter Glykoproteine und entfernen oder fügen dementsprechend Glukosemoleküle an die N-Glykosylierten Oligosaccharide. Weisen die Oligosaccharide noch Glukosereste am Ende auf, so binden Calnexin und Calreticulin vorübergehend an die Faltungsintermediate, wodurch deren Durchtritt durch das sekretorische Kompartiment behindert wird (Pind et al. 1994; Arunachalam et al. 1995; Gelman et al. 1995; Nauseef et al. 1995; Hebert et al. 1996).

Falsch gefaltetes FVIII bindet an das Chaperon Immunoglobulin-binding protein GRP78/BiP (BiP), ein Mitglied der 70 kDa Hitzeschockproteinfamilie, deren Synthese durch falsch gefaltetes Protein im ER induziert wird (Dorner et al. 1987; Nichols et al. 1998; Pipe et al. 1998a; Moussalli et al. 1999). BiP retransloziert einen Teil der falsch gefalteten und aggregierten FVIII Proteine in das Cytoplasma zum Abbau (Tagliavacca et al. 2000). Die verminderte BiP-Bindefähigkeit von B-Domäne deletiertem FVIII ist vermutlich einer der Gründe für seine effektivere Sekretion. Die Dissoziation von BiP ist energieabhängig und notwendig, bevor FVIII zum Golgi transportiert werden kann.

Die Ausschleusung aus dem ER erfolgt zum großen Teil über die ERES-Rezeptoren LMAN1 (Leguminous mannose binding lectin 1), auch als ERGIC-53 (ER-golgi intermediate compartment protein 53) bekannt, und MCFD2 (multiple coagulation factor deficiency 2) (Moussalli et al. 1999; Cunningham et al. 2003; Zhang et al. 2003). Dieses Modell des rezeptorvermittelten anterograden Transports für sekretorische Proteine wurde vor kurzem erstmalig für FVIII und FV bei Säugerzellen beschrieben (Nichols et al. 1998) und stellt eine Alternative bzw. Erweiterung zum bislang geltenden Modells eines unselektiven anterograden Transports dar. Letzteres Modell beschreibt den anterograden Transport als ungerichtet, indem die sekretorischen Proteine über einfache Diffusion in Bereiche des ER gelangen, die als Vesikel abgeschnürt werden (Wieland et al. 1987; Martinez-Menarguez et al. 1999). Selektive Anreicherung von luminalen Proteinen im ER wird dabei indirekt über Rezeptor-vermittelten retrograden Transport erreicht.

Die Rolle der ERES-Rezeptoren beim Transport von FVIII wurde aufgrund des erblichen kombinierten FVIII-FV-Mangels erkannt, welcher durch Defekte in LMAN1 oder MCFD2 bei gleichzeitigen niedrigen FVIII- und FV-Spiegeln (5 % - 30 %) charakterisiert ist (Nichols et al. 1998; Zhang et al. 2003). FVIII und FV sind homologe Proteine mit identischer Domänenstruktur und es wird vermutet, dass beide über ihre B-Domänen glykosylierungsunabhängig über das lösliche MCFD2-

Protein an den Transportrezeptor LMAN1 binden, der als Typ-I Transmembranprotein in der ER-Membran verankert ist (Zhang et al. 2005). Dieser FVIII-MCFD2-LMAN1-Komplex scheint sich speziell in ERES anzusammeln, und durch die Wechselwirkung zwischen dem Diphenyl-Export-Signal (Kappeler et al. 1997; Nufer et al. 2002) des LMAN1 mit COPII zur Ausbildung und Abschnürung von COPII Coatomen umhüllten Vesikel zu führen (Schekman 1996). Die abgeschnürten Vesikel verlieren anschließend ihre COPII-Hülle und können mit weiteren vom COPII befreiten Vesikeln zu ERGICs (ER-golgi intermediate compartments) fusionieren. ERGICs dienen als Zwischenkompartiment, von wo aus COPI-umhüllte Vesikel Proteine wie z. B. LMAN1 über das Dilysin ER Retentionsmotiv (Itin et al. 1995) wieder zum ER zurücktransportiert werden. Der für den weiteren Transport zum Golgi bestimmte Teil des ERGICs gelangt über Mikrotubuli zum Golgi-Apparat und fusioniert schließlich mit diesem auf der cis-Seite. Im Golgi-Apparat erfolgt die O-Glykosylierung, die Ausbildung der Disulfidbrücken und die Sulfatierung des Proteins. Sechs Tyrosinreste innerhalb der sauren Regionen (AS 346, 718, 719, 723, 1664, 1680) sind sulfatiert (Pittman et al. 1992), und zumindest einige der Sulfate sind notwendig für die effiziente Spaltung und Aktivierung durch Thrombin sowie für die hochaffine Bindung an von Willebrand-Faktor (VWF) (Michnick et al. 1994; Kjalke et al. 1995).

Im Golgi erfolgen auch die ersten intrazellulären Spaltungen über Furin/PACE (Kaufman 1992) in eine leichte Kette mit den Domänen A3-C1-C2 (etwa 80 kDa) und eine schwere Kette mit den Domänen A1-A2 und je nach Proteolyse Teilen der B-Domäne (90 bis 220 kDa) (Abbildung 4). Die Spaltung erfolgt nach den Arginin-Resten 1313 und 1648. Anschließend wird das FVIII-Protein aus der Zelle als Heterodimer sezerniert.

Beide Ketten sind nicht-kovalent durch ein Metallion verbunden, wobei noch nicht klar ist, welche Spezies im FVIII im Plasma vorliegt. Es ist bekannt, dass aufgereinigte schwere und leichte Ketten zusammen mit Mn(II) oder Ca(II) aktiven FVIII ergeben (Fay 1999), aber auch für Cu(I) wird eine Rolle in dieser Bindung diskutiert (Bihoreau et al. 1993; Tagliavacca et al. 1997).

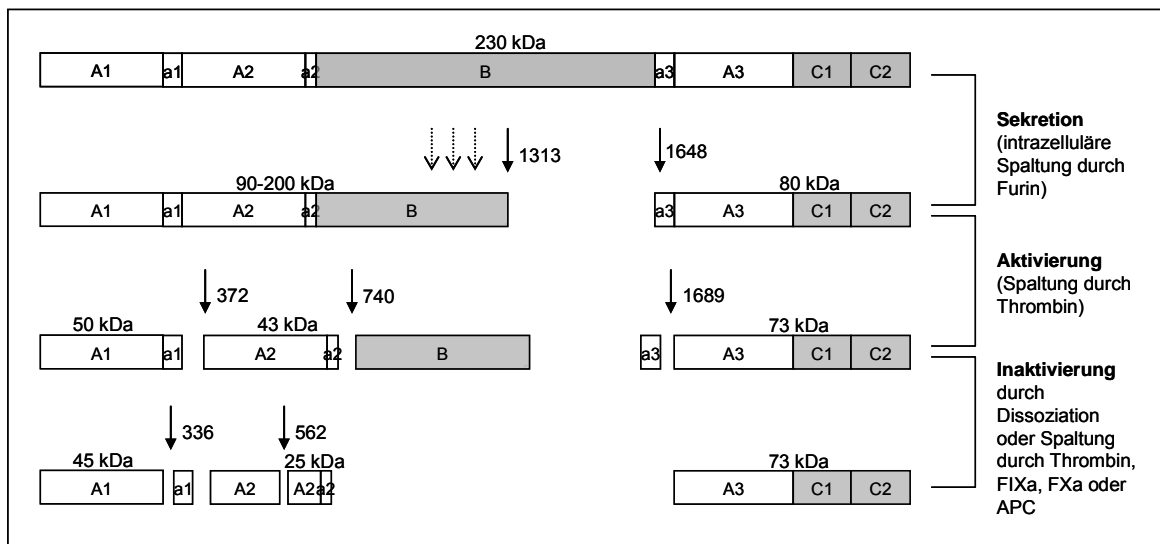


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der posttranslationalen Prozessierung des FVIII-Proteins.

Angegeben sind neben den Domänen und den sauren Regionen (a1-a3) die Spaltstellen mit den entsprechenden Aminosäurepositionen und die molekularen Größen der entstehenden Fragmente.

FVIII zirkuliert im Plasma überwiegend als Heterodimer aus leichter Kette (a3-A3-C1-C2) und schwerer Kette (A1-a1-A2-a2-B). Die Länge der schweren Kette variiert aufgrund begrenzter Proteolyse, die in der B-Domäne nach den Positionen Arg1313 und Arg1648 erfolgen kann (gestrichelte Pfeile). Zur Aktivierung sind weitere Spaltungen durch Serinproteasen im Plasma erforderlich (durchgezogene Pfeile), so dass FVIIIa als Heterotrimer von A1-a1, A2-a2 und A3-C1-C2 vorliegt. Der unterste Abschnitt zeigt Spaltungen an, die zu Inaktivierung und Abbau des Proteins führen (modifiziert nach (Lenting et al. 1998b)).

1.3.4 Wirkungsweise von FVIII als Kofaktor

Am Ort der Blutgerinnung erfolgt die endgültige Aktivierung durch Thrombin oder FXa, die innerhalb der schweren Kette hinter den Argininresten 372 und 740 und in der leichten Kette nach Arg1689 schneiden, so dass das aktive FVIIIa ein Heterotrimer aus der leichten Kette A3-C1-C2 und den Domänen A1-a1 und A2-a2 ist (Eaton et al. 1986). Die leichte Kette und A1-a1 bleiben über ein Metallion assoziiert, während A2-a2 durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden ist.

Die Funktion von FVIII als Kofaktor in der Gerinnungskaskade erfordert die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. FVIII bindet nach der Sezernierung über die Domänen a3 und C2 als inaktives Protein im Plasma mit hoher Affinität an VWF (Dissoziationskonstante K_d etwa 0,4 nM; (Weiss et al. 1977; Tuddenham et al. 1982; Saenko et al. 1997) und wird von diesem stabilisiert und vor Proteolyse geschützt (Wise et al. 1991; Kaufman et al. 1999). Die Assoziation mit VWF erhöht die Halbwertszeit von FVIII im Plasma von 2-3 Stunden auf 12-14 Stunden (Weiss et al. 1977).

Nach der Abspaltung von a3 dissoziiert VWF ab; FVIIIa wird freigesetzt und bindet in einem membranständigen Komplex an FIXa (A2 und A3), FX (a1) und FXa (C2). Weitere proteolytische Schritte durch Proteasen aus dem Gerinnungssystem (Thrombin, FIXa, FXa, aktiviertes Protein C) und die Dissoziation von A2-a2 führen zu Inaktivierung und Abbau des FVIIIa-Trimers (Vehar et al. 1984; O'Brien et al. 1992).

1.4 Rekombinante Expression von FVIII

1.4.1 Probleme bei der rekombinanten Herstellung von FVIII

Aus Gründen der Sicherheit gegenüber der Übertragung von Krankheitserregern wird zunehmend rekombinant hergestellter FVIII zur Therapie verwendet. Die Herstellung ist jedoch sehr ineffizient und daher teuer und aufwendig. Dabei erlaubt die Komplexität von FVIII keine Expression in Bakterien sondern erfordert Säugerzellen, wie BHK- oder CHO-Zellen. Die Ausbeute in den derzeit verwendeten Zellsystemen ist 2-3 Größenordnungen niedriger als die bei einem Protein vergleichbarer Größe. Insgesamt zeichnen sich drei Problembereiche ab [Übersicht in (Soukharev et al. 2002)]: (1) ineffiziente Transkription, (2) ineffizienter intrazellulärer Transport und (3) die Notwendigkeit von stabilisierenden von Willebrand Faktor (VWF) um eine stabile Akkumulation im Überstand zu bewirken (Kaufman 1989a).

- (1) Sowohl in Zellen, die mit einem FVIII-Expressionsvektor transfiziert waren, als auch in retroviral transduzierten Zellen zeigte sich, dass FVIII-mRNA in einer um zwei Größenordnungen niedrigeren Konzentration vorlag als andere mRNAs (wie FIX), deren cDNAs in identische Vektoren kloniert waren (Hoeben et al. 1990; Israel et al. 1990; Lynch et al. 1993; Chuah et al. 1995; Hoeben et al. 1995; Koeberl et al. 1995; Fallaux et al. 1996). In weiteren Arbeiten konnten Sequenzen in den Exons für die A2-Domäne charakterisiert werden, die die Transkription der FVIII-cDNA inhibieren, so dass auch die Produktion von retroviralen Vektoren in Verpackungszellen in ihrer Effizienz stark beeinträchtigt ist (Hoeben et al. 1990; Israel et al. 1990; Lynch et al. 1993; Chuah et al. 1995; Hoeben et al. 1995; Koeberl et al. 1995; Fallaux et al. 1996).
- (2) In einer Reihe von rekombinanten Expressionssystemen wurde deutlich, dass der Transport von FVIII vom ER zum Golgi Apparat sehr ineffizient verläuft (Kaufman et al. 1988a; Pittman et al. 1989; Dorner et al. 1994a). Seit längerem

ist bekannt, dass FVIII im ER an Chaperone wie BiP (Immunglobulin-bindendes Protein), Calnexin und Calreticulin bindet (Marquette et al. 1995; Swaroop et al. 1997; Pipe et al. 1998b).

Es wird diskutiert, in wieweit die stark glykosylierte B-Domäne dabei eine Rolle spielt, denn die Deletion der B-Domäne führt zu einer verringerten Assoziation mit diesen Chaperonen (Dorner et al. 1987; Pipe et al. 1998a). Die Glykosylierung ist wichtig für die Sekretion von FVIII. Dies wurde vor allem daran deutlich, dass in Gegenwart von Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, es zu einer stabiler Interaktion von FVIII und BiP und einer verstärkten FVIII-Aggregatbildung kommt (Dorner et al. 1987; Tagliavacca et al. 2000).

Trotz der niedrigen Ausbeute in rekombinanten Systemen gibt es zurzeit vier rekombinante FVIII-Präparate, die in Europa und in den USA zugelassen und kommerziell erhältlich sind (Soukharev et al. 2002). Die Proteine werden in Chinese Hamster Ovary (CHO)- oder Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen produziert, in die stabil entweder die gesamte FVIII-cDNA oder eine B-Domänen-deletierte FVIII-cDNA (BDD FVIII) transfiziert wurde (Lee 1999) und die in Bezug auf Plasma-Halbwertszeit, Immunogenität und andere entscheidende biologische Parameter den FVIII-Präparationen aus Plasma entsprechen (Mannucci et al. 2000).

1.4.2 Lösungsansätze für die Probleme bei der rekombinanten Expression

Die Zahl der Lösungen für die Schwierigkeiten bei der rekombinanten FVIII-Expression scheint begrenzt, da die Charakterisierung von Mutationen in Hämophilie A-Patienten zeigt, dass die meisten Modifikationen das FVIII-Protein destabilisieren oder inaktivieren (Bowen 2002). Dennoch gibt es einige Ansätze bei denen durch Änderung der kodierenden Sequenz bzw. durch Verwenden alternativer Zellsysteme eine Verbesserung der FVIII-Produktion erzielt wurde.

Eine Möglichkeit zur Steigerung der FVIII-Ausbeute besteht in der Expression einer FVIII-cDNA ohne den für die B-Domäne kodierenden Bereich mit Ausnahme der Furin Konsensus Schnittstelle (Eaton et al. 1986; Toole et al. 1986). Die Deletion der B-Domäne hat dabei anscheinend keinen Einfluß auf die Plasma-Halbwertszeit oder die immunologischen Eigenschaften des FVIII-Proteins. (Pittman et al. 1993; Berntorp 1997). Allerdings gibt es zumindest in vitro Unterschiede in den Gerinnungstest im Vergleich zu der Wildtypvariante. Durch die Deletion wird die Menge der mRNA und die des primären Translationsprodukts gesteigert, verglichen mit der Wildtypvariante (Pittman et al. 1993; Pittman et al. 1994; Pipe et al. 1998a; Sandberg et al. 2001). Die Sekretion des 170 kDa Moleküls bestehend aus der

schweren Kette (A1-A2; 90 kDa) und der leichten Kette (A3-C1-C2; 80 kDa) ist jedoch vermindert entweder wegen verminderter Faltung und/oder ineffizientem ER-Golgi Transport (Pipe 2004). Möglicherweise ist für die Funktion beim Transport eine glykosylierungsreiche Region der B-Domäne verantwortlich. FVIII mit einem kurzen Teil der B-Domäne mit 5 potentiellen N-Glykosylierungsstellen wird so effizient wie FVIII ohne B-Domäne sezerniert (Miao et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit stellen Mutationen der Chaperon-Bindestellen dar. Durch Punktmutationen in der A1 Domäne, ist es gelungen die Interaktion mit BiP zu reduzieren und dadurch eine höhere FVIII Sekretion zu ermöglichen (Miao et al. 2004). Allerdings ist hierbei noch nicht geklärt ob das produzierte FVIII durch Umgehung der Qualitätskontrolle noch mit dem physiologischen FVIII übereinstimmt.

Die Wahl der Zelllinie ist außerdem von großer Wichtigkeit für die Produktion von FVIII. Es wurden bereits je nach verwendeter Zelllinie große Unterschiede bei der Expression von BDD und Wildtyp FVIII festgestellt. Einige Zelllinien produzieren annähernd gleichviel BDD- und FL-FVIII wohingegen andere 10-fach mehr BDD-FVIII produzieren (Pittman et al. 1994; Herlitschka et al. 1998; Chen et al. 1999; Haack et al. 1999; Doering et al. 2002). Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der unterschiedlichen zellulären Qualitätskontrolle bei sekretorischen Proteinen.

Schließlich gibt es erste Versuche, FVIII in transgenen Tieren herzustellen (Paleyanda et al. 1997; Niemann et al. 1999). Allerdings gibt es bei diesem Verfahren Bedenken wegen des Risikos der Übertragung von Pathogenen wie z. B. Prionen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass andere post-translationale Modifikationen des FVIII potentielle neue Antigene für den Patienten darstellen.

Über die bloße Steigerung der Produktionseffizienz gehen Ansätze hinaus, bei denen die Eigenschaften des FVIII-Proteins verändert werden. So wurde bereits die Halbwertszeit von FVIII durch Stabilisierung bzw. reduzierter Sensitivität gegenüber Clearance, Inaktivierung und proteolytischen Abbau verlängert. Durch Einfügen einer Di-sulfidbrücke zwischen der schweren und leichten Kette, durch Mutation der LRP-Rezeptorbindestelle zur Reduktion der FVIII-Clearance in der Leber und durch Mutation der Thrombin- und APC-Inaktivierungsstellen konnte bereits FVIII mit verlängerter Halbwertszeit generiert werden (Soukharev et al. 2002). Die Risiken, die durch diese Veränderung am FVIII entstehen, im Hinblick auf die physiologischen und immunologischen Eigenschaften, lassen sich allerdings noch nicht genau abschätzen.

1.5 Genterapeutische Ansätze zur Behandlung der Hämophilie A

Obgleich diese Substitutionstherapie effektiv ist, hat sie mehrere Nachteile. Darunter fallen die weltweit begrenzte Verfügbarkeit von FVIII-Präparaten, hohe FVIII-Produktionskosten, die Notwendigkeit häufiger Infusion bedingt durch die kurze Halbwertszeit von FVIII *in vivo*, das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern und die Entwicklung von inhibitorischen Antikörpern in etwa 20-30% der Patienten mit schwerer Hämophilie A. (Fakharzadeh et al. 2000).

Die Gentherapie, bei der das defekte Gen durch eine gesunde Kopie ersetzt wird, bietet einen alternativen Weg zur Langzeitkorrektur der Hämophilie (Kaufman et al. 1997). Die Entwicklung der Gentherapie der Hämophilie A wurde bereits ausgiebig untersucht über *ex vivo* und *in vivo* Gentransferansätze unter Verwendung von Adenoviren, Retroviren und nicht-viralen Vektoren. Obgleich zahlreiche Berichte die potentielle Durchführbarkeit für die Gentherapie der Hämophilie A demonstrieren haben (Naldini et al. 1996a; Naldini et al. 1996b; VandenDriessche et al. 1999; Stein et al. 2001; Kang et al. 2005), gibt es nach wie vor Probleme wie etwa bei der Langzeitexpression, der Immunantwort und der Vektortoxizität.

1.5.1 Gentherapie-Verfahren

Bei den Gentherapie-Verfahren kann man grundsätzlich zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-Ansätzen sowie zwischen nicht-viralen und viralen Vektoren unterscheiden (Romano et al. 1999; Dyer et al. 2000).

Bei *in vivo*-Protokollen wird dem Patienten der Transgenvektor systemisch (intravenös) oder lokal (zum Beispiel intramuskulär) verabreicht, so dass der Gentransfer innerhalb des Körpers stattfindet. Dieses Verfahren bringt als Vorteil mit sich, dass große Vektorchargen für ein Patientenkollektiv wie ein Medikament präpariert werden können, mit denen die Therapie nicht nur in Spezialkliniken durchgeführt und die Behandlungskosten relativ niedrig gehalten werden können. Als Nachteile sind zuerst Gefahren in Bezug auf Toxizität und Immunogenität zu beachten. Zudem ist beim *in vivo*-Gentransfer die gezielte Modifikation nur eines einzigen Zelltyps oder Gewebes noch nicht optimiert, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Zellen der Keimbahn genetisch verändert werden.

Ex vivo-Protokolle beinhalten die gentechnische Modifikation von Zellen außerhalb des Körpers, die dann dem Patienten infundiert werden. Die Zellen können körpereigene Zellen sein (autologe Transplantation), aber bei geeigneter Konditionierung des Patienten oder Immunisolation der Zellen auch von Fremdspendern (allogen)

oder sogar Tieren stammen. Mit diesem Verfahren umgeht man Nebenwirkungen des Vektors bezüglich Immunogenität oder Keimbahnveränderung. Allerdings muß zumindest bei autologen Zelltherapien eine individuelle Therapie durchgeführt werden, die aufwendiger und kostenintensiver ist.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Fortschritte der Hämophilie A-Gentherapie im Mausmodell

	Vektor	Gen	Ergebnis	Bemerkungen
aus HSC differenzierte Blutzellen (Moayeri 2005)	Retroviral	sekretions-modifiziertes humanes FVIII	25 % der normalen Aktivität ohne Inhibitoren	partielle Knochenmarksablation
aus HSC differenzierte Blutzellen (Gangadharan 2006)	Retroviral	canines FVIII	100 % der normalen Aktivität ohne Inhibitoren	partielle Knochenmarksablation
aus HSC differenzierte Blutplättchen (Shi 2006)	Transgene Mäuse	humanes FVIII	Hämostase ohne FVIII Blutspiegel und mit hohen Inhibitoren	Knochenmarksablation
Endothelzellen (Liu 2006)	Plasmid mit Transposase	humanes FVIII	10 % der normalen Aktivität	neugeborene zum Zeitpunkt des Gentransfers
Hepatozyten (Ohlfest 2005)	Plasmid mit Transposase	humanes FVIII	10 - 100 % der normalen Aktivität	Toleranzinduktion durch neonatales FVIII nötig
Hepatozyten (Xu 2005)	Retroviral	Canines FVIII	139 % der normalen Aktivität ohne Inhibitoren	neugeborene Mäuse zum Zeitpunkt des Gentransfers
B-Zellen (Lei 2005)	Retroviral	A2 und C2 Domäne des humanen FVIII	Reduktion der Inhibitorbildung	

(modifiziert und erweitert nach (Ponder 2006)

Tabelle 2: Zusammenfassung der Fortschritte der Hämophilie A-Gentherapie im Hundemodell

	Vektor	Gen	Ergebnis	Bemerkungen
Lebertransduktion in Hämophilie A-Hunden (Jiang 2006)	AAV mit Transthyretin-Promotor	canines FVIII	2,5 % der normalen Aktivität	
Lebertransduktion in Hämophilie A-Hunden (Sarkar 2006)	AAV mit synthetischem LeberPromotor	canines FVIII	3 % der normalen Aktivität	Schwere und leichte Kette von FVIII wurden getrennt exprimiert
Lebertransduktion in Hämophilie A-Hunden (Xu 2005)	Retroviral mit hAAT Promotor (10^{10} TU/kg)	canines FVIII	116 % der normalen Aktivität	neugeborene Hunde zum Zeitpunkt des Gentransfers

Legende: AAV, adeno-assoziiertes Virus; hAAT, human α 1-antitrypsin; TU, transducing units; vg, vector genomes. (modifiziert und erweitert nach (Ponder 2006)

Die bisher publizierten Daten über präklinische Studien über die Hämophilie A Therapie zeigen, dass mittlerweile die ersten Erfolge hinsichtlich der Persistenz der FVIII-Expression auf hohem Niveau in Tiermodellen gelungen sind, dass diese

allerdings im adulten System noch nicht auf größere Tiermodelle übertragen werden konnten (Tabelle 1 und 2).

1.5.2 Hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen der Gentherapie für Hämophilie A

Zunehmend werden auch hämatopoetische Stammzellen (HSC) als Zielzellen für eine *ex vivo* Gentherapie der Hämophilie A mit ersten Erfolgen eingesetzt. HSC sind definiert als Zellen, die nach Transplantation in einen Rezipienten ohne blutbildendes System (z. B. nach letaler Strahlungsexposition) durch Proliferation und Zelldifferenzierung die gesamte Hämatopoese rekonstituieren und dauerhaft erhalten können (Weissman 2000).

Sie besitzen als Zielzellen für die Therapie der Hämophilie A zahlreiche Vorteile:

- (1) Durch die *ex vivo*-Transduktion werden Probleme einer potentiellen Vektorimmunität vermieden. Zusätzlich wird durch die Verwendung von replikationsdefekten Vektoren die Expression von viralen Genen in den Zielzellen und eine potentielle Immunantwort gegen virale Proteine im Rezipienten verhindert.
- (2) Im Gegensatz zu anderen adulten Stammzellkompartimenten sind sie am besten charakterisiert und am leichtesten verfügbar. Außerdem belegen langjährige klinische Erfahrungen mit der Transplantation von HSC (in der Regel im Kontext von Leukämien), dass mit moderat invasiven Methoden aus Knochenmark und peripherem Blut genügend HSC für eine therapeutische Anwendung isoliert werden können.
- (3) Eine anhaltende Expression des Transgens wird durch dauerhafte Persistenz der transduzierten Zellen ermöglicht, die nach geeigneter Konditionierung des Empfängers mit den untransduzierten Zellen zusammen in Form eines Chimärismus vorliegen. Eine Immunantwort des Patienten gegen die Zellen wird durch autologe Transplantationen vermieden (Little et al. 2002).
- (4) Die im Rahmen der Hämatopoese durch polyklonale Expansion und Differenzierung stattfindende Vermehrung des Transgens, trägt zusätzlich zur dauerhaften Expression in Blutzellen bei. Außerdem besteht die Möglichkeit der Steuerung der Genexpression in bestimmten hämatopoetischen Zelllinien durch Verwendung von zelltypspezifischen transkriptionellen Elementen im Expressionsvektor (Shi et al. 2007)
- (5) Einer der wichtigsten Vorteile bei der Verwendung von HSC als Zielzellen, liegt in dem verminderten Risiko, eine Inhibitorbildung gegen FVIII auszulösen. Wie

in Kapitel 4 beschrieben, stellt diese Immunreaktion ein Hauptproblem bei anderen Therapieansätzen dar. Wie aus Untersuchungen zur allogenen Knochenmarktransplantation hervorgeht, wird durch die Expression in hämatopoetischen Zellen eine lebenslange Immuntoleranz gegen die in diesen Zellen exprimierten Fremdartigene induziert (Weissman 2000).

Im gentherapeutischen Ansatz von Hoeben et al. wurden murinen Knochenmarkzellen (KMZ) ex vivo mit einem FVIII-BDD kodierenden Vektor retroviral transduziert und in letal bestrahlte Mäuse transplantiert (Hoeben et al. 1992). Obwohl in vivo Vektorsequenzen nachgewiesen wurden, konnten weder FVIII-mRNA noch FVIII-Protein im Plasma detektiert werden. Evans & Morgan verwendeten ebenfalls eine B-Domänen-deletierte (BDD) FVIII-cDNA, die zwar im Knochenmark der FVIII-defizienten Empfängermäuse transkribiert wurde, aber nicht zu messbaren FVIII-Spiegeln im Plasma führte (Evans et al. 1998). Jedoch resultierte die Therapie in einigen Rezipienten in einer Immuntoleranz gegen injizierten humanen FVIII, die nur durch die vorherige Expression niedriger Mengen transgenen FVIII-Proteins erklärt werden kann.

Erst kürzlich konnten drei Studien erste therapeutische Erfolge in hämophilen Mäusen erzielen.

- (1) So wurden in dem Ansatz von Moayeri und Hawley Knochenmarkzellen mit einem retroviralen Vektor, mit einer zur verbesserten Sekretion modifizierten kodierenden Sequenz des humanen FVIII-BDD, transduziert und in myeloablatierte hämophile Mäuse transplantiert (Moayeri et al. 2005a). Dabei wurden FVIII-Spiegel von 200 ng/ml (was etwa 100% des normalen FVIII-Spiegels entspricht) erreicht, die bis zu 25 Wochen nach Transplantation persistierten.
- (2) Eine weitere Studie von Gangadharan und Parker mit einem vergleichbaren Ansatz mit der kodierenden Region von caninen FVIII-BDD führte ebenfalls zu physiologischen FVIII-Spiegeln, die bis zu 10 Monate andauerten (Gangadharan et al. 2006a).
- (3) In einer weiteren Studie konnte humanes FVIII-BDD unter der Kontrolle des thrombozytenspezifischen Glykoprotein-1b α -Promotor in einem ähnlichen Gentherapieansatz die Gerinnung von Hämophilie A Mäusen verbessern (Yarovi et al. 2003; Shi et al. 2007). Obgleich der FVIII-Plasmaspiegel nicht über 1% des normalen Wertes stieg, konnte FVIII in den α -Granula von

Plättchen nachgewiesen und anhand der Blutungszeiten bzw. der Überlebenshäufigkeit nach Schwanzverletzung eine deutlich verbesserte Gerinnungsfunktion in Hämophilie A Mäusen festgestellt werden. Es wurde postuliert, dass FVIII nur am Blutungsort von aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet wird und so selbst in Gegenwart von FVIII-Inhibitoren zu einer effektiven Gerinnung beitragen kann.

Die FVIII-Spiegel der ersten zwei genannten Studien waren allerdings nur mit veränderten FVIII-Varianten möglich. So weist das canine FVIII eine 10 fach höhere spezifische Aktivität und das sekretionsverbesserte FVIII, bei dem die BiP-Bindestelle mutiert ist, eine 20 fach höhere Sekretion auf. Außerdem ist die Übertragung auf ein größeres Tiermodell oft mit deutlich niedrigeren Expressionspiegeln verbunden. Es ist daher nach wie vor unter anderem nötig die Expression der Vektoren zu optimieren.

1.5.3 Gentransfer in HSC

Der ideale Gentherapievektor hätte einige, wenn nicht alle der folgenden Eigenschaften: Leicht zu produzieren, infiziert sowohl sich teilende als auch sich nicht-teilende Zellen, verfügt über eine regulierbare Genexpression, ist immunologisch inert, erlaubt gewebespezifisches Targeting, kann große Expressionskassetten aufnehmen und integriert sequenzspezifisch ins Genom ohne dabei Nebenwirkungen hervorzurufen (Park et al. 2006). Es ist unwahrscheinlich, dass so ein Vektor gefunden wird, deswegen müssen spezifische Vektoren der Therapie entsprechend maßgeschneidert sein um adequat die relevanten Zellen zu modifizieren.

Für die Etablierung von Gentherapieprotokollen mit HSC als Zielzellen ist eine Eigenschaft dieses Zelltyps besonders zu beachten: HSC sind relativ ruhend und teilen sich nur selten (Brenner 1996; Wagers et al. 2002). Eine Zytokin-induzierte Proliferation *ex vivo* durch Eintritt in den Zellzyklus ist mit Differenzierungsprozessen und partiellen Einbußen der Repopulierungsfähigkeit im SCID-Transplantationsmodell verbunden (Williams 1993; Glimm et al. 2000). Der ideale Vektor für die Transduktion von HSC ist daher in der Lage, ruhende Zellen zu transduzieren und im Interesse einer dauerhaften Transgenexpression in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Zudem sollte die Kapazität des Vektors die Insertion von mehr als 5 kb Fremd-DNA erlauben, um eine Expressionskassette aus Promotor, BDD FVIII-cDNA und ggf. weiteren regulatorischen Elementen aufnehmen zu können. Diese

Bedingungen erfüllen zurzeit nur lentivirale Vektoren, die im Folgenden näher charakterisiert werden.

1.5.4 Lentivirale Vektoren

Lentivirale Vektoren sind HIV-1 abgeleitet und besitzen die Fähigkeit ins Genom zu integrieren. Die Integrationseffizienz kann dabei ebenso wie bei den MLV-Vektoren durch die Zellteilungsaktivität erhöht werden. Sie besitzen allerdings gegenüber den MLV-Vektoren eine Reihe von Vorteilen:

- (1) Sie können *in vivo* auch ausdifferenzierte Zellen wie Neuronen und Hepatozyten effizient transduzieren (Naldini et al. 1996a; Park et al. 2000).
- (2) Die große Verpackungskapazität ermöglicht es auch große Gene bis etwa 18 kb zu verwenden (Kumar et al. 2001). Allerdings nimmt mit zunehmender Größe auch die Verpackungseffizienz ab.
- (3) Der Tropismus kann durch Pseudotypisierung, also durch Austausch des Hüllproteins verändert werden (Kang et al. 2002; Sinn et al. 2005; Qian et al. 2006).
- (4) Bei den neuen Generationen der lentiviralen Vektoren ist der LTR-Promotor durch einen Prozess, der unter dem Namen self-inactivation (SIN) bekannt ist, abgeschaltet (Miyoshi et al. 1998). Der damit verbundene Sicherheitsgewinn verringert das Risiko einer Insertionsmutagenese wie sie bei den drei beschriebenen Fällen der ADA-SCID-Studie aufgetreten ist (Bester et al. 2006).
- (5) Lentivirale Vektoren integrieren anders als bei MLV-Vektoren in Genombereiche, in denen keine Promotoren liegen, bzw. die weit von Transkriptionsinitiationsstellen von exprimierten Genen entfernt sind (De Palma et al. 2005).
- (6) Das onkogene Potential von lentiviralen Vektoren wird als gering eingeschätzt, da es bei HIV-Patienten äußerst selten zur Tumorentstehung kommt, die auf einer Insertionsmutagenese beruhen könnte.

Derzeit gibt es zwei klinische Studien mit lentiviralen Vektoren:

- (1) Eine Phase I/II klinische Studie beinhaltet die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen, um Antisense-RNA-Sequenzen gegen HIV Gene zu exprimieren (Humeau et al. 2004; Manilla et al. 2005). In dieser Studie, die erste ermutigende Ergebnisse vorweist, wurden Sicherheitsfaktoren wie etwa Insertionsmutagenese, die Produktion von replikationskompetenten Lentiviren und Vektormobilisation erfasst.
- (2) Eine weitere *ex vivo* Phase I/II Gentherapie Studie wurde in Frankreich initiiert, um die Sicherheit und Effizienz von lentiviral transduzierten CD34+ hämatopoeti-

schen Stammzellen für die Therapie von Patienten mit Sichelzellanämie oder β -Thalassämie zu testen (Bank et al. 2005).

1.5.5 Nebenwirkungen von retroviralen Vektoren beim Einsatz in der Gentherapie und Ansätze zu deren Vermeidung

Die Nebenwirkungen bei den derzeitigen Gentherapieansätzen sind hauptsächlich Folge der (A) Immunantwort gegen den Vektor und der (B) Insertionsmutagenese:

(A) Durch die adaptive Immunantwort gegen den Vektor und das *de novo* synthetisierte Genprodukt, kommt es sowohl zur Elimination des Vektors und der transduzierten Zellen als auch zu einer Gedächtniszellen vermittelten Immunantwort, die eine weitere Behandlung mit Vektor oder Transgen beeinträchtigen (Mingozi et al. 2003; Follenzi et al. 2004). Diese Immunantwort kann sogar lebensbedrohliche Ausmaße erreichen, wie der Fall 1999 gezeigt hat, bei dem eine starke Immunantwort gegen das Adenovirale Vektor Protein zum Tod eines Patienten mit Ornithin Transcarbamylase-Defizienz führte (Raper et al. 2003).

- (1) Eine Strategie die Immunantwort zu unterdrücken, besteht in der Inhibition kostimulatorischer Wege wie etwa die CD40/CD40L oder die CD28-CD80/CD86 Interaktionen zwischen T- und Antigen-präsentierende Zellen (APCs) (Kay et al. 1995; Halbert et al. 1998). Durch Behandlung mit CTLA4-Ig wurden bereits im Tiermodell bei AAV und Ad-Vektoren längere Expressionszeiten erreicht. Diese Vorgehensweise richtet sich allerdings eher gegen die bereits eingesetzte Immunantwort. Die bessere Alternative wäre dagegen eine Immunantwort erst gar nicht entstehen zu lassen.
- (2) Dies wird versucht indem dendritische Zellen in ihrer unreifen, inaktiven Form durch genetische Veränderung tolerogen gemacht werden (Zhao et al. 2006). Dendritische Zelle sind die wichtigsten APCs die eine T-Zell-Aktivierung oder Toleranzinduktion vermitteln.
- (3) Schließlich sollen durch Veränderung antigenener Epitope der viralen Capsidproteine die Anti-Vektor Immunantwort abgeschwächt werden. Dies ist bereits zu einem Teil erfolgreich bei Ad- und AAV-Vektoren z.B. durch Austausch der Serotypen realisiert worden.
- (4) Eine weitere Maßnahme zur Reduktion der Immunantwort besteht im Austausch des weithin genutzten viralen CMV-Promotors durch physiologische Promotor. So konnte durch Ersatz des CMV-Promotors mit einem leberspezifischen Promotor die cytotoxische T-Lymphozyten-Antwort (CTL) in der Leber reduziert werden (Follenzi et al. 2004; Franco et al. 2005).

