

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München**

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Entwicklung eines *in vivo*-
Transfektionsmodells zur induzierbaren
Genexpression in murinen Hepatozyten**

Eric K. Hubner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Fabian Geisler
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid
3. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 16.02.2017 bei der
Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 04.07.2018 angenommen.

A. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	12
1 Einleitung	13
1.1 Notwendigkeit der gentechnischen Veränderung von Hepatozyten	13
1.2 Etablierte Methoden zur Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten <i>in vivo</i>	14
1.2.1 Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten durch Erzeugung von transgenen Mäusen, Knockin- oder Knockout-Mäusen und die Erzeugung von induzierbaren Mausmodellen.....	14
1.2.2 Virale Vektoren zur Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten.....	16
1.2.2.1 Adenovirale und adeno-assoziierte virale Systeme zur <i>in vivo</i> -Transduktion von Hepatozyten.....	17
1.2.2.2 Lentivirale Systeme zur <i>in vivo</i> -Transduktion von Hepatozyten	18
1.2.3 Injektion von nackter DNA als Methode der Generierung transgener Hepatozyten und die Entwicklung der <i>hydrodynamischen Schwanzveneninjektion</i>	19
1.2.4 Transposon-Systeme in Kombination mit der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion zur stabilen Langzeit-Genexpression in murinen Hepatozyten.....	20
1.3 Das pSLIK-System als Grundlage eines Transfektionssystems zur induzierbaren <i>in vivo</i>-Genexpression in murinen Hepatozyten	22
1.4 Der pTAC-Vektor als Rückgrat des neuen <i>in vivo</i>-Transfektionsmodells	24
1.5 Die Rolle von Promotoren bei der Transgenexpression	25
1.6 <i>Rosa26^{mTmG}</i>-Reportermäuse	26
1.7 Einklonierte Transgene und shRNAs	27
1.7.1 YAP	27
1.7.2 GFP	28
1.7.3 miR-shHNF4a	28

2	Ziele	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Reagenzien und Chemikalien.....	30
3.1.2	Restriktionsendonukleasen.....	31
3.1.3	10x Annealing Buffer.....	31
3.1.4	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	31
3.1.5	Kits.....	32
3.1.6	Primer Sequenzen.....	32
3.1.7	LB-Agar-Platten und LB-Medium.....	33
3.1.8	Materialien, Medikamente und Instrumente für die Tierexperimente.....	33
3.1.9	Allgemeine Geräte.....	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Klonierung.....	35
3.2.1.1	PCR der <i>Inserts</i> aus dem Vektor.....	35
3.2.1.2	Herstellung des miR-shHNF4 α -Inserts.....	37
3.2.1.3	Verdau der <i>Inserts</i> und Vektoren mit Restriktionsendonukleasen.....	38
3.2.1.4	Ligation von Vektor und <i>Insert</i>	40
3.2.1.5	Transformation der Ligationsprodukte.....	40
3.2.1.6	Kolonie-PCR und Mini-Präparation der Klonierungsprodukte 41	
3.2.1.7	LR-Clonase-Reaktion.....	41
3.2.2	Tierexperimentelle Methoden.....	42
3.2.2.1	Allgemeine Haltungsmethoden.....	42
3.2.2.2	Mauslinien und Genotypisierung.....	42
3.2.2.3	Tierexperimenteller Versuchsaufbau.....	43
3.2.2.4	Hydrodynamische Schwanzveneninjektion.....	44
3.2.2.5	Aktivierung der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase durch intraperitoneale Tamoxifen-Injektion.....	44
3.2.2.6	Aktivierung der Doxycylin-induzierbaren Genexpression.....	45
3.2.2.7	Organentnahme.....	45

3.2.3	Histologische Methoden	45
3.2.3.1	Fixierung und Aufbereitung der Lebern	45
3.2.3.2	Schneiden der Blöcke und absteigende Reihe.....	46
3.2.3.3	Immunfluoreszenz.....	46
3.2.4	Mikroskopie und Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Das pTACSLIK-System.....	49
4.2	Ergebnis der <i>in vivo</i> Versuche	50
4.2.1	Promotorabhängige <i>in vivo</i> YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten.....	51
4.2.2	Promotorabhängige <i>in vivo</i> YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten in der YAP-Färbung.....	53
4.2.3	<i>In vivo</i> GFP-Überexpression als Marker der shHNF4α- Expression in murinen Hepatozyten.....	55
4.2.4	Induzierbare <i>in vivo</i> HNF4α-Suppression	56
5	Diskussion.....	58
5.1	<i>In vivo</i>-Transfektionsmodell zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten	58
5.2	Strikt Doxycyclin-abhängige induzierbare <i>in vivo</i>- Transgenexpression in murinen Hepatozyten.....	58
5.3	Promotorabhängige <i>in vivo</i>-YAP-Expression in murinen Hepatozyten	59
5.4	Induzierbare miR-shRNA <i>in vivo</i>-Expression in murinen Hepatozyten	62
5.5	Ausblick	63
5.5.1	Einklonierung eines universellen Promotors.....	64
5.5.2	Optimierung der Doxycyclin-Gabe	64
5.5.3	Identifizierung von effizienteren miR-shRNAs für den Gen- Knockdown <i>in vivo</i>	65
5.5.4	Anwendung des neuen <i>in vivo</i> -Transfektionsmodells zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten in Kombination mit induzierbaren Mausmodellen	66
5.6	Schlussfolgerung.....	68

6 Bibliographie 69

B. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 Das Tet-On System.....	15
Abbildung 2 Mechanismus der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion.	20
Abbildung 3 Funktionsweise des <i>Sleeping Beauty</i> Transposon Systems....	21
Abbildung 4 Das pSLIK System.	23
Abbildung 5 Der pTAC-Vektor.....	24
Abbildung 6 Die Rosa26 ^{mTmG} -Reportermaus.	27
Abbildung 7 Tierexperimenteller Versuchsaufbau.....	44
Abbildung 8 Das pTACSLIK-System.....	49
Abbildung 9 Donorvektoren für die Transgen- und miR-shRNA-Expression.	50
Abbildung 10 Vektoren für die YAP-Überexpression <i>in vivo</i>	51
Abbildung 11 Promotorabhängige induzierbare <i>in vivo</i> -YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten.	52
Abbildung 12 Quantifizierung der promotorabhängigen <i>in vivo</i> -YAP- Überexpression in murinen Hepatozyten.	52
Abbildung 13 <i>In vivo</i> YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten mit dem ApoE-YAP-Plasmid in der FLAG- und YAP-Färbung.....	54
Abbildung 14 YAP-Überexpression mit dem ApoE.HCR.hAAT-Promotor in der FLAG- und YAP-Färbung.....	54
Abbildung 15 Vektor für die <i>in vivo</i> GFP- und miR-shHNF4 α -Überexpression.	55
Abbildung 16 Doxycyclin-abhängige <i>in vivo</i> GFP-Überexpression in murinen Hepatozyten als Marker der miR-shRNA-Expression.	55
Abbildung 17 Induzierbare intrazelluläre GFP-Expression in murinen Hepatozyten mit dem ApoE-shHNF4 α -Plasmid.	56
Abbildung 18 Quantifizierung der HNF4 α -Expression mit der Immunfluoreszenz nach Transfektion mit dem ApoE-shHNF4 α -Plasmid.	57
Abbildung 19 Prinzip des Fluoreszenz-„Sensor Assays“.	66

C. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Systeme zur Generierung induzierbarer Mausmodelle im Überblick.	16
Tabelle 2 Legende zu Abbildung 4 : Das pSLIK-System.....	24
Tabelle 3 Legende zu Abbildung 5 : Der pTAC-Vektor.....	25
Tabelle 4 Übersicht der <i>Inserts</i> für die Klonierung.	36
Tabelle 5 Für den Verdau der <i>Inserts</i> verwendete Restriktionsendonukleasen.	39
Tabelle 6 Für den Verdau der Vektoren verwendete Restriktionsendonukleasen.	40

D. Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
ϑ	Temperatur
2A	2A - Peptid
A	Adenosin
(E)GFP	(enhanced) grün fluoreszierendes Protein
ApoE.HCR	hepatische Locus-Kontrollregion des ApoE-Gens
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
Asp	Asparaginsäure
attL1	Rekombinationsstelle für die Gateway-Klonierung
attL2	Rekombinationsstelle für die Gateway-Klonierung
attR1	Rekombinationsstelle für die Gateway-Klonierung
attR2	Rekombinationsstelle für die Gateway-Klonierung
attB1	Rekombinationsstelle nach Gateway-Klonierung
attB2	Rekombinationsstelle nach Gateway-Klonierung
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAGGS-Promotor	CMV early enhancer/chicken beta actin-Promotor
CMV	Cytomegalovirus – Promotor
CreER	Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Dox	Doxycyclin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
Fa.	Firma
Frt	Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase
g	Gram
G	Guanin
GOI	Zielgen
hAAT	humaner α1-Antitrypsin-Promotor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histon-Deacetylase
HIV	humaner Immundefizienz-Virus
HNF4α	hepatocyte nuclear factor 4 alpha

HSB5	<i>Hyperactive Sleeping Beauty</i> Transposase 5
IR	<i>Inverted Repeats</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kpb	Kilo-Basenpaare
lacZ	Gen für das β -Galactosidase Enzym
LSL-Kassette	<i>LoxP</i> -Stopp- <i>LoxP</i> -Kassette
Lys	Lysin
mG	membrangebundenes EGFP
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mG	membrangebundenes GFP
mT	membrangebundenes tdTomato
pA	Polyadenylierungssignal
pCA	CMV β -actin enhancer-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Pikomol
qRT-PCR	quantitative reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RISC	RNA induzierter Supprimierungs-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtTA3	Reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
s	Sekunden
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SR	<i>Sleeping Beauty</i> Erkennungssequenzen
T	Thymin
t	Zeit
tdTomato	tandem dimeres Tomato
TRE	Tetracyclin-responsives Element
Tyr	Tyrosin

UbiC

vgl.

YAP

Ubiquitin-C Promotor

vergleiche

YES-assoziiertes Protein

Zusammenfassung:

Effiziente und flexible Systeme zur Überexpression und zum Knockdown von Genen in murinen Hepatozyten *in vivo* sind essenziell für translationale Mausmodelle. Hier wird ein neues induzierbares Transfektionsmodell basierend auf der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion in Kombination mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System vorgestellt, das die konstitutive Expression einer CreER mit der Doxycyclin-induzierbaren Expression eines Transgenes oder einer miR-shRNA kombiniert.

Summary:

Efficient and flexible systems for overexpression and knockdown of genes in murine hepatocytes *in vivo* are essential for translational mice models. Here, we present a novel inducible transfection model based on the hydrodynamic tail vein injection in combination with the *sleeping beauty* transposon system that combines the constitutive expression of a CreER with the doxycycline-inducible expression of a transgene or miR-shRNA.

1 Einleitung

Lebererkrankungen sind weit verbreitet, rund 29 Millionen Menschen in der Europäischen Union leiden an einer chronischen Lebererkrankung (Roudot-Thoraval 2013). Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die fünft häufigste Krebsursache in Europa (Roudot-Thoraval 2013). Dabei gibt es vier Hauptursachen für fortschreitende Lebererkrankungen und die Entwicklung von Lebertumoren: Übermäßiger Alkoholkonsum, Virushepatitis B und C sowie metabolisches Syndrom mit Fettleibigkeit (Roudot-Thoraval 2013).