(B) Bei den derzeitigen *ex vivo* klinischen Studien mit eingesetzten Zellzahlen von 10^7 - 10^{10} und entsprechender Vektordosierung wird jedes Gen eines humanen Genoms – unter der Annahme einer zufälligen Integrationsverteilung – mehrere Male vom integrierenden Vektor getroffen (Baum et al. 2006). Eine Integration des Vektors in Gene bzw. in die Nähe von Genen kann zu dominanten bzw. rezessiven Mutationen führen. Bei der dominanten Mutation besteht die Gefahr einer Aktivierung bzw. Steigerung der Expression eines Proto-Onkogens, währenddessen eine rezessive Mutation das Risiko der Inaktivierung eines Tumorsuppressionsgens beinhaltet. Rezessive Mutationen stellen dabei ein geringeres Sicherheitsrisiko dar, weil der Verlust eines Tumorsuppressionsgens zumeist durch das vorhandene Wildtyp-Allel kompensiert werden kann, sofern dies nicht durch Vorhandensein einer Heterozygotie nicht möglich ist (von Kalle et al. 2004).

Ein Beispiel für die negativen Folgen einer dominanten Mutation bietet die vor kurzem in Frankreich initiierte Gentherapiestudie, in der Kinder mit der X-chromosomal vererbten schweren kombinierten Immundefizienz (SCID-X1) *ex vivo* mit γ -Kette der Interleukin-2 Rezeptor Familie (IL2RG oder γ_c) exprimierende MLV-basierte Vektoren behandelt wurden (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Von 11 gentherapierten Kindern sind 3 an einer T-Zell Leukämie erkrankt, an der bislang ein Kind gestorben ist (Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Kohn et al. 2003; Baum et al. 2004). Die Leukämie steht im Zusammenhang mit der Integration des MLV-Vektors, bei der durch die Promotoraktivität der 3'LTR-Region die Aktivierung des benachbarten Proto-Onkogens *LMO2* eine Leukämie ausgelöst hat (Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

Entsprechend dem Mehrschrittmodell der Tumorgenese ist jedoch nicht nur eine Mutation, sondern vielmehr das Zusammenspiel verschiedener Faktoren zur malignen Transformation nötig, zu denen das Vorhandensein mehrerer Mutationen in der gleichen Zelle, die aus der Transgenüberexpression resultierende Nebenwirkungen (vor allem wenn es sich dabei etwa um ein Signalprotein handelt), intrinsische Faktoren der Zielzelle sowie extrinsische Umweltfaktoren wie etwa die klonale Konkurrenz *in vivo* gehören (Kustikova et al. 2005; Modlich et al. 2005).

So gibt es Hinweise, dass auch bei der SCID-X1-Studie neben der Aktivierung des Proto-Onkogens *LMO*, die unregelmäßige Expression von IL2RG cDNA (Dave et al. 2004), der selektive Vorteil der genkorrigierten Zellen, die Expansion der prä-malignen lymphatischen Klone durch Antigene sowie ein durch die Erkrankung ausgelöster Hämatopoese-Stress in Verbindung mit einem antiapoptotischen

Cytokin-Milieu zum Ausbruch der Leukämie beitragen (Fischer et al. 2004; Gaspar et al. 2004).

Es gibt zahlreiche Ansätze das Risiko der Insertionsmutagenese zu reduzieren. Die Ansätze zielen dabei auf die einzelnen Schritte der Gentherapie beginnend mit der Auswahl der Zielzellen, der Zellzahl, den Kulturbedingungen, dem Gentransfer mit unterschiedlichen Vektortypen und –dosierungen, über die Lokalisation der Integration, der Transgensequenz, der Expressionsstärke, bis hin zu der Transplantation mit verschiedenen Zelldosen, dem Engraftment und der Selektion durch das Milieu des Patienten, bei der es zu einer selektiven Anreicherung bestimmter Klone kommen kann (Baum et al. 2006).

- (1) Die Limitierung der Zielzellzahl (z.B. durch Verwendung unreiferer Stammzellen) und der Vektorkopien stellt eine einfache Methode zur Reduktion der Insertionsmutagenese dar (Baum et al. 2003). Die Verwendung von weniger Zellen bedeutet jedoch auch einen höheren proliferativen Stress der auch zu maligner Transformation führen kann. Weniger Vektorkopien hingegen gehen auf Kosten der Expressionsstärke.
- (2) Beim Vektordesign der Transgenarchitektur unterscheidet man derzeit hauptsächlich drei Ansätze, die das Risiko einer dominanten Mutation reduzieren sollen:
 - a. Die Verwendung von physiologischen Promotoren anstelle von konstitutiv aktiven Enhancer-Promotor Kassetten reduziert die Interaktion mit benachbarten zellulären Promotoren. Vorzugsweise soll dabei auf den Ursprungspromotor des therapeutischen Gens zurückgegriffen werden (May et al. 2000; Pawliuk et al. 2001; Adjali et al. 2005; Seggewiss et al. 2005). Wenn der Expressionspiegel wegen eines schwächeren physiologischen Promotors unter der therapeutischen Schwelle bleibt, hilft eine Verbesserung der RNA-Prozessierung. Hierbei kann der Export, die Stabilität und die Translation der Transkripte verbessert werden (Krall et al. 1996; Kraunus et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit zur Kompensation des schwächeren Promotors besteht in der Verbesserung der Proteinstabilität (Wahlers et al. 2001).
 - b. Ein weiterer Ansatz besteht in dem Einbau von Begrenzungssequenzen, die die Enhancerfunktion des Vektors abschirmen und damit Interaktionen mit benachbarten zellulären Promotoren reduzieren sollen (Zaiss et al. 2002).

So wurden bereits erfolgreich die Isolierungselemente wie z.B. das Hühner HS4-Element verwendet (Rivella et al. 2000; Yusufzai et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung der Transkription einer benachbarten proto-onkogenen Sequenz durch virale Integration, stellt die bei lentiviralen Vektoren verwendete SIN-Technologie dar, bei der die Promotor Aktivität der 3'LTR durch Deletion eines Großteils der U3-Region minimiert wird (Humeau et al. 2004; Bank et al. 2005; Manilla et al. 2005). Es zeigte sich aber bereits, dass dies alleine nicht ausreicht um transkriptionelle Effekte des integrierten viralen Vektors auf benachbarte genomische Regionen zu verhindern. Außerdem ist die Termination der Transgen-Transkription dadurch weiter geschwächt.

- c. Zur Verbesserung der transkriptionellen Termination der Transgenkassette können Terminations-Enhancer und starke Polyadenylierungssignale verwendet werden (An et al. 2004).
- (3) Ein anderer Ansatz besteht im Einbau eines Suizidgens, wie etwa das Thymidin-kinase- oder das Cytosindeaminase-Gen, in den lentiviralen Vektor, um eventuell transformierte Zellen durch Gabe von Ganciclovir oder Gemcitabin zu eliminieren (Germano et al. 2003; Wiewrodt et al. 2003). Darüber hinausgehend führt die Verwendung des Telomerase Promotors, der nur in Keimbahnzellen und manchen Tumorzellen angeschaltet ist, als Transkriptionssteuerung des Suizidgens möglicherweise zur automatischen Elimination der tumorigenen transduzierten Zelle (Painter et al. 2005).
- (4) Die Identifikation einer Methode den Vektor in eine vorherbestimmte Stelle im Genom integrieren zu lassen, stellt einen weiteren viel versprechenden Ansatz dar. Eine Strategie bestand dabei, die HIV-Integrase mit einem Sequenz spezifischen DNA-Bindeprotein zu fusionieren (Tan et al. 2004). Diese Methode zeigt aber derzeit noch eine niedrige Effizienz der sequenzspezifischen Integration.

1.5.6 Physiologische Promotoren für die Expression von FVIII

Im gesunden Menschen ist die Leber das wichtigste Organ der physiologischen Expression von FVIII (Wion et al. 1985). Durch Lebertransplantationen kann die FVIII-Defizienz korrigiert werden (Bontempo et al. 1987; Delorme et al. 1990), und auch Perfusionsexperimente mit isolierten Tierlebern stützen diese Ansicht (Owen et al. 1979). Die Expression erfolgt überwiegend in Hepatozyten (Zelechowska et al. 1985), aber auch sinusoidale Endothelzellen der Leber sind in der Lage, FVIII zu sezernieren.

Die Leber ist daher eines der Zielorgane für die Gentherapie der Hämophilie A. Obwohl biologisch aktiver FVIII auch in anderen Organen und Zelltypen exprimiert werden kann, birgt die ektopische FVIII Expression das Risiko der zellvermittelten bzw. der humoralen Immunantwort (Miao et al. 2000; Grimm et al. 2003; Verhoeyen et al. 2004).

Durch Modifikation der Expressionskassette für eine leberspezifischen Expression, sowie den lebergerichteten viralen Tropismus wurden die Immunantwort gegen die transduzierten Zellen und das Transgenprodukt erheblich reduziert (Miao et al. 2000; Notley et al. 2002; Grimm et al. 2003; Verhoeyen et al. 2004). In vivo scheint die Umgebung in der Leber die Immuntoleranz gegenüber dem exprimierten Protein zu favorisieren (Mingozzi et al. 2003).

Eine lebergerichtete Transkription kann durch Verwendung leberspezifischer Promotoren erreicht werden, von denen bereits einige im Kontext von Retroviren untersucht wurden:

Der murine Albumin Promotor-Enhancer treibt die Expression von humanem Alpha 1-Antitrypsin in Mäusen über eine Dauer von bis zu 6 Monaten an (Kay et al. 1992). Albuminkonzentrationen und damit auch dessen Expressionssteuerung sind im Menschen jedoch instabil und fallen oft auf niedrige Spiegel ab während einer chronischen oder einer akuten Lebererkrankung (Tavill 1972).

Der humane Alpha1-Antitrypsin Promotor (hAAT) wurde anfänglich als nicht leberspezifisch betrachtet, da er eine vergleichbare Expression in NIH3T3 Fibroblasten und Hepa A1 Leberzellen ermöglichte. In vivo jedoch war der hAAT Promotor stärker in Leberzellen als der Promotor vom Albumin-Gen, dem RNA polymerase II-Gen und dem Phosphoenolpyruvat Carboxykinase Gen (Hafenrichter et al. 1994b).

Zudem ermöglichte der hAAT Promotor eine anhaltende starke Expression in vivo über eine Periode von über 40 Wochen (Hafenrichter et al. 1994a).

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung und Optimierung der Expression von Faktor VIII (FVIII) für die rekombinante Herstellung und Gentherapie der Hämophilie A.

(1) Daher sollte in dieser Arbeit zunächst der limitierende intrazelluläre Transport von FVIII im rekombinanten System näher charakterisiert werden.

Zum einen sollte durch Fusion von FVIII an das Reporterprotein enhanced green fluorescence protein (GFP) die Dynamik des FVIII-Transports durch konfokale lasermikroskopische Lebendzellanalysen visualisiert werden. Dazu wurde zunächst die Funktionalität des FVIII-GFP Fusionsproteins durch vergleichende Charakterisierung mit dem FVIII-Wildtyp-Protein überprüft.

Zum anderen sollte durch Blockierung der am sekretorischen Transport beteiligten Chaperone, ER-Exit-Rezeptoren und Vesikelhüllproteine COP I und II, deren Einfluß auf die Sekretion von FVIII untersucht werden.

(2) Gegenüber diesem Zelllinien basierten System, stellen primäre Endothelzellen ein physiologischeres Zellsystem für die FVIII-Synthese dar, da diese im Organismus einen Teil der FVIII-Expression übernehmen, über eine physiologische posttranslationale Modifikation verfügen und zudem durch von Willebrand Faktor-Koexpression FVIII stabilisieren und effizienter sezernieren. Für die rekombinante FVIII-Produktion wäre eine immortale Zelllinie wünschenswert, die den gleichen Phänotyp wie die primären Endothelzellen aufweisen. Daher sollte ein weiterer Ansatz darin bestehen, aus Nabelschnurblut ausdifferenzierte Endothelprogenitorzellen, durch Transduktion der aktiven Untereinheit der humanen Telomerase in eine immortale Zelllinie zu verwandeln.

(3) Für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der Hämophilie A eignen sich hämatopoetische Stammzellen als Zielzellen, da sie leicht verfügbar sind, langfristig Blutzellen generieren und das Potential zur Toleranzinduktion gegenüber körperfremder Antigene haben. Diese Zellen können am effizientesten über lentivirale Systeme transduziert werden. Derartige Ansätze mit humanem FVIII als Transgen waren allerdings bislang aufgrund zu niedriger Expression wenig erfolgreich. Daher sollte in dieser Arbeit das Potential von transkriptionellen und

posttranskriptionellen Elementen in Form von Enhancer, Intron und untranslatierten Exon hinsichtlich einer Steigerung der FVIII-Expression untersucht werden.

Außerdem sollten verschiedene physiologische Promotoren im Bezug auf FVIII-Expressionsstärke evaluiert werden. Physiologische Promotoren bieten zahlreiche Vorteile gegenüber den ubiquitär exprimierten viralen Promotoren. So wird durch die transkriptionell kontrollierte Expression im Zielgewebe das Risiko der Immunantwort durch ektopische Expression reduziert. Weiterhin ist das Potential von epigenetischen Silencing-Effekten und insertioneller Aktivierung benachbarter zellulärer Proto-Onkogenen durch Promoterinteraktion geringer. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit im Einzelnen die Verwendung des Elongationsfaktor-1 α -, des humanen α 1-Antitrypsin- und des FVIII-Promotors im FVIII-kodierenden lentiviralen Vektor der dritten Generation in Bezug auf Gentransfereffizienz und FVIII-Expressionsstärke evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ACL TM -Analysensystem	Instrumentation Laboratories, Lexington, MA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Autoradiographie-Film (Hyperfilm TM MP)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	
- für Agarosegele (Horizon 11-14)	Invitrogen, Karlsruhe
- für SDS-PAGE (Mini Protean 3)	Bio-Rad, München
FACSCalibur (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Gewebeschalen für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Heizblock	Techne, Princeton, NJ
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryocontainer	Nalgene, Rochester, NY
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, NY
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen; Leica, Wetzlar
MACS Preseparation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magneten (MiniMACS, VarioMACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MoFlo-Durchflusszytometer	Cytomation, Fort Collins, CO
PCR-Block (GeneAmp 2400)	Perkin-Elmer, Weiterstadt
pH-Meßgerät	Knick, Berlin
Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen	Dahlhausen, Köln
Stericup-Filter	Millipore, Eschborn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge (L8-M)	Beckman, München
Vivaspin-Konzentratoren	Sartorius, Göttingen
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg;
Corning, Wiesbaden	
Zellschaber	Corning, Wiesbaden
Zellsieb (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2 Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Acrylamid- Rotipherese [®] Gel 30	(30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid); Stammlösung Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth (#T846.3), Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Ampicillin	Roche, Mannheim

APS	Ammoniumperoxodisulfat; Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Diethylpyrocarbonat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Isolationskit	DNeasy™ Tissue Kit; Qiagen, Hilden
ECL-Lösungen	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce, Rockford, IL
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Roche (#901393), Mannheim
Größenmarker	
- DNA	SmartLadder; Eurogentec, Seraing, Belgien
- Protein	BenchMark™ Prestained Protein Ladder; Invitrogen, Karlsruhe
Immunochem® FVIII:C	Baxter, Wien, Österreich
Immunozytm® FVIII:Ag	Baxter, Wien, Österreich
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt
LB Agar	Invitrogen (#22700-025), Karlsruhe
LB Broth Base	Invitrogen (#12780-029), Karlsruhe
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Octanate®	FVIII aus Humanplasma; Octapharma, Frankfurt
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1); Roth, Karlsruhe
PCR-Reagenzien	
- AmpliTaq	Perkin Elmer, Weiterstadt
- AmpliTaq Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
- GeneAmp® PCR-Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt
- Magnesiumchlorid	Perkin Elmer, Weiterstadt
- PfuTurbo	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- Superscript RT/Taq-Mix	Superscript II H-Reverse Transkriptase und Platinum Taq- Polymerase; Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid-Maxipräparations-kits	Qiagen, Hilden; Genomed, Bad Oeynhausen
PVDF-Membran	Roti®-PVDF; Roth, Karlsruhe
QIAEX II- und QIAquick- Gelextraktionskits	Qiagen, Hilden
ReFacto®	FVIII (rekombinant; B-Domänen-deletiert); ReFacto; Wyeth Pharma GmbH, Münster)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNA-Isolationskit	Oligotex Direct mRNA Mini-Kit; Qiagen, Hilden
RNase A	Serva, Heidelberg
RotiLoad1-Auftragspuffer	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Natriumdodecylsulfat; Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TeloTAGGG-PCR ELISA Kit	Roche, Mannheim
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid; Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3 Zellkulturreagenzien, Medien und Zusätze

Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose); Invitrogen (#21969-035), Karlsruhe
DMSO	Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I (RNase-frei)	Roche (#776785), Mannheim
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt
EBM-/EGM-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
EBM-2-/EGM-2-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FBS	Fötales Rinderserum (für die Zellkultur bei 56°C für 30 Min. hitzeinaktiviert); Biochrom, Berlin
Ficoll	Biocoll Separating Solution; Biochrom (#L6115), Berlin
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine (Lösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelatine (Pulver)	Merck, Darmstadt
Glukose	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX™-I	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution; Sigma-Aldrich (#H6648), Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HSA	Humanes Serumalbumin (20%ige Lösung); DRK- Blutspendedienst Niedersachsen, Springe
IMDM/2% FBS	Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 2% FBS; StemCell Technologies, Vancouver, BC
MEM Nichtessentielle	Invitrogen (#11140-035), Karlsruhe Aminosäure-Lösung (100x)
MEM Vitaminlösung (100x)	Invitrogen (#11120-037), Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat MEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺); Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Polybren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich (#2162), Taufkirchen
RPMI 1640	RPMI 1640 (ohne Glutamin) Invitrogen (#31870-025), Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	0,4%ige Lösung; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA in HBSS; Invitrogen (#25300-054), Karlsruhe
Wasser	Sigma-Aldrich (#W3500), Taufkirchen

2.1.4 Antikörper

AK-Spezifität	Chromophor	Hersteller/Produkt-Nr.	Spezies/Isotyp
CD14	PE	BD347497	Maus IgG2b
anti-FVIII	unkonjugiert	Enzyme Research Laboratories #SAF8C-IC	
Schaf-IgG		Sigma-Aldrich #A3415	
Maus-Ig	RPE	DAKO R0439	Kaninchen-F(ab') ₂ -Fragm.

2.1.5 Bakterienstämme

Für alle Transformationen wurden chemisch kompetente *E. coli* verwendet. Da es insbesondere bei retroviralen Vektoren in *RecA*-exprimierenden Stämmen zu inter- und intramolekularen Rekombinationen kommen kann, wurde nur mit den *RecA*-negativen Stämmen DH5 α , STBL2 gearbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines zur Klonierung

Bei den Klonierungsschritten wurden Standardmethoden (Sambrook et al. 2001) bzw. die Herstellerangaben verwendet.

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuss an Enzym verdaut. Bei einem Doppelverdau mit zwei inkompatiblen Enzymen wurde ein sequentieller Verdau mit zwischengeschalteter Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

PCR wurde mit Standardmethoden durchgeführt. Für die Klonierung wurde die Polymerase *Pfu*-Turbo (Stratagene) mit Proofreadingfunktion verwendet, während für Nachweis-PCRs die Taq-Polymerase (New England Biolabs) benutzt wurde.

Gelegentlich war es nötig eines oder beide entstehenden Fragment-Enden mit Überhängen zu glätten. Dies wurde mit dem Enzym DNA Polymerase I (Large Klenow Fragment) bewerkstelligt, welches 5'-Überhänge über seine Polymerase-Aktivität auffüllt und 3'-Überhänge aufgrund seiner 5'->3' Exonuklease-Funktion entfernt.

Das verdaute Vektorfragment wurde zur Verminderung der Religationshäufigkeit mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt. Die Fragmente wurden zusammen mit einer DNA-Leiter (SmartLadder mit Banden zwischen 200 bp und 10 kb) über eine TBE-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente im Gel über Ethidiumbromid und UV-Einstrahlung visualisiert. Die Fragmente mit den entsprechenden Größen wurden aus dem Gel ausgeschnitten und über das Qiaquick

Gelextraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die entsprechenden Fragmente wurden in 1-10 fachen molarem Überschuss des Inserts gegenüber dem Vektor gemischt und mit der T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 16 °C inkubiert. Alternativ zur direkten Ligation mit einem PCR-Produkt, wurde das PCR-Produkt zunächst über die TOPO-Reaktion in den pCR2.1-Vektor mittels TOPO-TA-Kit zwischenkloniert und nachfolgend aus dem pCR2.1-Vektor mit dem entsprechenden Restriktionsenzym wieder herausgeschnitten und das entstandene Fragment für die Ligation verwendet. Am folgenden Tag wurden die Ligationsansätze in die chemisch kompetenten Bakterienstämme den Herstellerangaben entsprechend transformiert. Je nach Resistenzgen des verwendeten Vektors wurden die transformierten Bakterien zur Selektion auf Ampicillin- (Endkonzentration 100 µg/ml) oder Kanamycin-haltigen (Endkonzentration 30 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Zur Analyse der entstandenen Klone wurden die auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien über Kolonie-PCR bzw. Mini-Übernachtkultur mit anschließender Plasmid-Minipräparation mittels alkalischer Lyse und nachfolgendem Testverdau analysiert. Bei positiven Klonen wurden die Fragmentgrenzen sequenziert, bzw. wenn ein PCR-Fragment verwendet wurde, das gesamte PCR-Insert sequenziert.

2.2.2 Klonierung der FVIII-GFP-Konstrukte

Die Klonierung der FVIII-GFP-Konstrukte erfolgte in zwei Schritten.

Im ersten Schritt wurde die Fusion der cDNA von FVIII mit der von GFP im Plasmid vollzogen. Im zweiten Schritt wurden die Fusionskonstrukte in einen lentiviralen Vektor kloniert.

Ausgangsplasmide für die erste Klonierung waren die Plasmide pSP64-FVIII-FL mit der Wildtyp FVIII cDNA [(Toole et al. 1984); ATCC: K01740] und pSP64-FVIII-BDD mit einer B-Domäne deletierten FVIII-Variante [Nukleotide 2428-5067 deletiert; (Herder 2003) sowie das EGFP (im Folgenden als GFP abgekürzt) kodierende Plasmid pEGFP-N2 (BD Clontech, Heidelberg).

Die FVIII-GFP-Fusionskonstrukte wurden generiert über jeweils eine 3-Fragmente-Ligation für die B-Domäne deletierte und die Wildtypvariante von FVIII: Der Vektor pEGFP-N2 wurde geöffnet mit XmaI und Sall. Das erste Insert war jeweils das 5'FVIII-Sall-XbaI-Fragment der Wildtyp (6955 bp) bzw. der B-Domäne deletierten FVIII cDNA (4315 bp) aus den entsprechenden Vektoren pSP64-FVIII-FL und pSP64-FVIII-BDD. Das zweite Insert war das verbleibende 109 bp lange 3'-Fragment des FVIII mit einem deletierten STOP-Codon (grau schraffiert bei der Primersequenz) und einer eingefügten XmaI-Restriktionsschnittstelle am 3' Ende.

Das zweite Insert wurde über PCR mit den Primern FVIII-XbaI-sense (5'-CCT GTG GTG AAC TCT CTA GAC CCA CCG-3') und FVIII-deltaTGA-XmaI-antisense (5'-GAT CCC GGG GTA GAG GTC CTG TGC CTC GCA G-3') generiert, in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) über die TOPO-TA-Reaktion zwischenkloniert und schließlich für die 3-Fragmente-Ligation mittels XbaI und XmaI (unterstrichen) herausgeschnitten.

Aus den Ligationsprodukten pN2-FVIII-BDD-GFP und pN2-FVIII-FL-GFP wurden jeweils die FVIII-GFP kodierenden Sequenzen mittels SalI und NotI herausgeschnitten und in den SalI/NotI-geöffneten lentiviralen Vektor pMF363 (Mitta et al. 2002) in die MCS inkloniert.

Um die FVIII-GFP Fusionskonstrukte mit den unfusionierten FVIII-Varianten vergleichen zu können wurden die kodierenden Regionen von FVIII-FL und FVIII-BDD aus den Vektoren pSP64-FVIII-FL und BDD über Sal I in den pMF363 kloniert. Die Korrektheit der Sequenz wurde mittels Sequenzierung von PCR-Produkten mit überlappenden Sequenzen generiert. Die Primer sind im Folgenden aufgeführt wobei der Name des Primers sich aus der Nummer des PCR-Produkts in der Reihenfolge von 5' nach 3', einem F für Forward bzw. R für Reverse sowie der Länge des PCR-Produkts zusammensetzt:

Target-01-F447,CAA CGG GAC TTT CCA AAA TG; Target-01-R447,GAC CTA GCA GAC CCA TCC AG; Target-02-F411,GAA TTC ACG GTT CAC CTT TTC; Target-02-R411,TGT CTT TTC CTT GGC CAG AC; Target-03-F412,GAA TTC AGG CCT CAT TGG AG; Target-03-R412,CTG TCC AAG GTC CAT CAA GAG; Target-04-F354,TTT CTT GTG AGG AAC CAT CG; Target-04-R354,CCA GTC CTC CTC TTC AGC AG; Target-05-F408,AAA TTC GCT CAG TTG CCA AG; Target-05-R408,CTG GCA GAA TTG GAA AAT CC; Target-06-F398,TCA CTG ATG TCC GTC CTT TG; Target-06-R398,GTT GGA GGC TTG GAA CTC TG; Target-07-F358,CCG AAG CTG GTA CCT CAC AG; Target-07-R358,GCC TCT GTT CCG AAA GTC TG; Target-08-F357,TCT TCA TGT CGA TGG AAA ACC; Target-08-R357,TCT GTC GCA AGA GCA TCA AC; Target-09-F385,GAC TGA CCC TTG GTT TGC AC; Target-09-R385,TGC TGC CAA ATT GTC TGA TG; Target-10-F353,GCA GCA ACA GAG TTG AAG AAA C; Target-10-R353,AAC AAA GCA GGT CCA TGA GC; Target-11-F438,TGT ATC GTC AAC AGA GAG TGG; Target-11-R438,ATC CAC CTT GCT GAT TCT GG; Target-12-F383,TCC ACC AGA TGC ACA AAA TC; Target-12-R383,GAG GCA AAA CTA CAT TCT CTT GG; Target-13-F432,TTT TCC AAG CAG CAG AAA CC; Target-13-R432,CTA CGT TGC GTG ACA AAA TTC; Target-14-F445,AGG GGA GGA AGA AAA CTT GG; Target-14-R445,TGC TGC TGG AAG ATG AGA AG; Target-15-F435,GCA AAG GTA TCA TCA TTT CCA TC; Target-15-R435,CCA CTT AAT CGC TCC CTC TG; Target-16-F418,GGA AAC TAG CAA TGG GTC TCC; Target-16-R418,TTG ATG GCG TTT CAA GAC TG; Target-17-F373,GGC AAA GCA AGG TAG GAC TG; Target-17-R373,TCC ACG GTA TAA GGG CTG AG; Target-18-F432,GTG GCA GTG TCC CTC AGT TC; Target-18-R432,CAT GAG CAG GGT TCA GTG TG; Target-19-F435,ATT GGA CCC CTT CTG GTC TG; Target-19-R435,CCA AAT TCC AGC TTT GGA TG; Target-20-F352,CTG GCT TAG TAA TGG CTC AGG; Target-20-R352,GCC CAC TGT CCA TAT TGT CC; Target-21-F425,GGG AAT GGC TTC TGG ACA

C; Target-21-R425,TCA ACT CCA TGC GAA GAG TG; Target-22-F450,TTG CTC GAT ACA TCC GTT TG; Target-22-R450,TCA CCA CAG GTG TGA AGG AG; Target-23-F364,TGG CCA TCA GTG GAC TCT C; Target-23-R364,GAA CTT CAG GGT CAG CTT GC; Target-24-F338,ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC; Target-24-R338,GTC CTC CTT GAA GTC GAT GC; Target-25-F387,GCC GAG GTG AAG TTC GAG; Target-25-R387,CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC; Target-26-F448,ACA TGG TCC TGC TGG AGT TC; Target-26-R448,GGG GTG CTA GAG ATT TTC CAC;

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Ready ReactionCycle Sequencing Kit (Applied Biosciences) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt und mit einem ABI Prism 3100 Sequencer mittels Software ABI Sequencing Software analysiert.

2.2.3 Klonierung der FXIII A-5'Untranslatierten Region (5'UTR)

Die Herstellung der 5'UTR des FXIII A-Gens wurde von Interactiva Biotechnologie (Ulm) durch Oligonukleotidsynthese des sense-Strangs mit anschließender Gegenstrangsynthese und nachfolgender Hybridisierung zu einem Doppelstrang durchgeführt. Der Sense Strang hat die folgende Sequenz:

5'-GCG CGG CCG CGA AGT CCC CGA GGC GCA CAG AGC AAG CCC ACG CGA GGG CAC CTC TGG AGG GGA GCG CCT GCA GGA CCT TGT AAA GTC AAA AGC GGC CGC GC-3' An den Enden sind NotI-Restriktionsschnittstellen eingefügt (unterstrichen), über die die Sequenz in die NotI-Schnittstelle des pcDNA3.1-FVIII-BDD-Vektors (Herder 2003) zwischen CMV-Promotor und FVIII kodierender Sequenz einkloniert wurde. Der resultierende Vektor wurde pcDNA-CMV-5'UTR genannt. Die Korrektheit der über PCR generierten Sequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

2.2.4 Klonierung des FXIII A-enhancer

Als FXIII A-Enhancer-Region wurde ein Bereich von -806 bis -290 Nukleotiden vor dem Translationsstart gewählt, von dem man weiß, dass dieser in MEG-01 Zellen Enhancer-Aktivität aufweist (Kida et al. 1999). Die Region wurde mittels PCR amplifiziert und über MunI-Schnittstellen in den Primerenden in die MunI-Schnittstelle des pcDNA3.1-FVIII-BDD-Vektors und des pcDNA-CMV-5'UTR kloniert, wodurch die Konstrukte pcDNA-enh-CMV und pcDNA-enh-CMV-5'UTR entstanden. Die Primer hatten folgende Sequenzen: FXIII A-enh-MunI-F 5'-GCC CAA TTG TCC GAA ATG TTG GCA ACC C-3' und FXIII A-enh-MunI-R 5'-ATA CAA TTG CGG CCG CAT TTT GAC TTT ACA AG-3'. Die Korrektheit und Orientierung der über PCR generierten Sequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

2.2.5 Klonierung des chimären β -Globin/IgG-Introns

Das synthetische Intron des pCI-Neo-Vektors (Promega), bestehend aus der 5'-Donorstelle des humanen β -Globingens und der Branchstelle und 3'-Akzeptorstelle vom Intron einer variablen Region einer IgG schweren Kette, wurde mittels PCR amplifiziert und über NheI-Schnittstellen in den Primerenden in die NheI-Schnittstelle der 5'UTR des FVIII im Vektor pMF363-FVIII-BDD-GFP kloniert. Die Primer sind im Folgenden aufgeführt:

NheI-IntPCI-136F: 5'-GCG CAG CTA GCA GGT AAG TAT CAA GGT TAC AAG ACA GG-3'; IntPCI-NheI-136R: CGA TCG CTA GCC CTG TGG AGA GAA AGG CAA AG-3'.

2.2.6 Klonierung der physiologischen Promotoren in lentivirale Vektoren

Die Konstrukte, die bei diesen Experimenten verwendet wurden, basieren auf dem replikationsdefizienten bizistronischen Vektor cPPT-C(FVIII-BDD)IGWS, der für das humane B-Domäne deletierte FVIII (FVIII-BDD) und für das enhanced green fluorescent protein unter der Kontrolle des CMV Promotors kodiert (Follenzi et al. 2002a; Follenzi et al. 2002b; Tonn et al. 2002; Herder et al. 2003). Die Deletion der Nukleotide 2428-5067 der FVIII cDNA resultiert in einem funktionellen FVIII Protein von dem der Großteil der B-Domäne mit den Aminosäuren 760 bis 1639 fehlt. Um die anderen Promotoren zu verwenden wurde der CMV Promotor mit XhoI herausgeschnitten und mit dem entsprechenden XhoI verdautem Fragment ersetzt. Fragmente, die die Promotoren der Gene hAAT und FVIII enthielten wurden durch PCR mittels Pfu-Polymerase generiert. Als Matrize diente genomische DNA von HEK293 Zellen die mit Hilfe des Qiagen DNA purification Kit den Herstellerangaben entsprechend isoliert wurde.

Für den FVIII Promotor wurde die minimale Sequenz bestehend aus den Nukleotiden -44 bis +148 verwendet, die die Wildtyp transkriptionelle Aktivität in HepG2 aufweist (Lewis et al. 1987; McGlynn et al. 1996). Die Nummerierung bezieht sich dabei, wie auch im Folgenden auf die Transkriptionsstartstelle die als +1 definiert wird, wobei die nächstfolgende Base strangaufwärts mit -1 nummeriert wird.

Beim hAAT Promotor wurde der Großteil der Promotorsequenz (-488 bis +20), der die hepatozytenspezifische regulatorische response Elemente umspannt, verwendet (Mendel et al. 1991; Kalsheker et al. 2002).

Ein Fragment, das den EF1-alpha Promotor kodiert, wurde aus dem Plasmid pEFIRES-P mittels PCR generiert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von

Stephen Hobbs (Institute of Cancer Research, London, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Die für die Generierung der Promotorfragmente verwendeten Primer enthielten alle je eine XhoI Restriktionsschnittstelle am jeweiligen 5' Ende um die Fragmente direkt in die mit XhoI verdauten lentiviralen Vektoren zu klonieren.

Die Primer Sequenzen sind im Folgenden aufgelistet, wobei sense und antisense durch s bzw. as und die Promotorbereiche durch Nummern in Klammern indiziert wurden.

F8(-44)XhoI-s 5'-CCG CTC GAG GGC TGC TTC CCA CTG ATA AA-3';

F8(+148)XhoI-as 5'-CG CTC GAG ACT GGA GAA GCA AAA GGT TAA T-3';

hAAT(-488)XhoI-s 5'-CCG CTC GAG ATT TTT CCA TCG GGA CCA TC-3';

hAAT(+20)XhoI-as 5'-CGG GAG CTC GAG GTC CTC GTC CGT ATT TAA GCA-3';

EF1a(-204)-XhoI-s 5'-GCC CTC GAG ATT CAA GCT TCG TGA GGC TC-3';

EF1a(+985)-XhoI-as 5'-CGC CTC GAG GTT CAC GAC ACC TGA AAT GG-3'

Die Identität und die korrekte Orientierung der Promotorsequenzen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

2.2.7 Klonierung der physiologischen Promotoren in plasmidbasierte Vektoren

Bei den plasmidbasierten Konstrukten wurde zusätzlich zu den bereits in dem vorigen Kapitel erwähnten Promotoren eine leberspezifische Lokuskontrollregion (HCR) bestehend aus dem Konstrukt HCR1-TATA-box-HCR2 vor den jeweiligen Promotor kloniert. Die Klonierung erfolgte dabei in 3 Schritten: (1) Zunächst wurde das HCR1-TATA-box-HCR2-Konstrukt im pBlueskript II SK(+)-Vektor (Stratagene) generiert. (2) Anschließend wurden die Promotoren des FVIII, hAAT und EF1 α -Gens jeweils 3' vor dem HCR-Konstrukt einkloniert. (3) Im dritten Schritt wurden die HCR-Promotor-Konstrukte in den pcDNA3.1-FVIII-BDD anstelle des CMV Promotors eingefügt bzw. das HCR-Konstrukt vor den CMV kloniert.