Seit der weltweiten Einführung des Multikinase-Inhibitors Sorafenib im Jahr 2008 für das HCC im fortgeschrittenen Stadium (Peck-Radosavljevic 2014) hat die Anzahl klinischer Studien mit Medikamenten gegen neue molekulare Angriffspunkte rasant zugenommen (Shen et al. 2013). Diese relativ neue Klasse von Medikamenten steht für eine neue Therapiestrategie bei Krebserkrankungen, der sogenannten *targeted therapy*. Hierbei werden Pharmaka eingesetzt, die Zielstrukturen angreifen die spezifisch für das Überleben und das Wachstum des Tumors wichtig sind, deren Beeinflussung in gesunden Zellen aber keine bis geringe Wirkung zeigen (Zhukov et al. 2008). Dies setzt Kenntnis über molekulare Mechanismen im gesunden und erkrankten Lebergewebe voraus.

1.1 Notwendigkeit der gentechnischen Veränderung von Hepatozyten

Die Hausmaus (*Mus musculus*), die sich 99% der Gene mit dem Menschen teilt, ist seit über 100 Jahren das Rückgrat der molekulargenetischen Forschung (Dow et al. 2012). Durch Exom-Sequenzierung von humanen HCC-Proben konnten in den letzten Jahren genetische Alterationen des humanen HCCs identifiziert werden (Li et al. 2011, Guichard et al. 2012, Schulze et al. 2015). Für die genaue Untersuchung der Einflüsse der einzelnen Gene sind gentechnische Veränderungen von HCC-Tumorzelllinien *in vitro* und für die Erforschung insbesondere von Angiogenese und Metastasierung die gentechnische Veränderung von Hepatozyten *in vivo* sehr hilfreich (Frese et al. 2007).

1.2 Etablierte Methoden zur Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten *in vivo*

Als etablierte Methoden der Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten *in vivo* sollen hier die Generierung von genetisch veränderten Mäusen aus konditionellen Stammzelllinien, sowie adenovirale, adeno-assoziierte virale und lentivirale Transduktionssysteme mit ihren Möglichkeiten, Vorteilen und Nachteilen vorgestellt werden.

1.2.1 Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten durch Erzeugung von transgenen Mäusen, Knockin- oder Knockout-Mäusen und die Erzeugung von induzierbaren Mausmodellen

Zur Generierung von genetisch veränderten Hepatozyten können Mäuse bereits im Stadium der Embryonalen Stammzelle (ES-Zelle) oder der Oozyte modifiziert werden um transgene Mäuse oder Knockin- oder Knockout-Mäuse zu generieren (Doyle et al. 2012).

Zur Erzeugung von transgenen Mäusen wird DNA in die Pronuklei von befruchteten Oozyten injiziert (Gordon et al. 1980, Doyle et al. 2012). Dabei integriert die injizierte DNA zufällig in die murine chromosomale DNA (Doyle et al. 2012). Probleme mit transgenen Mausmodellen sind, dass die Transgenexpression möglicherweise von der Anzahl der Kopien und der Position, in der das Transgen in die chromosomale DNA integriert, abhängig ist (Okabe 2001). Eine Leber-spezifische Expression des Transgens kann durch Verwendung eines gewebsspezifischen Promotors erzielt werden (Zhu et al. 2003).

Im Gegensatz zu transgenen Mausmodellen lassen Knockin- und Knockout-Mausmodelle die gen- bzw. sequenzspezifische Modifikation von Mäusen zu (Doyle et al. 2012). Dabei werden beispielsweise durch homologe Rekombination in ES-Zellen gezielt Gene verändert oder ausgeschaltet (Thomas et al. 1987, Capecchi 1989, Doyle et al. 2012). Dadurch können Mäuse von jedem gewünschten Genotyp erzeugt werden (Capecchi 1989).

Um eine bessere Kontrolle über die Genexpression bzw. -suppression zu haben, oder mögliche ungewollte Effekte durch die genetische Modifikation während der Embryogenese zu verhindern, gibt es verschiedene Systeme zur

induzierbaren Expression oder Suppression von Genen sowohl bei transgenen Mäusen als auch bei Knockout- und Knockin-Mäusen (**vgl. Tabelle 1**) (Ray et al. 1997, Doyle et al. 2012). Ein Beispiel für die induzierbare Genexpression ist die Doxycyclin-abhängige Expression mit dem Tet-On System, die auch als Grundlage des hier beschriebenen induzierbaren Transfektionssystems dient (Lewandoski 2001, Markusic et al. 2005, Doyle et al. 2012). Das Tet-On System erlaubt die induzierbare, reversible (Shin et al. 2006, Dow et al. 2014) und durch Auswahl des entsprechenden Promotors gewebsspezifische Expression eines Zielgens *in vivo* (Vanrell et al. 2011). Das System besteht aus zwei Hauptkomponenten: ein Tetracyclin-responsives Element (TRE) reguliert dabei die Zielgen- oder die miR-shRNA-Expression und ein reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (z.B. rtTA3) dient als Doxycyclin-Sensor und erlaubt die Expression der Gene unter Kontrolle des TREs (**vgl. Abbildung 1**) (Markusic et al. 2005, Dow et al. 2014).



Abbildung 1 Das Tet-On System.

Wenn an den rtTA3 Doxycyclin (Dox) gebunden ist, kann dieser an das TRE binden und die Gene unter Einfluss des TREs werden abgeschrieben (modifiziert nach Shin et al. 2006). Das rtTA3 wird hier von einem Ubiquitin-C Promotor (UbiC) reguliert.

Ebenfalls wurden bereits Ecdyson-regulierte Genexpressionssysteme erfolgreich zur Ponasterone A-abhängigen Genexpression für die induzierbare Transgenexpression verwendet (Albanese et al. 2000, Saez et al. 2000, Doyle et al. 2012). Fest etabliert ist auch die Tamoxifen-induzierbare Expression von Genen wie zum Beispiel bei der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase CreER (Feil et al. 1996). Die CreER ist ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und einer Mutante der humanen Östrogenrezeptor-Ligandenbindungsdomäne (Feil et al. 1996, Feil et al. 1997). Durch gezielte Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne ist das Protein unempfindlich gegenüber dem natürlichen Liganden 17β -Estradiol und hoch empfindlich

gegenüber dem synthetischen Östrogenantagonisten Tamoxifen (Feil et al. 1996, Feil et al. 1997).

Neben der Regulierung der Genexpression durch Transaktivatoren kann die Genexpression sowohl in transgenen als auch in Knockout- oder Knockin-Mausmodellen durch Rekombinationssysteme reguliert werden (Doyle et al. 2012). Am bekanntesten ist dabei das Cre-loxP und das Flp-FRT-System (Doyle et al. 2012). Die beiden Rekombinasen (Cre bzw. Flp) führen zu konservativen DNA-Rekombinationen zwischen den zwei jeweils 34bp langen Erkennungssequenzen loxP bzw. FRT (**vgl. Tabelle 1**) (Lewandoski 2001).

Induzierbare Mausmodelle durch Transaktivatoren	
System	Transaktivator
Tet-On System	Doxycyclin
Ecdyson System	Ponasterone A
CreER	Tamoxifen
Induzierbare Mausmodelle durch Rekombinationssysteme	
Rekombinase	Erkennungssequenz
Cre	LoxP: ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
Flp	FRT: GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC
Tabelle 1 Systeme zur Generierung induzierbarer Mausmodelle im Überblick. (Nach Lewandoski 2001, Doyle et al. 2012).	

1.2.2 Virale Vektoren zur Generierung von gentechnisch veränderten Hepatozyten

Virale Vektoren werden seit Jahrzehnten als Werkzeuge der *in vivo* und *in vitro* Transduktion verwendet (Shayakhmetov et al. 2005). Lundstrom beschreibt im Allgemeinen vier Probleme mit viralen Vektoren als Transduktionsvehikel, auch wenn die Eigenschaften, Vor- und Nachteile der einzelnen Viren sich durchaus unterscheiden (Lundstrom 2003):

1. Ineffizienz der Transduktion, vor allem *in vivo*
2. Probleme mit der gewebespezifischen Expression
3. Probleme bei der dauerhaft stabilen Expression
4. Sicherheit im Sinne von Replikationsdeffizienz

Hier sollen im Folgenden adenovirale, adeno-assoziierte virale und lentivirale Transduktionssysteme zur Erzeugung transgener Hepatozyten *in vivo* dargestellt werden.

1.2.2.1 Adenovirale und adeno-assoziierte virale Systeme zur *in vivo*-Transduktion von Hepatozyten

Adenoviren sind unbehüllte doppelsträngige DNA Viren und etablierte Transduktionsvehikel (Shayakhmetov et al. 2005). Für die heute verwendeten Adenoviren wird vorwiegend das Genom von Ad2 und Ad5 modifiziert und für den Gentransfer optimiert (Shayakhmetov et al. 2005). Es ist technisch einfach, hohe Titer transgener Adenoviren herzustellen (Lundstrom 2003), die eine hohe Transduktionseffektivität aufweisen (Liu et al. 2003). Mit *high-capacity* adenoviralen Vektoren ist eine Transduktion von bis zu 36kbp großer Fremd-DNA möglich (Jager et al. 2009).

Nachteile insbesondere der ersten Generation von Adenoviren sind eine nur kurze Expressionsdauer aufgrund einer immunogenen Wirtsreaktionen gegen die virale Genexpression mit verbundener Gewebstoxizität (Schiedner et al. 1998). Die Immunreaktion besteht dabei zum Großteil aus einer Reaktion des angeborenen Immunsystems (Guidotti et al. 2001, Bowen et al. 2002) und führt zu einem entsprechenden Vektorverlust (Liu et al. 2003). Nach intravenöser Injektion von Ad5-Vektoren in Mäusen wird ein Großteil davon in die Leber aufgenommen (Vrancken Peeters et al. 1996, Shayakhmetov et al. 2005) und eine erfolgreiche Expression von Transgenen in der Leber ist über einen begrenzten Zeitraum möglich (Connelly 1999, Zaiss et al. 2016). Während mit klassischen adenoviralen Vektoren die Transgenexpression in der Leber für bis zu einem Monat möglich ist, ist mit *helper-dependent* adenoviralen Vektoren eine Langzeitexpression von über einem Jahr möglich (Kim et al. 2001). Im Moment wird intensiv daran gearbeitet, adenovirale Transduktionssysteme durch eine Reduktion der Immunogenität effizienter zu machen (Hendrickx et al. 2014). So konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Modifizierung von Adenoviren mit Polyethylenglykol (PEG) zu einer reduzierten Immunogenität bei stabiler Transduktionskapazität in der Lunge führt (O'Riordan et al. 1999). Eine Arbeit von Wonganan et al. zeigte eine 50% niedrigere Transaminasen-

und IL-12-Erhöpfung bei stabiler hepatischer Transduktion in der Maus nach PEGylierung (Wonganan et al. 2011).

Adeno-assoziierte virale (AAV) Systeme sind je nach der verwendeten Virusart hoch Hepatozyten-spezifisch (Zincarelli et al. 2008, Rezvani et al. 2016). Auch wenn AAVs nur mit einer niedrigen Frequenz in das Zielgenom integrieren (Nakai et al. 2001), so gibt es Hinweise, dass eine Integration zur Entstehung von Tumoren, beispielsweise zum HCC, beitragen kann (Nault et al. 2015). Unabhängig von diesen seltenen Integrationsereignissen werden AAV-Vektoren durch eine stabile Expression des zum Großteil episomal vorliegenden AAV-Genoms für die hepatische Transgenexpression verwendet (Nakai et al. 2001). Bei erhöhter Zellteilung, wie zum Beispiel in der Leber von neonatalen Mäusen (Hu et al. 2010), kann es so aber zu verstärktem Vektorverlusten kommen (Malik et al. 1997). Nachteile gegenüber dem Adenovirus ist jedoch, dass es etwas schwerer ist einen hohen Virustiter herzustellen (Lundstrom 2003, McClure et al. 2011) und die Kapazität für Transgene etwas niedriger ist mit einer optimalen Vektorgröße von 4,1 bis 4,9kbp (Dong et al. 1996).

1.2.2.2 Lentivirale Systeme zur *in vivo*-Transduktion von Hepatozyten

Lentiviren gehören zu den Retroviren und die meisten lentiviralen Transduktionssysteme basieren auf den *humanen Immundefizienz-Virus* (HIV) (Vigna et al. 2000, Lundstrom 2003). Mit ihnen können relativ große Zielgene von 8 bis 10 kbp transduziert werden (Sinn et al. 2005) und durch Integration in das Genom der Zielzelle kann eine stabile Langzeitexpression erreicht werden (Kay et al. 2001, Lundstrom 2003).

Kontrovers wird in der Literatur hingegen die Effizienz lentiviraler Transduktionssysteme in Hepatozyten *in vivo* diskutiert und ob für die lentivirale Transduktion eine Zellzyklusaktivierung bzw. Zellteilung nötig ist (Park et al. 2000) oder nicht (Pfeifer et al. 2001, Follenzi et al. 2002). Bisher konnte sich die Infektion mit Lentiviren nicht als Transduktionsmethode zur Generierung transgener Hepatozyten etablieren.

1.2.3 Injektion von nackter DNA als Methode der Generierung transgener Hepatozyten und die Entwicklung der *hydrodynamischen Schwanzveneninjektion*

Nebst der aufwendigen Züchtung transgener Mauslinien und Knockin- oder Knockout-Mauslinien sowie die Nutzung viraler Vektoren etablierte sich in den 1990er Jahren zunehmend die Transfektion mittels nackter DNA als Methode zur Erzeugung transgener Hepatozyten *in vivo* (Zhang et al. 1997, Liu et al. 1999). Am Anfang waren diese Methoden sehr aufwendig und häufig mit operativen Eingriffen verbunden, wie zum Beispiel bei der intraportalen Injektion von nackter DNA bei gleichzeitigem Abklemmen der Lebervenen (Budker et al. 1996). Erste Versuche, nackte DNA systemisch über Schwanzveneninjektionen mit niedrigem Volumen (0,2ml pro Maus) zu injizieren, scheiterten (Liu et al. 1999). *In vivo*-Experimente zeigten für nackte DNA im Serum eine Halbwertszeit von ungefähr 10min (Kawabata et al. 1995, Liu et al. 1999). Auf Grund des schnellen Abbaus durch Serumnukleasen ist eine effektive Transfektion der Zellen nicht möglich (Liu et al. 1999). Wird das in die Schwanzvene injizierte Volumen aber auf 1,5-2ml erhöht ist eine effektive Transfektion *in vivo* möglich (Liu et al. 1999). Die Effizienz hängt dabei von dem injizierten Volumen, der Zeit in der das Volumen injiziert wird und der DNA-Konzentration ab: Je höher das injizierte Volumen, je schneller die Injektion und je höher die DNA-Konzentration in der Injektionslösung, desto erfolgreicher die Transfektion (Liu et al. 1999, Zhang et al. 1999, Maruyama et al. 2002). Am effizientesten ist die Methode dabei in der Leber (Liu et al. 1999). Das injizierte Volumen, das in etwa dem Blutvolumen der Mäuse entspricht, übersteigt dabei das Herzminutenvolumen und staut sich zurück in die Vena cava inferior, wo die Injektionslösung mit der DNA regelrecht *hydrodynamisch* in das Lebergewebe gepresst wird (**vgl. Abbildung 2**) (Wu et al. 1981, Liu et al. 1999). Man spricht deswegen auch von der *hydrodynamischen Schwanzveneninjektion*.

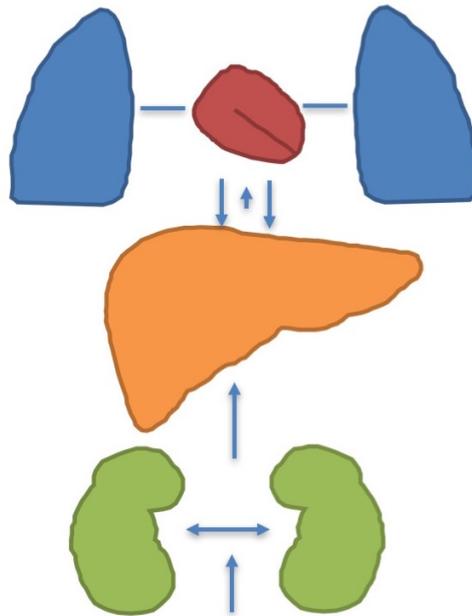


Abbildung 2 Mechanismus der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion.

2ml der Injektionslösung mit dem Plasmid werden in die Schwanzvene injiziert und überschreiten das Herzminutenvolumen. Das Volumen staut sich zurück in die Leber und die DNA wird regelrecht in die Hepatozyten gepresst (nach Liu et al. 1999).

1.2.4 Transposon-Systeme in Kombination mit der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion zur stabilen Langzeit-Genexpression in murinen Hepatozyten

Probleme bei der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion von nackter DNA waren, dass die Aktivität der DNA-Expression nach der Injektion innerhalb von acht Stunden ein Maximum erreichte, danach aber kontinuierlich abfiel und in den meisten Organen nach sechs Tagen nicht mehr nachweisbar war (Liu et al. 1999). Für eine stabile Genexpression ist also beispielsweise eine Integration des Zielgenes in das Genom der transfizierten Zelle notwendig. Eine Möglichkeit zur Integration in das Wirtsgenom ist die Verwendung von Transposon-Systemen, wie zum Beispiel das *Sleeping Beauty*-Transposon-System (Yant et al. 2007). Transposons sind Genabschnitte, die im Genom beweglich sind und ubiquitär vorkommen: Ungefähr 45% des menschlichen Genoms bestehen aus Transposon-Elementen (Lander et al. 2001, Hackett et al. 2013). Während bei Klasse I-Transposons die DNA-Abschnitte zunächst in RNA-transkribiert werden und dann in den Zielabschnitt wieder revers-transkribiert werden, wird bei Klasse II Transposons der DNA-Abschnitt direkt ausgeschnitten und in den Zielbereich

eingefügt (Hackett et al. 2013). Das *Sleeping Beauty*-Transposon-System ist ein Klasse II-Transposon System (Hackett et al. 2013). Über *Sleeping Beauty*-Erkennungssequenzen (SR), die auf beiden Seiten des Zielgenes (*Gene of Interest*, GOI) lokalisiert sind und aus 200-250bp langen *Inverted Repeats* (IR) bestehen, findet das Enzym *Transposase* das auszuschneidende GOI (Ivics et al. 2015). Dieses wird dann an bestimmten Sequenzstellen ausgeschnitten und im Genom an TA-Sequenzstellen eingefügt (vgl.

Abbildung 3) (Skipper et al. 2013). Die entstehenden Einzelstranglücken werden durch Wirtsenzyme repariert (vgl. **Abbildung 3**) (Ivics et al. 2015).

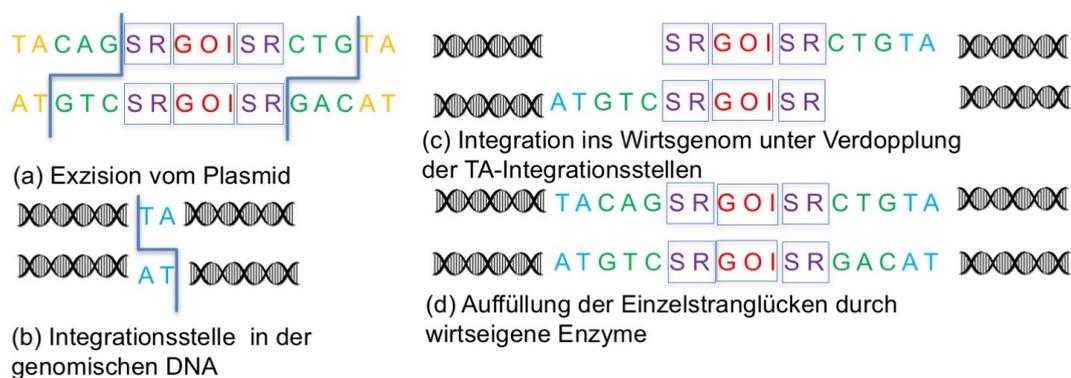


Abbildung 3 Funktionsweise des *Sleeping Beauty* Transposon Systems.

Zunächst wird das Zielgen (GOI) vom Wirtsplasmid durch die *Transposase* geführt von *Sleeping Beauty* Erkennungssequenzen (SR) ausgeschnitten (a). Die Integration in das Wirtsgenom erfolgt an bestimmten TA-Zielsequenzen in die genomische DNA (b) unter Duplikation des TA-Dinukleotides (c). Die Einzelstranglücken werden dann von wirtseigenen Enzymen aufgefüllt (d). (Nach Skipper et al. 2013, Ivics et al. 2015).

In diesem Transfektionssystem wird die *Hyperactive Sleeping Beauty*-Transposase 5 (HSB5) in Form des bereits etablierten pc-HSB5-Plasmids verwendet (Yant et al. 2007), die ungefähr zehnmal effizienter ist als die Wildtyp-*Sleeping Beauty*-Transposase (Hausl et al. 2010).

Das durch *Sleeping Beauty*-Erkennungssequenzen (SR) flankierte Konstrukt wurde in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau jeweils zusammen mit einem Expressionsplasmid für die *Hyperactive Sleeping Beauty*-Transposase 5 (pc-HSB5) in einer *trans*-Konfiguration hydrodynamisch in die Schwanzvene injiziert (Yant et al. 2000, Yant et al. 2007). Der Vorteil an dieser Methode ist, dass sich Transgene stabil und effizient *in vivo* in murinen Hepatozyten exprimieren lassen (Yant et al. 2000, Yant et al. 2007, Hausl et al. 2010). Die Effizienz ist dabei von der Größe des

Konstruktes abhängig, mit jeder kbp Transposon-Größe sinkt die Effizienz dabei exponentiell um ca. 30% (Izsvak et al. 2000).

Transfektionsmodelle und Krankheitsmodelle, die die hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System zur Transgenexpression in der Leber *in vivo* kombinieren sind längst etabliert, die meisten Modelle sind jedoch nicht induzierbar oder exprimieren lediglich ein Transgen (He et al. 2004, Belcher et al. 2010, Keng et al. 2011, Cheng et al. 2014, Subleski et al. 2015, Chung et al. 2016, Tao et al. 2016).

Hier wird ein neues *in vivo*-Transfektionsmodell vorgestellt, das die konstitutive Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase mit der Doxycyclin-induzierbaren Expression von exogenen Transgenen in murinen Hepatozyten kombiniert.

1.3 Das pSLIK-System als Grundlage eines Transfektionssystems zur induzierbaren *in vivo*-Genexpression in murinen Hepatozyten

Shin et al. stellten einen *pSLIK (single lentivector for inducible knockdown)*-Vektor vor, der Grundlage für den induzierbaren Teil des hier etablierten *in vivo*-Transfektionsvektors ist (Shin et al. 2006). Dieses System besteht im Prinzip aus einem zwei Vektoren-System im Sinne der *Gateway*-Klonierungsmethode (Shin et al. 2006). Mit dieser kann durch Rekombination, katalysiert durch das LR-Clonase-Enzym, das Zielgen oder die Ziel-miR-shRNA flankiert von attL1/2-Erkennungssequenzen, einfach aus dem Donorvektor in den leeren Zielvektor mit den attR1/2-Erkennungssequenzen gebracht werden (**vgl. Abbildung 4**) (Shin et al. 2006, Festa et al. 2013). Das integrierte Konstrukt ist im Zielvektor nach Rekombination von attB1/2-Sequenzen flankiert.