Die einzelnen Schritte wurden im Detail wie folgt durchgeführt:

(1) Die HCR-Region wurde über PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Der Sense-Primer enthielt eine zusätzliche EcoRV-Schnittstelle (HCR-F-EcoRV: 5'-GCG ATA TCG CGG AAT TCG GCT TGG TGA CTT AGA GAA CAG AG-3') und der Antisense-Primer eine ClaI-Schnittstelle (HCR-R-ClaI: 5'-CCA TCG ATG CGG GAT CCT TGA ACC CGG ACC CTC TCA CAC TA-3'). Dabei entstanden zwei Amplifikate mit ähnlicher Sequenz die nach Sequenzierung als HCR1 (368 bp) bzw. HCR2-Region (383 bp) identifiziert werden konnten. Beide wurden über EcoRV/ClaI separat in den EcoRV/ClaI geöffneten pBlueskript II SK(+)-Vektor einkloniert, so dass die

Konstrukte pBS-HCR1 und pBS-HCR2 entstanden. Nachfolgend wurde in den pBS-HCR1-Vektor 3' von der HCR1-Region eine TATA-Box mit über die Clal und XhoI-Schnittstellen eingefügt mit der Folge der Entstehung des pBS-HCR1-TATA-Konstrukts. Die TATA-Box wurde synthetisch hergestellt mit folgender Sequenz (TATA-Clal-XhoI: 5'-CCA TCG ATG GTG CTT AAA TAC GGA CTC CGC TCG AGC GG-3'; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen). Anschließend wurde das HCR1-TATA-Fragment des pBS-HCR1-TATA-Plasmids durch EcoRV/XhoI-Verdau isoliert, der XhoI-Überhang mittels Klenow-Large-Fragment aufgefüllt und in die EcoRV-Schnittstelle des pBS-HCR2 5' vor das HCR2 kloniert. Daraus resultierte das Plasmid pBS-HCR1-TATA-HCR2.

(2) Anschließend wurden die in vorherigen Kapitel beschriebenen Promotorfragmente hAAT, EF1 α und FVIII jeweils über PCR mit einer 5'-XhoI- und einer 3'-KpnI-Schnittstelle amplifiziert, mit diesen Enzymen verdaut und in den XhoI/KpnI-geöffneten pBS-HCR1-TATA-HCR2-Vektor 3' von der HCR2-Sequenz eingefügt.

(3) Bei den dabei entstandenen Konstrukten pBS-HCR1-TATA-HCR2-EF1 α p, pBS-HCR1-TATA-HCR2-FVIIIp und pBS-HCR1-TATA-HCR2-hAATp wurde die HCR1-TATA-HCR2-Promotor Region jeweils über EcoRV/KpnI isoliert, die Enden über Klenow-Reaktion aufgefüllt und in den EcoRV/MluI-verdauten und ebenfalls durch Klenow mit glatten Enden versehenen pcDNA3.1-FVIII-BDD-Vektor kloniert. Durch den EcoRV/MluI Verdau des pcDNA3.1-FVIII-BDD-Vektors wurde der CMV-Promotor herausgeschnitten und mit den HCR-Promotor-Sequenzen ersetzt.

Im Falle des CMV-Promotors wurde die HCR1-TATA-HCR2-Sequenz aus dem pBS-HCR1-TATA-HCR2-Plasmid über EcoRV/XhoI-Verdau isoliert, die Restriktionsenden mittels Klenow geblunted und in den lediglich mit MluI-geöffneten, mittels Klenow geglätteten pcDNA3.1-FVIII-BDD-Vektor kloniert.

Die Korrektheit der Sequenzen der dabei entstandenen Konstrukte pcDNA-HCR-EF1 α p-FVIII-BDD, pcDNA-HCR-FVIIIp-FVIII-BDD und pcDNA-HCR-hAATp-FVIII-BDD wurden durch Sequenzierung der klonierten HCR-Promotor-Regionen bestätigt.

2.2.8 Zellkultur

Sofern nicht anders erwähnt wurden alle Zelllinien von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, www.dsmz.de) bezogen. Die

Zellen wurden expandiert und in mehreren Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit kultivierten eukaryotischen Zelllinien

Hämatopoetische Zellen	
K562	Zelllinie aus Knochenmark eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie; Differenzierungspotential in Richtung von Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten (DSMZ ACC 10); kultiviert in RPMI1640 mit 2 mM GlutaMAX-I und 10% FBS (Lozzio et al. 1975)
Leberzelllinien	
HepG2	humane Hepatozelluläre Karzinomzelllinie (DSMZ ACC 180) ; kultiviert in DMEM mit 2 mM GlutaMAX-I und 10% FBS; (Aden et al. 1979)
Hepa 1-6	murinen Hepatomazelllinie (DSMZ ACC 175); kultiviert in DMEM mit 2 mM GlutaMAX-I, 5 mg/ml Glukose und 10% FBS; (Darlington et al. 1980)
Sk-Hep-1	Humane Leber Adenokarzinom-Zelllinie (DSMZ ACC 141) kultiviert in RPMI1640 mit 2 mM GlutaMAX-I und 20% FBS; (Fogh et al. 1977)
Endothelzellen	
CBEC	(Herder 2003) kultiviert in EGM-2 Medium.
HUVEC	Primäre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (CC-2517; Cambrex, Verviers, Belgien); kultiviert in EGM-2 Medium.
Fibroblasten	
Fibroblasten	Primäre Hautfibroblasten, Adult (NHDF; Cambrex, Verviers, Belgien); kultiviert in DMEM mit 2 mM GlutaMAX-I und 20% FBS
Fibroblasten mit MCFD2 Defekt	Primäre Fibroblasten aus einer Hautstanze von einem Patienten mit kombinierten FV-FVIII-Mangel, DMEM mit 2 mM GlutaMAX-I und 20% FBS
Weitere Zelllinien	
CHO-K1	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (DSMZ ACC 110) (Puck et al. 1958)
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie durch Adenovirus Typ 5 transormiert (DSMZ ACC 305); kultiviert in DMEM mit 2 mM GlutaMAX-I und 10% FBS; (Graham et al. 1977) Die Zellen sind zusätzlich stabil transfiziert mit dem großen T-Antigen aus SV40, so dass Plasmide mit dem SV40-Replikationsursprung nach der Transfektion in diesen Zellen amplifiziert werden können (Fairman et al. 1988). Das Gen für das große T-Antigen wurde mit einem G418-Resistenzgen kotransfiziert (DuBridge et al. 1987). Vor der Verwendung der Zellen für diese Arbeit erfolgte eine Selektion auf das transfizierte T-Antigen-Konstrukt durch Kultur der Zellen über mehrere Passagen (insgesamt 19 Tage) in Gegenwart von 400 µg/ml G418.

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre gehalten. Medien und PBS wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt. Zellzahlbestimmungen wurden mit verbesserten Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Lebendzellzahlen wurden über Trypanblaufärbung bestimmt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

2.2.8.1 Isolation, Kultur und Transfektion von CD14+ Monozyten

Für die Anreicherung von CD14-positiven Zellen wurden die mononukleären Zellen (MC) aus peripherem Blut über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Als Ausgangsmaterial wurden Buffy Coats eingesetzt. Das Blut wurde zuerst mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt. Die Zentrifugationen wurden in 50 ml-Falconröhrchen durchgeführt, in denen 25 ml Ficoll mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet wurden. In der ersten Zentrifugation (30 Min., 850 x g, 20 °C; ohne Bremse) sammelten sich die MC in der Interphase zwischen dem Erythrozytenpellet und der Ficollphase darunter und der thrombozytenhaltigen Plasmaphase darüber. Um aus der MC-Fraktion sowohl die restlichen Thrombozyten als auch Ficollreste zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (10 Min., 300 x g, 4 °C; zuerst ohne Bremse, dann mit Bremse) und abschließend im geeigneten Medium oder Puffer aufgenommen. Die Selektion von CD14-positiven Monozyten wurde mit dem Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Für die MACS-Separation wurden MidiMACS-Magneten und LS-Säulen verwendet, die für maximal 2×10^9 Zellen geeignet sind. Die Effizienz der Anreicherung wurde durch durchflusszytometrische Detektion der CD14-Expression der Zellen in Positiv- und Negativfraktionen überprüft. Die Zellen wurden anschließend in Kultur genommen und über das Amaxa Nucleofection Kit (Amaxa, Köln) bzw über Lipofektion mittels Lipofectamin2000 (Invitrogen) den Herstellerangaben entsprechend transfiziert.

2.2.9 Produktion lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel wurden hergestellt durch triple Co-Transfektion mit der Vektor DNA, dem Verpackungskonstrukt pCMV Δ R8.91 (Zufferey et al. 1997) und dem Pseudotypisierungskonstrukt pMD2.VSVG, der für das Vesikuläre Stomatitis Virus Glykoprotein G (VSV-G) kodiert (McGlynn et al. 1996; Follenzi et al. 2002a) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Luigi Naldini, Torino, Italien). Die Transfektion der Zellen wurde durch Calciumphosphat Kopräzipitation durchgeführt (Follenzi et al. 2002b; Kalsheker et al. 2002). Es wurde dabei für eine 10 cm Kulturschale ein Mischungsverhältnis von 20 μ g Transgenvektor, 13 μ g pCMV Δ R8.91 und 7 μ g pMD2.VSVG verwendet. Sechzehn Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen wurden für weitere 48 Stunden kultiviert. Die Aufkonzentrierung der lentiviralen Partikel erfolgte durch Ultrazentrifugation (50.000 x g, 2 h, 4 °C) des Kulturüberstandes. Das Pellet wurde mit 1/100 des

Zentrifugiervolumens in PBS mit 1% HSA resuspendiert. Die Viruspräparationen wurden anschließend schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.10 Titerbestimmung

Der Vektortiter der lentiviralen Präparationen wurde bestimmt als die Konzentration der Partikel, die 293-Zellen als Referenz-Zelllinie zu transduzieren vermögen (d. h. als 293-transduzierende Einheiten pro ml oder kurz als TU/ml mit TU: transducing units). Alle hierfür verwendeten Konstrukte enthielten EGFP als Markergen, so dass die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch quantifiziert werden konnte. Der Titer wurden wie folgt bestimmt: 293 Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24 Wellplatte in Mehrfachansätzen ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurde der 293 Zellrasen inokuliert mit einer seriellen 10fachen Verdünnung der viralen Konzentrate die mit 8 µg/ml Polybrene Endkonzentration supplementiert wurden. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert („Spinokulation“; 1,250 x g, 90 min, 32°C) und wieder weiterkultiviert. Sechzehn Stunden nach Transduktion, wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 48 Stunden Kultur, wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vereinzelt. Transduzierte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie über die EGFP-Expression des bizistronischen Vektors detektiert. Der Vektortiter wurde wie folgt berechnet: Vektortiter in TU/ml = (Anzahl der eingesetzten Zellen) x (Anteil der transduzierten Zellen) x Verdünnungsfaktor. Für die Titerberechnung wurden nur solche Transduktionen berücksichtigt, bei denen der Anteil der transduzierten Zellen zwischen 2 und 20 % lag. Dies diente zur Vermeidung der Unterschätzung des Titers weil bei höheren Prozentzahlen die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachtransduktionen ansteigt.

2.2.11 Transduktion und FACS Analyse von 293, HepG2, Hepa1-6 und SK-Hep Zellen.

Einen Tag vor der Transduktion wurde jede Zelllinie in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24 Wellplatte ausgesät. Die Zellen wurden mit jeweils einem der 4 verschiedenen rekombinanten lentiviralen Konstrukte mit einer MOI von 5 transduziert (Multiplicity of infection; Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln und zu transduzierenden Zellen). Die Transduktion erfolgte dabei wie im Kapitel 2.2.10 beschrieben durch Inokulation des Viruskonzentrats in der für die MOI entsprechenden Verdünnung und anschließender Spinokulation.

Die Kulturen wurden nach erfolgter Transduktion auf 10^6 Zellen expandiert und anschließend mit einem FACSVantage SE-Zellsortiergerät (BD Biosciences) über ihrer EGFP-Expression sortiert. Anschließend wurden die angereicherten Zellen in Kultur expandiert. Für die FVIII-Expressionsanalyse wurden 10^6 EGFP-sortierte Zellen in 6 Well-Schalen ausplattiert. Nach 48 stündiger Kultur wurden die Zellüberstände für nachfolgende FVIII-Bestimmungen bei -80°C eingefroren und die genomische DNA wurde für realtime PCR Analyse mittels DNeasy Tissue kit (Qiagen) aus den Zellen isoliert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.12 Detektion der EGFP-Expression in transduzierten Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte enthielten die EGFP-cDNA, so dass nach jeder Transduktion die EGFP-Expression als Maß für die Transduktionseffizienz durch-flußzytometrisch bestimmt wurde. Die Zellen wurden für die Messung vorbereitet, indem sie - nach Trypsin/EDTA-Behandlung bei adhären Zellen - in FACS-Puffer (1% FBS/0,1% Natriumazid in PBS) gewaschen und in 1% Formaldehyd in PBS aufgenommen wurden. Die Messung wurde mit einem FACScan (Gerät und CellQuest-Software von Becton Dickinson) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden in jeder Messung untransduzierte Zellen mitgeführt, die kein EGFP exprimierten.

2.2.13 Transfektion

Die Transfektion der HEK293T Zellen wurde durch Calciumphosphat Kopräzipitation durchgeführt (Follenzi et al. 2002b; Kalsheker et al. 2002). Es wurde dabei für eine 10 cm Kulturschale 20 μg Plasmid präzipitiert. Weitere Transfektionsmethoden [Lipofektamin2000 (Invitrogen), Fugene6 (Roche) und Nukleofektion (Amaxa)] wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.2.14 Blockierung der Expression von Transportproteinen mittels RNA-Interferenz

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird ein Prozess bezeichnet, bei dem die Funktionalität der Transkripte inhibiert und dadurch die Genexpression herunterreguliert wird (Shankar et al. 2005). Dieses System entwickelte sich vermutlich zur Abwehr von Viren und Transposons und um die Expression von zahlreichen Genen zu regulieren. Der Mechanismus basiert auf der Fähigkeit selektiv bestimmte Transkripte zu inhibieren entweder im Cytoplasma durch kurze komplementäre RNA oligonukleotid-

Duplexe (siRNA) oder im Nukleus mittels short hairpin RNA (shRNA) Moleküle. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende siRNAs verwendet.

Tabelle 4: Details der verwendeten siRNAs

Bezeichnung	Zielgen	Referenznr.	Zielsequenz	Sequenz	Firma	Konzentration
COPI a	β -COPI	NM_016451	A339-A359	5' -AAC TTC CTG GAC TTC TGA TGA-3'	Dharmacon	20 μ M
COPI b	β -COPI	NM_004766	A92-C112	5' -AAG AAA GCT AAC TGC TAG ATC-3'	Eurogentec	50 μ M
			A625-T645	5' -AAG GCG TGA ATT GCA TTG ATT-3'	Eurogentec	50 μ M
COPII	Sec31	AF139184	A95-A115	5' -AAT TGG ATG CAA CAT TTA GTA-3'	Dharmacon	20 μ M
			A529-T549	5' -AAC AGA CAA GTT CAG CAT ATT-3'	Dharmacon	20 μ M
p24	p24	X92098		5' -AAC CGG ATG TCC ACC ATG ACT-3'	Qiagen	20 μ M
p26	p26 (p24B)	AJ132270		5' -AAG TCA AGG GCG TTT ATC AGT-3'	Qiagen	20 μ M
API a	μ -Adaptin	NM_032493	A591-A611	5' -AAG GCA TCA AGT ATC GGA AGA-3'	Qiagen	20 μ M
API b	γ -Adaptin	NM_001128	A681-T701	5' -AAC CTC ATC ATG TCC GGA TAT-3'	Qiagen	20 μ M
Kontrolle	NT-siRNA	Qiagen cat. 1022076		5' -AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT-3'	Qiagen	5 μ M

Bei den Blockingexperimenten wurden HEK293T Zellen verwendet die stabil mit FVIII-BDD transduziert waren. Die Transfektion erfolgte über Oligofectamine (Invitrogen) den Herstellerangaben entsprechend. Der Kulturüberstand wurde 72 Stunden nach siRNA-Transfektion geerntet und die FVIII-Aktivität mittels chromogenen Assays bestimmt.

2.2.15 Detektion von FVIII auf Proteinebene

Um FVIII-Protein im Zellkulturüberstand nachzuweisen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es Verfahren, um die Aktivität des FVIII-Proteins (FVIII:C) zu bestimmen wie den Einstufen-Gerinnungstest oder den chromogenen Assay. Außerdem kann mit einem ELISA oder über Western Blotting FVIII-Protein (FVIII:Ag) nachgewiesen werden. Der Western Blot verfügt über die niedrigste Sensitivität der genannten Methoden, so dass in manchen Fällen eine FVIII-Anreicherung über Ultrafiltration durchgeführt wurde.

2.2.16 Konzentration von FVIII-Kulturüberstand durch Ultrafiltration

Für die Anreicherung von FVIII aus Kulturüberstand wurden Vivaspin 20-Konzentratoren (Sartorius) mit inerten Polyethersulfon-Membranen verwendet. Da die erwarteten Proteinketten über 80 kDa lagen, wurde eine kleinere Porengröße gewählt (MWCO 30.000), so dass alle gewünschten Proteine ohne Verlust aufkonzentriert werden konnten.

Die Konzentratoren wurden mit 20 ml Kulturüberstand befüllt und bei 3060 x g und 20 °C zentrifugiert. Die Länge der Zentrifugation war abhängig vom zu konzentrierenden Volumen und vom gewünschten Konzentrationsfaktor. Für eine

Einengung von 30-60 ml um einen Faktor 100-400 waren Zentrifugationen von insgesamt etwa 45-120 Min. erforderlich. Die Konzentrate wurden anschließend im chromogenen Assay, ELISA und Westernblot auf FVIII:C- bzw. FVIII:Ag-Gehalt getestet.

2.2.17 Quantifizierung von FVIII:C mit Einstufen-Gerinnungstest

Das Prinzip des Einstufen-Gerinnungstests oder Mangelplasma-Assays beruht auf der Messung der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) mit einem ACLTM-Analysensystem von Instrumentation Laboratories, das nach dem Prinzip des Zentrifugalanalysators arbeitet. In einer Mischung von FVIII-defizientem Plasma und der zu messenden Probe wird durch bovines Kephalin und mikrokristalline Kieselgur das endogene Gerinnungssystem voraktiviert. Durch Zugabe von Ca^{2+} wird die Gerinnung gestartet. Die Pipettierung von Reagenzien und Proben erfolgt automatisch, und das Gerät misst die Änderung der Lichtstreuung einer Probe während der Gerinnungsbildung. Die Zeit bis zur maximalen Steigung des Messsignals während der Gerinnungsbildung ist ein Maß für die aPTT. Über eine Kalibrationsgerade mit Proben bekannter FVIII:C-Aktivität, in der die aPTT in Sek. gegen die FVIII-Aktivität in Prozent (100% entsprechen der durchschnittlichen FVIII-Aktivität im Plasma eines Normalkollektivs) doppelt-logarithmisch aufgetragen wird, können FVIII:C-Konzentrationen in unbekanntenen Proben quantifiziert werden. Das Gerät erstellt automatisch eine Kalibrationskurve aus drei Verdünnungen des Kalibrationsplasmas, so dass im Bereich von 15-150% FVIII:C gemessen werden kann. Höher konzentrierte Proben wurden vorverdünnt, und für Proben mit geringerer FVIII-Aktivität wurde die Kalibration durch weitere Verdünnungen des Kalibrationsplasmas erweitert, so dass 1-2% FVIII:C noch detektiert werden konnten. Die Bedienung des ACLTM-Analysensystems erfolgte nach Angaben des Herstellers. In jeder Messung wurden neben Normplasma als Positivkontrolle zusätzlich Kulturüberstände von Zellen, die kein FVIII sezernierten, als Negativkontrollen mitgeführt.

2.2.18 Quantifizierung von FVIII:C mit chromogenem Assay

Beim chromogenen Test wird die FVIII-Aktivität über die Generierung von aktivem Faktor Xa bestimmt. Durch Mischung der Probe mit zwei Reagenzien (A: Phospholipid und Albumin; B: FIXaß, FX, Ca^{2+} , Albumin, Thrombin) entsteht aktiver FVIIIa, der als Kofaktor zusammen mit FIXaß, Ca^{2+} und Phospholipid eine Aktivierung von FX zu FXa bewirkt. In einem zweiten Schritt wird ein Substrat

zugesetzt, von dem in einer spezifischen Reaktion durch FXa p-Nitroanilin abgespalten wird, dessen Konzentration spektralphotometrisch bei 405 nm gemessen wird.

Der chromogene Test wurde mit dem Coamatic FVIII:C-System (Chromogenix) im Wesentlichen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Test wurde für die Durchführung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen so modifiziert, dass alle Volumina auf 25% reduziert wurden. Zudem wurde die Standardkurve durch weitere Verdünnungen der Kalibrationsplasmen erweitert. Die Sensitivität des Tests lag bei einer FVIII-Aktivität von etwa 1%.

2.2.19 FVIII:Ag-ELISA

Zur Messung der FVIII-Antigen-Konzentration (FVIII:Ag) wurde ein FVIII:Ag-ELISA (American Diagnostica) verwendet. Dieser Sandwich-ELISA beruht auf zwei monoklonalen Antikörpern, die gegen Epitope auf der leichten Kette des FVIII gerichtet sind. Im ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Proben in Teststreifen einer 96-Well-Platte inkubiert, die mit dem ersten monoklonalen anti-FVIII-Antikörper beschichtet waren. Nicht-gebundenes FVIII-Protein und andere Probenbestandteile wurden ausgewaschen, und im zweiten Schritt wurde ein Konjugat aus dem zweiten monoklonalen anti-FVIII-Antikörper und Peroxidase zugegeben, das mit dem gebundenen FVIII:Ag reagierte. Ungebundenes Konjugat wurde durch erneutes Waschen entfernt. Im dritten Schritt erfolgte die Substratreaktion, in der in Gegenwart von H_2O_2 das Chromogen Tetramethylbenzidin zu einer blauen Substanz oxidiert wurde, deren Konzentration spektralphotometrisch bei 450 nm gemessen wurde.

Der ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Standardkurve wurde allerdings durch weitere Verdünnungen der Kalibrationsplasmen erweitert. Die Sensitivität des Tests lag bei einer FVIII:Ag-Konzentration von etwa 2 ng/ml.

2.2.20 FVIII Detektion mittels FVIII-Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse von FVIII wurde bei konfluenten Kulturen der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen bevor Medium ohne FCS dazugegeben wurde. Nach einer weiteren Kultur über 15 Stunden wurde der Überstand filtriert (0.22 μ m) und mittels Vivaspin 20-Konzentratoren aufkonzentriert (2.2.16). Aliquots der Konzentrate wurden gemischt mit reduzierendem Laemmli Puffer, hitzedenaturiert (95 °C, 5 Min.) und über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden über eine Tank-Blot-Apparatur

(Biorad) auf Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) transferiert. Das FVIII-Protein wurde visualisiert durch Inkubation der Membran mit monoklonalem Maus anti-human FVIII HCh Antikörper (Green Mountain Antibodies, Burlington VT USA) bei einer Verdünnung von 1:200, gefolgt von der Inkubation mit horseradish peroxidase (HRP)-konjugiertem Esel anti-Maus IgG (1:1000 verdünnt) und schließlich entwickelt über das Peroxidase Substrat Kit TMB (Axxora GmbH, Grünberg). Rekombinantes humanes B-Domäne deletiertes FVIII (siehe 2.1.2) wurde als Positivkontrolle verwendet.

2.2.21 FVIII-GFP Detektion mittels GFP-Westernblot-Analyse

Überstände von FVIII-GFP transfizierten Zellen wurden gefiltert (0,22 µm) und mittels Vivaspin 20-Konzentratoren aufkonzentriert (2.2.16). Die Aufkonzentrierten Überstände und Zellysate wurden mittels anti-GFP Mikrobeads und dem µMACS Proteinisoliationskit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Zugabe von Complete Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim) immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Blotten wurden die FVIII-GFP-Fusionsproteine durch Inkubation mit monoklonalen anti-GFP Antikörper (Roche, Mannheim) und Peroxidase-Konjugiertem Ziege Anti-Maus sekundären Antikörper (BD, Heidelberg) über ECL-Reaktion (Pierce) visualisiert.

2.2.22 Immunfluoreszenzanalysen von fixierten Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Färbung auf kollagenbeschichtete MatTek-Schalen (MatTek Corp., Ashland, MA, USA) ausplattiert. Die Zellen wurden in 3,5 % Paraformaldehyd fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und mit 3 % humanen Serum Albumin (Blutspendedienst, Frankfurt) in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern gefärbt: Anti-FVIII IgG2a Maus monoklonaler Antikörper (mAk) (clone 3A7, Immunotech, Marseilles, Frankreich); Kaninchen Anti-calnexin polyklonaler Antikörper (pAk) (H-70, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA); Kaninchen Anti-p24 pAk (QVL, freundlicherweise erhalten von R. Pepperkok); Kaninchen anti-BSTR pAk (Untereinheit β'-COP).

Primäre Antikörper wurden detektiert mit Cy3 oder Cy5 gekoppelten Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG-Sekundäre Antikörper (Dianova, Hamburg). Gefärbte Zellen wurden eingedeckt mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Bilder der immungefärbten Zellen wurden aufgenommen mit einem invertierten Konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS SP2 AOBS, Wetzlar) ausgestattet mit einem 1.4 NA

PLAPO BL 63x Objektiv. Die Bilder wurden mit der Leica Standard Software TCS-AOBS bearbeitet.

2.2.23 Lebendzell-Fluoreszenzanalysen

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion auf kollagenbeschichtete MatTek-Schalen (MatTek Corp., Ashland, MA, USA) ausplattiert. Für Transfektionen, wurde Plasmid-DNA über ein Leica IRBE Mikroskop ausgestattet mit einem Eppendorf InjectMan Ni2 Mikromanipulator (Eppendorf, Hamburg) mit selbstgezogenen Nadeln mit den Einstellungen 150 hPa und 0,4 Sekunden mikroinjiziert (beschrieben in Pepperkok 1993). Für die Lebendzellmikroskopie wurde das Kulturmedium mit DMEM (ohne Phenolrot) supplementiert mit 25 mM HEPES und 0,5 g/l Bikarbonat, pH 7,4 ersetzt. Die Zellen wurden bei den Aufnahmen bei 37 °C mikroskopiert und für Bildersequenzen wurde ein Bild pro 2 Sekunden aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten an einem PerkinElmer Life and Analytical Sciences UltraView RS real-time confocal system (Boston, MA) bestehend aus einem Nikon Eclipse TE200 Mikroskop ausgestattet mit einem 1,3 NA PlanFluar 100x Objektiv (Jena). Das System enthielt eine Perspex box zur Temperaturkontrolle. Um die Bildersequenzen zu analysieren und QuickTime-Filme zu generieren, wurde die NIH open source software ImageJ verwendet.

2.2.24 RNA- und DNA-Quantifizierung mittels Realtime Analyse

2.2.25 Quantifizierung der integrierten Vektor DNA mittels genomischer Realtime-PCR.

Um die Kopiezahl der integrierten Vektoren pro Genom zu quantifizieren wurden 300 ng der extrahierten genomischen DNA verwendet. Für die quantitative PCR wurden 3 Sätze von Primerpaaren und Sonden eingesetzt:

- 1) Der GAG Vorwärts- (5'-GGA GCT AGA ACG ATT CGC AGT TA-3') und Rückwärts-Primer (5'-GGT TGT AGC TGT CCC AGT ATT TGT C-3'), und die GAG Sonde (5'-(FAM)- ACA GCC TTC TGA TGT TTC TAA CAG GCC AGG - (Eclipse Dark Quencher)-3), wurden verwendet, um das 5'-Ende des lentiviralen *gag* Gens (GAG), welches sich im erweiterten Verpackungssignal (Ψ) befindet, zu detektieren.
- 2) Der h β -Aktin Vorwärts- (5'-TCC GTG TGG ATC GGC GGC TCC A-3') und Rückwärts-Primer (5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3') und die h β -Aktin Sonde (5'-(Yakima Yellow)-CCT GGC CTC GCT GTC CAC CTT CCA-(Eclipse

Dark Quencher)-3') wurden verwendet, um das humane β -Aktin Gen in 293, HepG2 und SK-Hep Zelllinien zu quantifizieren.

- 3) Der, m β -Aktin Vorwärts- (5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3') und Rückwärts-Primer (5'-CAA TAG TGA CCT GGC CGT-3'), und die m β -Aktin Sonde (5'-(Yakima Yellow)-CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC-(Eclipse Dark Quencher)-3') wurden verwendet um das Maus β -Aktin Gen in der Hepa1-6 Zelllinie zu detektieren.

Die Primer und zweifarbkonjugierte Sondenoligonukleotide wurden synthetisiert von Eurogentec (Belgien). Die quantitative PCR-Reaktionen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und auf einem ABI Prism 7700 sequence detection system (PE-Applied Biosystems) detektiert wie beschrieben in (Donath et al. 1995; Piacibello et al. 2002).

2.2.26 SYBR-Green Realtime PCR

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels SYBR-Green Realtime PCR. Dazu wurde zunächst die RNA mit dem Qiagen RNeasy Kit isoliert und nachfolgend in cDNA umgeschrieben (RT Stratascript First-Strand Kit; Stratagene). Die Realtime PCR wurde mit dem FullVelocity™ SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene) durchgeführt verwendet über ein ABI Prism 7700 sequence detection system (PE-Applied Biosystems) detektiert. Das Vorhandensein von Kontaminationen, Mispriming und Primerdimere wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse und einer nachfolgenden Gelelektrophoreseanalyse ausgeschlossen. Der jeweilige Schmelzpunkt stimmte mit dem über die Länge und Basenabfolge errechnetem Schmelzpunkt überein. (anhand der Formel $T_m = 81.5 + A + 0.41 \times (\% G/C) - (500/bp)$, wobei $A = 16.6 \times \log_{10} \{ [Salz] / (1 + 0.7 \times [Salz]) \}$, and $[Salz] = [Na^+] + 4[Mg^{++} - dNTP]^{0.5} + [Tris^+]$).

2.2.27 Simulation des FVIII-GFP-Moleküls

Die Strukturdaten wurden als Stoylova2002.pdb-Datei von der Strukturseite der „Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource“ (HAMSTeRS) Internetseite (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) geladen. Die Struktur vom FIXa wurde von der „protein data base“ (<http://www.pdb.org>) geladen (1pfx.pdb) (Brandstetter et al. 1995).

Die Simulation der Strukturen von FVIII-GFP wurde freundlicherweise von Dr. Nicolaes vom Institut für Biochemie am Cardiovasculären Forschungsinstitut der Universität von Maastricht durchgeführt. Die Energieminimierung der Strukturen

wurde mittels YASARA's YAMBER2 (Yet Another Model Building and Energy Refinement) (Krieger et al. 2002; Krieger et al. 2004) Kraftfeld mit und ohne weitreichender Coulomb-Wechselwirkung durchgeführt.

2.2.28 Immortalisierung von Endothelzellen

2.2.29 Kultivierung und Transduktion von HUVEC und Endothelprogenitorzellen

Die Endothelprogenitorzellen (EPC) wurden von Christian Herder (Herder 2003) zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus humanem Nabelschnurblut über CD34-MACS-Selektion und einem speziellen Kulturprotokoll ausdifferenziert. Primäre HUVEC-Zellen wurden von der Firma Cambrex bezogen. Um die aktive Domäne der humanen Telomerase (hTERT) in die Endothelzellen einzubringen, mussten zunächst retrovirale Partikel von den hTERT-Vektoren erzeugt werden, die freundlicherweise von Stefan Zimmermann zur Verfügung gestellt wurden. Dazu wurden die retroviralen Vektoren pOS-IRES-GFP (kodiert nur für EGFP), pOS-hTERT-IRES-GFP (kodiert für hTERT und EGFP) und pOS-DN_hTERT-IRES-GFP (kodiert für eine dominant negative Variante von hTERT (Hahn et al. 1999) und EGFP) über Calciumphosphat-Präzipitation in die Verpackungszelllinie Phoenix-Ampho transfiziert (Klingmuller et al. 1997).

Für die retrovirale Transduktion der Endothelzellen wurden 48 Stunden zuvor jeweils 1×10^4 Endothelzellen (Passagen 3 bis 8) in Vertiefungen einer gelatinisierten 6-Well-Platte ausgesät. Zur Transduktion wurde die Hälfte des Mediums mit frischen retroviralen Überstand dreimal innerhalb von 48 Stunden ersetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht transduziert ansonsten jedoch unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Achtundvierzig Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen unter Anleitung von Dr. Marie Follo im Zentrum für Klinische Forschung der Universität Freiburg selektioniert. Mit einem Hochgeschwindigkeits-Durchflusszytometer (MoFlo, Cytomation) wurde von jeder Kultur ein Teil der Zellen (1% der jeweiligen Population) mit der stärksten EGFP-Fluoreszenz aus den Mischpopulationen heraussortiert. Je Kultur wurden etwa $1,5 \times 10^4$ Zellen erhalten, die anschließend wieder in Kultur genommen wurden und deren Expansion über Wachstumskurven aufgezeichnet wurde. Die Zellen wurden in 1/10 der konfluenten Zellzahl ausplattiert und kurz vor Erreichen der Konfluenz durch Trypsin/EDTA Behandlung passagiert. Bei jeder Passage wurden Zellen eingefroren

und zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur wurde die Transgenexpression über die durchflusszytometrische Bestimmung der EGFP Expression bestimmt.

2.2.30 Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP)

Die Telomeraseaktivitäten der Zellpopulationen wurden mit dem TeloTAGGG-PCR ELISA Kit (Roche, Mannheim) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Für jede Probe, wurden 0,5 µg des Gesamtproteins aus dem Zelllysate für den PCR-Ansatz verwendet. Das ELISA-Signal der Probe wurde zu dem Signal einer Kontrollmatrize mit einer bekannten Anzahl an telomeren Wiederholungen in Beziehung gesetzt und die resultierenden relativen Telomerase-Aktivitätsmesswerte übersetzt in das X-fache der Telomerase Aktivität von Phoenix Ampho Zellen die mit jedem Test mitgeführt wurden. RNase-behandelte Zelllysate wurden als Negativ-Kontrollen für jede Probe eingesetzt.

2.2.31 Statistik

Ungepaarter zweiseitiger Student's *t* test, Graphpad Prism- und Excel-Software wurden verwendet, um die statistische Signifikanz beim Vergleich der Expressionslevel bei verschiedenen transkriptionellen und posttranskriptionellen Elementen zu berechnen. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Fehlerbalken und Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Trafficking von FVIII

3.1.1 Charakterisierung der für die Analyse des FVIII-Traffickings verwendeten FVIII-GFP Fusionsproteine

Um den sekretorischen Weg von FVIII in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde die Wildtyp- und eine B-Domäne deletierte Variante (Tonn et al. 2002; Herder 2003) des FVIII an das N-terminale Ende vom EGFP fusioniert (Abbildung 5).

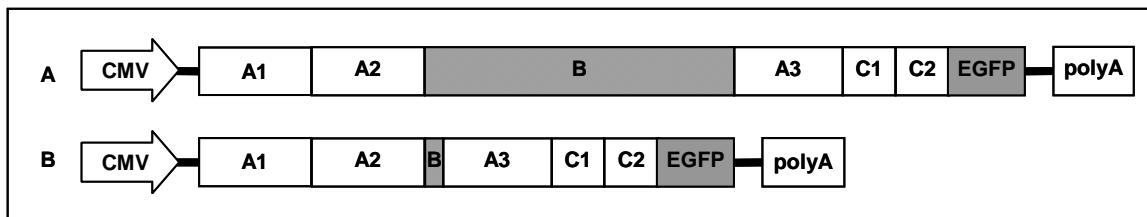


Abbildung 5: Schematische Darstellung der FVIII-GFP Fusionskonstrukte

Sowohl das Wildtyp- (A) als auch das B-Domäne deletierte FVIII (B) wurde C-terminal mit dem EGFP fusioniert. Die kodierende Sequenz der FVIII-Domänen und des EGFP-Teils sind proportional dargestellt. Die entstandenen Konstrukte wurden nachfolgend als FVIII-FL-GFP (A) bzw. als FVIII-BDD-GFP (B) bezeichnet. Abkürzungen: CMV = immediate early promoter des Cytomegalievirus; polyA = Polyadenylierungssequenz; EGFP = enhanced green fluorescent protein.

Die entstandenen Konstrukte (FVIII-FL-GFP und FVIII-BDD-GFP) wurden nachfolgend in den lentiviralen Vektor pMF363 (Mitta et al. 2002) kloniert. Damit die Eigenschaften der FVIII-GFP-Fusionskonstrukte mit den entsprechenden unfusionierten FVIII-Varianten verglichen werden konnten, wurden außerdem FVIII-FL und FVIII-BDD in den pMF363 Vektor einkloniert. Die resultierenden Expressionsvektoren (pMF363-FVIII-BDD, pMF363-FVIII-FL, pMF363-FVIII-BDD-GFP und pMF363-FVIII-FL-GFP) wurden in den nachfolgenden Experimenten teilweise über transiente Transfektion teilweise stabil über lentivirale Transduktion in die Zellen eingebracht.

3.1.1.1 ImmunoFluoreszenzaufnahmen von FVIII-GFP transfizierten HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden transient mit den FVIII-GFP-Varianten transfiziert und das intrazelluläre FVIII mit anti-FVIII Antikörpern immunFluoreszenz gefärbt. Die Überlappung der GFP- und FVIII-Signale der konfokalen lasermikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 5, C und F) kolokalisieren zu 100 %. Die Verteilung der

Signale ist fleckig und retikulär. Sowohl FVIII-FL-GFP als auch FVIII-BDD-GFP transfizierte Zellen zeigen das gleiche Muster. Mock transfizierte Zellen zeigen bei gleichen Belichtungseinstellungen keine Fluoreszenz (nicht dargestellt).