Shin et al. konnten zeigen, dass eine effiziente Doxycyclin-induzierbare Suppression von Genen mit diesem lentiviralen System *in vitro* in murinen embryonalen Fibroblasten möglich ist (Shin et al. 2006). In dieser Arbeit werden Teile des pSLIK-Systems verwendet um ein bereits etabliertes System zur stabilen Genexpression in der Leber um eine induzierbare Genexpression zu erweitern.

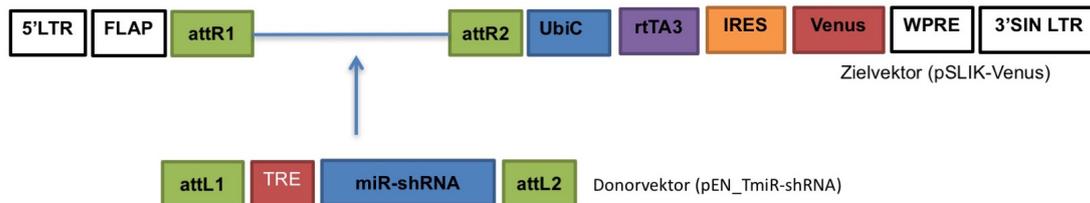


Abbildung 4 Das pSLIK System.

Die in den Donorvektor einklonierte Ziel-miR-shRNA wird über eine LR-Clonase-Reaktion (blauer Pfeil) in den Zielvektor eingebracht und dort Doxycyclin-abhängig exprimiert. Legende siehe **Tabelle 2**. (Modifiziert nach Shin et al. 2006).

Abkürzung	Erklärung
5'LTR	5' Long Terminal Repeat: Enthält regulatorische Elemente für die retrovirale Wirtsintegration und Replikation (Benachenhou et al. 2013).
3' SIN LTR	Vektor mit selbstinaktivierender (SIN) Mutation im 3' Long Terminal Repeat: Dadurch ist der 3'LTR im Provirus transkriptionell inaktiv (Miyoshi et al. 1998).
FLAP	DNA-FLAP: spielt eine Rolle beim retroviralen DNA-Import in den Zellkern (Zennou et al. 2000, Arhel et al. 2006).
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranskriptionelles Regulatorisches Element: Erhöht die Expressionsaktivität von lentiviralen Vektoren deutlich (Zufferey et al. 1999).
attR1/2	Gateway-Klonierung-Erkennungssequenzen des Zielvektors (Festa et al. 2013).
attL1/2	Gateway-Klonierung-Erkennungssequenzen des Donorvektors (Festa et al. 2013).
TRE	Tetracyclin responsives Element: reguliert die Doxycyclin-abhängige Genexpression im Tet-on System (Markusic et al. 2005, Dow et al. 2014).
rtTA3	Reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator: Doxycyclin-Sensor im Tet-On System (Markusic et al. 2005, Dow et al. 2014).
miR-shRNA	Short hairpin RNA (shRNA) für RNA Interferenz (RNAi), bei dem die short interfering RNA (siRNA) in ein mikroRNA (miRNA) Rückgrat integriert wurde (Zeng et al. 2003, Boden et al. 2004, Silva et al. 2005). Mit RNAi können gezielt Gene auf

	RNA Level ausgeschaltet werden (Hutvagner et al. 2002, Lehner et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass shRNAs die als miRNA Imitate konstruiert werden effizienter sind als konventionelle shRNA-Konstrukte (Boden et al. 2004, Silva et al. 2005).
UbiC	Ubiquitin-C Promotor (Wilber et al. 2005, Shin et al. 2006).
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle: Virale Elemente, die den Translationsbeginn in der Mitte einer RNA ohne freies 5' Ende erlauben (Martinez-Salas et al. 2008, Thompson 2012).
Venus	Gelbes fluoreszierendes Protein (Rekas et al. 2002).
Tabelle 2 Legende zu Abbildung 4 : Das pSLIK-System.	

1.4 Der pTAC-Vektor als Rückgrat des neuen *in vivo*-Transfektionsmodells

Der pTAC-Vektor ist ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Konstrukt, das im Wesentlichen über die *Sleeping Beauty*-Erkennungssequenzen (SR), die das Konstrukt flankieren, die stabile Genomintegration mit Hilfe der *Sleeping Beauty*-Transposase nach hydrodynamischer Schwanzveneninjektion *in vivo* vermittelt. Es stellt somit das Vektor-Rückgrat des neuen Transfektionssystems dar. Es enthält ferner einen konstitutiv exprimierten mCherry-Reporter und eine Tamoxifen-induzierbare, unter der Kontrolle des leberspezifischen ApoE.HCR.hAAT-Promotors exprimierte Cre-Rekombinase (CreER) (**siehe Abbildung 5**). Außerdem enthält er die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen PmeI und PspXI, die hier für die Einklonierung der verwendeten pSLIK-Sequenzen für die induzierbare Genexpression verwendet wurden.



Abbildung 5 Der pTAC-Vektor.

Zwischen die PmeI- und der PspXI-Schnittstelle werden die Bestandteile des pSLIK-Vektors einkloniert. Legende siehe **Tabelle 3**.

Abkürzung	Erklärung
SR	<i>Sleeping Beauty</i> -Erkennungssequenzen (Ivics et al. 2015).
ApoE.HCR.hAAT	Humaner α 1 Antitrypsin-Promotor (hAAT) unterstützt durch die hepatische Locus-Kontrollregion des ApoE-Gens (ApoE.HCR) (Miao et al. 2000).
CreER	Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (Feil et al. 1996, Feil et al. 1997).
2A	2A-Peptid: Bindeprotein, erlaubt die Expression von mehreren Proteinen durch einen Promotor (Trichas et al. 2008, Wang et al. 2015).
mCherry	Rotes fluoreszierendes Protein (Fink et al. 2010).
PmeI	Schnittstelle für Restriktionsendonuklease PmeI.
PspXI	Schnittstelle für Restriktionsendonuklease PspXI.
Tabelle 3 Legende zu Abbildung 5 : Der pTAC-Vektor.	

1.5 Die Rolle von Promotoren bei der Transgenexpression

Die Expressionseffektivität eines Transgenes hängt von den verwendeten Promotoren, dem transfizierten Gewebe und den Versuchsumständen (*in vivo* oder *in vitro*) ab (Tchorz et al. 2012). Für das hier vorgestellte Konstrukt wurden neben dem im pSLIK bereits etablierten Ubiquitin-C-Promotor (UbiC-Promotor), der ApoE.HCR.hAAT-Promotor und der CMV-Promotor einkloniert und *in vivo* getestet.

Der bereits im pSLIK vorhandene UbiC-Promotor kann stabile miR-shRNA-Expression in Zellkulturen vermitteln (Shin et al. 2006). Auch eine stabile Luciferase-Expression *in vivo* in der Mäuseleber mit hydrodynamischer Schwanzveneninjektion ist bereits beschrieben (Wilber et al. 2005).

Mit dem ApoE.HCR.hAAT-Promotor können leberspezifisch und erfolgreich Transgene in der Mäuseleber *in vivo* exprimiert werden (Miao et al. 2000, Ehmer et al. 2014). Dieser modifizierte leberspezifische humane α 1-Antitrypsin-Promotor zeichnet sich durch zusätzliche expressionsverstärkende Elemente wie die hepatische Locus-Kontrollregion des ApoE-Gens (ApoE.HCR) aus (Simonet et al. 1993, Miao et al. 2000). Dadurch ist eine

deutliche Verstärkung der Expressionsaktivität in der Leber möglich (Miao et al. 2000).

Der Cytomegalovirus-Promotor (CMV-Promotor) ist ein starker Promotor für *in vitro*-Versuche, wird *in vivo* aber häufig durch DNA-Methylierung (Brooks et al. 2004) und Histon-Deacetylierung (Wright et al. 2005) deaktiviert (Mehta et al. 2009). Der CMV-Promotor für die folgenden Konstrukte entstammt dem HA-E2F-1wt-pRC CMV-Plasmid (Addgene # 21667) (Krek et al. 1994).

1.6 *Rosa26^{mTmG}*-Reporterermäuse

Um eine Transfektion der Hepatozyten mit den Konstrukten nachzuweisen, wurden *Rosa26^{mTmG}*-Reporterermäuse verwendet. In dem *Rosa26*-Lokus werden gerne exogene Gene eingefügt, da er gut zugänglich ist, ubiquitär exprimiert wird und das Ausschalten des *Rosa26*-Gens zu keinem Phänotyp führt (Zambrowicz et al. 1997, Soriano 1999, Irion et al. 2007, Tchorz et al. 2012).

Das mTmG-Konstrukt besteht aus einem pCA Promotor, der zunächst nur Zugang zu einem von loxP-Seiten flankierten membrangebundenen Tandem-dimeren Tomato (mT) hat (**vgl. Abbildung 6**) (Shaner et al. 2004, Muzumdar et al. 2007). Wird das durch loxP-Seiten flankierte mT herausgefloxt, dann hat der pCA Promoter nun Zugriff auf ein membrangebundenes GFP (mG) (**vgl. Abbildung 6**) (De Paola et al. 2003, Muzumdar et al. 2007). Diese Reaktion wird durch die Cre-Rekombinase effizient katalysiert (Hamilton et al. 1984, Nagy 2000).

Zu diesem Zwecke enthalten alle in die Mäuse eingebrachten Konstrukte eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreER) unter Kontrolle des ApoE.HCR.hAAT-Promotors. Somit lässt sich die erfolgreiche Transfektion der murinen Hepatozyten nach intraperitonealer Tamoxifengabe der Mäuse mit einem Farbumschlag der Membranen von rot nach grün nachweisen.

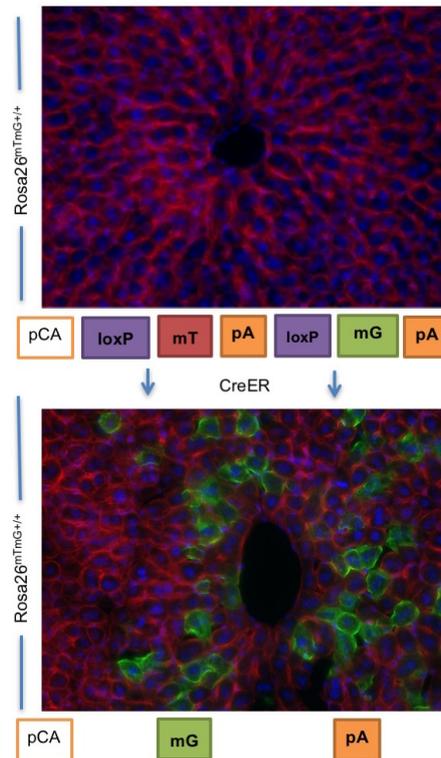


Abbildung 6 Die *Rosa26^{mTmG}*-Reportermaus.

Im ungenutzten Zustand hat der pCA-Promotor nur Zugriff auf ein mT (rot fluoreszierend), die Zellen leuchten rot. In den transfizierten Zellen floxt die CreER nun nach Tamoxifengabe die von loxP-Seiten flankierte Sequenz aus dem Mäusegenom hinaus. Damit hat der pCA-Promotor nun Zugriff auf das mG (grün fluoreszierend), die Zellen leuchten grün (modifiziert nach Muzumdar et al. 2007). **tdTomato** und **GFP** nativ, **DAPI**, Kryoschnitte, 200X Vergrößerung.

1.7 Einklonierte Transgene und shRNAs

Für die *in vivo* Versuche wurden folgende Transgene und miR-shRNAs in die Konstrukte einkloniert: YAP, GFP und miR-shHNF4 α .

1.7.1 YAP

Das mit FLAG markierte YAP wurde aus dem Plasmid p2xFlag CMV2-YAP2 (Addgene # 19045) kloniert (Oka et al. 2008). YAP ist ein Transkriptions-Cofaktor unter Kontrolle des Hippo-Signalwegs und wird durch Phosphorylierung durch LATS1/2 im Zytoplasma retiniert und somit inaktiviert (Zhang et al. 2010, Jie et al. 2013, Kong et al. 2015, Ehmer et al. 2016). Der FLAG-Protein-Tag ist ein Oktapeptid (AspTyrLysAspAspAspLys), mit dem exogene Transgene zuverlässig mit dem anti-FLAG M2-Antikörper nachgewiesen werden können (Einhauer et al. 2001).

1.7.2 GFP

Das *enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), im Weiteren zur Vereinfachung *GFP* bezeichnet, ist im pEN_TTGmiRc2-Vektor zur miR-shRNA Überexpression enthalten (Addgene #25753) (Shin et al. 2006). Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein 1961 von Osamu Shimomura aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein (Shimomura et al. 1962, Tsien 1998). Durch die fluoreszierende Eigenschaft hat GFP eine herausragende Bedeutung in der Biochemie und Zellbiologie erlangt und wird zum Beispiel als Marker bei der Genexpression oder bei der Beobachtung von zellulären Vorgängen verwendet (Tsien 1998).

1.7.3 miR-shHNF4a

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine verbreitete und etablierte Methode um endogene Gene *in vivo* zu supprimieren (Shin et al. 2006). Klassischerweise wird dabei eine Doppelstrang-RNA im Sinne einer 21-22 Nukleotid großen *small interfering-RNA* (siRNA) durch die RNA-Polymerase III transkribiert (Brummelkamp et al. 2002, Hutvagner et al. 2002), die dann durch die Homologie mit der Ziel-mRNA deren Abbau im RNA-induzierten-Supprimierungs-Komplex (RISC) vermittelt (Paddison et al. 2002, Lehner et al. 2004, Shin et al. 2006). Das im pSLIK-Vektor etablierte shRNA-Design als mikroRNA-Imitat („miR-shRNAs“), das hier übernommen wird, hat zahlreiche Vorteile (Shin et al. 2006). So können dank der Expression über die RNA-Polymerase II entsprechende Polymerase-II-Promotoren verwendet werden (Zeng et al. 2003, Lehner et al. 2004, Shin et al. 2006, Zhu et al. 2007) und es konnte gezeigt werden, dass die Gen-Suppression mit diesem shRNA-Design effizienter ist (Boden et al. 2004, Silva et al. 2005).

Als Stammsequenz für das hier verwendete miR-shHNF4a-Insert wurde eine bereits *in vivo* etablierte und getestete shRNA gegen den murinen *hepatic nuclear factor 4α* (HNF4α) übernommen (Yin et al. 2011). HNF4α gehört zur Gruppe der *nuclear receptor*-Superfamilie und wird hauptsächlich in der Leber exprimiert (Yin et al. 2011). Er spielt eine Rolle beim hepatischen Lipidmetabolismus (Hayhurst et al. 2001, Yin et al. 2011) und die *loss of function*-Mutation ist mit *maturity onset diabetes of the young* (MODY) assoziiert (Li et al. 2016).

2 Ziele

Die Ziele dieser Doktorarbeit bestehen darin, das bereits bestehende Transposon-System mit konstitutiver Expression eines Zielgens zu erweitern und mit dem pSLIK-System zu kombinieren, um eine neues induzierbares *in vivo*-Transfektionssystem zu etablieren.

Die drei Ziele sind im Wesentlichen:

1. Erweiterung eines bestehenden Transfektionssystems zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten über die hydrodynamische Schwanzveneninjektion in Kombination mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System.
2. Testung und Etablierung der Doxycyclin-induzierbaren Expression von exogenen Transgenen.
3. Testung und Etablierung der Doxycyclin-induzierbaren Unterdrückung von endogenen Genen über miR-shRNAs.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien genügen mindestens dem Reinheitsgrad zu analytischen Zwecken.

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

DNA Leiter GeneRuler 1 kb Plus, (Fa. Thermo Scientific)

Gel Loading Dye, Orange (Fa. NEB)

Objektträger Superfrost Plus (Fa. Thermo Scientific)

Deckgläser (Fa. Medite)

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Fa. Sigma-Aldrich)

Tissue-Tek (Fa. Sakura)

LE Agarose (Fa. Biozym)

BSA, Bovines Serumalbumin (Fa. Roth)

Ethanol, unvergällt absolut (Fa. Merk)

Ethanol, 80% (Fa. Brüggemann)

Ethidiumbromid (Fa. Sigma)

Isopropanol (Fa. Roth)

Sucrose (Fa. Roth)

TWEEN-20 (Fa. Sigma)

Ampicillin (Fa. AppliChem)

Chloramphenicol (Fa. Sigma-Aldrich)

LB-Agar, Luria-Miller (Fa. Roth)

LB- Medium, Luria-Miller (Fa. Roth)

Gelstar Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Fa. Lonza)

TAE-Stammlösung (Apotheke Klinikum Rechts der Isar)

SOC-Medium (Fa. Fisher Scientific)

dNTP-Mix (Fa. Bionline)

Gentamicinsulfat (Fa. AppliChem)

Säurefrei (pH7) phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4% (Fa. Roth)

T4-DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs)

Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Fa. Invitrogen)

Histoclear (Roti-Histol, Fa. Roth)

Antigen Unmasking Solution (Fa. Vector Labs)

PBS-Dulbecco 9,55g/l (Fa. Biochrom)
0,2%-PBST-Lösung: 200µl Tween-20 auf 50ml PBS-Dulbecco
Goat Serum B11-035 (Fa. PAA)
Fluoroshield (Fa. Sigma)
TRIS (Fa. Roth)
Natriumchlorid (Fa. Serva)
Magnesiumchlorid (Fa. Sigma)
3M Natriumacetatlösung (Fa. Merck)
Stbl3 Competent Cells (Fa. Thermofisher)
DB3.1 Competent Cells (Fa. Thermofisher)

3.1.2 Restriktionsendonukleasen

Ascl (Fa. New England Biolabs)
BfuAI (Fa. New England Biolabs)
PacI (Fa. New England Biolabs)
PmeI (Fa. New England Biolabs)
PspXI (Fa. New England Biolabs)
Sall (Fa. New England Biolabs)
SpeI (Fa. New England Biolabs)
XhoI (Fa. New England Biolabs)

3.1.3 10x Annealing Buffer

Für die Hybridisierung der beiden gegenläufigen miR-shRNA-Oligonukleotide wurde folgender 10x-Annealing Buffer verwendet:

100mM Tris pH 7.5	0,5ml	einer 2M-Lösung
500mM Natriumchlorid	1ml	einer 5M-Lösung
100mM Magnesiumchlorid	203 mg	
ddH ₂ O		auf 10 ml

3.1.4 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Fa. Life Technologies)
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (Fa. Invitrogen)
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Fa. Life Technologies)
Goat pAb to Chk IgY (FITC) (Fa. Abcam)
Monoclonal Anti Flag M2 produced in mouse (Fa. Sigma)

anti-GFP, rabbit IgG fraction (Fa. Invitrogen)
anti-GFP, chicken IgY fraction, unconj. (Fa. Life Technologies)
anti-HNF-4 α , rabbit polyclonal IgG (Fa. Santa Cruz Biotechnology)
anti-YAP #49112, rabbit (Fa. Cell Signaling)

3.1.5 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen)
NucleoSpin Gel and PCR Clean Up (Fa. Macherey & Nagel)
NucleoBond PC20 (Fa. Macherey & Nagel)
NucleoBond PC500 (Fa. Macherey & Nagel)
Phusion DNA Polymerase (Fa. Thermo Fisher)

3.1.6 Primer Sequenzen

Alle Primer wurden bei der Fa. Eurofins MWG Operon generiert und als Stock der Konzentration 100pmol/ μ l gelöst. Für die Anwendung wurden die Oligonukleotide dann in ddH₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt. Darauf beziehen sich auch die Volumenangaben im Folgenden.

Bei den Klonierungsprimern indizieren die unterstrichenen Sequenzteile die Erkennungssequenz für die angegebene Restriktionsendonuklease.

Genotypisierung:

Primer GT1: CAG-sc-LP TACTTGGCATATGATACTTGATGTAC
Primer GT2: R26-GT_UP AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
Primer GT3: R26-GT-WT_LP GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Klonierung:

Primer PspXI-pSLIK R:

AAT TT GCTCGAGC TTA CTT AGT TAC CCG GGG AGC ATG TCA AG

Primer PmeI-pSLIK F2:

AATTC GTTTAAAC AGG GAC AGC AGA GAT CCA GTT TGG

Primer PacI-ApoE F:

TTTCC TTAATTAA GTT AGG CTC AGA GGC ACA CAG G

Primer AscI-ApoE R:

GGGTC GGCGCGCC GTT GGA CCT GGG AGT GGA CAC

Primer PacI-CMV F:

TTTCC TTAATTAA TAG TAA TCA ATT ACG GGG TCA TTA GTC

Primer AscI-CMV R:

GGGTC GGCGCGCC CTG ACG GTT CAC TAA ACC AGC

Primer SpeI-YAP2 F:

TTTCC ACTAGT GAG CTC GTT TAG TGA CCG TCA GAA TTG ATC

Primer Sall-YAP2 R:

ACATC GTCGAC GGA GGG GTC ACA GGG ATG C

Forward Oligo *HNF4 α* :

AGCGAGTGCCAACCTCAATTCATCCTAGTGAAGCCACAGATGTAGGATG
AATTGAGGTTGGCACC

Reverse Oligo *shHNF4 α* :

GGCAGGTGCCAACCTCAATTCATCCTACATCTGTGGCTTCACTAGGATG
AATTGAGGTTGGCACT

3.1.7 LB-Agar-Platten und LB-Medium

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurden 16g LB-Agar (Luria-Miller) in 400ml destilliertem Wasser in einer 400ml-Laborflasche gelöst und autoklaviert. Nachdem die Suspension auf mindestens 40°C abgekühlt ist wurde das entsprechende Antibiotikum in unten genannter Verdünnung der Stockkonzentration hinzugegeben und die Masse in Petrischalen gegossen.