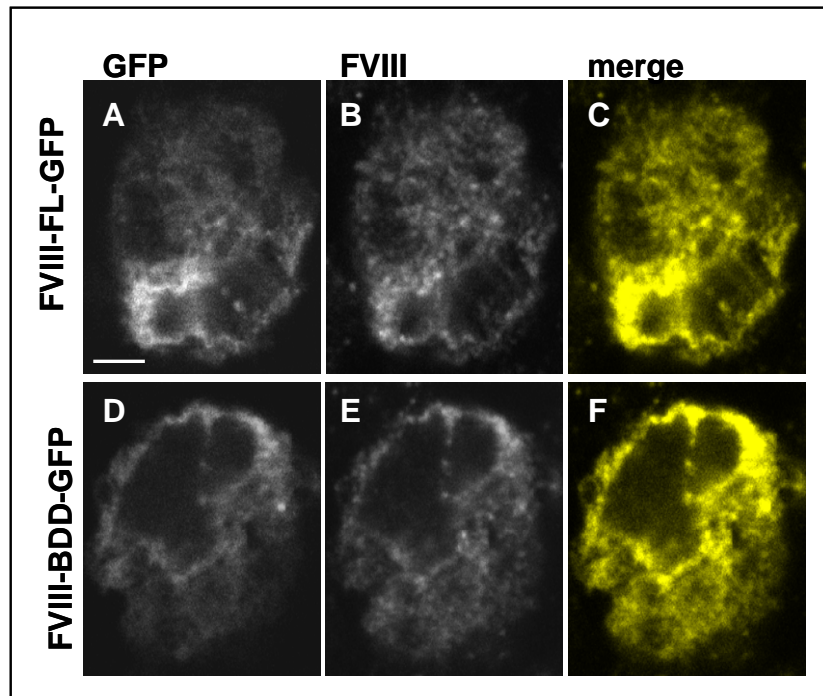


Abbildung 6: Kolokalisation von FVIII und GFP in FVIII-GFP transfizierten HEK293T-Zellen

HEK293T Zellen wurden mit FVIII-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert, anschließend in Paraformaldehyd fixiert, gefärbt mit anti-FVIII-Antikörpern und sekundären Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern und aufgenommen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. A und D: GFP-Fluoreszenz, B und E: FVIII-Signal, C und F: Kolokalisation des GFP- (grün) und FVIII-Kanals (rot); Kolokalisation ist gelb dargestellt aufgrund der Kombination des grünen und roten Signals; Maßstab, 4 μm

3.1.1.2 Vergleich der FVIII-Aktivität zwischen FVIII-GFP-Fusionsproteinen und unfusionierten FVIII-Varianten

Um einen möglichen Einfluss der fusionierten GFP-Domäne auf die FVIII-Aktivität des Fusionsproteins zu überprüfen, wurden vergleichende Messungen der FVIII-Aktivität und des FVIII-Antigen-Spiegels aus dem Kulturnüßstand von HEK293T Zellen vorgenommen, die mit den FVIII-GFP- und den entsprechenden FVIII-Varianten transient transfiziert waren.

Wie in Abbildung 7 dargestellt besteht sowohl bei den B-Domäne deletierten als auch bei den Wildtypvarianten kein signifikanter Unterschied in der FVIII-Expression zwischen GFP-fusionierten und unfusionierten Konstrukten ($p > 0,3$). Die Expression der B-Domäne deletierten FVIII-Varianten liegt etwa 3-mal so hoch wie die der Wildtypvarianten (durchschnittlicher Wert für B-Domäne-deletierten FVIII-Varianten:

21,8 % / ml \pm 1,2 bzw. für Wildtypvarianten: 7,1 % / ml \pm 0,5). Die aus dem Verhältnis zwischen Aktivität und Antigenlevel errechneten spezifischen Aktivitäten liegen für die B-Domäne-deletierten FVIII-Varianten bei 0,73 (chromogener Assay) bzw. 0,93 (Einstufentest) und für die Wildtypvarianten zwischen 0,93 (chromogener Assay) und 0,67 (Einstufentest).

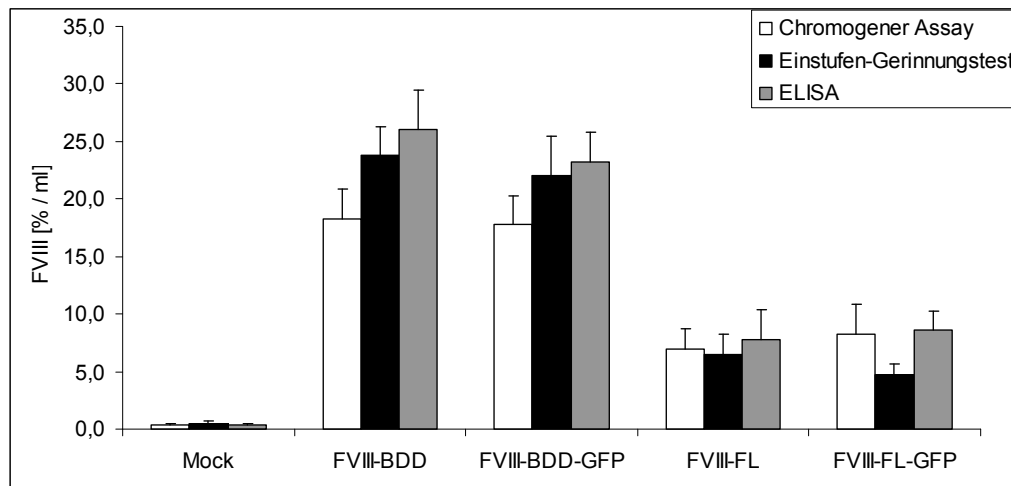


Abbildung 7: Die Expression der FVIII-GFP-Varianten und der entsprechenden unfusionierten FVIII-Varianten ist vergleichbar.

FVIII-Expression wurde 48 Stunden nach transients Transfektion der entsprechenden Konstrukte in HEK293T Zellen im Kulturüberstand analysiert. Bestimmt wurde die FVIII-Aktivität im chromogenen Assay (weiße Balken), im Einstufen-Gerinnungstest (schwarze Balken) und die FVIII-Antigenkonzentration im ELISA (graue Balken). Der FVIII-Spiegel ist in % / ml angegeben, wobei 100 % / ml äquivalent zu 200 ng / ml sind, und einem physiologischen FVIII-Spiegel entsprechen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; n=4; jedes n stellt den Mittelwert aus Triplikaten dar. Signifikanzen des Vergleichs zwischen FVIII-BDD und FVIII-BDD-GFP Konstrukte beim chromogenen Assay: p=0,89; Einstufentest: p=0,70; ELISA: p=0,54. Signifikanzen des Vergleichs zwischen FVIII-FL und FVIII-FL-GFP Konstrukten beim chromogener Assay: p=0,70; Einstufentest: p=0,39; ELISA: p=0,82.

Ein weiteres Indiz, dass das GFP-Protein die FVIII-Aktivität nicht beeinflusst, wurde durch Messung der FVIII-Aktivität nach Zugabe von rekombinanten GFP in verschiedenen molaren Verhältnisse aufgezeigt. Weder bei 10 fach geringerer Menge, noch bei einer äquimolaren Konzentration, noch beim 10 fachen molaren Überschuss von GFP gegenüber FVIII ändert sich die FVIII-Aktivität (Abbildung 8).

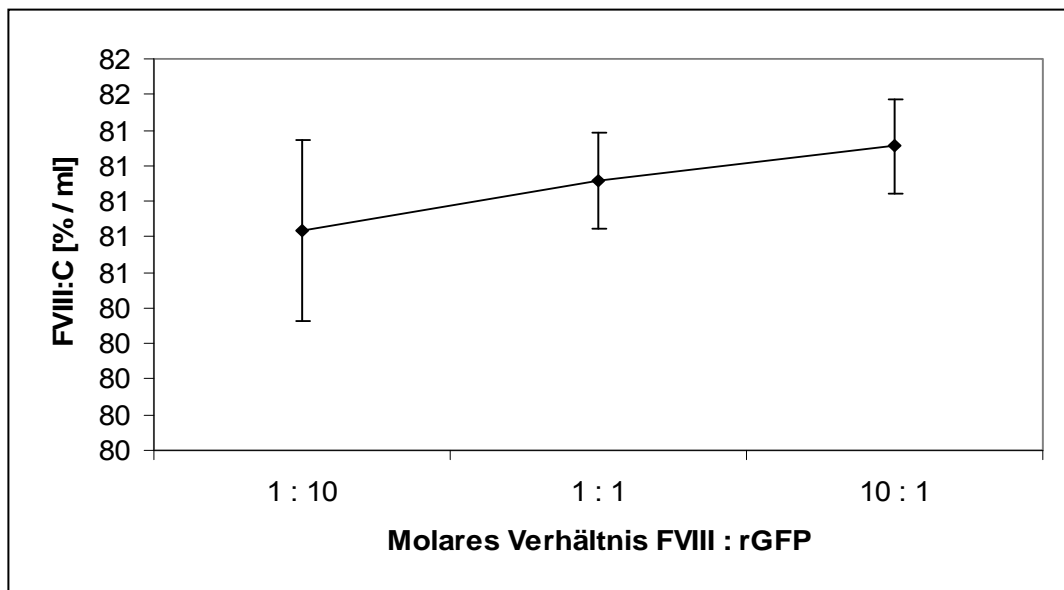


Abbildung 8: Rekombinantes GFP hat keinen Einfluss auf die FVIII-Aktivität

Rekombinantes GFP wurde in den angegebenen molaren Verhältnissen zu einem FVIII Standard (80 % / ml) dazugegeben und nachfolgend im chromogenen Assay gemessen. (n=3; Mittelwert \pm Standardfehler)

Eine wichtige Eigenschaft von FVIII stellt die Bindung an VWF dar, wodurch FVIII im Blut stabilisiert wird und die Halbwertszeit auf etwa 12 Stunden gehalten wird. Die Bindefähigkeit von GFP-fusionierten und unfusionierten FVIII-Varianten wurde indirekt über eine VWF-Koexpression verglichen.

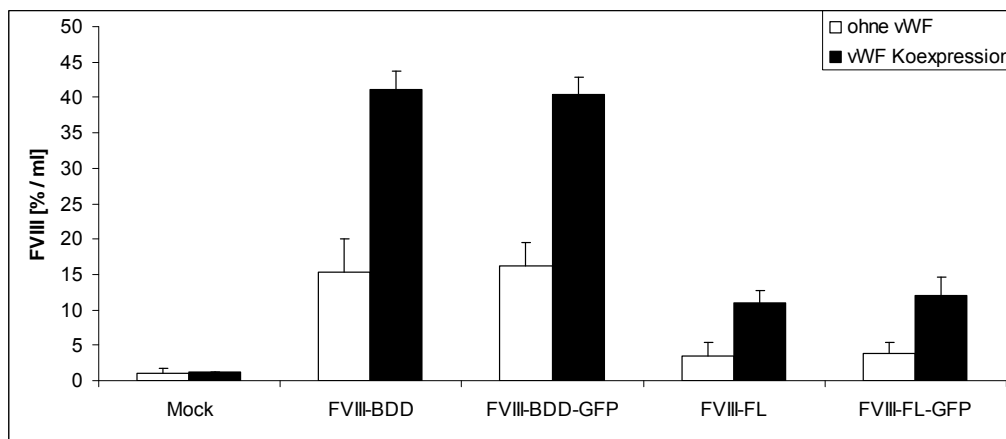


Abbildung 9: Koexpression von VWF und den FVIII-GFP-Varianten bzw. den entsprechenden unfusionierten FVIII-Varianten führt zu einer vergleichbaren Steigerung der FVIII-Sekretion.

FVIII-Expression wurde nach transienter Transfektion der entsprechenden FVIII-Konstrukte zusammen mit (schwarze Balken) bzw ohne (weiße Balken) VWF-Expressionsplasmid pMT2-ADA-VWF (ATCC #67172) in HEK293T Zellen analysiert. Bestimmt wurde die FVIII-Aktivität im chromogenen Assay. Der FVIII-Spiegel ist in % / ml angegeben, wobei 100 % / ml äquivalent zu 200 ng / ml sind, und einem physiologischen FVIII-Spiegel entsprechen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler; n=3; jedes n stellt den Mittelwert aus Triplikaten dar. Signifikanzen für den Vergleich zwischen den FVIII-BDD und FVIII-BDD-GFP Konstrukten: ohne VWF: p=0,92; mit VWF Koexpression: p=0,88; Signifikanzen für den Vergleich zwischen den FVIII-FL und FVIII-FL-GFP Konstrukten: ohne VWF: p=0,90; mit VWF Koexpression: p=0,70;

Auch hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den GFP-fusionierten und den unfusionierten FVIII-Varianten gefunden ($p > 0,7$). Durchschnittlich steigert die Koexpression von VWF die Sekretion von FVIII um den Faktor $2,8 \pm 0,1$ (FVIII-BDD: 2,7; FVIII-BDD-GFP: 2,5; FVIII-FL: 3,1 und FVIII-FL-GFP: 3,1).

3.1.1.3 GFP fusioniertes FVIII wird intrazellulär prozessiert.

Um die intrazelluläre Prozessierung von FVIII-GFP zu überprüfen, wurden Lysat und Überstand von FVIII-GFP transfizierten Zellen mittels anti-GFP Antikörper immunopräzipitiert und immunogeblottet.

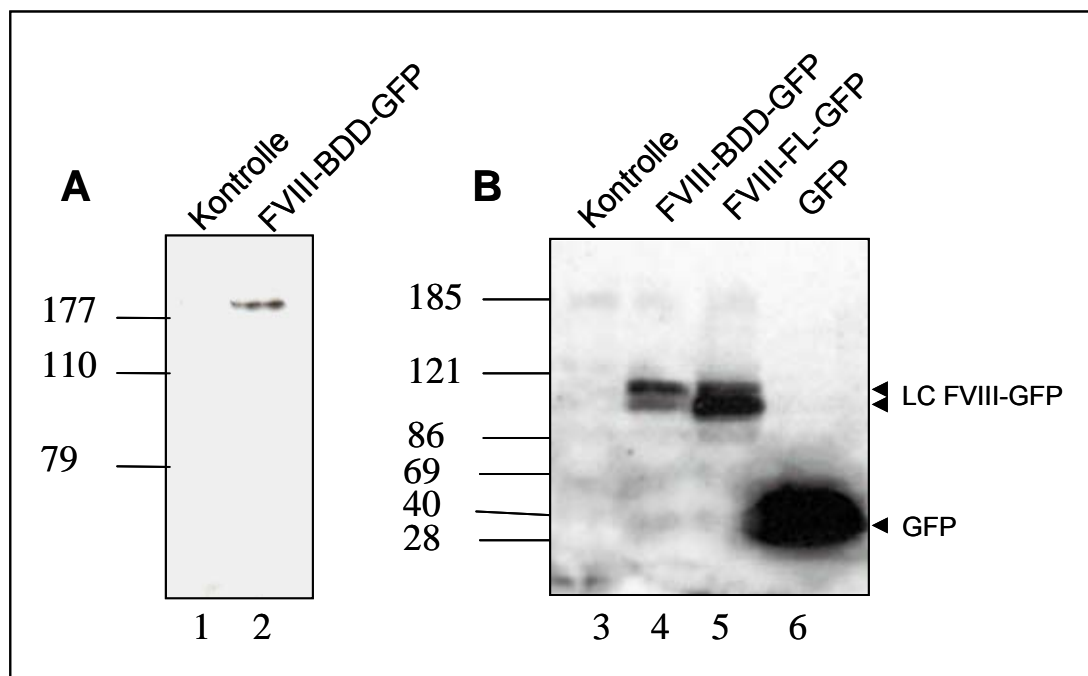


Abbildung 10: Intrazelluläre Prozessierung von FVIII-GFP

GFP-Immunpräzipitation und Westernblotdetektion mit anti-GFP Antikörper von Zelllysate (A) und Kulturüberstand (B) von FVIII-BDD-GFP transfizierten HEK293T Zellen. Als Kontrolle wurden mit Leervektor transfizierte Zellen verwendet. Spur 6 zeigt Lysat von GFP transfizierten Zellen. Der Autoradiographiefilm wurde 1 Stunde inkubiert. Die Zahlen geben die Größen des Proteinmarkers in kDa an. LC = leichte Kette.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde eine einfache 180 kDa Bande beim Lysat aus FVIII-BDD-GFP transfizierten Zellen detektiert. Diese Größe entspricht dem ungespaltenen FVIII-BDD-GFP Fusionsprotein, dass sich aus dem B-Domäne deletierten 150 kDa großen FVIII (Dorner et al. 1987) und dem GFP (27-30 kDa) (Chalfie et al. 1994) zusammensetzt.

Die Doppelbanden beim Westernblot von konzentriertem Kulturüberstand von FVIII-BDD-GFP und FVIII-FL-GFP transfizierten Zellen (Abbildung 10, Spur 4) entsprechen der zusammengesetzten Größe aus GFP und der leichten Kette von FVIII (80 kDa) (Dorner et al. 1987).

3.1.1.4 Simulation der Struktur von FVIII-GFP

In Abbildung 11A ist das derzeit aktuellste Molekülmodell des membrangebundenen FVIII/FIXa Komplexes dargestellt (Stoilova-McPhie et al. 2002). Die Struktur von FVIII wurde dabei ermittelt aus der Kristallstruktur der C2-Domäne (Pratt et al. 1999), dem Homologiemodell für die C1 Domäne und dem A-Domänenheterotrimer (letzteres basierend auf der Kristallstruktur vom Caeruloplasmin) sowie einer elektronenmikroskopischen Analyse von 2-dimensionalen Kristallen von BDD-FVIII auf einem Phospholipidmonolayer. Zu erkennen ist die Anordnung des FVIII und FIXa-Moleküls (zur besseren Darstellungen wurden die Moleküle etwas auf der horizontalen Achse voneinander entfernt) in der Position in der sie auf der Membranoberfläche aneinander binden.

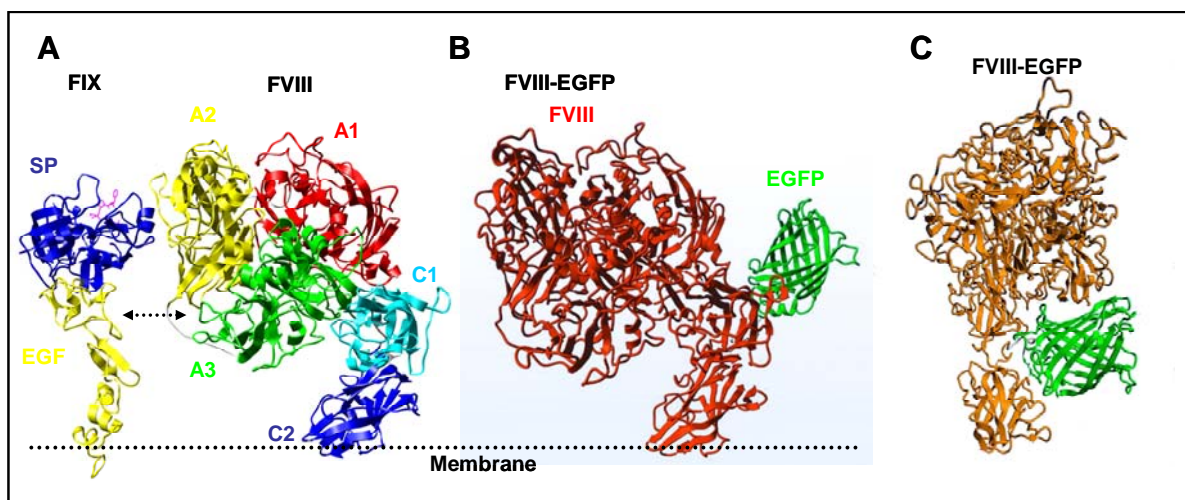


Abbildung 11: Molekülmodell des membrangebundenen FVIII/FIXa Komplex im Vergleich zum FVIII-GFP-Modell

(A:) Rechts ist das FVIII-Modell verankert in der Phospholipid-Membran (gepunktete Linie) als Bandstruktur dargestellt. Die FVIII Domänen sind in verschiedenen Farben markiert. Links ist die Kristallstruktur von porcinem FIXa, eingelassen in die Membranoberfläche mit den EGF- und den Serinprotease (SP) Domänen markiert, dargestellt. Die FVIII und FIXa-Strukturen wurden manuell mit Hilfe des Programms UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) gedockt, so dass die meisten der Interaktionsflächen in kleinstmöglicher Entfernung zueinander ausgerichtet wurden. Anschließend wurden die Proteine auf der horizontalen Ebene etwa 2 nm zwecks besserer Darstellung auseinander gezogen.

(B): Darstellung der FVIII-GFP Struktur nach Simulation mit dem Yamber2 Force Field Modell.

(C): Darstellung der FVIII-GFP Struktur nach Simulation mit dem Yamber2 Force Field Modell inklusive Coulombwechselwirkung.

Das FVIII-GFP-Modell in der Simulation ohne Coulombwechselwirkung (Abbildung 11B) ist zum Vergleich in der gleichen Ausrichtung dargestellt, wobei die C-terminale GFP-Domäne (grün) zu der, der FIXa-Interaktionsfläche entgegengesetzten, Seite ausgerichtet ist. Bei der Strukturberechnung unter Einbeziehung der weitreichenden Coulomb-Wechselwirkungen (Abbildung 11C) zeigt sich, dass sich die GFP-Domäne zwischen die C- und die A-Domänen anordnet, wodurch deren Winkel zueinander etwas vergrößert wird. Zur besseren Darstellung ist das FVIII-GFP-Modell den anderen FVIII-Modellen gegenüber um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht.

3.1.1.5 Mikroskopische Untersuchungen zum Vergleich BDD und FL Trafficking

Um das intrazelluläre Traffickingverhalten der FVIII-GFP Varianten mit dem der unfusionierten FVIII-Varianten zu vergleichen, wurden Koimmunfärbungen mit Antikörpern gegen etablierte Kompartimentmarker, die den frühen sekretorischen Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat repräsentieren, durchgeführt. Antikörper gegen Calnexin wurden verwendet um das ER darzustellen (Kaufman et al. 1997). Transportvesikel zwischen ER-exit sites (ERES) und dem Golgi-Apparat wurden mittels Antikörper gegen p26 angefärbt (Emery et al. 2000). Frühe Transportvesikel und der gesamte Golgi-Komplex wurden über Antikörper gegen eine Untereinheit des COPI lokalisiert, einem proteinreichen Vesikelhüllkomplex, der beim Abschnüren und Transport von Vesikeln hilft (Lowe et al. 1998).

Das Trafficking des FVIII-GFP nach Transfektion wurde überprüft durch Kolo-kalisation der GFP-Fluoreszenzsignale mit jedem der oben genannten immunfluoreszenzgefärbten Kompartimentmarker.

Die Immunfärbungen von den FVIII-FL-GFP und FVIII-BDD-GFP transfizierten Zellen sind vergleichbar hinsichtlich der Verteilung des Immunfluoreszenzmusters, wobei das Ausmaß an Kolo-kalisationen beim FVIII-FL-GFP Protein mit Calnexin und p26 geringer ist, als bei der B-Domäne deletierten FVIII-Variante. Nur ein geringer Anteil der FVIII-GFP-Fluoreszenz kolo-kalisiert jeweils mit der Calnexin, p26 bzw. COPI-Färbung. Die Kolo-kalisation mit COPI (Abbildung 12 unterste Reihe jeweils bei A und B) wurde erst möglich durch Akkumulation der FVIII-Varianten im intermediären Kompartiment mittels zweistündigem 15°C-Temperaturblocks, eine Bedingung, bei der bekanntermaßen sekretorische Proteine in diesem Kompartiment akkumulieren (Saraste et al. 1984; Brodsky et al. 1999).

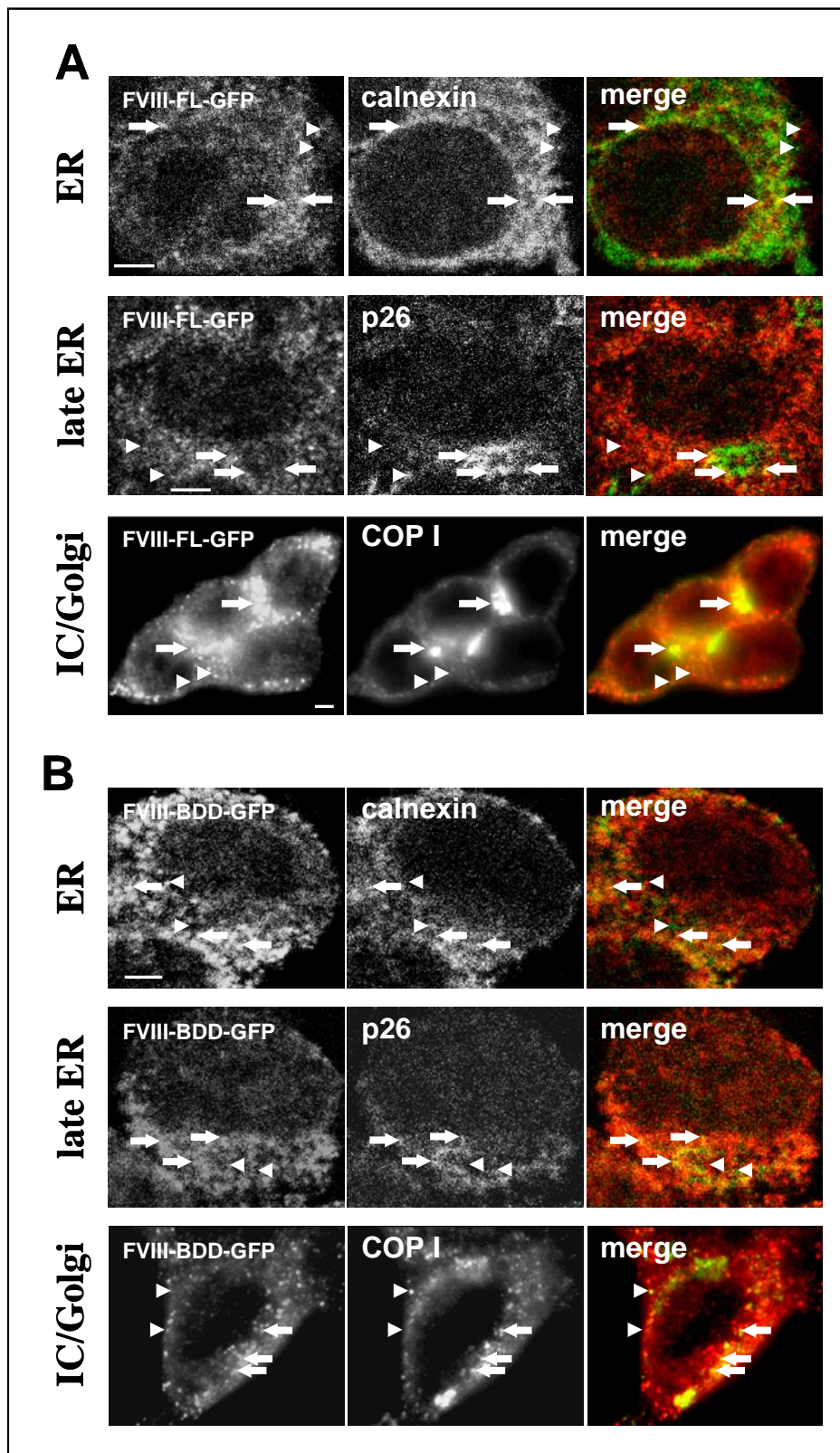


Abbildung 12: Sekretion von rekombinanten FVIII-GFP in HEK293T Zellen.

HEK293T Zellen wurden transfiziert mit FVIII-FL-GFP (A) bzw. FVIII-BDD-GFP (B) und Kolokalisation von FVIII-GFP mit Calnexin (obere Reihe), p26 (mittlere Reihe) oder COPI (untere Reihe) durch Aufnahmen der Zellen nach Färbung mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Bei den Überlappungen der einzelnen Fluoreszenzkanäle (merge) sind die Kompartimentmarker in grün, das FVIII-GFP in rot und kolokalisierende Strukturen in gelb dargestellt. Beispiele von Kolokalisationen sind gekennzeichnet mit Pfeilen, während nicht-kolokalisierende Strukturen durch Pfeilspitzen hervorgehoben sind. Größenmassstab: 5 μ m

Insbesondere bei der Färbung von FVIII-FL-GFP transfizierten HEK293T Zellen sind kernnahe Golgistrukturen sowohl mit (gelbe Strukturen) als auch ohne FVIII-GFP-Signal (grüne Strukturen) erkennbar. Bei der Aufnahme mit FVIII-BDD-GFP transfizierten Zellen sind punktartige kolokalisierende Strukturen zu erkennen, die auf COPI umhüllte FVIII-BDD-GFP transportierende vesikuläre tubuläre cluster (VTCs) zurückzuführen sind.

Der Großteil des FVIII-GFP Signals jedoch ist keinem der untersuchten Kompartimentmarker zuzuordnen.

3.1.2 Analyse des intrazellulären Trafficking von FVIII-GFP in lebenden Zellen

Um ein besseres Verständnis vom intrazellulären Transport von FVIII zu bekommen, wurde die räumliche und zeitliche Dynamik des FVIII-GFP-Transports an lebenden Zellen untersucht. In COS-1-Zellen wurde 24 Stunden nach Mikroinjektion des FVIII-BDD-GFP kodierenden Konstrukts zunächst die ER-lumenale Lokalisation im Echtzeit-Konfokalen System verifiziert. Im Gegensatz zu zytosolischem GFP (Abbildung 13 B) wurden bei den FVIII-BDD-GFP transfizierten Zellen vom ER stammende Membranen des sekretorischen Wegs angefärbt (Abbildung 13 A). Ein Teil der Zellen wies Aggregatbildung auf (Abbildung 13 C).

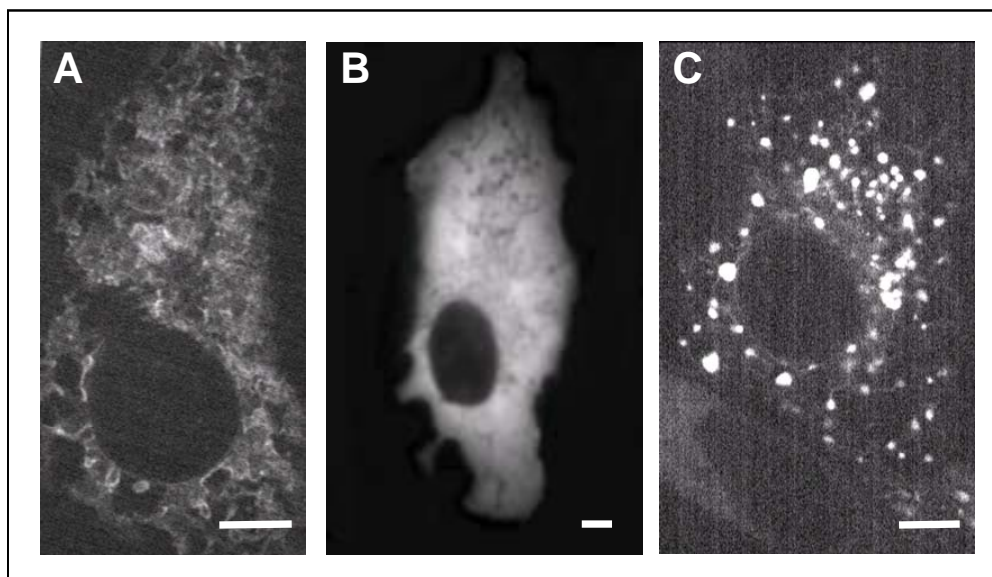


Abbildung 13: Lokalisation und Aggregatbildung des FVIII-BDD-GFP-Fusionsproteins in COS-1 Zellen

FVIII-BDD-GFP wurde nach Mikroinjektion der cDNA transient in COS-1 Zellen exprimiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch konfokale Aufnahme des GFP Signals visualisiert (A und C). Etwa 30% der Zellen wiesen statt des typischen ER-Musters (A) Aggregatbildung auf (C). Zum Vergleich wurde eine zytosolische GFP exprimierende COS-1 Zelle gegenübergestellt (B). Maßstab 10 μm .

Um den Transport des FVIII-BDD-GFP vom ERGIC zum Golgi beobachten zu können, wurde ein System gewählt, bei dem der anterograde Transport bei 15°C blockiert und durch erneutes Erwärmen der Zellen auf 37°C wieder aktiviert wird (Kuismanen et al. 1992; Blum et al. 2000).

Durch Zugabe von 100 µg / ml Cyclohexamid zur Blockierung der Proteinsynthese, sollte der intrazelluläre Transport in Form eines Pulse-Chase-Experiments leichter verfolgt werden können. Überraschenderweise blieb jedoch die FVIII-BDD-GFP-Fluoreszenz im ER über einen Zeitraum von 6 Stunden stabil (nicht dargestellt). Daher wurden die nachfolgenden Experimente ohne Cyclohexamidzugabe durchgeführt.

Zunächst war bei der 37 °C-Inkubation das ER mit der typischen netzartigen dynamischen Struktur sichtbar (Abbildung 14 A und B). Die Expression war jedoch im Vergleich zu anderen sekretorischen GFP-fusionierten Proteinen deutlich schwächer, weshalb die maximale kinetisch auswertbare Expositionszeit von 2 Sekunden gewählt werden musste. Die Expression von FVIII-FL-GFP fiel noch geringer aus (nicht dargestellt), so dass im Folgenden nur die B-Domäne deletierte FVIII-Variante verwendet wurde.

Durch Temperaturblock (15 °C, 2 Stunden) akkumuliert FVIII-BDD-GFP in ERES, zu erkennen an der punktförmigen Struktur in der Zellperipherie (Abbildung 14 C und D). Der überwiegende Anteil dieser Strukturen war statisch (Abbildung 14 D, Pfeilspitzen). Vereinzelt bewegliche Strukturen (Abbildung 14 D, Pfeil) deuten auf erste, nach Aufhebung des Temperaturblocks entstandene, Transportstrukturen hin. Um vereinzelt Bewegungen zwischen ER und Golgi sichtbar zu machen, waren deutlich längere Blockierungszeiten von über 4 Stunden nötig, als das für andere sekretorische Proteine wie etwa für das ER-Signalpeptid-GFP Konstrukt (lumenales GFP) beschrieben ist (Simpson et al. 2006). Etwa 10 Minuten nach Aufheben des Temperaturblocks waren erste vereinzelt schnelle Bewegungen von punktförmigen Strukturen über weite Entfernungen vom peripheren ERGIC, den ERES, zum perinukleären Golgi-Komplex erkennbar (Abbildung 14 E und F). In den meisten Fällen endeten die Bewegungen im Golgi-Komplex bzw. es schien, dass die vesikulären Transportträger mit den dortigen Strukturen fusionierten.

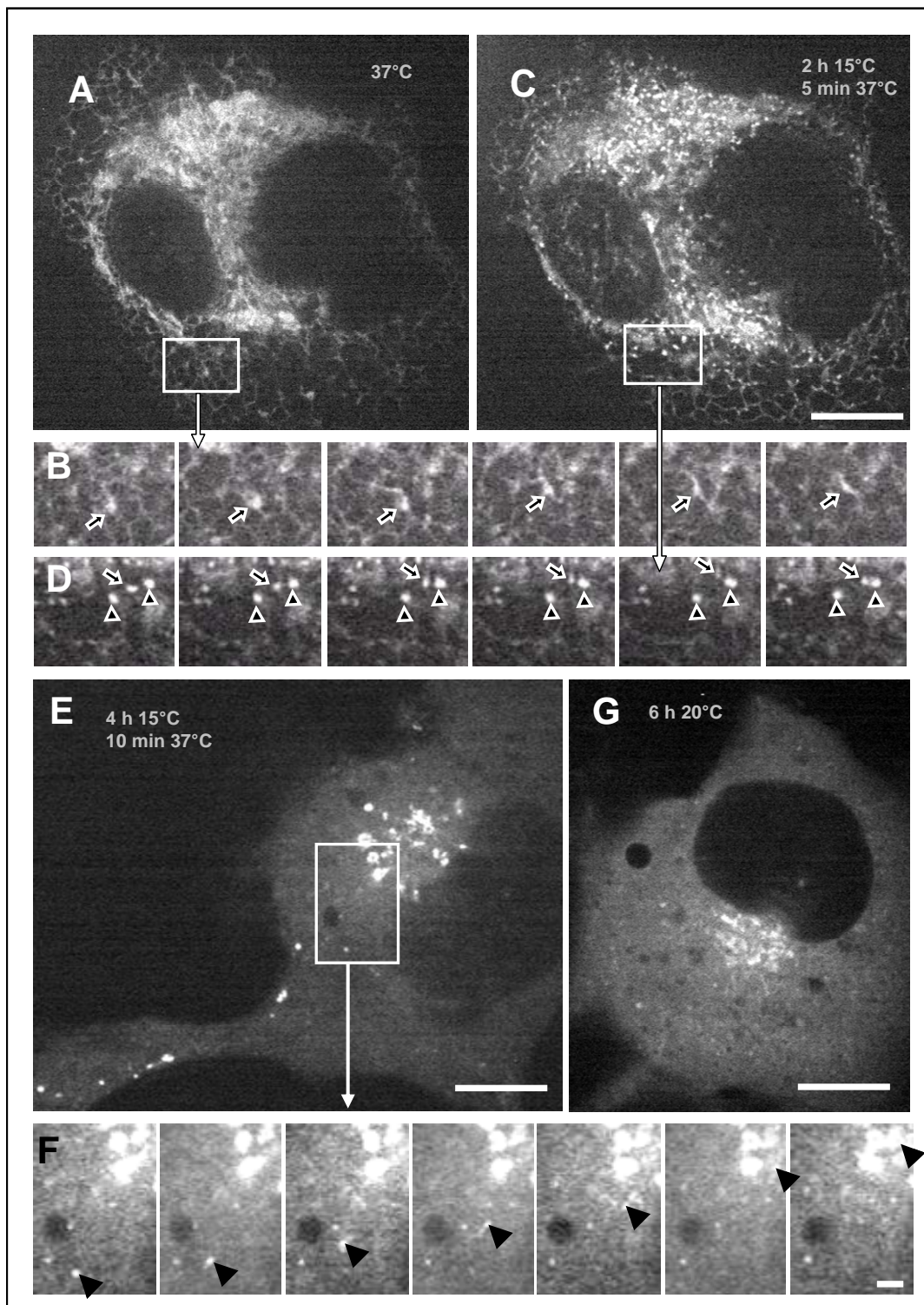


Abbildung 14: Dynamik des FVIII-BDD-GFP Traffickings in lebenden COS-1 Zellen.

FVIII-BDD-GFP wurde nach Mikroinjektion der cDNA transient in COS-1 Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen zunächst durch konfokale Aufnahme des GFP Signals visualisiert (A und B). Die in Abbildung A dargestellte Zelle wurde nach einem Temperaturblock von 2 Stunden bei 15°C erneut bei 37°C aufgenommen (C und D). Beim Ausschnitt B liegt der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Bildern bei 20 Sekunden, während die Ausschnitte in D im Abstand von 2 Sekunden aufeinander folgen. Der Pfeil im Ausschnitt B zeigt auf eine ER-Struktur zur Verdeutlichung der Dynamik. Der Pfeil im Ausschnitt D verfolgt einen beweglichen vesikulären Cluster während die Pfeilspitzen auf statische ER-exit sites (ERES) weisen. Maßstab 10 μm . (E und F) Nach einem Temperaturblock von 4 Stunden bei 15°C und anschließendem Erwärmen auf 37°C wurden nach 10 Minuten Transportbewegungen von vesikulären Strukturen vom peripheren ERGIC zum perinukleären Golgi-Komplex beobachtet. In F ist die Bewegung eines Transportvesikels durch einen Pfeilkopf hervorgehoben. Abstand zwischen den Bildern: 2 Sekunden. Maßstab 2 μm . (G) Durch Akkumulation bei 20 °C wurden perinukleäre Strukturen sichtbar. Maßstab 10 μm .

Die Bewegungen wurden gelegentlich unterbrochen und zum Teil gabelten sich die Strukturen auf und bewegten sich in unterschiedliche Richtungen weiter. In dem Beispiel von Abbildung 14 G bewegte sich eine FVIII-BDD-GFP beladene vesikuläre Transportstruktur mit einer Geschwindigkeit von 1,3 μm pro Sekunde zum Golgi-Apparat, was mit der beschriebenen Geschwindigkeit von Mikrotubuli-abhängigen Bewegungen von prä-Golgi Karriern übereinstimmt (Blum et al. 2000).

Im Vergleich zu anderen sekretorischen Proteinen waren sowohl die Anzahl der Bewegungen mit durchschnittlich 3 % aller punktförmigen Strukturen als auch die Zahl der Zellen bei denen Bewegungen beobachtet werden konnten mit 5 % relativ gering. Im Gegensatz dazu sind beim lumenalen GFP in fast allen transfizierten Zellen etwa 40 % der punktförmigen Strukturen beweglich (Simpson et al. 2006).

Auch die Akkumulation von FVIII-BDD-GFP im Golgi bzw. Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch einen 20 °C Temperaturblock (Griffiths et al. 1986) (Abbildung 14 G) war in diesem Zellsystem erst nach etwa 6 Stunden erkennbar, während dies bei anderen sekretorischen Proteinen wie etwa beim lumenalen GFP bereits nach 3 Stunden der Fall ist.

3.2 Einfluss der Inhibition verschiedener am Transport von FVIII beteiligter Proteine auf die Sekretion von FVIII

Um den Einfluss verschiedener am sekretorischen Weg beteiligter Proteine auf die Sekretion von FVIII zu untersuchen, wurden sowohl deren Expression mittels siRNA unterdrückt als auch eine natürliche MCFD2-Knockout-Zelllinie verwendet.

3.2.1 Blockierung der Expression von Transportproteinen mittels siRNA

Für die siRNA-Experimente wurden HEK293T Zellen verwendet, die stabil mit FVIII-BDD transduziert waren. Durch siRNA-Blockierung der Expression bestimmter Untereinheiten der Hüllproteinkomplexe COPI und COPII wurde deren Beitrag zum anterograden ER-Golgi Transport von FVIII-BDD untersucht. Weiterhin wurde die Expression der neu identifizierten p24-Cargo-Rezeptor Familienmitglieder p24 und p26 blockiert, von denen gezeigt wurde, dass sie mit FVIII in ERES kolokalisieren [Kapitel 3.1.1.5 und (Becker et al. 2004)]. Schließlich wurden siRNAs gegen die Clathrin Adapterproteine μ - und γ -adaptin AP-1, die einen Teil des vesikulären Transports zwischen dem Trans Golgi Netzwerk (TGN) und der Zytoplasmamembran vermitteln, verwendet.

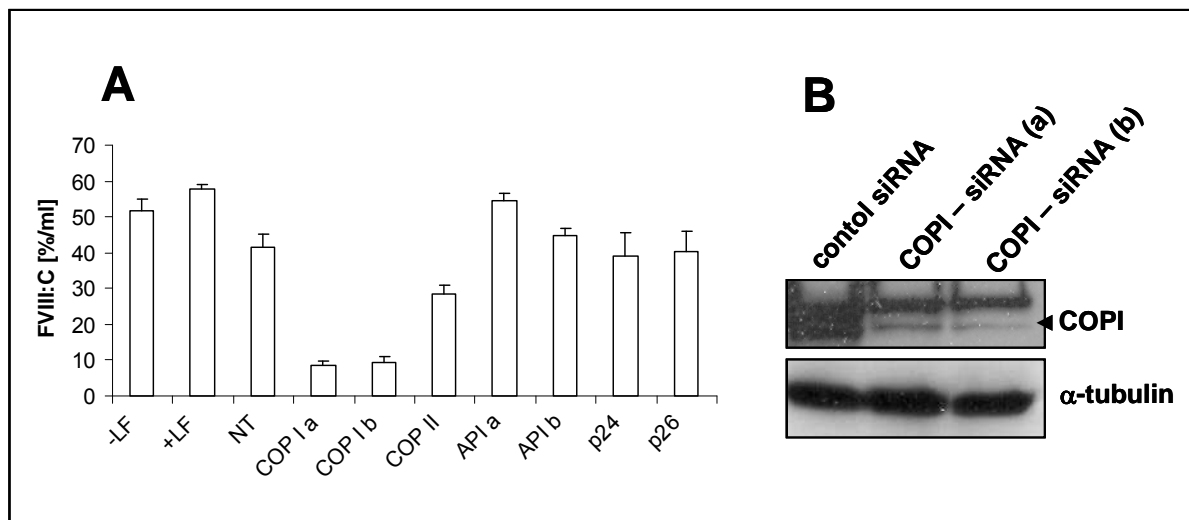


Abbildung 15: Verringerte FVIII-BDD-Sekretion durch Herunterregulierung der COPI/II Expression.

(A) Stabil transduzierte FVIII-BDD-sezernierende HEK293T-Zellen wurden transient transfiziert mit den auf der X-Achse angegebenen siRNAs. Die Menge an sezerniertem FVIII-BDD wurde 72 Stunden nach siRNA-Transfektion im Überstand mittels chromogenen Assays gemessen. Die ersten drei Balken repräsentieren die Negativkontrollen: -LF = ohne Transfektionsagens ohne siRNA; +LF = mit Transfektionsagens ohne siRNA; NT = unspezifische siRNA deren Sequenz zu keiner menschlichen mRNA komplementär ist (Non-target-siRNA); COPI a = siRNA gegen die β -COPI-Untereinheit; COPI b = siRNA gegen β' -COPI-Untereinheit; COPII = siRNA gegen Sec31; API a = siRNA gegen μ -Adaptin; API b = siRNA gegen γ -Adaptin.

(B) Westernblotanalyse der COPI Expression in COPI a und b-siRNA transfizierten HEK293T bestätigt die Herunterregulierung von COPI (untere der beide Banden). Gefärbt wurde der Blot mit anti- β COPI Antikörper. Von den gleichen Proben wurde eine Westernblotanalyse von α -Tubulin zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen durchgeführt.

Die Herunterregulierung der COPI und COPII Expression führte zu einer deutlichen Reduktion (jeweils um 78 % bzw. um 32 %) des sezernierten FVIII-BDD (Abbildung 15 A). Die Blockierung von COPI wurde mittels Westernblotanalyse nachgewiesen, bei der eine deutliche Reduktion der Intensität der COPI-Bande zu sehen ist (Abbildung 15 B, Pfeilkopf). Die obere Bande bei der COPI-Färbung ist unspezifisch. Die Blockierung der p24 bzw. p26 Expression führte nicht zu einer verringerten FVIII-Sekretion. Interessanterweise führt auch das Silencing der μ - and γ -Adaptin Expression zu keiner Reduktion der FVIII-Sekretion, so dass von einem AP-1 unabhängigen FVIII-BDD-Transport vom TGN zur Zelloberfläche auszugehen ist.

3.2.2 Rolle von MCFD2 als ER-Exit-Rezeptor zur Verpackung von FVIII

Es ist noch wenig untersucht, in wieweit MCFD2 an der Sekretion von FVIII beteiligt ist. Daher sollte der Einfluss von MCFD2 auf die Sekretion von FVIII durch Verwendung von MCFD2 defizienten Fibroblasten untersucht werden. Diese Fibroblasten stammen von einem Patienten mit kombiniertem F5/F8-Mangel bedingt durch den Defekt im MCFD2-Gen. Durch die Eine-Base-Deletion 249delT im Exon 2 entsteht 24 Basen 3' von der Deletion ein Stop-Codon, wodurch ein trunkiertes und anscheinend nicht funktionales Protein translatiert wird (Abbildung 16 A) (Zhang et al. 2003).

Nach lentiviraler Transduktion der FVIII-BDD- und FVIII-FL-Konstrukte mit einer MOI von 5 wurden keine signifikanten Unterschiede im FVIII-Sekretionsverhalten zwischen den Wildtyp und den MCFD2 defizienten Fibroblasten festgestellt ($p=0,58$ für FVIII-BDD und $p=0,69$ für FVIII-FL) (Abbildung 16 C). Die B-Domäne deletierte FVIII-Variante wurde etwa 4fach stärker exprimiert (FVIII:C: 11,2 % / ml \pm 1,9 für Wildtyp bzw. 10,4 % / ml \pm 2,6) als die Wildtypvariante (FVIII:C: 2,7 % / ml \pm 1,2 für Wildtyp bzw. 3,1 % / ml \pm 1,7). Die Expression der GFP fusionierten FVIII-Varianten zeigte das für das ER typische retikuläre Muster, wobei auch hier kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität und Verteilungsmuster zwischen Wildtyp und MCFD2 defizienten Fibroblasten festgestellt werden konnte (Abbildung 16 B). Bei gleicher Expositionsdauer war allerdings die Fluoreszenzintensität bei den FVIII-FL-GFP transduzierten Zellen etwa halb so stark ausgeprägt wie bei den FVIII-BDD-GFP transduzierten Zellen.

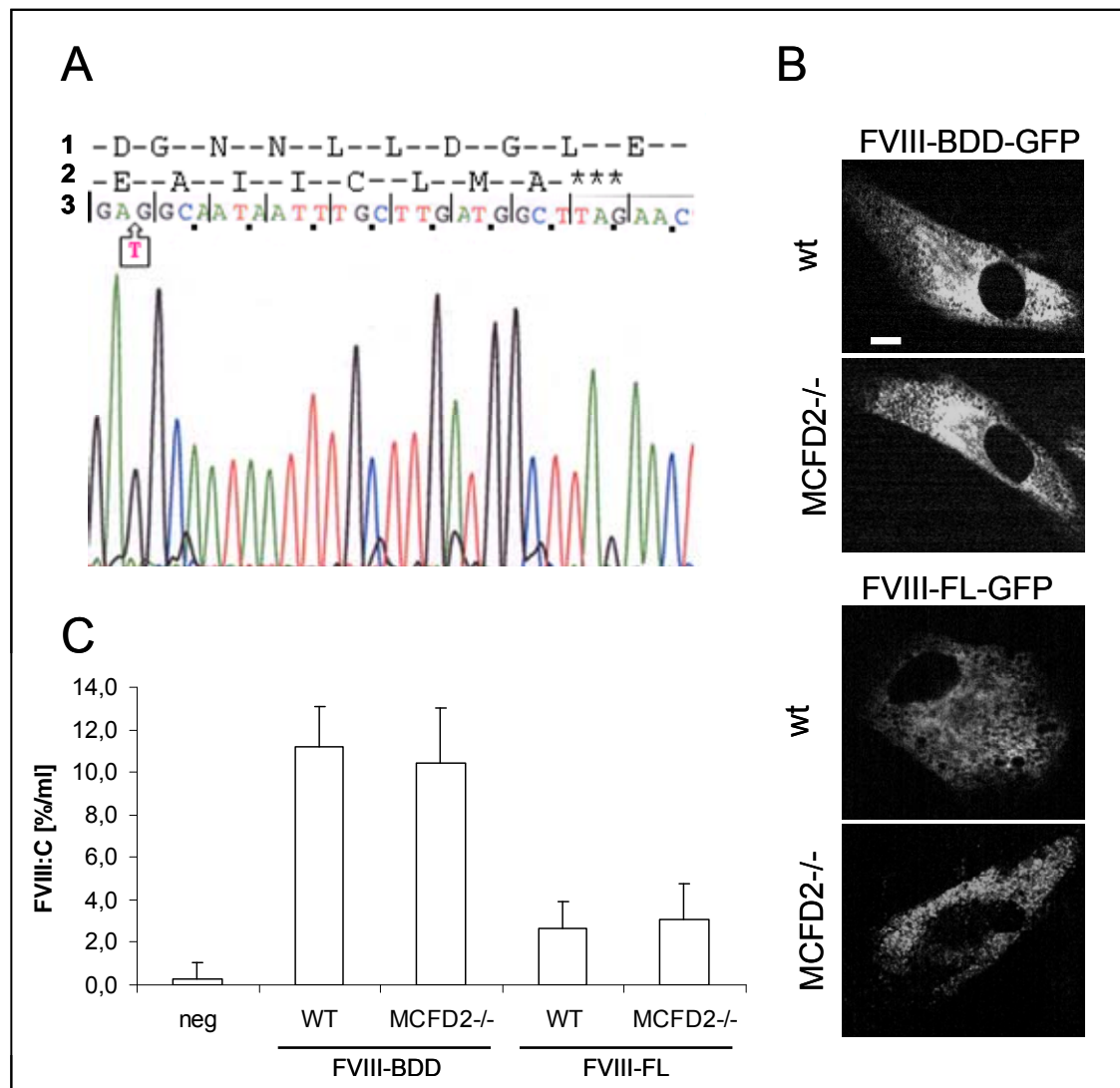


Abbildung 16: Mutation im MCFD2 Gen in Patientenzellen mit kombinierten F8/F5-Mangel führt zu keiner Veränderung in der FVIII-Sekretion.

Primäre Fibroblasten aus einer Hautstanze von einem Patienten mit kombinierten F8/F5-Mangel (freundlicherweise erhalten von Prof. Dr. Oldenburg) und zum Vergleich primäre Wildtyp-Fibroblasten (NHLF, Clonetics) wurden kultiviert und mit den lentiviralen Konstrukten FVIII-BDD, FVIII-FL, FVIII-BDD-GFP und FVIII-FL-GFP transduziert.

(A) Genomische DNA wurde aus kultivierten Patienten Fibroblasten gewonnen und sequenziert. Ausschnitt der Sequenzierung um die mutierte Region des MCFD2-Gens die zum kombinierten F8/F5-Leiden führt. (1) Wildtyp-Aminosäuresequenz; (2) mutierte Aminosäuresequenz (3); mutierte Nukleotidsequenz; der Pfeil zeigt wo ein Thymidinnukleotid deletiert ist (Exon 2, 249te Base unter der Berücksichtigung, dass die Zählung mit dem A des Translationsstartcodon bei 1 beginnt). Die Striche stellen das Leseraster der mutierten Sequenz und die Punkte das Leseraster der Wildtypsequenz dar. Die Deletion führt zu einem veränderten Leseraster ab der Aminosäure 83 mit der Folge von 7 von 8 veränderten Aminosäuren und eines nachfolgenden Translationsabbruchs (***).

(B) Konfokale Laser-Mikroskopie der mit FVIII-BDD-GFP und FVIII-FL-GFP transduzierten Wildtyp- und MCFD2 defizienten Fibroblasten. Maßstab: 10 μ M

(C) Wildtyp und MCFD2 defiziente Fibroblasten wurden mit den Konstrukten FVIII-BDD und FVIII-FL lentiviral transduziert. 72 Stunden nach Transduktion wurde die FVIII-Aktivität im Kulturüberstand mittels chromogenen Assay bestimmt. (Mittelwerte \pm Standardabweichungen; n=6).

3.3 Versuch zur Immortalisierung von endothelialen Progenitorzellen durch konstitutive Expression der aktiven Telomerase-Untereinheit.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die rekombinante Expression von FVIII ineffizient, was letztlich zu hohen Kosten der Krankenversorgung hämophiler Patienten führt. Es ist daher erstrebenswert, ein Zellsystem für *in vitro* als auch für *in vivo* Anwendungen zu finden, das eine effizientere Sekretion von FVIII ermöglicht. In der Arbeit von Herder (Herder et al. 2003) wurde ein System beschrieben, bei dem aus Nabelschnurblut ausdifferenzierte endotheliale Progenitorzellen nach lentiviraler Transduktion mit einem FVIII-BDD kodierenden Vektor hohe und stabile FVIII-Mengen sezernierten. Im Gegensatz zu den derzeit für die rekombinante Expression verwendeten ovariellen Hamsterzelllinie CHO, bieten diese Zellen den Vorteil einer physiologischeren Expression zusammen mit einer VWF-Koexpression, die als Trägerprotein im Plasma das FVIII-Protein stabilisiert. Das von den Endothelprogenitorzellen (EPCs) erreichte Niveau der FVIII-Expression von 7,0-7,8 IU / 10^6 Zellen / 48 h, wurde von den Zellen über den gesamten Kulturzeitraum bis zur Seneszenz gehalten und ist nur von wenigen anderen Studien bislang erreicht worden. Auch die kommerziell erhältlichen primären HUVEC-Zellen erzielten ein hohes Maß an FVIII-Sekretion (etwa 7,5 IU / 10^6 Zellen / 48 h). Wie alle primären somatischen Zellen unterliegen die Endothelzellen jedoch der Seneszenz und sind daher nicht direkt für eine rekombinante Expression einsetzbar. Um eine gut charakterisierte Zelllinie zu etablieren, die potentiell endlos in Kultur gehalten werden kann, ist es notwendig die Zellen zu immortalisieren. Die Immortalisierung durch Expression der Telomerase Reversen Transkriptase (TERT) ist dabei der klassischen Methode mittels viraler Transformation vorzuziehen, da die Zellen hierbei genetisch und phänotypisch stabil bleiben (Hahn 2002; Harley 2002).

Daher wurde in dieser Arbeit die aktive Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) über retrovirale Transduktion in die EPCs bzw. HUVECs eingebracht und die Zellen nach einem FACS-Anreicherungsschritt über einen längeren Zeitraum kultiviert.

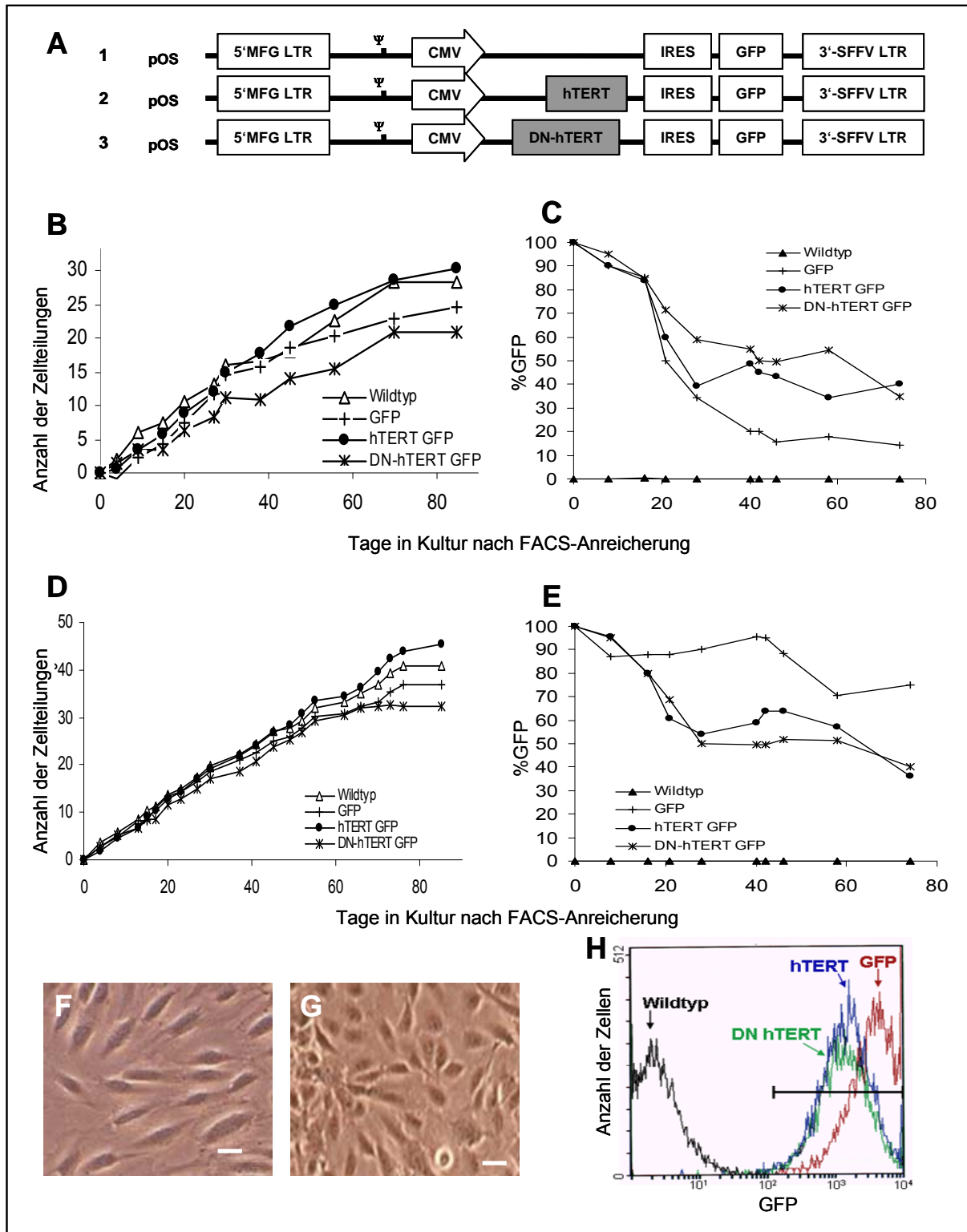


Abbildung 17: Ektopische hTERT Expression führt nicht zur Immortalisierung von EPC und HUVEC Zellen. (A) Schematische Darstellung der retroviralen Vektoren für den Immortalisierungsversuch. (1) Leervektor exprimiert nur GFP vom IRES. (2) Bicistronischer Vektor kodierend für hTERT und GFP. (3) Bicistronischer Vektor kodierend für eine dominant negative Form der hTERT und GFP. Die LTR Regionen sind aufgebaut aus U3, R und U5. Ψ = Verpackungssignal; MFG = abgeleitet von MoMuLV 5'LTR mit verkürzter Murine embryonic stem cell virus (MESV)-leader Sequenz; SFFV = Spleen focus-forming virus. EPC- (B, C, F und H) und HUVEC-Zellen (D, E und G) wurden mit jedem der Vektoren transduziert, mittels FACS auf hohe GFP Expression sortiert und als separate Kulturen passagiert. (B und D) Wachstumskurven zeigen ein vergleichbares Wachstum für EPC (B) und HUVEC-Zellen (D). (C und E) Der Anteil der mittels FACS-Analyse bestimmten GFP-exprimierenden EPC- (C) und HUVEC-Zellen (E) nimmt bei allen Konstrukten und Zellen über den Kulturzeitraum ab. (H) Eine repräsentative FACS-Analyse zeigt die Überlagerung der GFP-Messungen der mit den jeweiligen Vektoren transduzierten EPC an Tag 4 nach FACS-Sortierung. (F und G) zeigen die mikroskopische Morphologie der EPC (F) und HUVEC (G). Maßstab 50 μ m.

Wie in Abbildung 17 B und D zu sehen, wuchsen die Endothelzellen annähernd linear etwa 85 Tage lang und teilten sich in diesem Zeitraum 20-30 mal bei den EPC bzw. 30-40 mal bei den HUVEC. Bei allen Zellen kam es danach zu einem Teilungsstopp und die Zellen blieben über zwei Monate noch in Kultur ohne weitere Teilung, wonach der Versuch abgebrochen wurde. Ein erneuter Kultivierungsversuch mit allen Zellen und Konstrukten aus einer frühen eingefrorenen Charge vom Tag 8 nach FACS-Sortierung führte ebenfalls zum gleichen Ergebnis (20-25 Verdopplungen bei den EPCs und 25-35 Verdopplungen bei den HUVEC (nicht dargestellt). Die Expression wurde im gesamten Wachstumszeitraum mittels Durchflusszytometrische GFP-Messung beobachtet (Abbildung 17 C und E). Dabei war eine Abnahme der Anzahl GFP positiver Zellen von 100 % nach FACS-Sortierung bis auf 14-43 % bei transduzierten EPC bzw. 38-80 % bei HUVEC zu verzeichnen. Der Verlauf war allerdings nicht gleichmäßig sondern stieg zeitweise auch an, je nach der durch das Passagieren veränderten Zusammensetzung der Zellpopulation.

Um die Telomeraseaktivität am Ende der Wachstumsphase zu überprüfen wurden am Tag 85 nach FACS-Sortierung TRAP-Analysen von den pOS-IRES-GFP und pOS-hTERT-IRES-GFP transduzierten Zellen durchgeführt (Abbildung 18).

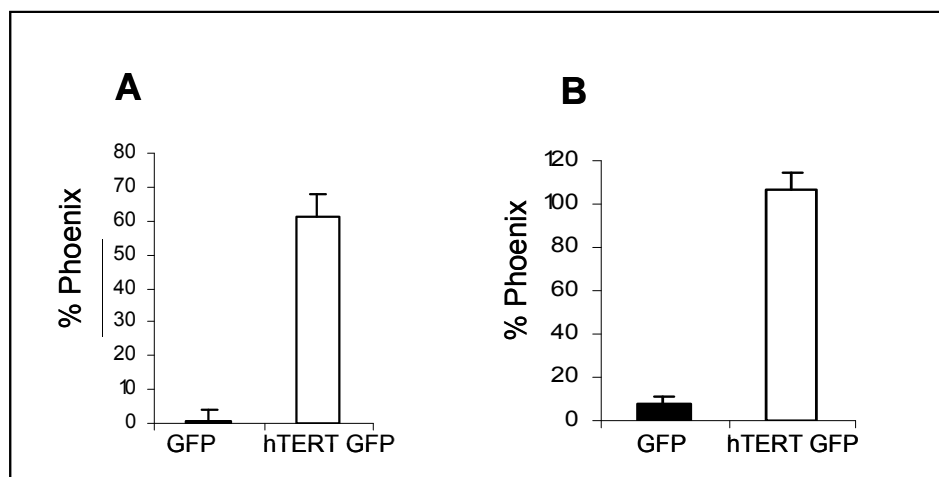


Abbildung 18: Telomeraseaktivität gemessen mittels TRAP Assay

Die Telomeraseaktivität wurde an Tag 85 nach FACS-Sortierung mittels Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) ELISApplus Assay gemessen. Die Messwerte sind im Vergleich zu Telomerase exprimierenden Phoenixzellen in % für EPC (A) und HUVEC (B) dargestellt. Während die mit dem pOS-IRES-GFP Vektor transduzierten Zellen keine bis sehr geringe Telomeraseaktivität aufwiesen, zeigten die pOS-hTERT-IRES-GFP transduzierten Zellen nahezu volle Telomeraseaktivität.

Die endogene Telomerase Aktivität bei pOS-IRES-GFP-mock-transduzierten Endothelzellen war verglichen mit der Aktivität der repräsentativen Telomerase-positiven immortalen Zelllinie Phoenix praktisch nicht vorhanden (1 ± 3 % bei EPC bzw. 8 ± 3 % bei HUVEC; $n = 3$). Dagegen führte die Transduktion mit hTERT (pOS-hTERT-IRES-GFP) zu einer Telomeraseaktivität 61 ± 7 % bei EPC bzw. 107 ± 8 % bei HUVEC-Zellen ($n = 3$).

3.4 Optimierung der FVIII-Expressionsvektoren auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene

3.4.1 Konstruktion transkriptioneller und posttranskriptioneller Elemente des FXIII A Gens zur Steigerung der hämatopoetischen Expression von FVIII

Hämatopoetische Zellen würden sich theoretisch aufgrund ihres direkten Zugangs zum Blut besonders gut für Gentherapieansätze zur Behandlung der Hämophilie A eignen. Insbesondere hämatopoetische Stammzellen besitzen ein großes Potential. Sie sind leicht durch Stammzellapharese zu gewinnen, es gibt große Erfahrungen bei der Transplantation, sie können aufgrund ihres Selbsterneuerungspotentials und der Differenzierungsfähigkeit in verschiedene hämatopoetische Linien eine dauerhafte Expression ermöglichen und Toleranzinduktion gegen das von ihnen exprimierte Transgen hervorrufen (Evans et al. 1998).

Mehrere Versuche hämatopoetische Zellen für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von Hämophilie A zu verwenden, stellten sich aufgrund der niedrigen FVIII-Expression als ineffektiv heraus. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht die Expression durch Klonieren transkriptioneller und post-transkriptioneller Elemente in FVIII-Expressionsvektoren zu steigern. Im Einzelnen wurden die 5' untranslatierte Region (5'UTR) und die Enhancerregion des FXIII A Gens, welches selektiv in Monozyten, Makrophagen und Megakaryozyten exprimiert wird, verwendet.

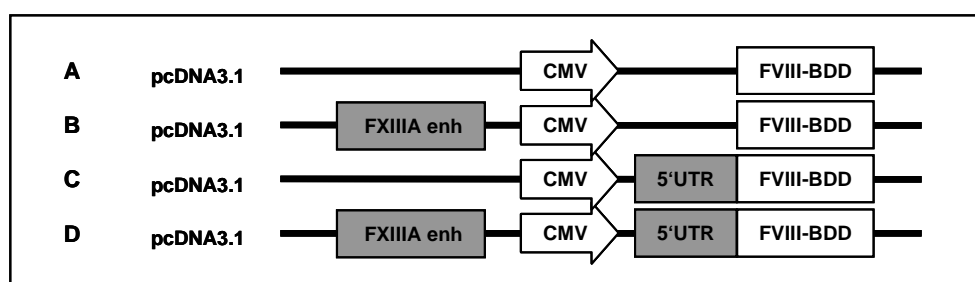


Abbildung 19: Plasmide zur hämatopoetischen Expression von FVIII.

Schematische Darstellung der auf pcDNA3.1-FVIII-BDD-kodierenden Expressionplasmide nach Einklonieren transkriptioneller Elemente. Der FXIII A-Enhancer wurde 5' vom CMV Promotor und die FXIII A-5'UTR wurde 3' vom Promotor und 5' von der kodierenden FVIII-BDD Region einkloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden nachfolgend als pcDNA-CMV (A), pcDNA-enh-CMV (B), pcDNA-CMV-5'UTR (C) und pcDNA-enh-CMV-5'UTR (D) bezeichnet.

Diese Elemente wurden einzeln und in Kombination in ein FVIII-BDD kodierendes Expressionsplasmid kloniert und nachfolgend in hämatopoetischen und nicht-

hämatopoetischen Zellen ausgetestet. Die entstandenen Plasmide sind schematisch in Abbildung 19 dargestellt.

Nachfolgend wurden die Konstrukte zunächst in der embryonalen Nierenzelllinie HEK293T ausgetestet (Abbildung 20).

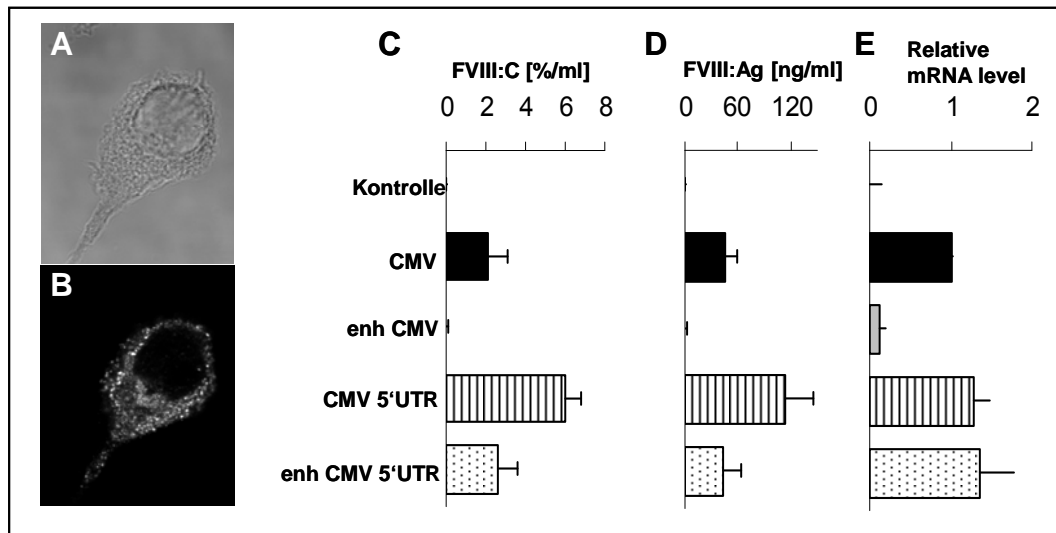


Abbildung 20: Effekte von Faktor XIII A transkriptionellen Elementen auf die Expression von Faktor VIII in HEK293T Zellen.

HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsvektoren mittels Lipofectamin2000 transient transfiziert. Die sezernierten FVIII Mengen im Kulturüberstand wurden 48 h nach Transfektion über chromogenen Assay (C) bzw. ELISA (D) bestimmt. Außerdem wurde zum gleichen Zeitpunkt aus den Zellen RNA isoliert und die mRNA-Spiegel über SybrGreen Realtime RT-PCR bestimmt (E). Die Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) von Triplikaten von sechs unabhängigen Experimenten bei den chromogenen und ELISA-Analysen und von einer quantitativen RT-PCR-Analyse dargestellt.

(A und B) repräsentative Aufnahme einer pcDNA-FVIII-BDD transfizierten Zelle in der Phasenkontrast- und konfokalen Laserscanning-Mikroskopie nach Immunfluoreszenzanfärbung von FVIII. Maßstab = 20 μ m.

Das Expressionsprofil im chromogenen Assay und ELISA stimmte von den relativen Verhältnissen überein. Mit dem ELISA wurde jedoch 10fach höhere Messwerte bestimmt, was vermutlich auf das Transfektionsreagenz zurückzuführen ist, da dieser Unterschied bei anderen Transfektionsmethoden wie etwa bei der Calciumphosphat-Methode nicht auftrat. Die Konstrukte pcDNA-CMV und pcDNA-enh-CMV-5'UTR führten zu etwa gleichen FVIII-Expressionslevel ($2,1 \pm 1,0$ % / ml gegenüber $2,6 \pm 1,0$ % / ml beim chromogenen Assay und $44,6 \pm 15,1$ ng / ml gegenüber $43,8 \pm 20,2$ ng / ml beim ELISA), während das Konstrukt mit dem FXIII A-Enhancer alleine

(pcDNA-enh-CMV) keine detektierbare FVIII-Expression zur Folge hatte ($0,1 \pm 0,0$ % / ml beim chromogenen Assay und $0,8 \pm 0,4$ ng / ml beim ELISA). Der Vektor mit der FXIII A-5'UTR alleine führte zu einer 2,8 ($6,0 \pm 0,8$ % / ml im chromogener Assay) bzw. 2,5 fachen ($112,7 \pm 32,0$ ng / ml im ELISA) Steigerung der FVIII-Expression ($p = 0,013$). Bei der Bestimmung des relativen FVIII-mRNA-Spiegels mittels Realtime-RT-PCR (Abbildung 20 E) konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den Konstrukten pcDNA-CMV, pcDNA-CMV-5'UTR und pcDNA-enh-CMV-5'UTR festgestellt werden ($p > 0,05$). Nur beim Konstrukt pcDNA-enh-CMV war eine deutliche Reduktion des mRNA-Spiegels auf etwa 13 ± 7 % des normalisierten mRNA-Spiegels des pcDNA-CMV-Konstrukts zu vermerken.