Zur Herstellung von LB-Medium wurden 10g LB-Medium (Luria-Miller) in 400ml destilliertem Wasser in einer 400ml-Laborflasche gelöst. Die Suspension wurde autoklaviert. Das entsprechende Antibiotikum wurde immer unmittelbar vor der Anwendung in unten genannter Verdünnung der Stockkonzentration hinzugegeben.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stockkonzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Verdünnung LB</u>
Ampicillin	100mg/ml	H ₂ O/Ethanol (50%)	1:1000
Chloramphenicol	34mg/ml	Ethanol	1:1000
Gentamicin	50mg/ml	ddH ₂ O	1:3333

3.1.8 Materialien, Medikamente und Instrumente für die Tierexperimente

Futter (Fa. Altromin)

Isofluran (Fa. Abbott)

Einmalspritzen 1ml und 3 ml (Fa. Braun)

Kanülen Sterican 27G und 24 G (Fa. Braun)

Einmalskalpelle Größe 11 und 22 (Fa. Feather)

ARGENTRIX Einmal-Höllenstein-Ätztift (Fa. Ryma Pharm)

DirectPCR Lyse Reagenz (Fa. PEQLAB)
Proteinase K-Lösung (Fa. AppliChem)
Tamoxifen (Fa. Sigma-Aldrich)
Corn Oil (Fa. Sigmal-Aldrich)
Doxycyclin-Hylat (Fa. AppliChem)
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% (Fa. Braun)

3.1.9 Allgemeine Geräte

Analysewaage (Fa. Kern & Sohn GmbH)
Blaulichttisch (Flu-o-blu) (Fa. Biozym)
Geldokumentationssystem (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH)
Gelelektrophoresekammer Rotiophorese Professional III (Fa. Roth)
Mikroskop Axiovert 25 und Axio A1 (Fa. Carl Zeiss AG)
Mikroskop Zeiss Axiovert 200 M (Fa. Carl Zeiss AG)
Mikroskop DM LB (Fa. Leica Microsystems)
Mikrotom HM355S (Fa. Thermo Scientific)
Mikrowelle (Fa. Sharp)
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 (Fa. PEQLAB)
PCR-Maschine Mastercycler Nexus Gradient (Fa. Eppendorf)
Power Supply E425 (Fa. Consort)
Präzisionswaage (Fa. Kern & Sohn GmbH)
Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf)
Vortexer 2000 (Fa. Heidolph Instruments)
Tischzentrifuge 5424R (Fa. Eppendorf)
Zentrifuge Avanti J-25 (Fa. Beckman)
Autoclav 2540E (Fa. Tuttnauer)
Petrischalen (Fa. Sarstedt)
CryoPureGefäße 1,6ml weiß (Fa. Sarstedt)
Pipetten Research plus 10ul, 100ul, 1000ul (Fa. Eppendorf)
ImmEdge Barrier Pen (Fa. Vector Labs)
Laborflasche Duran 400ml (Fa. Schott)
Glasperlen 4mm (Fa. Merck)
Parafilm M Verschlussfolie (Fa. Bemis)
Thermoshake (Fa. Gerhardt)

Einmalspritzen 10ml (Fa. Braun)
Filtropur 0,2 Sterilfilter (Fa. Sarstedt)
Sterilwerkbank Herasafe (Fa. Heraeus Instruments)
Falcon 15ml, 50ml (Fa. Corning Life Sciences)
Gewebe Einbettung Kassettensystem (Fa. Medite)
Entwässerungsmaschine Leica ASP300S
Einbettungsmaschine Leica EG 1150H
Streckbad 1052 (Fa. GFL)
Wippschüttler DRS-12 (Fa. neoLab)
Rotlicht-Lampe (Fa. Rossmann)

3.2 Methoden

Die Methoden lassen sich in die Klonierung der Konstrukte für die induzierbare Genexpression bzw. –suppression, die *in vivo* Testung der Konstrukte im tierexperimentellen Teil, sowie die Analyse der Ergebnisse durch Färbungen gliedern.

3.2.1 Klonierung

Die einzelnen Schritte der Klonierung lassen sich in die Schritte PCR-Amplifikation, Restriktion, Ligation, Transformation, Clon-Selektion und Plasmidpräparation aufteilen, die im Folgenden tabellarisch für die verschiedenen Konstrukte zusammengefasst werden. Zur Planung und graphischen Darstellung der Klonierungsversuche wurde der SnapGene Viewer verwendet (Fa. GSL Biotech LLC).

3.2.1.1 PCR der *Inserts* aus dem Vektor

Zunächst wurde das jeweilige *Insert* (Promotorkonstrukte bzw. Expressionskonstrukte) aus dem entsprechenden Vektor mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Durch das Design der Primer enthält das Insert dadurch zusätzlich die passenden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen. Im Allgemeinen wurde für die PCR eine 100µl Reaktion angesetzt mit jeweils 1µg Vektor, 20µl GC-Buffer, 5µl *forward* Primer, 5µl *reverse* Primer, 2µl dNTP Mix, 1µl Phusion Taq, 5µl DMSO und ddH₂O auf 100µl. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- I. 98°C 1 min

- II. 98°C 10 sec II.-IV. 40x
 III. Hyb θ 1min
 IV. 72°C Elong t
 V. 72°C 10 min
 V. 4°C Pause

Die PCR-Produkte wurden mit einem 1%-Agarose 1:10.000 Gelstar Gel aufgetrennt, auf dem Blaulichttisch (Flu-o-blu) visualisiert, ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach beiliegendem Protokoll aufgelöst und aufgereinigt sowie in 50 μ l ddH₂O gelöst.

Tabelle 4 gibt für das jeweilige Insert den entsprechenden Vektor, die verwendeten Primerpaare, die Hybridisierungstemperatur (Hyb θ), Elongationszeit (Elong t) und die Größe des auszuschneidenden Produktes an.

Insert	Aus Vektor	Primer 1	Primer 2	Hyb θ /°C	Elong t/min	Produkt/ bp
<i>YAP</i>	Addgene #19045	<u>SpeI</u> - YAP2 F	<u>Sall</u> - YAP2 R	TouchD	0,5	1702
<i>ApoE. HCR. hAAT- Promotor</i>	ApoE.HCR .hAAT- CreER	<u>PacI</u> - ApoE F	<u>AscI</u> - ApoE R	61	0,5	1148
<i>CMV- Promotor</i>	Addgene #21667	<u>PacI</u> - CMV F	<u>AscI</u> -CMV R	55	1,5	580
<i>CMV- pSLIK</i>	CMV-pSLIK	<u>PspXI</u> - pSLIK R	<u>PmeI</u> - pSLIK F2	62	3	3200
<i>ApoE. HCR. hAAT- pSLIK</i>	<i>ApoE. HCR.hAAt pSLIK</i>	<u>PspXI</u> - pSLIK R	<u>PmeI</u> - pSLIK F2	62	3	3800
<i>UbiC- pSLIK</i>	Addgene #25737	<u>PspXI</u> - pSLIK R	<u>PmeI</u> - pSLIK F2	62	3	3900

Tabelle 4 Übersicht der *Inserts* für die Klonierung.

TouchD: Touchdown-Protokoll, Hyb θ : Hybridisierungstemperatur, Elong t: Elongationszeit

Die sehr GC-reiche Sequenz des *YAP-Inserts* (Abschnitte mit bis zu 80%GC) erforderte mehrere PCR-Ansätze unter verschiedenen Bedingungen bis das Insert erfolgreich aus dem Konstrukt mit den Primern SpeI-YAP2 F und Sall-YAP2 R amplifiziert werden konnte. Eine erfolgreiche Amplifikation des *YAP-Inserts* konnte mit einem Touchdown-Protokoll erreicht werden. Bei dieser Methode macht man sich zu nutzen, dass bei einer Temperatur die höher liegt als die zu erwartende Primerhybridisierungstemperatur der Ertrag zwar geringer ist, die Spezifität für das Produkt aber höher (Bachmann et al. 2003).

In einem ersten Zyklus beginnt man mit einer Hybridisierungstemperatur, die ca. 10°C höher liegt als die berechnete Hybridisierungstemperatur für die Basen der Primer, die an das Plasmid binden (ungefähr 61°C). In einem zweiten Zyklus wählt man eine Hybridisierungstemperatur, die ungefähr der berechneten Hybridisierungstemperatur für die gesamte Primerlänge entspricht (ungefähr 65°C):

- I. 98°C 3 min
- II. 98°C 40 sec II.-IV. 20x
- III. 72°C 30 sec, 0,5°C pro Zyklus weniger
- IV. 72°C 30sec
- V. 98°C 30sec V.-VII. 30x
- VI. 65°C 30sec
- VII. 72°C 30sec
- VIII. 72°C 7min
- IX. 4°C Pause

3.2.1.2 Herstellung des *miR-shHNF4α-Inserts*

Die Stammsequenz der etablierten shRNA gegen den HNF4α lautet 5' GGTGCCAACCTCAATTCATCC 3' und wurde von Yin et al. mit Hilfe des BLOCK-iT RNAi Designer (Fa. Invitrogen) erstellt.

Nach dem pSLIK-Klonierungsprotokoll von Shin et al. wurden folgende Oligopaare für die Klonierung entworfen. Dabei entsprechen die unterstrichenen Teile der ursprünglichen (ggf. komplementären oder

reversen) Stammsequenz, die grün gedruckten Teile dem 4-bp Überhang für die Ligation mit den BfuA1-Schnittstellen und die blau gedruckten Teile dem Mittelteil. Die erste Base der Stammsequenz ist durch ein A zu ersetzen (rot).

Forward Oligo sh*HNF4α*:

5'AGCGAGTGCCAACCTCAATTCATCCTAGTGAAGCCACAGATGTAGGAT
GAATTGAGGTTGGCACC

Reverse Oligo sh*HNF4α*:

5'GGCAGGTGCCAACCTCAATTCATCCTACATCTGTGGCTTCACTAGGAT
GAATTGAGGTTGGCACT

In einem Mikrozentrifugationsgefäß werden jeweils 2µl (Konzentration: 100pmol/µl) der beiden entsprechenden *Forward* und *Reverse* Oligonukleotide zusammen mit 10µl 10x-Annealing Buffer gegeben und auf 100µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Lösung wird im Heizblock auf 95°C für mindestens fünf Minuten erhitzt, anschließend der Block langsam auf 37°C abgekühlt. Die Oligonukleotide werden im Block über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird zur Lösung 10µl 3M Natriumacetat-Lösung (pH=4,8) gegeben, anschließend die DNA mit 500µl Ethanol-100% ausgefällt. Nach Inkubation auf Trockeneis für 30min wird die Suspension bei 15.000 rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Der überstehende Alkohol wird mit der Pipette abgenommen, die DNA vorsichtig getrocknet und in 50µl ddH₂O gelöst.

3.2.1.3 Verdau der *Inserts* und *Vektoren* mit Restriktionsendonukleasen

Für die *Inserts* wurde jeweils eine 100µl Reaktion angesetzt mit 50µl *Insert-PCR-Produkt* aus vorheriger Gel-Aufreinigung, 10µl *Cut Smart Buffer*, 39,5µl ddH₂O, 1µl Enzym 1 und 1µl Enzym 2. Die Reaktion wurde bei 37°C über Nacht inkubiert, am nächsten Tag mit den *Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up* nach dem beiliegenden Protokoll aufgereinigt und in 12µl ddH₂O gelöst. **Tabelle 5** gibt eine Übersicht über die *Inserts*, die verwendeten Enzyme und etwaige Abweichungen vom Standardprotokoll.

Insert	Enzym 1	Enzym 2	Anmerkungen
YAP	Sall	SpeI	Sequentieller Verdau: zunächst mit Sall in NEBuffer 3 über Nacht (37°C), dann mit SpeI in NEBuffer 2 für 4h (37°C).
ApoE. HCR. hAAT- Promotor	Ascl	PacI	-
CMV- Promotor			
CMV-pSLIK	PspXI	PmeI	-
ApoE. HCR. hAAT- pSLIK			
UbiC-pSLIK			
miR-shHNF4a	-	-	Hybridisierte DNA-Oligomere haben bereits einen für die Ligation passenden 5'- und 3'-Überhang
Tabelle 5 Für den Verdau der <i>Inserts</i> verwendete Restriktionsendonukleasen.			

Für den Verdau des Vektors wurde im Allgemeinen ein 50µl Ansatz mit 3µg Vektor, 5µl Cut Smart Buffer, 1µl Enzym 1, 1µl Enzym 2 und ddH₂O auf 50µl angesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Mix auf ein 1%-Agarose Gel mit 1:10.000 Gelstar aufgetragen, auf dem Blaulichttisch visualisiert, ausgeschnitten, mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach beiliegendem Protokoll aufgereinigt und in 15µl ddH₂O eluiert. **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die verdauten Vektoren, die verwendeten Enzyme und die auszuschneidenden Bandengrößen.