Ein relativ ähnliches Expressionsprofil konnte bei den mit den gleichen Konstrukten transfizierten K562 Zellen im chromogenen Assay beobachtet werden (Abbildung 21). Allerdings war hier eine relativ höhere Expression bei dem pcDNA-enh-CMV-Plasmid zu sehen, die etwa das gleiche Niveau wie beim pcDNA-enh-CMV-5'UTR erreichte ($3,5 \pm 0,5$ % / ml bzw. $4,4 \pm 0,2$ % / ml FVIII-Aktivität). Auch war hier der Unterschied zwischen den Konstrukten pcDNA-CMV ($9,5 \pm 0,4$ % / ml) und pcDNA-CMV-5'UTR ($11,3 \pm 3,3$ % / ml) nicht signifikant ($p = 0,458$).

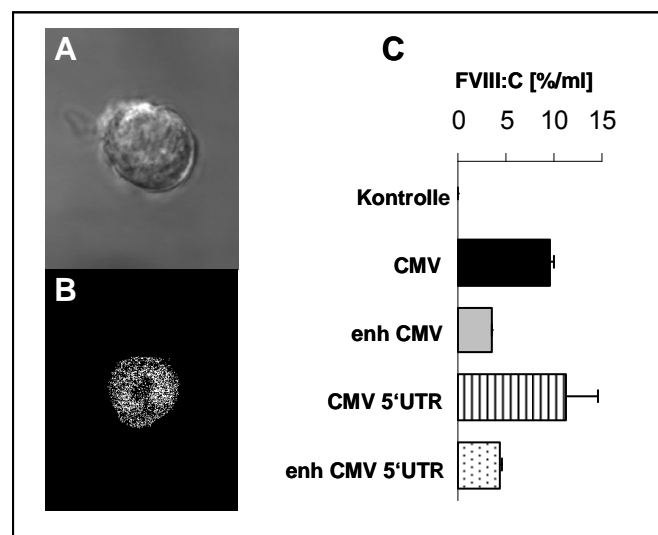


Abbildung 21: Effekte von Faktor XIII A transkriptionellen Elementen auf die Expression von Faktor VIII in K562 Zellen.

K562 Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsvektoren mittels Amaxa-Nucleofektion transient transfiziert. Die sezernierten FVIII Mengen im Kulturüberstand wurden 48 h nach Transfektion über chromogenen Assay (C) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) von Triplikaten von sechs unabhängigen Experimenten bei dargestellt. (A und B) repräsentative Aufnahme einer pcDNA-FVIII-BDD transfizierten Zelle in der Phasenkontrast- und konfokalen Laserscanning-Mikroskopie nach Immunfluoreszenzanfärbung von FVIII. Maßstab = 20 μ m.

Bei der Expression der Plasmide in primären CD14 positiven Monozyten (Abbildung 22) zeichnet sich eine deutliche relative Steigerung der FVIII-Expression beim pcDNA-5'UTR-CMV Konstrukt gegenüber allen anderen Konstrukten ab ($2,0 \pm 0,6$ % / ml), die bis zu 6fach über der des pcDNA-CMV Konstrukts ($0,4 \pm 0,2$ % / ml) liegt ($p = 0,038$). Diese Steigerung bei der FVIII-Sekretion wird noch übertroffen von dem $19,1 \pm 11,8$ fachen höheren FVIII-mRNA-Spiegel bei diesem Konstrukt.

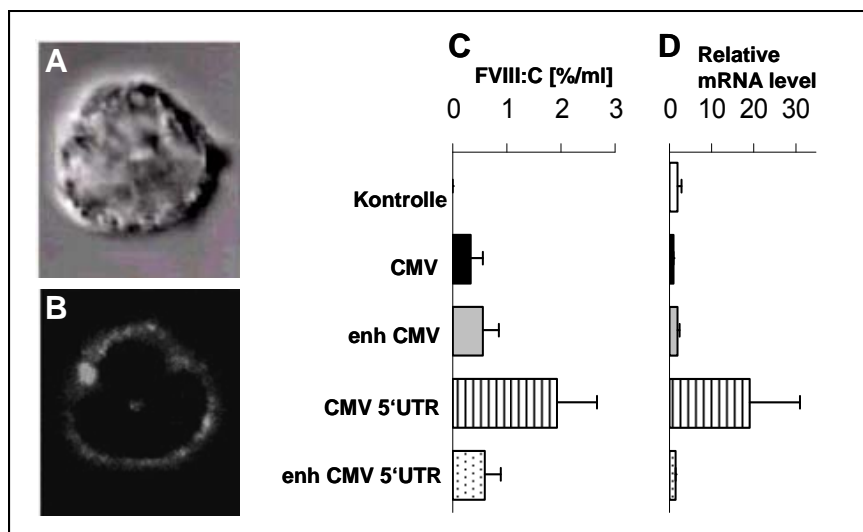


Abbildung 22: Effekte von Faktor XIII A transkriptionellen Elementen auf die Expression von Faktor VIII in primären Monozyten.

Primäre Monozyten wurden zunächst mittels CD14-MACS Selektion aufgereinigt und mit den angegebenen Expressionsvektoren mittels Amaxa Nukleofektion transient transfiziert. Die sezernierten FVIII Mengen im Kulturüberstand wurden 48 h nach Transfektion über chromogenen Assay (C) bestimmt. Außerdem wurde zum gleichen Zeitpunkt aus den Zellen RNA isoliert und die mRNA Level über SybrGreen Realtime RT-PCR bestimmt (D). Die Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) von Triplikaten von sechs unabhängigen Experimenten bei den chromogenen Analysen und von einer quantitativen RT-PCR-Analyse dargestellt.

(A und B) repräsentative Aufnahme einer pcDNA-FVIII-BDD transfizierten Zelle in der Phasenkontrast- und konfokalen Laserscanning-Mikroskopie nach Immunfluoreszenz-anfärbung von FVIII. Maßstab = 20 μ m.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FVIII-Expression bei allen Zelltypen am effizientesten nach Transfektion mit dem FXIII A-5'UTR enthaltenen Konstrukt war. Die Steigerung der FVIII-Sekretion reichte von 1,5fach bei K562 Zellen bis zum 6fachen Überschuss bei primären CD14 positiven Monozyten verglichen mit dem Ausgangskonstrukt. Die Steigerung der FVIII-Sekretion korrelierte dabei mit einem Anstieg des FVIII-mRNA-Spiegels.

3.4.2 Untersuchung des Effektes eines chimären Introns auf die Expression von FVIII

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Introns einen großen Einfluss auf den mRNA-Metabolismus haben auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus erst rudimentär verstanden ist (Le Hir et al. 2003). Nichtsdestotrotz wird das Einbringen von Intronsequenzen in cDNAs mittlerweile verstärkt verwendet um die rekombinante Expression im eukaryotischen System zu verbessern. Daher sollte auch in dieser Arbeit überprüft werden, ob das Einbringen eines Introns in das primäre FVIII-Transkript einen Einfluss auf die Expressionsstärke von FVIII hat. Hierzu wurde das chimäre Intron bestehend aus der 5'-Donorstelle des ersten Introns des humanen β -globin Gens sowie der Branchstelle und der 3'-Akzeptorstelle vom Intron einer variablen Region der IgG-Schweren Kette aus dem Expressionsvektor pCI-Neo (Promega) zwischen den CMV Promotor und der FVIII-kodierenden Region des lentiviralen pMF363-FVIII-BDD-GFP Vektors kloniert. Nach transienter Transfektion des Intron- und Ausgangskonstrukts in HEK293T Zellen wurde die FVIII-Aktivität im Kulturüberstand 48 Stunden später gemessen (Abbildung 23).

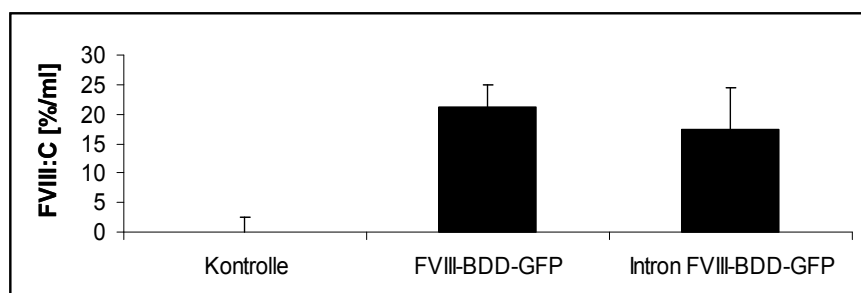


Abbildung 23: Effekte eines künstlichen Introns in der 5'UTR eines FVIII-Expressionsplasmids in HEK293T Zellen.

In den lentiviralen Vektor pMF363-FVIII-BDD-GFP wurde ein chimäres Intron aus dem β -Globin und Immunoglobulin Gen (HC-VR) zwischen CMV-Promotor und der FVIII-kodierenden Region kloniert. Der Vektor wurde im Vergleich mit dem Ausgangsvektor in HEK293T Zellen mittels Calciumphosphatmethode transient transfiziert. Die sezernierten FVIII-Mengen im Kulturüberstand wurden 48 h nach Transfektion über chromogenen Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) von Triplikaten von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Wie dem Säulendiagramm zu entnehmen ist, ändert das Vorhandensein des Introns in der 5'UTR die FVIII-Sekretion nicht signifikant ($p = 0,472$). Die Tendenz ist eher abnehmend ($21,0 \pm 4,3$ % / ml beim Ausgangsplasmid bzw. $17,5 \pm 7,4$ % / ml beim Intronkonstrukt). Nach lentiviraler Transduktion mit dem Intron-Konstrukt kommt es

zu keiner FVIII-Expression, wohingegen mit dem Basiskonstrukt ein FVIII-Spiegel von 25 % / ml / 48 h erreicht wurde (nicht dargestellt).

3.5 Die Abhängigkeit der FVIII-Expression von physiologischen Promotoren im Vergleich zum viralen CMV-Promotor

Im Hinblick auf gentherapeutische Ansätze mit integrierenden Vektoren, bietet die Verwendung von physiologischen Promotoren anstelle der häufig eingesetzten konstitutiven viralen Promotor- und Enhancerelemente den Vorteil eines geringeren pathogenen Potentials im Falle einer insertionellen Mutagenese.

Daher war es ein Anliegen dieser Arbeit verschiedene physiologische Promotoren im Hinblick auf Ihre Verwendbarkeit zur Expression von FVIII im lentiviralen System zu untersuchen. Es wurden drei physiologische Promotoren mit dem viralen CMV Promotor sowohl im Plasmid- als auch im lentiviralen System verglichen. Bei den physiologischen Promotoren handelte es sich um den ubiquitär exprimierten Elongation Factor 1- α (EF1 α)-Promotor, sowie die für lebergerichtete Expression ausgerichteten Promotoren des humanen α -1-Antitrypsin Gens (hAAT)- und schließlich der originale FVIII Promotor. Die Expression von FVIII wurde in Leberzelllinien und HEK293T bzw. CHO Zellen untersucht. Die in den nachfolgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse wurden zusammen mit Virginia Picanco erstellt.

3.5.1 Untersuchung physiologischer Promotoren im Plasmidsystem zur Expression von FVIII in HEK293T, Hepa1-6 und CHO Zelllinien

Die Expression der Plasmid-basierten in Abbildung 24 A dargestellten Vektoren zeigt ein vergleichbares Muster bei beiden menschlichen Zelllinien (HEK293T und Hepa1-6) mit je nach Promotor sehr unterschiedlichen FVIII-Spiegeln (Abbildung 24 B). Der EF1 α -Promotor bewirkte eine etwa doppelte so hohe Expression (HEK293T: $183,4 \pm 7,4$ % / ml und Hepa1-6: $132,7 \pm 2,8$ % / ml) wie die CMV-Promotor enthaltenden Plasmide (HEK293T CMV: $108,2 \pm 13,3$ % / ml und Hepa 1-6 CMV: $68,4 \pm 1,9$ % / ml bzw. HEK293T HCR-CMV: $105,4 \pm 8,6$ % / ml und Hepa 1-6 HCR-CMV: $54,7 \pm 4,3$ % / ml), während die leberspezifischen Promotoren zu einer etwa 3fach geringeren Expression als das Ausgangsplasmid führten (HEK293T hAATp: $37,5 \pm 2,7$ % / ml und Hepa1-6 hAAT: $16,5 \pm 3,5$ % / ml bzw. HEK293T FVIIIp: $33,2 \pm 2,3$ % / ml und Hepa1-6 FVIIIp: $17,2 \pm 0,8$ % / ml). Insgesamt war das Expressionsniveau bei den HEK293 etwas höher als bei den Hepa1-6 Zellen. Bei der Hamster-Zelllinie CHO

konnten kaum Unterschiede in den Expressionsniveaus der einzelnen Konstrukte festgestellt werden (21 – 37 % / ml).

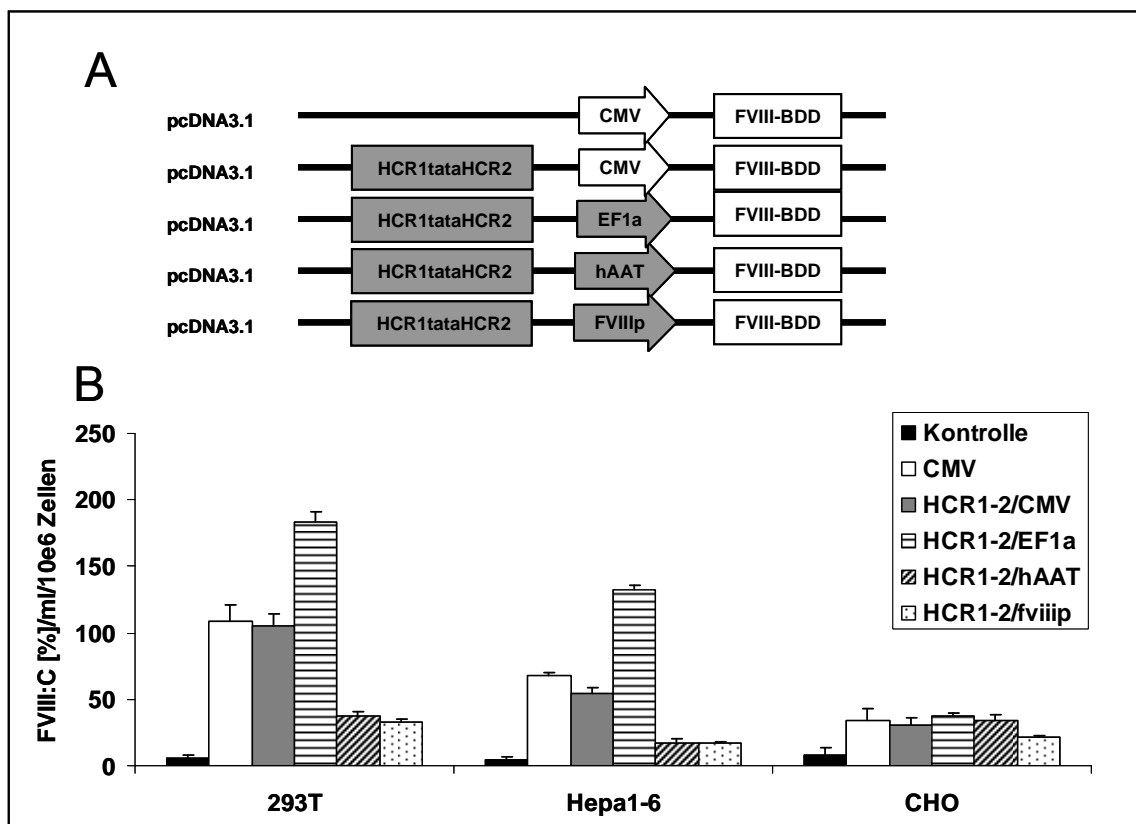


Abbildung 24: Untersuchung verschiedener Promotoren zur Expression von FVIII im Plasmidsystem

(A) Schematische Darstellung der Expressionsplasmide. HCR1tataHCR2 = Hepatic Locus Control Region mit einer TATA Box. Promotoren sind als Pfeile dargestellt.

(B) Messung der FVIII-Aktivitäten im Kulturüberstand 48 h nach transients Transfektion der angegebenen Konstrukte mittels Lipofectamin2000 in die aufgeführten Zelllinien. Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus Triplikaten dargestellt (n = 2).

3.5.2 Analyse der physiologischen Promotoren im lentiviralen System zur Expression von FVIII in HEK293T Zellen und Leberzelllinien.

3.5.3 Lentivirale FVIII-kodierende Vektoren führen zu einer effizienten und stabilen Transduktion von Leberzelllinien.

Die in dieser Studie verwendeten bicistronischen für FVIII-BDD und GFP kodierenden lentiviralen Vektoren sind in Abbildung 25 dargestellt.

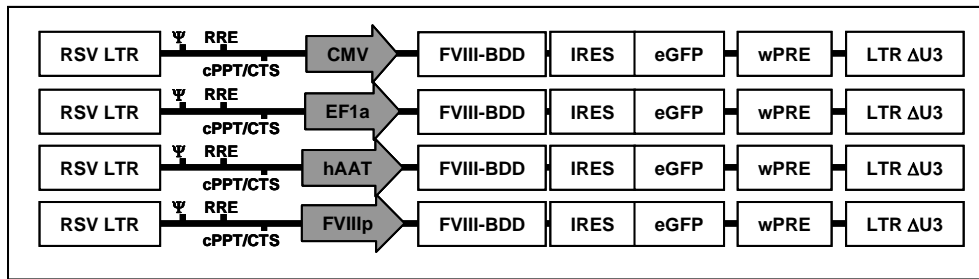


Abbildung 25: Replikations-defiziente HIV-1-basierte Vektoren mit den Promotoren CMV, EF1 α , hAAT und FVIII.

Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte, die separat für FVIII-BDD und GFP kodieren unter der Kontrolle der angegebenen Promotoren. Beim Ursprungsvektor C(FVIII-BDD)IGWS (Herder et al. 2003) wurde der CMV Promotor mit den entsprechenden anderen Promotoren ersetzt. Die hAAT und FVIII Promotoren wurden aus HKE293T DNA amplifiziert und der EF1 α Promotor wurde aus dem Plasmid pEFIRES amplifiziert.

LTR = long terminal repeat, ψ = HIV-1 Verpackungssignal, RRE = Rev responsive element, Δ LTR = Deletion in der 3'LTR zur Selbstinaktivierung des integrierenden Vektors.

Um zunächst die Effizienz der Transduktion des lentiviralen Systems zu überprüfen, wurden die Leberzelllinien und die HEK293T Zellen mit dem CMV Promotor enthaltendem Vektor (C(FVIII-BDD)IGWS transduziert und mittels FACS die Anzahl der GFP positiven Zellen 7 Tage nach Transduktion ermittelt (Abbildung 26).

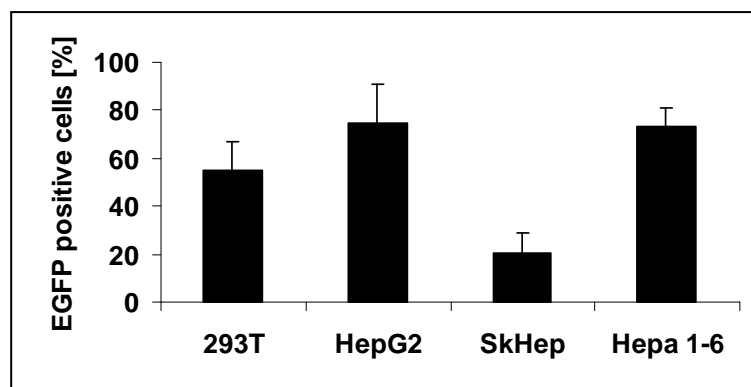


Abbildung 26: Analyse der Transduktionseffizienz des CMV Promotor enthaltenden lentiviralen Vektors in hepatischen und nicht-hepatischen Zelllinien.

FACS-Analyse der GFP Expression von HEK293T, HepG2, SkHep und Hepa1-6 Zelllinien 7 Tage nach Transduktion mit dem lentiviralen Vektor C(FVIII-BDD)IGWS, pseudotypisiert mit dem VSV-G Hüllprotein mit einer MOI von 5.

Die Transduktion war am effizientesten in HepG2 Zellen (74,7 ± 16,3 %) und Hepa1-6 (73 ± 7,8 %), gefolgt von HEK293T (54,6 ± 12%) und Sk-Hep (20,1 ± 8.9%). Der Anteil GFP-exprimierender Zellen und die mittlere GFP-Intensität blieben über den

Expansionszeitraum hinweg relativ unverändert, so dass man von einer stabilen Transduktion ausgehen kann.

Auch die FVIII-Expression ließ sich anhand der FVIII-mRNA mittels RT-PCR nachweisen (Abbildung 27). Aufgrund der gegen β -Aktin normalisierten FVIII-RT-PCR-Amplifikatintensitäten, konnten die relativen Expressionsstärken nach der jeweiligen Transduktion in den entsprechenden Zellen gemessen werden. Auffallend waren die hohen Expressionswerte bei den Sk-Hep Zellen (100, 92 und 44 % bei den entsprechenden Promotorkonstrukten CMV, EF1 α , FVIII) und die niedrigen Werte bei HepG2 (10,3 %) und Hepa1-6 (6,3 %) Zellen beim EF1 α -Promotor.

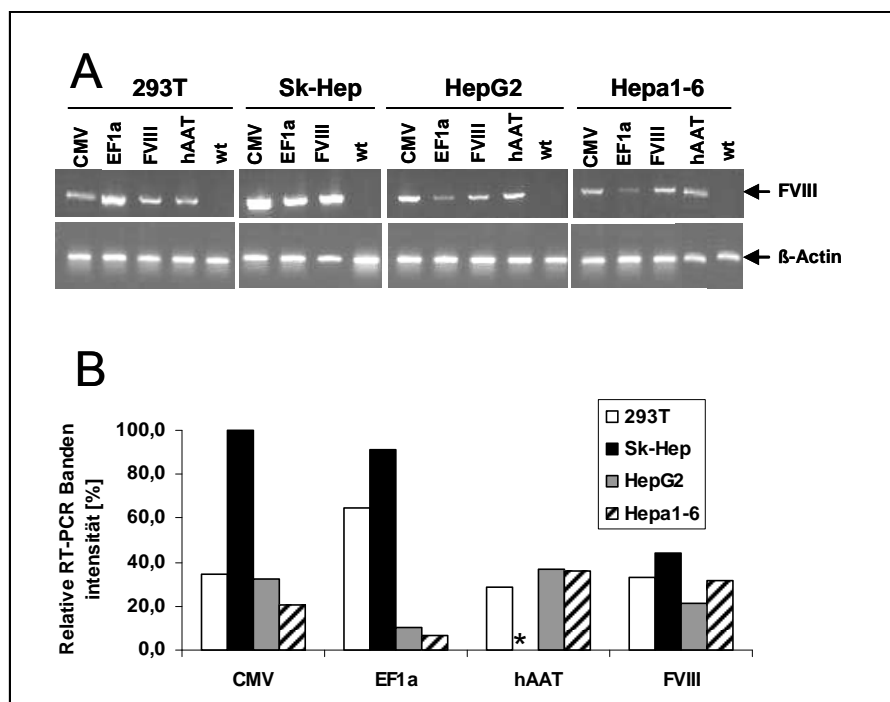


Abbildung 27: Analyse der FVIII-mRNA der transduzierten Zellen

Alle Zellen wurden mit einer MOI von 5 der jeweiligen lentiviralen Vektoren transduziert. RT-PCR wurde von gleichen Mengen an RNA 72 Stunden nach Transduktion durchgeführt, die Amplifikate in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung visualisiert (A). Zum Vergleich der RNA-Mengen, wurden die Bandenintensitäten mittels ImageJ-Programm ermittelt und gegen die β -Aktin Bandenintensität normalisiert aufgetragen (B) * = nicht bestimmt. Der höchste Wert wurde mit 100 % festgelegt.

3.5.4 FVIII ist stark exprimiert in Leberzelllinien nach FACS Anreicherung.

Um die Expressionslevel pro mittlere Vektorintegrationszahl pro Genom normalisieren zu können und um eine Zellpopulation mit hoher FVIII-Expression zu generieren, wurden die transduzierten Zellen mittels GFP-FACS sortiert. Die Zelllinien transduziert mit dem C(FVIII-BDD)IGWS-Konstrukt sezernierten FVIII

Protein, welches korrekt in schwere (90 kDa) und leichte (80 kDa) Kette gespalten wurde, mit nur einem geringen Anteil an ungespaltenen FVIII-BDD Protein (170 kDa) (Abbildung 28). Abgesehen von den kontaminierenden Banden aus dem konzentrierten Überstand, die auch in den nicht-transduzierten Kontrolle vorhanden waren, war das Muster identisch mit dem von rekombinanten FVIII (ReFacto: Spur 2) einem B-Domäne deletierten FVIII, bei dem die Deletion ähnlich derjenigen von unserem Konstrukt ist. Kein FVIII-BDD Protein konnte in konzentrierten Kulturüberständen von nicht transduzierten Zellen detektiert werden.

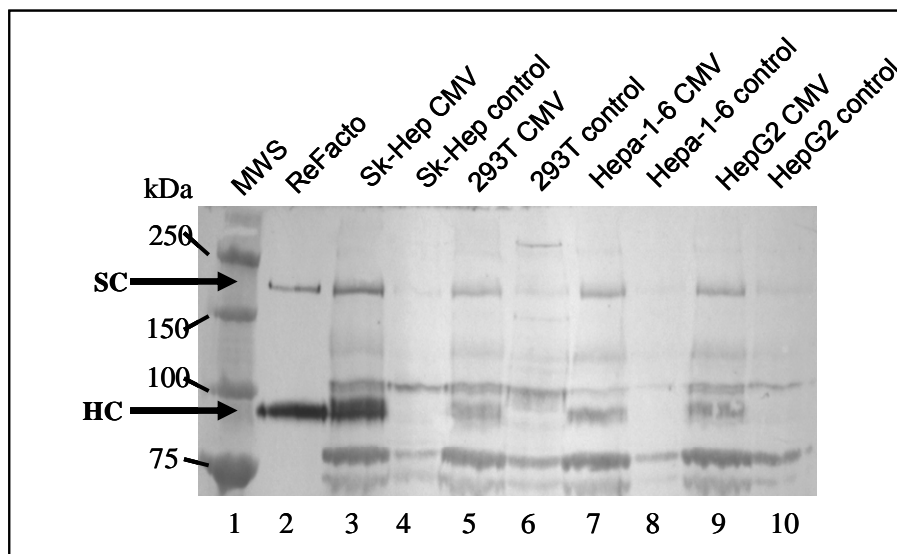


Abbildung 28: FVIII-Westernblot Analyse der FACS-angereicherten transduzierten Zellen.

Detektion des FVIII-Proteins in konzentriertem Überstand von Sk-Hep, HEK293T, Hepa 1-6, HepG2 Zellen transduziert mit dem C(FVIIIIDB)IGWS Vektor mittels Immunoblot (freundlicherweise durchgeführt von Mathias Behrmann bei Biotest). Die Proteinkonzentration pro Spur war 12 µg. Spur 1: Precision Protein Standard (250-20 kDa); Spur 2: Refacto (225 mIU FVIII); Spur 3: Sk-Hep-cPPT-C(FVIIIIDB)IGWS (3,162 mIU); Spur 4: Sk-Hep control; Spur 5: 293T-cPPT-C(FVIIIIDB)IGWS (2,796 mIU); Spur 6: 293T control; Spur 7: Hepa1-6-cPPT-C(FVIIIIDB)IGWS (1,752 mIU); Spur 8: Hepa 1-6 control; Spur 9: HepG2-cPPT-C(FVIIIIDB)IGWS (2,532 mIU); Spur 10: HepG2 Kontrolle. Färbezeit = 5 Minuten.

3.5.5 Bewertung der Promotor-Aktivität durch Messung der FVIII Expression im Verhältnis zur Anzahl der integrierten Vektorkopien.

Die FVIII-Expression der FACS GFP-angereicherten Zellpopulation wurde 48 Stunden nach Ausplattieren von 10^6 Zellen im Kulturüberstand mittels chromogenen Assays gemessen. Die Ergebnisse (Abbildung 29) zeigen ein anderes FVIII-Expressionsmuster als das der GFP Expression (Abbildung 26) bzw. der relativen RNA-Mengen (Abbildung 27). Auf die Anzahl der Zellen bezogen, waren die Effizienzen jedes Promotors und Zelllinie deutlich unterschiedlich. Der CMV

Promotor war der Stärkste (FVIII Expression $1,85 \pm 0,77$ IU/ml/ 10^6 Zellen bei HEK293T; $3,15 \pm 1,38$ bei HepG2; $5,03 \pm 0,28$ bei SK-Hep; $0,91 \pm 0,40$ bei Hepa1-6) gefolgt von dem EF1- α Promotor ($0,30 \pm 0,04$ IU/ml bei HEK293T; $0,04 \pm 0,02$ bei HepG2; $2,75 \pm 0,25$ bei SK-Hep, $0,46 \pm 0,07$ bei Hepa1-6). Wie in Abbildung 29 A gezeigt ergab die Expression mittels leberspezifischen Promotor hAAT deutlich niedrigere FVIII Expressionslevel ($0,44 \pm 0,30$ IU/ml/ 10^6 Zellen bei HEK293T; $0,10 \pm 0,03$ bei HepG2; $0,04 \pm 0,03$ bei Hepa1-6) wohingegen das FVIII-Promotor enthaltende Konstrukt ganz gute Expression in Leberzelllinien ($0,47 \pm 0,15$ IU/ml/ 10^6 Zellen bei Hepa1-6 und $0,44 \pm 0,08$ bei SK-Hep) verglichen mit der HEK293T Zelllinie ($0,20 \pm 0,09$ IU/ml/ 10^6 Zellen) zeigte.

Um zu bestimmen, ob die unterschiedlichen Expressionslevel auf die mittlere Kopiezahl des integrierten viralen Vektors zurückzuführen war, wurde in die Kopiezahl mittels quantitativer Taqman PCR von genomischer DNA durchgeführt. Die Kopiezahl der integrierten viralen Vektoren pro Genom bewegte sich von $1,0 \pm 0,7$ pro HEK293T Genom transduziert mit dem EF1 α -Promotor enthaltenden Vektor bis hin zu $68,3 \pm 7,5$ pro SK-Hep Zelle transduziert mit den FVIII-Promotor enthaltenden Vektor (Abbildung 29 B).

Es war bemerkenswert, dass mit jedem der Vektoren, HEK293T Zellen nur etwa 1 Kopie pro Genom enthielten, während die Hepatozyten viele Vektorkopien im Genom enthielten. Die relative Kopienzahl von jedem Vektor in HepG2 und Hepa1-6 Zellen waren bemerkenswert ähnlich.

Beim CMV-Promotor enthaltenden Vektor, resultierte die Transduktion in $23,5 \pm 4,2$ Kopien/HepG2 Genom und $26,4 \pm 6,1$ Kopien/Hepa1-6 Genom; beim EF1- α Promotor $3,9 \pm 5,5$ Kopien/HepG2 Genom und $2,4 \pm 3$ Kopien/Hepa1-6 Genom; beim hAAT Promotor $15,2 \pm 9,3$ Kopien/HepG2 Genom und $14,8 \pm 3,2$ Kopien/Hepa1-6 Genom; beim FVIII Promotor $8,1 \pm 5,9$ Kopien/HepG2 Genom und $9,2 \pm 0,9$ Kopien/Hepa1-6 Genom).

Bei der Berechnung des Verhältnisses von FVIII Expression pro Kopie von integrierten Vektoren kamen Ergebnisse heraus, die der Expression pro Anzahl der Zellen ähnelt (Abbildung 29 A). Eine Ausnahme davon war die hohe FVIII-Expression in HepG2 Zellen, die mit dem CMV-Promotor-Konstrukt transduziert waren ($3,15 \pm 1,38$ IU/ml/ 10^6 Zellen), was mit der relativ hohen Anzahl von Vektorkopien ($23,5 \pm 4,2$ Kopien/HepG2 Genom) zu einem niedrigen FVIII-Expression pro Kopie Verhältnis führte.

Die höchste Expression pro Anzahl der Zellen ($5,03 \pm 0,28$ IU/ml/ 10^6 Zellen) und pro Anzahl der Kopien ($68,3 \pm 7,5$) konnte bei SK-Hep Zellen beobachtet werden.

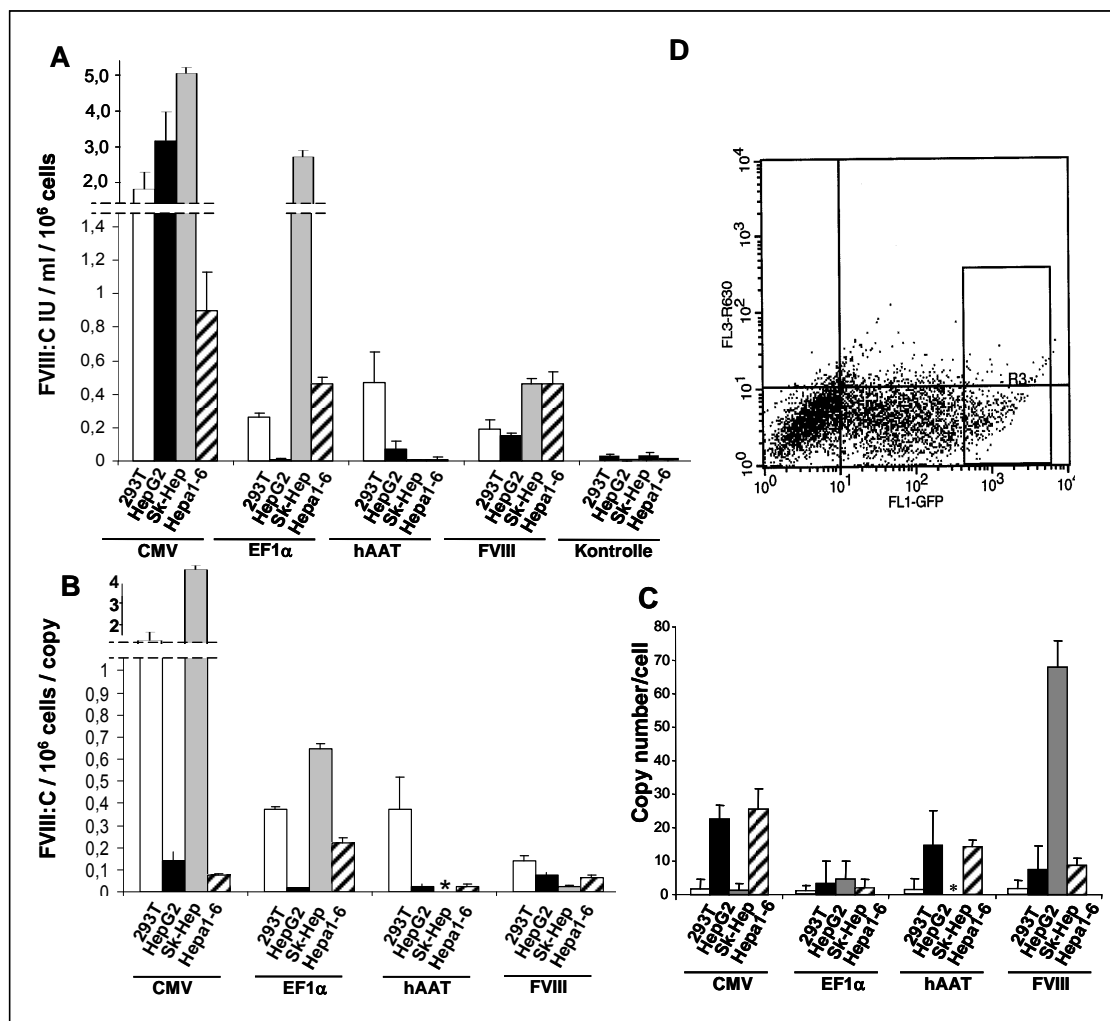


Abbildung 29: FVIII Expression in Abhängigkeit der Zellzahl und der Anzahl der lentiviralen Integrationen.

Vergleich der FVIII Expression in sortierten Leberzelllinien und HEK293T Zellen nach lentiviralen Gentransfer. Die Zellen wurden transduziert mit dem C(FVIII-BDD)IGWS Vektor mit den entsprechenden Promotoren (untere Bezeichnung auf der X-Achse).

(A) FVIII:C-Spiegel der Kulturüberstände 48 Stunden nach Ausplattieren von 10^6 Zellen gemessen mittels chromogenen Assay.

(B) Bestimmung der mittleren viralen Kopienzahl pro Genom der transduzierten Zelllinien. Realtime-PCR wurde mit gleichen Mengen genomischer DNA durchgeführt. Die Kopienzahl der lentiviralen Vektoren wurden normalisiert zu β -Aktin als interner Standard für die analysierte Genomzahlen.

(C) Effizienz der FVIII-Expression bezogen auf die virale Kopienzahl. (D) Repräsentative Aufnahme bei der FACS-Sortierung (HEK293T Zellen transduziert mit C(FVIII-BDD)IGWS). Die Zellen in Region 3 wurden aufgefangen und weiterkultiviert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass FVIII effizienter von Zellen produziert wurde, welche mit den ubiquitären Promotor-Konstrukten transduziert waren, im

Gegensatz zu denen mit leberspezifischen Promotoren. Der FVIII-Promotor-Vektor bewirkte gute FVIII-Expressionsspiegel, die in Leberzelllinien höher ($0,47 \pm 0,15$ IU/ml/ 10^6 Zellen in Hepa 1-6 und $0,44 \pm 0,08$ in SK-Hep Zellen) als in der nicht-Leberzelllinie HEK293T waren. Generell war die Höhe der FVIII-Expression abhängiger vom jeweiligen Promotor als von der Kopienzahl des integrierten Vektors.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zum Trafficking von FVIII

4.1.1 Verwendung von FVIII-GFP Fusionsproteinen zur Analyse des sekretorischen Wegs von FVIII

Seitdem erstmals versucht wurde FVIII rekombinant herzustellen, ist bekannt, dass FVIII verglichen mit anderen Proteinen vergleichbarer Größe im rekombinanten Expressionssystem 2 bis 3 Größenordnungen weniger effizient sezerniert wird (Kaufman et al. 1988b). Zum Großteil liegt dieses Problem an dem ineffizienten intrazellulären Transport im heterologen System, was möglicherweise durch die komplexe Natur des FVIII-Proteins mit seinen umfangreichen posttranslationalen Modifikationen bedingt ist. Große Unterschiede in der FVIII-Sekretionsfähigkeit verschiedener Säugerzelllinien verdeutlichen, dass der physiologische Hintergrund der Zelle mit entscheidend für die effiziente Expression von FVIII ist (Dorner et al. 1994b). Untersuchungen des intrazellulären Transportwegs von FVIII sind daher wichtig, um daraus gewonnene Erkenntnisse sowohl für eine effizientere rekombinante Herstellung von FVIII zu verwenden als auch für Hämophiliepatienten, bei denen nicht das FVIII-Protein selbst, sondern dessen intrazellulärer Transport Grund für die Erkrankung ist.

Analysen zum Trafficking von FVIII wurden dabei hauptsächlich über Pulse-Chase Experimente bzw. Koimmunopräzipitationen von FVIII-Bindungspartnern durchgeführt (Pipe et al. 1998a). Eine weitere Möglichkeit, den intrazellulären Transport zu untersuchen, stellt die direkte Visualisierung in lebenden Zellen nach Fusion von FVIII an das Reporterprotein enhanced green fluorescence protein (GFP) dar. Das GFP Molekül, isoliert aus *Aequorea victoria*, findet breite Anwendung und wird weithin akzeptiert als *in vivo* Reporter um dynamische Prozesse in Zellen oder Organismen zu untersuchen. Als Fusions-Tag wird GFP benutzt, um das daran fusionierte Protein zu lokalisieren und die Bewegungen zwischen den subzellulären Kompartimenten zu studieren (Lippincott-Schwartz et al. 2000).

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit chimäre Moleküle konstruiert, bei denen das GFP an das C-terminale Ende des FVIII fusioniert wurde.

Wie bereits in der Einleitung erörtert, ist die B-Domäne nicht für die Gerinnungsaktivität notwendig. Eine mögliche Funktion beim intrazellulären

Transport wird allerdings diskutiert. Daher wurde neben der Wildtyp- auch die B-Domäne deletierte Variante von FVIII GFP getaggt.

Die so entstandenen FVIII-GFP Varianten wurden mit den entsprechenden unfusionierten FVIII-Varianten biochemisch verglichen, um einen negativen Einfluss der GFP Domäne auf die Eigenschaften des FVIII-Moleküls auszuschließen.

Im Einzelnen wurden Immunfluoreszenzfärbung, vergleichende FVIII-Messungen und Westernblotanalysen durchgeführt.

Die vollständige Kolo-kalisation der GFP-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz der FVIII-spezifischen Antikörperfärbung, lässt vermuten, dass alle entstandenen FVIII Moleküle eine funktionale GFP-Domäne besitzen. Weiterhin zeigten Kolo-kalisationsanalysen der Wildtyp und B-Domäne deletierten FVIII-GFP Varianten mit am sekretorischen Weg beteiligten Proteinen, Calnexin, p26 und COPI ein vergleichbares Muster, wie es zuvor bereits für die unfusionierten FVIII-Varianten beschrieben wurde (Becker et al. 2004).

Bei der Westernblotanalyse war im konzentrierten Überstand lediglich die leichte Kette zu erkennen, während das FVIII-GFP intrazellulär hauptsächlich in der Einzelkettenform vorlag. Dies lässt vermuten, dass der Hauptanteil des FVIII-GFP in der Zelle in Kompartimenten, die sich sekretorisch vor dem Golgi-Apparat befinden, in unprozessierter Form vorliegt. In den Überstand wird dagegen ausschließlich in schwere und leichte Kette gespaltenes FVIII-GFP sezerniert. Die N-terminale schwere Kette konnte dabei allerdings wegen der Verwendung eines Anti-GFP-Antikörpers zur Färbung des Westernblots nicht dargestellt werden. Die leichte Kette wies anhand der charakteristischen Doppelbande auf eine in der Literatur beschriebene unterschiedliche Glykosylierung hin (Pittman et al. 1994).

Weiterhin konnten nach parallelen Transfektionen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von FVIII-FL-GFP und FVIII-FL bzw zwischen FVIII-BDD-GFP und FVIII-BDD im Hinblick auf den FVIII-Antigenspiegel und die FVIII-Aktivität erkannt werden. Auch die vergleichbare Steigerung der Expression nach Kotransfektion mit einem VWF-kodierenden Plasmid spricht dafür, dass die GFP-Domäne bei der Bindung an VWF nicht stört. Rekombinantes GFP in verschiedenen Konzentrationen stört nicht die FVIII-Aktivität.

Es scheint also, dass die GFP-Untereinheit weder Einfluss auf die Expressionstärke, noch auf die intrazelluläre Prozessierung, noch auf die Interaktionen mit seinen

Bindungspartnern VWF bzw. FIXa, FX und Phospholipide bei der Aktivierung von FX hat.

Dies ist überraschend, da die C2-Domäne von FVIII, an das das GFP C-terminal fusioniert ist, die für die Aktivität wichtige Lipidbindungsdomäne beinhaltet (Pratt et al. 1999).

Die Simulation des FVIII-GFP Moleküls zeigt zunächst ohne Einbeziehung der weitreichenden Coulombwechselwirkungen, dass der GFP-Teil sterisch weder die Bindung an FIXa noch an die Lipidmembran behindert. Unter Berücksichtigung der Coulombwechselwirkungen, bei der die Struktur ein energetisches Minimum und daher eine der optimalen Strukturen erreichen sollte, zeigt sich allerdings, dass das FVIII-GFP-Molekül im Vergleich zum FVIII leicht gebogen ist. Außerdem scheint sich der GFP-Teil in dieser Berechnung in die Lücke zwischen den 2 C-Domänen und dem A-Domänentrimer zu schieben. Demnach sollte jedoch die FIXa-Interaktionsdomäne von FVIII nach wie vor für FIXa zugänglich sein. Die Frage bleibt, ob dieses Modell die wirkliche Struktur abbildet, da bei der Interaktion mit den natürlichen Liganden der GFP-Teil aus dem A-C-Domänenzwischenraum auch herausgedrängt werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der GFP-Teil anscheinend nicht die Faltung, Prozessierung und Funktionalität des FVIII-Teils beeinflusst. Das Fusionsprotein FVIII-GFP scheint demnach für Lebend-FVIII-Lokalisationsuntersuchungen geeignet zu sein.

Erste Lebendzellbeobachtungen zeigen, dass FVIII-BDD-GFP in den Säugerzelllinien COS1, Vero und HEK293 sowie in primären Fibroblasten und Endothelzellen sich bei normalen Kulturbedingungen bei 37 °C im ER befindet. Dies erklärt auch die hauptsächlich vorhandene Einzelkettenform im Westernblot des Zelllysats, da FVIII im ER noch nicht prozessiert bzw. gespalten wird. Die Aufnahmen wurden hauptsächlich mit FVIII-BDD-GFP gemacht, da die Fluoreszenzintensität beim FVIII-FL-GFP deutlich geringer war. FVIII-FL-GFP transfizierte Zellen zeigten aber ein vergleichbares ER-Muster.

Die Mobilität des FVIII im ER scheint dabei vergleichbar zu anderen lumenalen ER-Proteinen zu sein. Immobilisierungen, die nach Inhibition von Chaperonen bei anderen GFP fusionierten sekretorischen Proteinen auftreten (Nehls et al. 2000), konnten bei FVIII-GFP nicht beobachtet werden.

Dagegen wurden vereinzelt Zellen mit FVIII-GFP-Aggregaten beobachtet. Dies ist möglicherweise durch die unterschiedlichen Expressionsniveaus nach Mikroinjektion

der Plasmidvektoren bedingt. Dass es bei der FVIII-Expression zur Ausbildung von Aggregaten kommt, wurde bereits biochemisch nachgewiesen (Plantier et al. 2005). Durch Temperaturblock bei 15 °C akkumuliert FVIII-GFP, wie das für alle bislang mit diesem Verfahren untersuchten sekretorischen Protein beobachtet wurde, in sogenannten ER-exit-sites (ERES) (Kuismanen et al. 1992; Blum et al. 2000). Diese Strukturen sind statisch und bewegen sich nicht mit der dynamischer ER-Struktur mit. Bei FVIII-GFP ist allerdings Dauer, die für diese Akkumulation in den ERES nötig ist, deutlich länger und dieses Verhalten zeigen auch nicht alle transfizierte Zellen. Transportbewegung zwischen ER und Golgi nach Aufhebung des 15 °C Temperaturblocks waren im Vergleich zu anderen sekretorischen Proteinen äußerst selten zu sehen (Simpson et al. 2006). Diese Aufnahmen zeigen erstmalig, dass FVIII in vesikulären tubulären Clustern transportiert werden. Ein reiner Vesikeltransport über die mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisierten 60 nm-sekretorischen Vesikel ist ausgeschlossen, da diese Strukturen zu klein für die lichtmikroskopische Auflösung sind und mit dieser Technik nicht beobachtet werden können.

Weiterhin dauert eine Akkumulation im Golgi durch 20 °C Temperaturblock deutlich länger als bei anderen sekretorischen Proteinen beobachtet wurde (Blum et al. 2000). Das FVIII nach Cyclohexamidzugabe selbst nach 6 Stunden noch hauptsächlich im ER zu beobachten ist, deutet daraufhin, dass FVIII nur sehr langsam in den sekretorischen Weg eintritt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Lebendzellanalysen darauf hin, dass FVIII-GFP im Vergleich zu anderen GFP-getaggten sekretorischen Proteinen deutlich schlechter aus dem ER transportiert wird. Das Hauptproblem am Transport von FVIII liegt daher vermutlich am Faltungsprozess im ER und nicht am nachfolgenden Transport.

4.1.2 Einfluss verschiedener Transportproteine auf die Sekretion von FVIII

Wie in der Einleitung erwähnt, wurden bereits einige am Transport von FVIII beteiligten Proteine über Koimmunopräzipitationsanalysen untersucht (Kaufman et al. 1988b).

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die Expression einiger an der Sekretion beteiligter Proteine blockiert wurde bzw. nicht vorhanden war, und anschließend der daraus resultierende Effekt auf die FVIII-Sekretion untersucht.

Verglichen mit Kontrollzellen, führte die Herunterregulierung der COPI-Expression über einen Zeitraum von 72 Stunden zu einer dramatischen um 78 % verminderten

FVIII-Sekretion. Im Gegensatz dazu, führte das siRNA-Silencing von COPII zu einer Reduktion der FVIII-Sekretion um 32 %. Daher kann vermutet werden, dass nicht nur COPII am anterograden Transport zwischen ER und Golgi beteiligt ist, sondern auch und evt. sogar noch im stärkeren Maße COPI.

Entgegen der klassischen Sichtweise einer ausschließlichen Beteiligung am retrograden Transport (Aridor et al. 1995), steht dies im Einklang mit neueren Hinweisen auf teilweise COPI-vermittelten anterograden Transport (Richards et al. 2002; Stauber et al. 2006). Allerdings ist natürlich nicht ausgeschlossen dass ein Teil dieses Effektes dadurch bedingt ist, dass wegen Blockierung des COPI vermittelten retrograden Transports, der anterograde Transport wegen mangelndem Rücktransport von Membranen und ER-Retentionsproteinen in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Weiterhin ist auffällig dass die Blockierung der bislang einzigen für die Ausschleusung vom Golgiapparat zur Zytoplasmamembran charakterisierten Clathrin Adapterproteine μ - und γ -adaptin AP-1 nicht zu einer Verminderung der FVIII-Sekretion führt. Es muss daher weitere am sekretorischen Transgolgi-Transport beteiligte Hüllproteine geben (Seaman et al. 1996).

Wie in der Einleitung beschrieben, ist seit kurzem durch genetische Untersuchung an Patienten mit kombiniertem FV/FVIII-Mangel die Beteiligung von MCFD2 und LMAN1 an der Ausschleusung von FVIII aus dem ER entdeckt worden. Es wird vermutet, dass MCFD2 als Adapterprotein FVIII an den membranständigen ER-Exit-Rezeptor rekrutiert, der dann schließlich FVIII in Vesikel für den Transport zum Golgi-Apparat verpackt.

Bei den Untersuchungen an MCFD2 defizienten Fibroblasten in dieser Arbeit konnten allerdings beim Vergleich mit Wildtyp-Fibroblasten kein Effekt des Fehlens von MCFD2 auf die Sekretion von FVIII festgestellt werden. Allerdings war die Expression von FVIII-FL nahe am Detektionslimit, so dass Effekte in diesem System nur schwer nachweisbar sind. Der fehlende Effekt bei der B-Domäne deletierten FVIII-Variante könnte ein Hinweis auf die mögliche Funktion der B-Domäne bei der Rekrutierung durch MCFD2 sein, was bereits aufgrund von Cross-Linking-Immunopräzipitationsversuchen postuliert wurde (Zhang et al. 2005). Dies kann jedoch wegen der Messungenauigkeit beim FVIII-FL in diesem System nicht überprüft werden.

4.2 Endothelprogenitorzellen lassen sich durch hTERT-Transduktion alleine nicht immortalisieren

Bei diesem Ansatz wurde versucht, durch heterologe Expression von hTERT Endothelzellen zu immortalisieren, mit dem Ziel eine stabile Zelllinie mit hohem FVIII-Sekretionspotential zu generieren. Die über den Zellkulturzeitraum verfolgte GFP-Expression sowie die Telomerase-Aktivitätsmessungen bestätigten die erfolgreiche Transduktionen und Expression der hTERT. Trotz Berichten, denen zufolge mit diesem Ansatz primäre Zellen erfolgreich immortalisiert werden konnten (Price et al. 2004), traten die Zellen bis zu 30 bei EPC bzw. 50 Teilungen bei HUVEC nach Transduktion in die Seneszens ein. Dies stimmt in etwa mit der maximalen Teilungsfähigkeit von somatischen Zellen überein. Die Zellen konnten in dem sich nicht mehr teilenden Zustand noch über 2 Monate in Kultur gehalten werden, bevor der Versuch abgebrochen wurde. Suboptimale Kulturbedingungen als Grund für den Seneszenseintritt waren nicht wahrscheinlich, da eine erneute Kultur von einem frühen eingefrorenen Zustand aus die gleichen Ergebnisse lieferte. Als mögliche Ursache könnte eine nicht funktionelle ektopische Telomerase-Aktivität vorliegen. Dies würde bedeuten, dass die Telomerase zwar im TRAP-Assay Aktivität zeigt, in den Endothelzellen aber nicht an ihrem Substrat, den Telomeren, wirken kann und somit die Telomere trotzdem kürzer werden.

4.3 Optimierung der FVIII-Expressionsvektoren durch Verwendung einer 5'-untranslatierten Region

Mehrere Versuche hämatopoetische Zellen für Gentherapieansätze der Hämophilie A zu verwenden, stellten sich aufgrund von niedrigen FVIII-Expressionsspiegeln als ineffizient heraus. Erst kürzlich konnten zwei Studien physiologische FVIII-Expressionspiegel in FVIII-Knockout Mäusen durch Verwendung eines caninen und eines sekretionsverbesserten humanen FVIII-Moleküls erreichen, von denen bekannt ist, dass sie einige Male effektiver als humaner FVIII exprimiert werden (Moayeri et al. 2005b; Gangadharan et al. 2006b).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Einklonieren einer 5'UTR des FXIII A-Gens zwischen CMV-Promoter und der cDNA des humanen FVIII die Expression von FVIII in hämatopoetischen Zellen und HEK293T-Zellen signifikant steigert. In CD14⁺ Monozyten konnte eine 6fach höhere Expression beobachtet werden. Untranslatierten Regionen können den nukleären Export, die zytoplasmatische Lokalisation, die Stabilität und die Effizienz der Translation der

mRNA verändern. Der vorliegende Mechanismus, der zu der Steigerung der FVIII-Expression ist nicht bekannt. Es wurde aber festgestellt, dass dieser Effekt je nach Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt ist und dass in allen untersuchten Fällen die über Realtime-RT-PCR-Analysen ermittelte mRNA-Menge erhöht war. Der Effekt könnte also zumindest teilweise auf eine erhöhte Stabilität der mRNA zurückzuführen sein.

Die Verwendung des FXIIIA-enhancer Elements führte alleine und in Kombination mit der 5'UTR zu einer reduzierten bis gleichbleibenden FVIII-Expression im Vergleich zum Ausgangsvektor. FXIIIA wird unter anderem in Monozyten, Makrophagen und Megakaryozyten exprimiert (Henriksson et al. 1985; Weisberg et al. 1987). Daher wäre es nahe liegend, wenn die Verwendung des FXIIIA-Enhancers in Monozyten zu einer Steigerung der FVIII-Expression führen würde. Allerdings wurden die Untersuchungen, die zur Identifikation der Enhancerregion führten, an MEG-01 Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie wurde aus einer megakaryoblastischen Leukämie gewonnen, die möglicherweise andere genregulatorische Proteine hinsichtlich der FXIIIA-Enhanceraktivität als primäre Monozyten aufweist. Aufgrund der vielfältigen Kombinationen der zahlreichen genregulatorischen Proteine die je nach Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt sind, ist es nicht möglich die Wirkungsweise von neu kombinierten transkriptionellen Elementen vorherzusagen.

Eine weitere Möglichkeit der Expressionssteigerung von FVIII, liegt in der Insertion von Introns in die FVIII-cDNA. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression rekombinanter Proteine von der genomischen DNA höher ist, als von der cDNA (Gross et al. 1987; Huang et al. 1990). Dies ist für FVIII aufgrund der Größe des Genlocus nicht durchführbar, aber die Insertion einiger kurzer Intronsequenzen aus dem FIX-Locus in die FVIII-cDNA führte bereits zu deutlich gesteigerten FVIII-Ausbeuten (Plantier et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendbarkeit eines chimären Introns bestehend aus Intronelementen des humanen β -Globingens und einer variablen Region des Gens der IgG-schweren Kette auf die Expression von FVIII untersucht. Das Intron wurde dabei 5' vor der FVIII-cDNA einkloniert um den Einfluß von möglichen kryptischen 5'-Donorspleißstellen innerhalb der FVIII-Sequenz zu verhindern.

Dabei zeigte sich allerdings keine Expressionsverbesserung gegenüber dem Ausgangskonstrukt. Dies verdeutlicht, dass es einmal von der Position aber auch vom Transgen abhängt, in wie weit ein Intron zur Expressionssteigerung beiträgt. In der Arbeit von Plantier (Plantier et al. 2001) waren große Variationen der FVIII-

Expression je nach Insertionsstelle festzustellen. In vielen anderen Untersuchungen konnten bei gleichem Intron und gleicher Intronposition deutliche Unterschiede in der Expression in Abhängigkeit der verwendeten cDNA festgestellt werden. Wurde der lentivirale Vektor zur stabilen Integration verwendet, war die Expression sogar deutlich niedriger, was auf mögliche Interferenzen mit den im lentiviralen Vektor enthaltenen Donor- und Akzeptorspleißstellen hinweist.

4.4 Verwendung von physiologischen Promotoren für Gentherapievektoren

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt eine Strategie zur Vermeidung des Risikos einer durch retroviraler Integration hervorgerufenen Mutation die Verwendung von physiologischen bzw. Originalpromotoren dar. Dadurch ließe sich die Interaktion mit benachbarten Promotoren der Integrationsstelle anders als bei den bislang häufig verwendeten konstitutiven viralen Promotoren wie etwa dem CMV-Promoter vermeiden.

Daher wurden in dieser Arbeit die leberspezifischen hAAT und FVIII Promotoren sowie der ubiquitär exprimierte EF1alpha Promoter mit dem viralen CMV-Promoter im lentiviralen FVIII kodierendem System verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die physiologischen Promotoren fähig waren, FVIII in Leberzelllinien und in HEK293T Zellen zu exprimieren. Wie zu erwarten war der CMV-Promoter am stärksten gefolgt vom EF1alpha, hAAT und FVIII Promoter.

Auffällig war, dass die leberspezifischen Promotoren der Gene FVIII und hAAT ebenso aktiv in der nicht-hepatischen Zelllinie HEK293T waren. Für das hAAT Gen ist allerdings auch extrahepatische Expression in Monozyten, Makrophagen, intestinalen epithelialen Zellen und respiratorischen Epithelzellen nachgewiesen worden (Perlmutter et al. 1985; Molmenti et al. 1993). Außerdem könnte durch die Trunkierung der Promotorfragmente die Zelltypspezifität eingeschränkt worden sein. So gibt es Hinweise, dass ein trunkierter hAAT Promotor in einer Leberzelllinie gleichermaßen aktiv, wie in den nicht-hepatischen Zelllinien NIH3T3, HeLa und HEK293T ist (Okuyama et al. 1996; Nash et al. 2004).

Die Aktivität des FVIII-Promoters in der HEK293T Zelllinie könnte zu einem Teil daran liegen, dass das FVIII-Gen neben der Leber auch in der Niere, Milz und in Lymphknoten exprimiert wird (Wion et al. 1985).

Die transkriptionelle Aktivität vom minimalen FVIII und hAAT Promotor ist wahrscheinlich vom Vorhandensein des hepatocyte nuclear factor HNF1 α abhängig und wird verstärkt durch das Fehlen von der homologen Isoform HNF1 β (Mendel et

al. 1991; McGlynn et al. 1996). HNF1 α ist überwiegend in Hepatozyten zu finden und scheint für die hohe Expression von FVIII und hAAT in der Leber verantwortlich zu sein. Dieser Faktor fehlt allerdings in dedifferenzierten Leberzelllinien (Rey-Campos et al. 1991) woraus sich die geringen FVIII-Expressionsspiegel erklären lassen.

Weiterhin wurde bei diesen Versuchen herausgefunden, dass die FVIII-Expressionsspiegel stärker vom Promotor als von der Anzahl der Kopien des integrierten Vektors abhängen. Die Verhältnisse der FVIII-Expression pro Kopiezahl von integriertem Vektor waren vergleichbar mit der FVIII-Expression pro Zellzahl, so dass die Anzahl der Integrationen anscheinend kaum Einfluss auf die Expression hat. Daten von lentiviralen Transduktionen lassen vermuten, dass die Transgenexpression linear mit der Anzahl der Kopien bis zu einer Kopienzahl von 4 ansteigt. Bei höheren Kopienzahlen, wie in der vorliegenden Arbeit vorhanden, gibt es keine lineare Tendenz mehr, wobei auch weitere Kopien nicht notwendigerweise eine höhere Expression zur Folge haben (Follenzi et al. 2000; Persons et al. 2003; Zielske et al. 2004).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die physiologischen Promotoren der Gene EF1 α und FVIII im lentiviralen System FVIII-Expressionsspiegel in Leberzelllinien erzielen, die einer physiologischen Expression für FVIII entsprechen würden. So konnte bei dem Vektor mit dem minimalen FVIII-Promoter in Hepa1-6 Zellen etwa 0,5 IU/ml FVIII /10⁶ Zellen in einem Volumen von 10 ml exprimiert werden. Umgerechnet würde man also $2,5 \times 10^7$ transduzierte Leberzellen benötigen um einen physiologischen FVIII-Blutspiegel von 1 IU/ml zu erreichen, eine verglichen mit der Leberzellzahl geringe Anzahl.

Obwohl diese Ergebnisse viel versprechend sind, ist bei Schlüssen von *in vitro* Untersuchungen auf die *in vivo* Situation Vorsicht angebracht. Zelllinien spiegeln möglicherweise nicht den physiologischen Hintergrund von hepatischen und nicht-hepatischen primären Zellen bzw. Geweben wider. Die Konstellation der Transkriptionsfaktoren einer sich teilenden Leberzelllinie wird vermutlich eine andere sein, als die von ruhenden Hepatozyten *in vivo*.

4.5 Ausblick

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Transportanalysen im Lebzellsystem, konnten erstmals Erkenntnisse über die Dynamik des intrazellulären FVIII-Transports gewonnen werden. Das hier etablierte System stellt die Grundlage für vielfältige Forschungsmöglichkeiten in Bezug auf rekombinante FVIII Expression und gentherapeutische Fragestellungen.

Das in dieser Arbeit aufgebaute System, den Einfluss der Blockierung von Transportproteinen auf die Sekretion von FVIII zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf den sekretorischen Weg von FVIII zu erhalten, lässt sich auf weitere Kandidatenproteine erweitern. Durch Überexpression bzw. Blockierung am FVIII-Transport beteiligter Proteine, ließe sich das Zellsystem hinsichtlich einer effizienteren FVIII-Sekretion verbessern.

Mit Hilfe der konstruierten und getesteten FVIII-GFP Fusionsproteine ist es nun möglich, den intrazellulären FVIII-Transport auch im Hinblick auf Einflüsse von Medikamenten auf die FVIII-Sekretion besser zu charakterisieren und mögliche Angriffspunkte für eine Verbesserung der FVIII-Herstellung zu identifizieren.

Zudem ist es von großer Bedeutung, die FVIII-Expression bei *in vivo* Gentherapiestudien zu lokalisieren. Die FVIII-GFP Proteine bieten hierfür deutliche Vorteile gegenüber der bestehenden schwierigen FVIII-Nachweismethodik.

Außerdem ist es mit diesem System möglich die Kinetik und den Beitrag von FVIII an der Thrombusbildung mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie nach Laser induzierter Gefäßläsion zu erforschen, wie dies bereits für andere Gerinnungsfaktoren gezeigt wurde.

Nicht zuletzt könnten gegen FVIII gerichtete B- und T-Zellen spezifisch über FVIII-GFP durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Hierüber ließe sich die bei der Therapie der Hämophilie A große Probleme bereitende FVIII-Inhibitorbildung näher erforschen.

Endothelprogenitor- und HUVEC-Zellen konnten durch Transduktion von hTERT alleine nicht immortalisiert werden. Eine Koexpression von hTERT zusammen mit anderen Immortalisierungsgenen wie etwa bmi-1 könnte zur Etablierung einer Endothelzelllinie mit einer stabilen, effizienten und physiologischen FVIII-Expression führen.

Die Untersuchungen der physiologischen Promotoren im lentiviralen Vektorsystem deuten darauf hin, dass sich der FVIII-Minimalpromoter für lebergerichtete FVIII-Expression eignet. Außerdem könnte seine Verwendung zur Risikominimierung

zukünftiger Hämophilie A Gentherapiestudien beitragen, da das Risiko der Tumorentstehung durch Promoterinteraktion mit der viralen Integrationsstelle benachbarten Onkogene bzw. der Immunantwort durch ektopische Expression in Antigen-präsentierenden Zellen durch die Verwendung des physiologischen Promoters vermindert wird.

Schließlich wurde bei der Untersuchung der FXIIIa-transkriptionellen Elemente die 5'UTR als geeignetes Element zur Expressionssteigerung von FVIII identifiziert. Dies stellt einen deutlichen Fortschritt sowohl für die bislang unter der niedrigen humanen FVIII-Expression leidenden hämatopoetischen Gentherapieansätze, als auch für die rekombinante FVIII-Herstellung in Zellkultur dar.

Zusammenfassung

Der Mangel von Faktor VIII (FVIII) führt zur häufigsten Gerinnungsstörung, der Hämophilie A. Die rekombinante Expression von FVIII für gentherapeutische Ansätze oder zur Herstellung von FVIII ist zwei bis drei Größenordnungen niedriger verglichen mit anderen Proteinen vergleichbarer Größe. Die Ursachen für die geringe Expression liegen zum großen Teil an der ineffizienten Transkription und dem ineffizientem intrazellulären Transport.

(1) Im Rahmen der Untersuchung der FVIII-Sekretion, konnte durch Verwendung von FVIII-GFP Fusionsproteinen zum ersten Mal gezeigt werden, wie FVIII in lebenden Zellen transportiert wird. Außerdem wurde anhand von vergleichenden Immunfluoreszenzfärbungen, FVIII-Messungen und Westernblotanalysen demonstriert, dass weder bei der B-Domäne deletierten noch bei der Vollängenvariante signifikante Unterschiede zwischen den GFP-fusionierten und Wildtyp-FVIII-Varianten messbar waren. Offensichtlich wird die Funktionalität von FVIII durch die C-terminal fusionierte GFP-Domäne nicht eingeschränkt. In ersten Lebendzellanalysen konnte gezeigt werden, dass sich FVIII in primären Zellen und Zelllinien hauptsächlich im ER befindet und eine für lumenale ER-Proteine charakteristischen Mobilität aufweist. Beim frühen sekretorischen Transport zeigte sich bei Temperaturblock-Experimenten eine verlängerte Dauer der Akkumulation in ER-Exit-Sites und eine vergleichsweise niedrige Frequenz von ER-Golgi-Bewegungen. Es konnte zum ersten Mal der Nachweis von FVIII-Transport durch vesikuläre tubuläre Cluster erbracht werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der möglicherweise durch Faltungsprobleme blockierte Austritt aus dem ER das Hauptproblem des ineffizienten FVIII-Transports zu sein scheint und weniger der intrazelluläre Transport an sich.

Mittels siRNA-Silencing wurde außerdem die überwiegende Beteiligung von COPI am intrazellulären Transport von FVIII deutlich, dessen Herunterregulierung zu einer 78 prozentigen Reduktion der FVIII-Sekretion im Gegensatz zu 32 Prozent bei COPII führte. Dagegen konnte durch Herunterregulierung der Expression der p24-Cargo-Rezeptor Familienmitglieder p24 und p26 und der Clathrin Adapterproteine μ - und γ -Adaptin bzw. durch physiologischen Knock-out im Falle von ER-Exit-Rezeptor MCFD2 kein Einfluß auf die FVIII-Sekretion festgestellt werden.

(2) Als Alternative zu dem ineffizienten FVIII-Expressionssystem in unphysiologischen Zelllinien, bieten primäre Endothelzellen den Vorteil einer hocheffizienten FVIII-Sekretion. Zur Verwendung bei der rekombinanten Produktion benötigt man allerdings eine kontinuierlich wachsende gut charakterisierte Zelllinie. Zur Immortalisierung wurden aus Nabelschnurblut gewonnene Endothelprogenitorzellen mit der aktiven Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) transduziert. Trotz erfolgreicher Transduktion und langfristiger Expression von hTERT, welche im TRAP-Assay normale Aktivität zeigte, gingen die Zellen nach der natürlichen Teilungsspanne in die Seneszenz über. Möglicherweise wird noch ein weiteres Immortalisierungsgen benötigt oder hTERT ist durch die ektopische Expression in diesen Endothelzellen nicht funktionell.

(3) Der Einsatz hämatopoetischer Stammzellen für gentherapeutische Ansätze zur Expression von humanen FVIII ist bislang aufgrund niedriger Expressionseffizienz der Vektoren limitiert. Es wurden daher die Kombinationen verschiedener transkriptioneller und posttranskriptioneller Elemente in FVIII-Expressionsvektoren ausgetestet. Hierbei zeigte sich, dass die Verwendung einer 5' untranslatierten Region (5'UTR) des hämatopoetisch exprimierten FXIII-A-Gens die FVIII-Sekretion in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen deutlich steigerte. Am stärksten war die Wirkung in primären Monozyten, in denen die FVIII-Expression den 6fachen Wert im Vergleich zum Ursprungsvektor ohne 5'UTR erreichte.

Leberzellen stellen weitere attraktive Zielzellen für gentherapeutische Ansätze dar, da Sie den primären physiologischen Ort der FVIII-Synthese darstellen. Die häufig für Gentherapievektoren verwendeten ubiquitär exprimierenden viralen Promotoren bewirken zwar hohe Expression in den transduzierten Zellen, haben allerdings den Nachteil durch ektopische Expression vermehrt Immunantworten auszulösen und durch starke Interaktion mit benachbarten Promotoren der Integrationsstelle im Genom möglicherweise tumorgene Effekte zu verursachen. Bei der Untersuchung verschiedener physiologischer Promotoren im Vergleich zum viralen CMV Promotor in Leberzellen konnte mit dem zum ersten mal getesteten minimalen FVIII-Promoter in einem lentiviralen Vektor der dritten Generation in Leberzelllinien eine vergleichsweise hohe Expression von 0,5 IU/ml FVIII /10⁶ Zellen erzielt werden.

Der FVIII-Promoter ist daher geeignet für eine lebergerichtete Expression und minimiert dabei das potentielle Risiko der häufig verwendeten ubiquitären viralen Promotoren.

Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., A. Fogel, et al. (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." Nature **282**(5739): 615-6.
- Adjali, O., G. Marodon, et al. (2005). "In vivo correction of ZAP-70 immunodeficiency by intrathymic gene transfer." J Clin Invest **115**(8): 2287-95.
- An, W. and A. Telesnitsky (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 transductive recombination can occur frequently and in proportion to polyadenylation signal readthrough." J Virol **78**(7): 3419-28.
- Antonarakis, S. E. (1998). "Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A." Haemophilia **4 Suppl 2**: 1-11.
- Aridor, M., S. I. Bannykh, et al. (1995). "Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport." J Cell Biol **131**(4): 875-93.
- Arunachalam, B. and P. Cresswell (1995). "Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin." J Biol Chem **270**(6): 2784-90.
- Bank, A., R. Dorazio, et al. (2005). "A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia." Ann N Y Acad Sci **1054**: 308-16.
- Baum, C. and B. Fehse (2003). "Mutagenesis by retroviral transgene insertion: risk assessment and potential alternatives." Curr Opin Mol Ther **5**(5): 458-62.
- Baum, C., O. Kustikova, et al. (2006). "Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors." Hum Gene Ther **17**(3): 253-63.
- Baum, C., C. von Kalle, et al. (2004). "Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences." Mol Ther **9**(1): 5-13.
- Becker, S., J. C. Simpson, et al. (2004). "Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells." Thromb Haemost **92**(1): 23-35.
- Berntorp, E. (1997). "Second generation, B-domain deleted recombinant factor VIII." Thromb Haemost **78**(1): 256-60.
- Bester, A. C., M. Schwartz, et al. (2006). "Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy." Gene Ther **13**(13): 1057-9.
- Bihoreau, N., S. Pin, et al. (1993). "Metal identification in human anti-hemophilia A factor (factor VIII)." C R Acad Sci III **316**(5): 536-9.
- Blum, R., D. J. Stephens, et al. (2000). "Luminal targeted GFP, used as a marker of soluble cargo, visualises rapid ERGIC to Golgi traffic by a tubulo-vesicular network." J Cell Sci **113 (Pt 18)**: 3151-9.
- Bohn, R. L., L. M. Aledort, et al. (2004). "The economic impact of factor VIII inhibitors in patients with haemophilia." Haemophilia **10**(1): 63-8.
- Bontempo, F. A., J. H. Lewis, et al. (1987). "Liver transplantation in hemophilia A." Blood **69**(6): 1721-4.
- Bowen, D. J. (2002). "Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights." Mol Pathol **55**(2): 127-44.

- Brackmann, H. H., E. Effenberger, et al. (2000). "NovoSeven in immune tolerance therapy." Blood Coagul Fibrinolysis **11 Suppl 1**: S39-44.
- Brandstetter, H., M. Bauer, et al. (1995). "X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9796-800.
- Brenner, M. K. (1996). "Gene transfer to hematopoietic cells." N Engl J Med **335**(5): 337-9.
- Brodsky, J. L. and A. A. McCracken (1999). "ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 507-13.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.
- Chen, C., X. D. Fang, et al. (1999). "The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines." Thromb Res **95**(2): 105-15.
- Chuah, M. K., T. Vandendriessche, et al. (1995). Development and analysis of retroviral vectors expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A. Hum Gene Ther. **6**: 1363-77.
- Colowick, A. B., R. L. Bohn, et al. (2000). "Immune tolerance induction in hemophilia patients with inhibitors: costly can be cheaper." Blood **96**(5): 1698-702.
- Cunningham, M. A., S. W. Pipe, et al. (2003). "LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII." J Thromb Haemost **1**(11): 2360-7.
- Darlington, G. J., H. P. Bernhard, et al. (1980). "Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells." J Natl Cancer Inst **64**(4): 809-19.
- Dave, U. P., N. A. Jenkins, et al. (2004). "Gene therapy insertional mutagenesis insights." Science **303**(5656): 333.
- De Palma, M., E. Montini, et al. (2005). "Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells." Blood **105**(6): 2307-15.
- Delorme, M. A., P. C. Adams, et al. (1990). "Orthotopic liver transplantation in a patient with combined hemophilia A and B." Am J Hematol **33**(2): 136-8.
- DiMichele, D. and E. J. Neufeld (1998). "Hemophilia. A new approach to an old disease." Hematol Oncol Clin North Am **12**(6): 1315-44.
- Doering, C. B., J. F. Healey, et al. (2002). "High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII." J Biol Chem **277**(41): 38345-9.
- Donath, M. S., P. J. Lenting, et al. (1995). "The role of cleavage of the light chain at positions Arg1689 or Arg1721 in subunit interaction and activation of human blood coagulation factor VIII." J Biol Chem **270**(8): 3648-55.
- Dorner, A. J., D. G. Bole, et al. (1987). "The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins." J Cell Biol **105**(6 Pt 1): 2665-74.
- Dorner, A. J. and R. J. Kaufman (1994a). The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. Biologicals. **22**: 103-12.