Vektor	Ursprungsplasmid	Enzym 1	Enzym 2	Auszuschneidende Bande/bp
pEN_TTmcs-Vektor	Addgene #25755	XhoI	SpeI	3757
pEN_TTGmiRc2-Vektor	Addgene #25753	BfuAI*	-	4794
pSLIK-Hygro-Vektor	Addgene #25737	PacI	AscI	11880
pTAC-Vektor	(Ehmer et al. 2014)	PmeI	PspXI	7458

Tabelle 6 Für den Verdau der Vektoren verwendete Restriktionsendonukleasen.
*Verdau mit nur einem Enzym in NEBuffer 3.1 bei 50°C für 1h, anschließend Inaktivierung der Reaktion bei 65°C für 20 Minuten.

3.2.1.4 Ligation von Vektor und *Insert*

Zur Quantifizierung der DNA-Menge wurde jeweils 1µl des Vektors und des *Inserts* auf einem 1%-Agarosegel aufgetragen. Für die Ligation wurden im Allgemeinen 7µl *Insert*, 1µl Vektor, 1µl T4-DNA-Ligase Reaction Buffer und 1µl T4 DNA-Ligase auf Eis zusammengegeben. Die Ligation wurde über 24h bei 14°C durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit 7µl ddH₂O statt 7µl *Insert* durchgeführt. Je nach Ergebnis des Quantifizierungsgels wurden die Verhältnisse bei der Ligation von Vektor und *Insert* leicht modifiziert.

3.2.1.5 Transformation der Ligationsprodukte

Die Ligationsprodukte wurden in CaCl₂-kompetente Zellen nach folgendem Heat-Shock-Protokoll transformiert (Froger et al. 2007). Die *Donorvektoren* (pEN_TTmcs- und pEN_TtmiRc2-Vektoren) wurden dabei im Allgemeinen in *DB3.1* kompetente *E. coli* transformiert, die *Zielvektoren* (pSLIK oder pTACSLIK Vektoren mit leerer Gateway-Ziel-Kassette) in *DB3.1* kompetente *E. coli* und die *Clonase*-Produkte (Produkte der pSLIK- und pTACSLIK-Vektoren mit Zielgen in der Gateway-Ziel-Kassette) in *StbI3* kompetente *E. coli*. Die in die *DB3.1* kompetente *E. coli* transformierten Plasmide enthalten dabei ein *ccdB*-Todesgen, das über Hemmung der DNA-Gyrase den Zelltod vermittelt und somit zur negativen Selektion verwendet werden kann (Couturier et al. 1998). Der *DB3.1*-Stamm wiederum enthält eine

gyrA462_{Agr->Cys} Mutation, die die Bakterien gegen die toxischen Effekte des *ccdB*-Genproduktes resistent macht (Wang et al. 2014).

Für die Transformation wurden 100µl eines bei -80°C gefrorenen *E. coli*-Stammes auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je 7µl der *Ligations*- bzw. 2µl des *Clonase*-Produktes zu den Bakterien gegeben und vorsichtig mit diesen gemischt. Die Bakterien wurden zunächst 20min auf Eis, dann 1min bei 42°C, dann erneut 2min auf Eis inkubiert.

Nach Zugabe von 400µl SOC-Medium wurden die Bakterien bei 37°C für 70min geschüttelt. Anschließend wurden 500µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die *Zielvektoren* wurden entsprechend der jeweiligen Resistenzgene auf Ampicillin/Chloramphenicol-Platten ausplattiert, die *Donorvektoren* auf Gentamicin-Platten, die *Clonase*-Produkte auf Ampicillin-Platten.

3.2.1.6 Kolonie-PCR und Mini-Präparation der Klonierungsprodukte

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und Mini-Kulturen in 5ml LB-Medium mit dem jeweils passenden Antibiotikum angesetzt. Die Mini-Kulturen wurden über Nacht (12-16h) bei 37°C bei 200rpm geschüttelt und am nächsten Tag mit dem *NucleoBond PC20-Kit* aufgereinigt. Mit dem NanoDrop wurden die DNA-Konzentrationen gemessen. Die erfolgreiche Klonierung wurde mit einer Kolonie-PCR, einem Test-Verdau und einer *Sanger*-Sequenzierung durch die Fa. GATC-Biotech bestätigt.

3.2.1.7 LR-Clonase-Reaktion

Durch die *LR-Clonase*-Reaktion wird das im Donorvektor von *attL1*- und *attL2*-Erkennungssequenzen flankierte Zielgene mit dem von *attR1*- und *attR2*- Erkennungssequenzen flankierten Bereich des Zielvektors rekombiniert (Festa et al. 2013). Durch die Transformation in *ccdB*-empfindliche *StbI3*-Bakterien und die Verwendung von mit Ampicillin angereicherten Medium wird das gesuchte Produkt selektiert (Festa et al. 2013).

Folgendes allgemeines Protokoll wurde für die *Gateway-LR-Clonase*-Reaktion verwendet. Bei Raumtemperatur wurden 150ng des jeweiligen Zielvektors mit 150ng des jeweiligen Donorvektors gemischt (insgesamt 1-7µl). Die Reaktion wurde auf 8µl mit TE-Buffer (pH 8,0) aufgefüllt.

Der *LR Clonase II*-Enzym-Mix wurde für zwei Minuten auf Eis aufgetaut und dabei zweimal für je zwei Sekunden kurz gevortext. Anschließend wurden 2µl des *LR Clonase II*-Enzym-Mix zu der Reaktion gegeben, die Reaktion kurz gevortext und herunterzentrifugiert. Die Reaktion wurde für je 1 Stunde bei 25°C inkubiert.

Zur Beendigung der Reaktion wurden je 1µl Proteinase K-Lösung zur Reaktion gegeben und die Reaktion für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierversuche wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz (TierSchG) und unter Einhaltung der im Tierversuchsantrag dargelegten Protokolle und Abbruchkriterien durchgeführt. Die Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche durch die Regierung von Oberbayern im Sinne des §8 Abs. 1 TierSchG lag vor (Tierversuchsantrag TVA: Az. 55.2.1.54-2532-64-13).

3.2.2.1 Allgemeine Haltungsmethoden

Die Tiere wurden in einzelbelüfteten Käfigen der Fa. Techniplast in Räumen des Zentrums für Präklinische Forschung der Technischen Universität München gehalten. Unter standardisierten Bedingungen wurden die Tiere dort in einem klimatisierten Umfeld mit 12-stündigen Hell-Dunkel-, sowie Dämmerungsphasen gehalten. Die Tiere erhielten autoklaviertes Mäusefutter der Fa. Altromin und autoklaviertes Trinkwasser bei zweimal wöchentlich Wechsel der Flasche *ad libitum*. Das als Streu dienende Holzgranulat wurde einmal wöchentlich gewechselt. Als Nestbaumaterial diente autoklavierter Zellstoff; ein rotes Kunststoffhaus wurde als Mäusehaus zur Verfügung gestellt. Das Hygienemanagement erfolgte nach den Empfehlungen der Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (Mahler Convenor et al. 2014). Die in der EU-Richtlinie EU-RL2010/63/EU festgelegten Bedingungen zur Haltung von Versuchstieren wurden eingehalten.

3.2.2.2 Mauslinien und Genotypisierung

Um eine Transfektion der Hepatozyten mit den Konstrukten nachzuweisen wurden *Rosa26^{mTmG}*-Reportermause verwendet. Zum

Nachweis des *Rosa26^{mTmG}*-Genotyps wurde den Mäusen unter Isofluran-Narkose ein Stück der Schwanzspitze mit dem Skalpell entfernt und die Blutung mit dem Höllenstein-Ätztift gestillt. Die Mäuse wurden daraufhin auf Nachblutungen und Nachwirkungen der Narkose beobachtet.

Die Mäuseschwänze wurden über Nacht bei 55°C mit 50µl DirectPCR-Lyse-Reagenz und 1µl Proteinase-K-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K bei 85°C für 50min inaktiviert. Danach wurden die Mäuseschwänze herunterzentrifugiert und die im Lysat vorhandene DNA für die Genotypisierung verwendet.

Für die PCR wurde ein Primer-Mastermix der Primer GT1, GT2 und GT3 in der Verdünnungskonzentration 1:10 erstellt. Dabei wurden die Primer im Verhältnis GT1:GT2:GT3=1:0,6:1 eingesetzt. Für den Ansatz wurden dann jeweils 1µl des Lysats, 1µl des Primer-Mastermixes, 10µl *REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix* und 8µl ddH₂O zusammenpipettiert und nach folgendem Protokoll eine PCR durchgeführt:

- I. 95°C 3 min
- II. 95°C 45 sec II.-IV. 40x
- III. 62°C 1 min
- IV. 72°C 1 min 30 sec
- V. 4°C Pause

Bei einem Wildtyp Allel erwartet man eine Bande von 650bp, bei einer *mTmG*-Mutante eine Bande von 450 bp.

3.2.2.3 Tierexperimenteller Versuchsaufbau

Der zeitliche Ablauf des tierexperimentellen Versuchsaufbaus ist in **Abbildung 7** dargestellt. Die jeweiligen Transposon-Plasmide wurden in *Rosa26^{mTmG}*- Mäuse beider Geschlechter im Alter von 8-10 Wochen zusammen mit dem pc-HSB5-Plasmid (Expressionsplasmid für die *Sleeping Beauty*-Transposase) am Tag 1 mit der Methode der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion injiziert. Nach stabiler Integration des Konstruktes und Clearance der nicht integrierten Vektoren (10 bis 14 Tage) wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen (TAM) intraperitoneal zur Aktivierung der transfizierten CreER-Rekombinase injiziert. Direkt anschließend wurde bei

der Versuchsgruppe für sechs Tage Doxycyclin (Doxy) ins Trinkwasser gegeben. Danach folgte die Sektion der Mäuse.

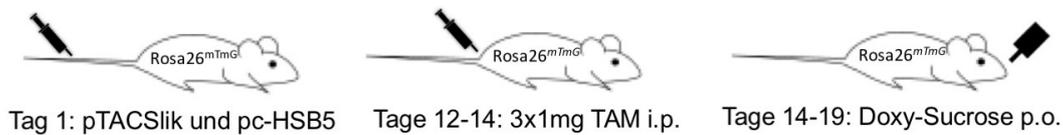


Abbildung 7 Tierexperimenteller Versuchsaufbau.

3.2.2.4 Hydrodynamische Schwanzveneninjektion

Pro Maus wurden 2ml Injektionslösung hergestellt. Dazu wurden 30 μ g Konstrukt und 2 μ g pc-HSB5 mit isotoner 0,9%-Kochsalzlösung auf 2ml aufgefüllt. Das hier verwendete Plasmid pc-HSB5 wurde von Yant et al. zur Verfügung gestellt und bereits beschrieben (Yant et al. 2007).

Für die Injektion wurden 2ml der Injektionslösung in eine 3ml-Einmalspritze mit einer 27G-Kanüle aufgezogen. Die Tiere wurden in einem Restraîner zur intravenösen Injektion gesetzt. Dann wurde der Schwanz für 30-60 Sekunden mit Rotlicht zur Erweiterung der Venen unter ständiger Kontrolle der Tiere beleuchtet. Nach Desinfektion und Reinigung der Injektionsstelle mit Ethanol-70% wurden die 2ml der Lösung innerhalb von 7-10s injiziert.

3.2.2.5 Aktivierung der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase durch intraperitoneale Tamoxifen-Injektion

Pro Maus wurde jeweils 1mg Tamoxifen an drei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Zur Herstellung der Tamoxifen-Injektionslösung wurde 10mg Tamoxifen auf der Feinwaage abgewogen. Dieses wurde zunächst in 40 μ l Ethanol-100% bei 55°C für 10min gelöst, anschließend wurden 960 μ l Corn Oil dazugegeben und die Lösung für weitere 10 min bei 55°C inkubiert.