- Dorner, A. J. and R. J. Kaufman (1994b). "The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins." Biologicals **22**(2): 103-12.
- DuBridge, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.
- Dyer, M. R. and P. L. Herrling (2000). "Progress and potential for gene-based medicines." Mol Ther **1**(3): 213-24.
- Eaton, D., H. Rodriguez, et al. (1986). "Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity." Biochemistry **25**(2): 505-12.
- Ehrenforth, S., W. Kreuz, et al. (1992). "Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs." Lancet **339**(8793): 594-8.
- Emery, G., M. Rojo, et al. (2000). "Coupled transport of p24 family members." J Cell Sci **113** (Pt **13**): 2507-16.
- Espana, F., P. Medina, et al. (2005). "The multifunctional protein C system." Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents **3**(2): 119-31.
- Evans, G. L. and R. A. Morgan (1998). "Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model for hemophilia A." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5734-9.
- Evatt, B. L. (2002). "Observations from Global Survey 2001: an emerging database for progress." Haemophilia **8**(2): 153-6.
- Fairman, M. P. and B. Stillman (1988). "Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro." Embo J **7**(4): 1211-8.
- Fakharzadeh, S. S. and H. H. Kazazian, Jr. (2000). "Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in hemophilia A." Semin Thromb Hemost **26**(2): 167-71.
- Fallaux, F. J., R. C. Hoeben, et al. (1996). The human clotting factor VIII cDNA contains an autonomously replicating sequence consensus- and matrix attachment region-like sequence that binds a nuclear factor, represses heterologous gene expression, and mediates the transcriptional effects of sodium butyrate. Mol Cell Biol. **16**: 4264-72.
- Farrugia, A. (2002). "Evolving perspectives in product safety for haemophilia." Haemophilia **8**(3): 236-43.
- Fay, P. J. (1999). "Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase." Thromb Haemost **82**(2): 193-200.
- Fischer, A., S. H. Abina, et al. (2004). "LMO2 and gene therapy for severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **350**(24): 2526-7; author reply 2526-7.
- Fogh, J., J. M. Fogh, et al. (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-6.
- Follenzi, A., L. E. Ailles, et al. (2000). "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences." Nat Genet **25**(2): 217-22.

- Follenzi, A., M. Battaglia, et al. (2004). "Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice." Blood **103**(10): 3700-9.
- Follenzi, A. and L. Naldini (2002a). "Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors." Methods Enzymol **346**: 454-65.
- Follenzi, A. and L. Naldini (2002b). "HIV-based vectors. Preparation and use." Methods Mol Med **69**: 259-74.
- Franco, L. M., B. Sun, et al. (2005). "Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II." Mol Ther **12**(5): 876-84.
- Gangadharan, B., E. T. Parker, et al. (2006a). High-level expression of porcine factor VIII from genetically modified bone marrow-derived stem cells. Blood. **107**: 3859-64.
- Gangadharan, B., E. T. Parker, et al. (2006b). "High-level expression of porcine factor VIII from genetically modified bone marrow-derived stem cells." Blood **107**(10): 3859-64.
- Gaspar, H. B., K. L. Parsley, et al. (2004). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector." Lancet **364**(9452): 2181-7.
- Gatti, L. and P. M. Mannucci (1984). "Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies." Thromb Haemost **51**(3): 379-84.
- Gelman, M. S., W. Chang, et al. (1995). "Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors." J Biol Chem **270**(25): 15085-92.
- Germano, I. M., J. Fable, et al. (2003). "Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas." J Neurooncol **65**(3): 279-89.
- Ghirardini, A., M. Puopolo, et al. (1996). "The international registry of immune tolerance: 1994 update." Vox Sang **70 Suppl 1**: 42-6.
- Gitschier, J., W. I. Wood, et al. (1984). "Characterization of the human factor VIII gene." Nature **312**(5992): 326-30.
- Glimm, H., I. H. Oh, et al. (2000). "Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0)." Blood **96**(13): 4185-93.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Griffiths, G. and K. Simons (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." Science **234**(4775): 438-43.
- Grimm, D., S. Zhou, et al. (2003). "Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy." Blood **102**(7): 2412-9.
- Gross, M. K., M. S. Kainz, et al. (1987). "Introns are inconsequential to efficient formation of cellular thymidine kinase mRNA in mouse L cells." Mol Cell Biol **7**(12): 4576-81.

- Haack, A., C. Schmitt, et al. (1999). "Analysis of expression kinetics and activity of a new B-domain truncated and full-length FVIII protein in three different cell lines." Ann Hematol **78**(3): 111-6.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hafenrichter, D. G., K. P. Ponder, et al. (1994a). "Liver-directed gene therapy: evaluation of liver specific promoter elements." J Surg Res **56**(6): 510-7.
- Hafenrichter, D. G., X. Wu, et al. (1994b). "Quantitative evaluation of liver-specific promoters from retroviral vectors after in vivo transduction of hepatocytes." Blood **84**(10): 3394-404.
- Hahn, W. C. (2002). "Immortalization and transformation of human cells." Mol Cells **13**(3): 351-61.
- Hahn, W. C., S. A. Stewart, et al. (1999). "Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells." Nat Med **5**(10): 1164-70.
- Halbert, C. L., T. A. Standaert, et al. (1998). "Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure." J Virol **72**(12): 9795-805.
- Harley, C. B. (2002). "Telomerase is not an oncogene." Oncogene **21**(4): 494-502.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, et al. (1996). "Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." Embo J **15**(12): 2961-8.
- Henriksson, P., S. Becker, et al. (1985). "Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages." J Clin Invest **76**(2): 528-34.
- Herder, C. (2003). Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Hämophilie A mittels FVIII-transduzierter hämatopoetischer Stammzellen. Institute of Transfusion Medicine and Immunhematology, Red Cross Blood Donor Service Baden Wuerttemberg Hesse. Frankfurt am Main.
- Herder, C., T. Tonn, et al. (2003). "Sustained expansion and transgene expression of coagulation factor VIII-transduced cord blood-derived endothelial progenitor cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2266-72.
- Herlitschka, S. E., U. Schlokot, et al. (1998). "High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line." J Biotechnol **61**(3): 165-73.
- Hoeben, R. C., M. P. Einerhand, et al. (1992). Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. Thromb Haemost. **67**: 341-5.
- Hoeben, R. C., F. J. Fallaux, et al., Eds. (1995). Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. Blood.
- Hoeben, R. C., R. C. van der Jagt, et al. (1990). Expression of functional factor VIII in primary human skin fibroblasts after retrovirus-mediated gene transfer. J Biol Chem. **265**: 7318-23.

- Huang, M. T. and C. M. Gorman (1990). "Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA." Nucleic Acids Res **18**(4): 937-47.
- Humeau, L. M., G. K. Binder, et al. (2004). "Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load." Mol Ther **9**(6): 902-13.
- Ingerslev, J., O. Sneppen, et al. (1999). "Treatment of acute bleeding episodes with rFVIIa." Vox Sang **77 Suppl 1**: 42-6.
- Israel, D. I. and R. J. Kaufman (1990). Retroviral-mediated transfer and amplification of a functional human factor VIII gene. Blood. **75**: 1074-80.
- Itin, C., R. Schindler, et al. (1995). "Targeting of protein ERGIC-53 to the ER/ERGIC/cis-Golgi recycling pathway." J Cell Biol **131**(1): 57-67.
- Kalsheker, N., S. Morley, et al. (2002). "Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin." Biochem Soc Trans **30**(2): 93-8.
- Kane, W. H. and E. W. Davie (1986). "Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 6800-4.
- Kang, Y., C. S. Stein, et al. (2002). "In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins." J Virol **76**(18): 9378-88.
- Kang, Y., L. Xie, et al. (2005). "Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer." Blood **106**(5): 1552-8.
- Kappeler, F., D. R. Klopfenstein, et al. (1997). "The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII." J Biol Chem **272**(50): 31801-8.
- Kasper, C. K. (1999). "Human factor VIII for bleeding in patients with inhibitors." Vox Sang **77 Suppl 1**: 47-8.
- Kaufman, R. J. (1989a). Genetic engineering of factor VIII. Nature. **342**: 207-8.
- Kaufman, R. J. (1989b). "Genetic engineering of factor VIII." Nature **342**(6246): 207-8.
- Kaufman, R. J. (1992). "Expression and structure-function properties of recombinant factor VIII." Transfus Med Rev **6**(4): 235-46.
- Kaufman, R. J. and S. W. Pipe (1999). "Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor." Thromb Haemost **82**(2): 201-8.
- Kaufman, R. J., S. W. Pipe, et al. (1997). "Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII." Blood Coagul Fibrinolysis **8 Suppl 2**: S3-14.
- Kaufman, R. J., L. C. Wasley, et al. (1988a). Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. J Biol Chem. **263**: 6352-62.
- Kaufman, R. J., L. C. Wasley, et al. (1988b). "Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells." J Biol Chem **263**(13): 6352-62.

- Kay, M. A., A. X. Holterman, et al. (1995). "Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4lg administration." Nat Genet **11**(2): 191-7.
- Kay, M. A., Q. Li, et al. (1992). "Hepatic gene therapy: persistent expression of human alpha 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery in vivo." Hum Gene Ther **3**(6): 641-7.
- Kernoff, P. B. (1984). "Porcine factor VIII: preparation and use in treatment of inhibitor patients." Prog Clin Biol Res **150**: 207-24.
- Kida, M., M. Souri, et al. (1999). "Transcriptional regulation of cell type-specific expression of the TATA-less A subunit gene for human coagulation factor XIII." J Biol Chem **274**(10): 6138-47.
- Kjalke, M., A. Heding, et al. (1995). "Amino acid residues 721-729 are required for full factor VIII activity." Eur J Biochem **234**(3): 773-9.
- Klingmuller, U., H. Wu, et al. (1997). "Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3016-21.
- Koeberl, D. D., C. L. Halbert, et al. (1995). Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. Hum Gene Ther. **6**: 469-79.
- Kohn, D. B., M. Sadelain, et al. (2003). "Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID." Nat Rev Cancer **3**(7): 477-88.
- Koschinsky, M. L., W. D. Funk, et al. (1986). "Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5086-90.
- Krall, W. J., D. C. Skelton, et al. (1996). "Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells." Gene Ther **3**(1): 37-48.
- Kraunus, J., D. H. Schaumann, et al. (2004). "Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing." Gene Ther **11**(21): 1568-78.
- Krieger, E., T. Darden, et al. (2004). "Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space." Proteins **57**(4): 678-83.
- Krieger, E., G. Koraimann, et al. (2002). "Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field." Proteins **47**(3): 393-402.
- Kuismanen, E., J. Jantti, et al. (1992). "Effect of caffeine on intracellular transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins." J Cell Sci **102 (Pt 3)**: 505-13.
- Kumar, M., B. Keller, et al. (2001). "Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors." Hum Gene Ther **12**(15): 1893-905.
- Kustikova, O., B. Fehse, et al. (2005). "Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking." Science **308**(5725): 1171-4.
- Lakich, D., H. H. Kazazian, Jr., et al. (1993). "Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A." Nat Genet **5**(3): 236-41.
- Le Hir, H., A. Nott, et al. (2003). "How introns influence and enhance eukaryotic gene expression." Trends Biochem Sci **28**(4): 215-20.

- Lee, C. (1999). "Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia." Thromb Haemost **82**(2): 516-24.
- Lenting, P. J., J. A. van Mourik, et al. (1998a). "The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function." Blood **92**(11): 3983-96.
- Lenting, P. J., J. A. van Mourik, et al. (1998b). The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. Blood. **92**: 3983-96.
- Levinson, B., S. Kenwrick, et al. (1990). "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene." Genomics **7**(1): 1-11.
- Lewis, J. H., F. A. Bontempo, et al. (1987). "Blood use in liver transplantation." Transfusion **27**(3): 222-5.
- Lind, P., K. Larsson, et al. (1995). "Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization." Eur J Biochem **232**(1): 19-27.
- Lippincott-Schwartz, J., T. H. Roberts, et al. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. Annu Rev Cell Dev Biol. **16**: 557-89.
- Little, M. T. and R. Storb (2002). History of haematopoietic stem-cell transplantation. Nat Rev Cancer. **2**: 231-8.
- Lowe, M. and T. E. Kreis (1998). "Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI." Biochim Biophys Acta **1404**(1-2): 53-66.
- Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-34.
- Lusher, J. M., S. Arkin, et al. (1993). "Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group." N Engl J Med **328**(7): 453-9.
- Lynch, C. M., D. I. Israel, et al. (1993). Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. Hum Gene Ther. **4**: 259-72.
- Manilla, P., T. Rebello, et al. (2005). "Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector." Hum Gene Ther **16**(1): 17-25.
- Mannucci, P. M. and P. L. Giangrande (2000). "Choice of replacement therapy for hemophilia: recombinant products only?" Hematol J **1**(2): 72-6.
- Mariani, G., A. Ghirardini, et al. (1994). "Immune tolerance in hemophilia-principal results from the International Registry. Report of the factor VIII and IX Subcommittee." Thromb Haemost **72**(1): 155-8.
- Marquette, K. A., D. D. Pittman, et al. (1995). A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. J Biol Chem. **270**: 10297-303.
- Martinez-Menarguez, J. A., H. J. Geuze, et al. (1999). "Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles." Cell **98**(1): 81-90.
- May, C., S. Rivella, et al. (2000). "Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin." Nature **406**(6791): 82-6.

- McGlynn, L. K., C. R. Mueller, et al. (1996). "Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor V111 gene." Mol Cell Biol **16**(5): 1936-45.
- Mendel, D. B., L. P. Hansen, et al. (1991). "HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro." Genes Dev **5**(6): 1042-56.
- Miao, C. H., K. Ohashi, et al. (2000). "Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro." Mol Ther **1**(6): 522-32.
- Miao, H. Z., N. Sirachainan, et al. (2004). "Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion." Blood **103**(9): 3412-9.
- Michnick, D. A., D. D. Pittman, et al. (1994). "Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage." J Biol Chem **269**(31): 20095-102.
- Mingozzi, F., Y. L. Liu, et al. (2003). "Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer." J Clin Invest **111**(9): 1347-56.
- Mitta, B., M. Rimann, et al. (2002). "Advanced modular self-inactivating lentiviral expression vectors for multigene interventions in mammalian cells and in vivo transduction." Nucleic Acids Res **30**(21): e113.
- Miyoshi, H., U. Blomer, et al. (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." J Virol **72**(10): 8150-7.
- Moayeri, M., T. S. Hawley, et al. (2005a). Correction of murine hemophilia A by hematopoietic stem cell gene therapy. Mol Ther. **12**: 1034-42.
- Moayeri, M., T. S. Hawley, et al. (2005b). "Correction of murine hemophilia A by hematopoietic stem cell gene therapy." Mol Ther **12**(6): 1034-42.
- Modlich, U., O. S. Kustikova, et al. (2005). "Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis." Blood **105**(11): 4235-46.
- Molmenti, E. P., D. H. Perlmutter, et al. (1993). "Cell-specific expression of alpha 1-antitrypsin in human intestinal epithelium." J Clin Invest **92**(4): 2022-34.
- Monroe, D. M. and M. Hoffman (2006). "What does it take to make the perfect clot?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(1): 41-8.
- Moussalli, M., S. W. Pipe, et al. (1999). "Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII." J Biol Chem **274**(46): 32539-42.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996a). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11382-8.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996b). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
- Nash, K. L., B. Jamil, et al. (2004). "Hepatocyte-specific gene expression from integrated lentiviral vectors." J Gene Med **6**(9): 974-83.
- Nathwani, A. C. and E. G. Tuddenham (1992). "Epidemiology of coagulation disorders." Baillieres Clin Haematol **5**(2): 383-439.

- Nauseef, W. M., S. J. McCormick, et al. (1995). "Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase." J Biol Chem **270**(9): 4741-7.
- Naylor, J. A., D. Buck, et al. (1995). "Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions." Hum Mol Genet **4**(7): 1217-24.
- Nehls, S., E. L. Snapp, et al. (2000). "Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes." Nat Cell Biol **2**(5): 288-95.
- Nichols, W. C., U. Seligsohn, et al. (1998). "Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII." Cell **93**(1): 61-70.
- Niemann, H., R. Halter, et al. (1999). "Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep." Transgenic Res **8**(3): 237-47.
- Notley, C., A. Killoran, et al. (2002). "The canine factor VIII 3'-untranslated region and a concatemeric hepatocyte nuclear factor 1 regulatory element enhance factor VIII transgene expression in vivo." Hum Gene Ther **13**(13): 1583-93.
- Nufer, O., S. Guldbrandsen, et al. (2002). "Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export." J Cell Sci **115**(Pt 3): 619-28.
- O'Brien, D. P., D. Johnson, et al. (1992). "Inactivation of factor VIII by factor IXa." Biochemistry **31**(10): 2805-12.
- Okuyama, T., R. M. Huber, et al. (1996). "Liver-directed gene therapy: a retroviral vector with a complete LTR and the ApoE enhancer-alpha 1-antitrypsin promoter dramatically increases expression of human alpha 1-antitrypsin in vivo." Hum Gene Ther **7**(5): 637-45.
- Owen, C. A., Jr., E. J. Bowie, et al. (1979). "Generation of factor VIII coagulant activity by isolated, perfused neonatal pig livers and adult rat livers." Br J Haematol **43**(2): 307-15.
- Painter, R. G., N. A. Lanson, Jr., et al. (2005). "Conditional expression of a suicide gene by the telomere reverse transcriptase promoter for potential post-therapeutic deletion of tumorigenesis." Cancer Sci **96**(9): 607-13.
- Paleyanda, R. K., W. H. Velander, et al. (1997). "Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk." Nat Biotechnol **15**(10): 971-5.
- Park, F. and K. W. Gow (2006). "Gene therapy: future or flop." Pediatr Clin North Am **53**(4): 621-38.
- Park, F., K. Ohashi, et al. (2000). "Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver." Blood **96**(3): 1173-6.
- Pawliuk, R., K. A. Westerman, et al. (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science **294**(5550): 2368-71.
- Perlmutter, D. H., F. S. Cole, et al. (1985). "Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 795-9.
- Persons, D. A., P. W. Hargrove, et al. (2003). "The degree of phenotypic correction of murine beta -thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number." Blood **101**(6): 2175-83.

- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-12.
- Piacibello, W., S. Bruno, et al. (2002). "Lentiviral gene transfer and ex vivo expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient." Blood **100**(13): 4391-400.
- Pind, S., J. R. Riordan, et al. (1994). "Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Biol Chem **269**(17): 12784-8.
- Pipe, S. W. (2004). "Coagulation factors with improved properties for hemophilia gene therapy." Semin Thromb Hemost **30**(2): 227-37.
- Pipe, S. W., J. A. Morris, et al. (1998a). "Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin." J Biol Chem **273**(14): 8537-44.
- Pipe, S. W., J. A. Morris, et al. (1998b). Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. J Biol Chem. **273**: 8537-44.
- Pittman, D. D., E. M. Alderman, et al. (1993). "Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII." Blood **81**(11): 2925-35.
- Pittman, D. D. and R. J. Kaufman (1989). Structure-function relationships of factor VIII elucidated through recombinant DNA technology. Thromb Haemost. **61**: 161-5.
- Pittman, D. D., K. N. Tomkinson, et al. (1994). "Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells." J Biol Chem **269**(25): 17329-37.
- Pittman, D. D., J. H. Wang, et al. (1992). "Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII." Biochemistry **31**(13): 3315-25.
- Plantier, J. L., B. Guillet, et al. (2005). "B-domain deleted factor VIII is aggregated and degraded through proteasomal and lysosomal pathways." Thromb Haemost **93**(5): 824-32.
- Plantier, J. L., M. H. Rodriguez, et al. (2001). "A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII." Thromb Haemost **86**(2): 596-603.
- Ponder, K. P. (2006). "Gene therapy for hemophilia." Curr Opin Hematol **13**(5): 301-7.
- Pratt, K. P., B. W. Shen, et al. (1999). "Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution." Nature **402**(6760): 439-42.
- Price, D. K. and W. D. Figg (2004). "hTert-immortalized endothelial cells: an important new research tool." Cell Cycle **3**(6): 789.
- Puck, T. T., S. J. Cieciura, et al. (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." J Exp Med **108**(6): 945-56.

- Qian, Z., M. Haessler, et al. (2006). "Targeting vascular injury using Hantavirus-pseudotyped lentiviral vectors." Mol Ther **13**(4): 694-704.
- Raper, S. E., N. Chirmule, et al. (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." Mol Genet Metab **80**(1-2): 148-58.
- Rey-Campos, J., T. Chouard, et al. (1991). "vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1." Embo J **10**(6): 1445-57.
- Richards, A. A., E. Stang, et al. (2002). "Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection." Mol Biol Cell **13**(5): 1750-64.
- Rivella, S., J. A. Callegari, et al. (2000). "The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites." J Virol **74**(10): 4679-87.
- Roberts, H. R. (1999). "The use of agents that by-pass factor VIII inhibitors in patients with haemophilia." Vox Sang **77 Suppl 1**: 38-41.
- Romano, G., C. Pacilio, et al. (1999). "Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals." Stem Cells **17**(4): 191-202.
- Ruddock, L. W. and M. Molinari (2006). "N-glycan processing in ER quality control." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4373-80.
- Saenko, E. L. and D. Scandella (1997). "The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor." J Biol Chem **272**(29): 18007-14.
- Sambrook, J. and D. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL Press.
- Sandberg, H., A. Almstedt, et al. (2001). "Structural and functional characterization of B-domain deleted recombinant factor VIII." Semin Hematol **38**(2 Suppl 4): 4-12.
- Saraste, J. and E. Kuismanen (1984). "Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface." Cell **38**(2): 535-49.
- Scharrer, I., G. L. Bray, et al. (1999). "Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates." Haemophilia **5**(3): 145-54.
- Schekman, R. (1996). "Polypeptide translocation: a pretty picture is worth a thousand words." Cell **87**(4): 593-5.
- Schenone, M., B. C. Furie, et al. (2004). "The blood coagulation cascade." Curr Opin Hematol **11**(4): 272-7.
- Seaman, M. N., P. J. Sowerby, et al. (1996). "Cytosolic and membrane-associated proteins involved in the recruitment of AP-1 adaptors onto the trans-Golgi network." J Biol Chem **271**(41): 25446-51.
- Seggewiss, R. and C. E. Dunbar (2005). "A new direction for gene therapy: intrathymic T cell-specific lentiviral gene transfer." J Clin Invest **115**(8): 2064-7.
- Shankar, P., N. Manjunath, et al. (2005). "The prospect of silencing disease using RNA interference." Jama **293**(11): 1367-73.

- Shi, Q., D. A. Wilcox, et al. (2007). Lentivirus-mediated platelet-derived factor VIII gene therapy in murine haemophilia A. J Thromb Haemost. **5**: 352-61.
- Simpson, J. C., T. Nilsson, et al. (2006). "Biogenesis of tubular ER-to-Golgi transport intermediates." Mol Biol Cell **17**(2): 723-37.
- Sinn, P. L., A. K. Penisten, et al. (2005). "Gene transfer to respiratory epithelia with lentivirus pseudotyped with Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein." Hum Gene Ther **16**(4): 479-88.
- Sjamsedin, L. J., L. Heijnen, et al. (1981). "The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial." N Engl J Med **305**(13): 717-21.
- Soukharev, S., D. Hammond, et al. (2002). "Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems." Blood Cells Mol Dis **28**(2): 234-48.
- Srivastava, A., M. Chandy, et al. (1998). "Low-dose intermittent factor replacement for post-operative haemostasis in haemophilia." Haemophilia **4**(6): 799-801.
- Stauber, T., J. C. Simpson, et al. (2006). "A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex." Curr Biol **16**(22): 2245-51.
- Stein, C. S., Y. Kang, et al. (2001). "In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors." Mol Ther **3**(6): 850-6.
- Stoilova-McPhie, S., B. O. Villoutreix, et al. (2002). "3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography." Blood **99**(4): 1215-23.
- Swaroop, M., M. Moussalli, et al. (1997). Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. J Biol Chem. **272**: 24121-4.
- Tagliavacca, L., N. Moon, et al. (1997). "Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII." J Biol Chem **272**(43): 27428-34.
- Tagliavacca, L., Q. Wang, et al. (2000). "ATP-dependent dissociation of non-disulfide-linked aggregates of coagulation factor VIII is a rate-limiting step for secretion." Biochemistry **39**(8): 1973-81.
- Tan, W., K. Zhu, et al. (2004). "Fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C direct integration of viral DNA into specific sites." J Virol **78**(3): 1301-13.
- Tavill, A. S. (1972). "The synthesis and degradation of liver-produced proteins." Gut **13**(3): 225-41.
- Teitel, J. M. (2000). "Unexpected bleeding disorders: Algorithm for approach to therapy." Clin Lab Haematol **22 Suppl 1**: 26-9; discussion 30-2.
- Tonn, T., C. Herder, et al. (2002). "Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor VIII." J Hematother Stem Cell Res **11**(4): 695-704.
- Toole, J. J., J. L. Knopf, et al. (1984). "Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor." Nature **312**(5992): 342-7.

- Toole, J. J., D. D. Pittman, et al. (1986). "A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5939-42.
- Tuddenham, E. G., R. S. Lane, et al. (1982). "Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease." Br J Haematol **52**(2): 259-67.
- VandenDriessche, T., V. Vanslembrouck, et al. (1999). "Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10379-84.
- Vehar, G. A., B. Keyt, et al. (1984). "Structure of human factor VIII." Nature **312**(5992): 337-42.
- Verhoeven, E. and F. L. Cosset (2004). "Surface-engineering of lentiviral vectors." J Gene Med **6 Suppl 1**: S83-94.
- von Kalle, C., B. Fehse, et al. (2004). "Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable." Semin Hematol **41**(4): 303-18.
- Wagers, A. J., J. L. Christensen, et al. (2002). "Cell fate determination from stem cells." Gene Ther **9**(10): 606-12.
- Wahlers, A., M. Schwieger, et al. (2001). "Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells." Gene Ther **8**(6): 477-86.
- Walsh, P. N. (2004). "Platelet coagulation-protein interactions." Semin Thromb Hemost **30**(4): 461-71.
- Weisberg, L. J., D. T. Shiu, et al. (1987). "Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain." Blood **70**(2): 579-82.
- Weiss, H. J., Sussman, II, et al. (1977). "Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease." J Clin Invest **60**(2): 390-404.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science. **287**: 1442-6.
- Wieland, F. T., M. L. Gleason, et al. (1987). "The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface." Cell **50**(2): 289-300.
- Wiewrodt, R., K. Amin, et al. (2003). "Adenovirus-mediated gene transfer of enhanced Herpes simplex virus thymidine kinase mutants improves prodrug-mediated tumor cell killing." Cancer Gene Ther **10**(5): 353-64.
- Williams, D. A. (1993). "Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul?" Blood **81**(12): 3169-72.
- Wion, K. L., D. Kelly, et al. (1985). "Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues." Nature **317**(6039): 726-9.
- Wise, R. J., A. J. Dorner, et al. (1991). "The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII." J Biol Chem **266**(32): 21948-55.

- Yarovoi, H. V., D. Kufirin, et al. (2003). Factor VIII ectopically expressed in platelets: efficacy in hemophilia A treatment. Blood. **102**: 4006-13.
- Yusufzai, T. M. and G. Felsenfeld (2004). "The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8620-4.
- Zaiss, A. K., S. Son, et al. (2002). "RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy." J Virol **76**(14): 7209-19.
- Zelechowska, M. G., J. A. van Mourik, et al. (1985). "Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes." Nature **317**(6039): 729-30.
- Zhang, B., M. A. Cunningham, et al. (2003). "Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex." Nat Genet **34**(2): 220-5.
- Zhang, B. and D. Ginsburg (2004). "Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders." J Thromb Haemost **2**(9): 1564-72.
- Zhang, B., R. J. Kaufman, et al. (2005). "LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway." J Biol Chem **280**(27): 25881-6.
- Zhao, Y. L., S. N. Murthy, et al. (2006). "Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization." Vaccine **24**(9): 1282-90.
- Zielske, S. P., K. T. Lingas, et al. (2004). "Limited lentiviral transgene expression with increasing copy number in an MGMT selection model: lack of copy number selection by drug treatment." Mol Ther **9**(6): 923-31.
- Zufferey, R., D. Nagy, et al. (1997). "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo." Nat Biotechnol **15**(9): 871-5.

Publikationen und Kongressbeiträge

Becker S, Simpson JC, Pepperkok R, **Heinz S**, Herder C, Grez M, Seifried E, Tonn T
Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells
Thromb Haemost. 2004 Jul;92(1):23-35.

Picanco V, **Heinz S**, Bott D, Behrmann M, Covas DT, Seifried E, Tonn T
Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal FVIII promoter
Cytotherapy 2007:1-10

Picanco-Castro V, **Heinz S**, Fontes A, Tadeu Covas D, Seifried E, Tonn T
The chimeric cytokine Hyper-IL-6 enhances the efficiency of lentiviral gene transfer in hepatocytes both in vitro and in vivo
Biotechnology Letters (angenommen)

Heinz S, Simpson JC, Pepperkok R, Seifried E, Tonn T.
Analysis of FVIII trafficking in living cells using FVIII-GFP fusion proteins.
(Manuskript in Bearbeitung)

Heinz S, Went D, Bott D, Seifried E, Tonn T.
Inclusion of an untranslated region improves factor VIII expression several fold in hematopoietic cells and cell lines.
(Manuskript in Bearbeitung)

19th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Birmingham UK, 12-18 Juli 2003
Tonn T, Herder C, **Heinz S**, Becker S, Grez M, Seifried E.
Developing hematopoietic stem cells as targets for gene therapy of hemophilia A (Poster)

35. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Innsbruck, 16.–19. September 2003
Heinz S, Tonn T, Becker S, Picanco, Grez M, Seifried E.
Construction and Expression of FVIII/EGFP fusion proteins suitable for analysis of FVIII trafficking in living cells. (Poster)

4th International Symposium on Stem Cell Transplantation and Gene Therapy, Idar-Oberstein, 22.-24. Oktober 2003
Heinz S, Tonn T, Becker S, Picanco V, Grez M, Seifried E.
Construction and Expression of FVIII/EGFP fusion proteins suitable for analysis of FVIII trafficking in living cells. (Poster)

48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), 25. - 28. Februar 2004, Hamburg
Heinz S, Tonn T, Becker S, Picanco V, Seifried E.
Construction and expression of FVIII/EGFP fusion proteins suitable for analysis of FVIII trafficking in living cells. (Vortrag)

Tonn T, Becker S, Simpson JC, Pepperkok R, **Heinz S**, Herder C, Grez M, Behrmann M, Seifried E.

Confocal laser scanning analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells (Poster)

36. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Mannheim, 2004

Heinz S, Becker S, Picanco V, Seifried E, Tonn T.

Analysis of factor VIII trafficking in living cells using FVIII/EGFP fusion proteins. (Vortrag)

Picanco V, Becker S, **Heinz S**, Seifried E, Tonn T.

Development of tissue specific lentiviral vectors for hemophilia A gene therapy. (Poster)

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), Mannheim, 23. - 26. Februar 2005

Tonn T, Simpson JC, Becker S, **Heinz S**, Germer M, Behrmann M, Pepperkok R, Seifried E.

COP I and COP II coatomers are involved in the anterograde ER to Golgi transport of B-domain deleted FVIII. (Vortrag)

Heinz S, Picanco V, Becker S, Behrmann M, Germer M, Seifried E, Tonn T

The impact of ubiquitous (CMV, EF-1a) and liver specific (HAAT, FVIII) promoters on the factor VIII

expression in hepatic and non-hepatic cell lines transduced with 3rd generation lentiviral vectors.

(Poster)

20th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Sydney Australia, 6 – 12 August 2005

Heinz S, Simpson J, Becker S, Germer M, Behrmann M, Pepperkok R, Seifried E, Tonn T.

Both, COP I and COP II coatomers are involved in the anterograde ER to Golgi transport of B-domain deleted FVIII. (Poster)

Tonn T, Loeckermann S, **Heinz S**, Behrmann M, Germer M, Radeke H, Kotischke R, Seifried E.

Analysis of factor VIII-specific T helper cell responses in E-17 knockout mice using peptide pool arrays. (Vortrag)

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), Basel, 15.-18. Februar 2006

Heinz S, Went D, Bott D, Roth S, Seifried E, Tonn T.

Improvement of recombinant FVIII expression in monocytic and megakaryocytic lineage hematopoietic cells through introduction of FXIIIa regulatory elements (Poster).

13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT), Düsseldorf, 12.-14. Juli 2006

Heinz S, Went D, Bott D, Seifried E, Tonn T.

mRNA-Stabilisation as a tool to improve recombinant FVIII expression (Poster).

39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) e.V. zusammen mit der International Society for Cell Therapy – EUROPE. (ISCT-Europe) 19.-22. September 2006

Heinz S, Went D, Bott D, Seifried E, Tonn T.

Enhanced Recombinant Expression of FVIII in 293T and Hematopoietic Cells Using an Expression Vector Containing the FXIIIa 5' Untranslated Region (Vortrag).

51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), Dresden, 21.-24. Februar 2007

Heinz S, Went D, Bott D, Seifried E, Tonn T.

Inclusion of an untranslated region improves factor VIII expression several fold in hematopoietic cells and cell lines used for recombinant expression (Poster).

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) e.V., Friedrichshafen am Bodensee, 18.-21. September 2007

Heinz S, Picanco V, Bott D, Abriss D, Seifried E, Tonn T

Recombinant expression of coagulation factor VIII in primary hepatocytes and hepatic cell lines stably transduced with 3rd generation lentiviral vectors comprising the minimal FVIII promoter

Weitere Publikationen:

Lotz GP, Brychzy A, **Heinz S**, Obermann WMJ.

A novel Hsp90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport
eingereicht bei Science (Manuscript Number:1139592)

Delev D, Pavlova, A, **Heinz S**, Blaise MC, Chandra T, Seifried E, Oldenburg J

Structural interpretation and expression studies of two novel mutations causing factor V deficiency

(Manuskript in Bearbeitung)

Lebenslauf

Name: Stefan Heinz
 Geburtsdatum / -ort 15.04.1976 / Konstanz
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

09/1982 – 07/1986 Grundschule in Bonn
 09/1986 – 07/1995 Gymnasium Aloisiuskolleg in Bonn-Bad Godesberg;
 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

07/1995 – 08/1996 Zivildienst im Brüderkrankenhaus St. Petrus Bonn (im Labor- und chirurgischen OP-Bereich)

Studium

10/1996 – 03/2002 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn;
 10/1999 – 06/2000 Auslandsstudium an der University of East Anglia (UEA), Norwich, England
 03/2001 Diplomprüfungen in Genetik (Hauptfach), Zellbiologie und Biochemie
 04/2001 – 03/2002 Diplomarbeit am Institut für Genetik in Bonn bei Prof. Dr. Willecke (Thema: "Untersuchungen zum qualitativen immunologischen Nachweis von Connexin 36 in der Mausretina")
 seit 07/2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Molekulare Therapie“ am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des DRK-Blutspendedienst, in Frankfurt am Main; Promotionsprojekt bei Prof. Dr. E. Seifried und PD Dr. T. Tonn.

Auszeichnungen

- Erasmusstipendium für ein Studienjahr in Norwich, England
- "Young Career Investigator Award" vom "Bayer Hemophilia Awards" Programm 2006

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Erhard Seifried für die Anregungen zu diesem Thema und für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, sowie für die außerordentliche Unterstützung im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Rolf Marschalek danke ich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit, sowie seine zahlreichen hilfreichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Torsten Tonn für die intensive Betreuung und den fortwährenden wissenschaftlichen Gedankenaustausch während der Durchführung der Arbeit und die hilfreiche Kritik bei deren Abfassung.

Herrn Dr. Jeremy Simpson, Herrn Prof. Dr. Rainer Pepperkok danke ich für die Unterstützung bei den Untersuchungen zum intrazellulären Trafficking. Herrn Dr. Manuel Grez danke ich für seinen wertvollen fachlichen Rat bei der Implementierung lentiviraler Systeme und Herrn Dr. Gerry Nicholaes für die Hilfe bei der Simulation der FVIII-GFP 3D-Struktur. Herrn Dr. Mathias Behrmann danke ich für die Unterstützung bei den FVIII-Western Blot Analysen.

Herrn Dr. Sven Becker, Frau Dr. Virginia Picanco, Dr. Jörg Schüttrumpf und Daniela Bott danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, da sie immer an mich geglaubt und stets für mich da war.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den

.....

Stefan Heinz