Für die intraperitonealen Injektionen wurden pro Maus 0,1ml fertige Injektionslösung mit einer 1ml Fertigspritze mit einer 27G-Kanüle nach Desinfektion in den linken unteren Quadranten des Abdomens intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse auf die Verträglichkeit der Injektionen nachbeobachtet. Die Injektionen wurden an drei konsekutiven Tagen durchgeführt.

3.2.2.6 Aktivierung der Doxycyclin-induzierbaren Genexpression

Nach Abschluss der Tamoxifeninjektionen wurde das Trinkwasser der Mäuse in der Experimentalgruppe durch eine Doxycyclin-Sucrose-Lösung ersetzt, während die Kontrollgruppe weiterhin normales Trinkwasser bekam. Zur Herstellung dieser Lösung wurde zunächst 5g Sucrose in 100ml Leitungswasser gelöst und autoklaviert. Die Sucrose soll dabei den Geschmack für die Mäuse verbessern (Hojman et al. 2007). Anschließend wurde 100mg Doxycyclin auf der Feinwaage abgewogen, in 4ml ddH₂O gelöst und mit einem 0,2 Sterilfilter filtriert und zur Sucroselösung gegeben. Nach drei Tagen wurde die Lösung erneuert, nach sechs Tagen die Mäuse seziiert.

3.2.2.7 Organentnahme

Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation erfolgte die Öffnung des Abdomens durch einen Längsschnitt. Zur retrograden Perfusion der Leber wurde eine 1ml Spritze mit einer 27G Kanüle mit phosphatgepufferter Formaldehydlösung-4% aufgezogen. Nach Punktion der Vena cava inferior und Anspülen der Leber erfolgte die Durchtrennung der Vena portae und schließlich die komplette Durchspülung der Leber. Anschließend wurde die Leber am Lebervenenstern entnommen, in ddH₂O gespült und in phosphatgepufferter Formaldehydlösung-4% fixiert.

3.2.3 Histologische Methoden

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion der Hepatozyten und der erfolgreichen Aktivierung oder Inaktivierung der Gene wurde als Methode die Immunfluoreszenz gewählt.

3.2.3.1 Fixierung und Aufbereitung der Lebern

Nach Entnahme der Leber wurden diese zunächst in ddH₂O gewaschen und dann für zwei Tage in phosphatgepufferter Formaldehydlösung-4% fixiert. Danach wurden die Lebern in Gewebeskassetten gelegt und bis zur Entwässerung in Ethanol-80% gelagert.

Die Entwässerung erfolgte vollautomatisch über Nacht in der Entwässerungsmaschine. Nach Erhitzung der Proben im Paraffinöl wurden diese in einem Inkubator bei 65°C bis zur Einbettung gelagert. Die Einbettung

erfolgte manuell mit der Einbettungsmaschine in Paraffin. Die Blöcke wurden für mindestens 30 Minuten gekühlt.

3.2.3.2 Schneiden der Blöcke und absteigende Reihe

Die Paraffinblöcke wurden nach vorheriger Kühlung auf -20°C mit einem Rotationsmikrotom in 3µm dicke Schnitte geschnitten und nach Glättung in einem Streckbad (45°C) auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte in einem Inkubator bei 65°C für 30 Minuten getrocknet.

Nach Aufbrechen der Formalin-fixierten Protein-Netzwerke mit Histoclear wurden die Präparate mit einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Protokoll entparaffiniert und entfettet:

Histoclear - 5 min

Histoclear - 5 min

Ethanol -100% - 3 min

Ethanol -100% - 3 min

Ethanol -96% - 3 min

Ethanol -96% - 3 min

Ethanol -80% - 3 min

Ethanol -80% - 3 min

ddH₂O - 5min

Dann wurden die Schnitte in einer Kunststoffwanne zunächst für drei Minuten in der Mikrowelle bei maximaler Leistung, anschließend für 15 Minuten bei 360W in Unmasking-Solution gekocht. Nach Abkühlen der Schnitte wurde die Unmasking-Solution durch Leitungswasser ersetzt.

3.2.3.3 Immunfluoreszenz

Beim weiteren Arbeiten mit den Schnitten wurde stets darauf geachtet, dass diese nicht austrocknen. Die Schnitte wurden aus dem Wasserbad genommen, überschüssiges Wasser abgesaugt, die Gewebefelder mit dem ImmEdge-Pen umrandet und die Schnitte mit PBST benetzt. Anschließend wurden die Schnitte auf dem Schüttler bei 20rpm für zehn Minuten inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 45min mit der Blocking-Lösung geblockt. Die Blocking-Lösung wurde dabei aus 250µl Goat Serum, 50mg Bovines Serumalbumin und 4750µl PBST hergestellt und im Kühlschrank bei 4°C

gelagert. Anschließend wurde auf die Positiv-Kontrolle 75µl der Blocking-Lösung mit dem Erstantikörper in folgenden Konzentrationen gegeben:

FLAG/GFP-Färbung:

Monocolonal Anti FLAG M2 produced in mouse (Fa. Sigma)	1:75
anti-GFP, rabbit IgG fraction (Fa. Invitrogen)	1:300

YAP/GFP-Färbung:

anti-GFP, chicken IgY fraction, unconj. (Fa. Life Technologies)	1:50
anti-YAP #49112, rabbit (Fa. Cell Signaling)	1:50

HNF4α/GFP-Färbung:

anti-GFP, chicken IgY fraction, unconj. (Fa. Life Technologies)	1:50
anit-HNF-4α, rabbit polyclonal IgG (Fa. Santa Cruz Biotechnology)	1:50

Der Schnitte wurden mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei der YAP/GFP-Färbung wurden die Schnitte abweichend zunächst für 30 Minuten bei 37°C inkubiert bevor sie über Nacht bei 4°C inkubiert wurden.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst zweimal über 30min mit PBST gewaschen, dann noch einmal über 10 min mit PBST. Danach wurden jeweils 75µl der Blocking-Lösung mit dem Zweitantikörper auf alle Positiv- und Negativkontrollen mit folgenden Konzentrationen aufgetragen:

Flag/GFP-Färbung:

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Fa. Life Technologies)	1:500
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (Fa. Invitrogen)	1:500
DAPI 1mg/µl	1:500

YAP/GFP-Färbung und HNF4α/GFP-Färbung:

Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Fa. Life Technologies)	1:500
Goat pAb to Chk IgY (FITC) (Fa. Abcam)	1:500
DAPI 1mg/µl	1:500

Die Schnitte wurden für 45 Minuten mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie viermal mit PBST über 2 Stunden gewaschen. Das Eindecken erfolgte mit Fluoroshield und Deckgläsern.

3.2.4 Mikroskopie und Statistische Auswertung

Für die Abbildungen und zur Quantifizierung wurden Aufnahmen mit dem Zeiss Axiovert 200M generiert. Die Abbildungen zeigen Aufnahmen in 630x Vergrößerung oder entsprechende Ausschnitte. Für die Quantifizierung wurden Aufnahmen von mindestens fünf Gesichtsfeldern in 200x Vergrößerung gemacht und mindestens 100 transfizierte Zellen mit der Softwareanwendung ImageJ ausgezählt.

Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen Student T-Test gemacht, als statistisch signifikant wurde das Ergebnis bei $p < 0,05$ betrachtet. Diagramme zeigen den Mittelwert an, Fehlerbalken die Standardabweichung.

4 Ergebnisse

Das hier neu vorgestellte pTACSLIK-System erlaubt die Kombination der konstitutiven Expression einer CreER mit der induzierbaren Expression eines Transgens oder einer miR-shRNA. Im Ergebnissteil soll nun zunächst das Expressionssystem erläutert werden, dann die Ergebnisse der induzierbaren Transgenexpression in Abhängigkeit des verwendeten rtTA3-Promotors und schließlich die Ergebnisse der induzierbaren miR-shRNA-Expression dargestellt werden.

4.1 Das pTACSLIK-System

Das pTACSLIK-System stellt als Expressionsplasmid das Kernstück des hier neu vorgestellten *in vivo*-Transfektionsmodells zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten da. Durch Kombination der Sequenzabschnitte für die induzierbare Genexpression des bereits etablierten pSLIK-Vektors (Addgene #25737) mit dem pTAC-Vektor wurde der UbiC-pTACSLIK-Zielvektor kloniert, bei dem ein Ubiquitin-C-Promotor das rtTA3-Element kontrolliert (Shin et al. 2006). Für die anderen beiden Zielvektoren bei dem entsprechend ein ApoE.HCR.hAAT- bzw. ein CMV-Promotor den rtTA3 kontrolliert, wurde der Ubiquitin-C-Promotor zunächst durch Klonierung im pSLIK-Vektor ersetzt und aus den entsprechenden Vektoren dann die Tet-Sequenz in den pTAC-Vektor kloniert (vgl. auch Methoden). Somit stehen drei pTACSLIK-Zielvektoren mit unterschiedlichen Promotoren zur Verfügung (**vgl. Abbildung 8a**).

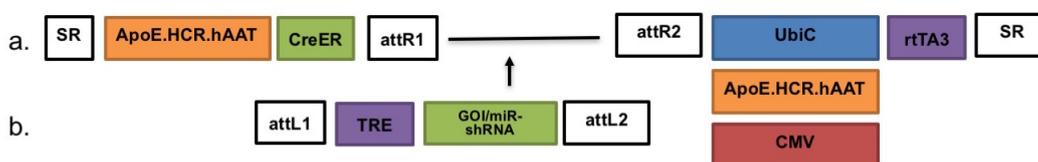


Abbildung 8 Das pTACSLIK-System.

In das pTACSLIK-System (a), das es in drei verschiedenen Ausführungen mit unterschiedlichen Promotoren gibt, lassen sich über Donorvektoren (b.) mit Hilfe der Clonase-Reaktion einfach Zielgene (GOI) und miR-shRNAs inklonieren, die dann Doxycyclin-abhängig exprimiert werden.

Diese Zielvektoren enthalten Erkennungssequenzen (SR) für die *Sleeping Beauty*-Transposase pc-HSB5 und erfüllen somit die Voraussetzung für eine stabile *in vivo*-Expression mit Transposons nach hydrodynamischer

Schwanzveneninjektion (Yant et al. 2007, Ivics et al. 2015). Neben der konstitutiven Expression der CreER erfolgt die Expression des Transgens oder der miR-shRNA Doxycyclin-abhängig über das TRE nach Bindung von Doxycyclin an das rtTA3 (Markusic et al. 2005, Dow et al. 2014).

Zielgene und miR-shRNAs können über die vorhandenen Erkennungssequenzen attR1 und attR2 für das *Gateway Cloning* schnell mit Hilfe von Donorvektoren in das pTACSLIK-System inkloniert werden (**vgl. Abbildung 8b**) (Festa et al. 2013). Die Grundvektoren für die Donorvektoren sind bereits beschrieben: pEN_TTmcs (Addgene #25755) für die Transgenexpression und pEN_TTGmiRc2 (Addgene #25753) für die miR-shRNA-Expression, der ein GFP zusätzlich zur miR-shRNA exprimiert (Shin et al. 2006). In diese Vektoren wurde zur Validierung ein FLAG-markiertes YAP bzw. eine miR-shHNF4 α inkloniert (**siehe Abbildung 9**).



Abbildung 9 Donorvektoren für die *Transgen*- und *miR-shRNA*-Expression.

Die Donorvektoren enthalten attL1/2 Erkennungssequenzen, mit denen die *Zielgene* (a) bzw. *miR-shRNAs* (b) in die Zielvektoren kloniert werden (Festa et al. 2013). (Modifiziert nach Shin et al. 2006).

4.2 Ergebnis der *in vivo* Versuche

Sowohl für die exogene Transgenexpression, als auch für den Gen-*Knockdown* mittels miR-shRNAs gilt, dass die Konstrukte zusammen mit dem Expressionsplasmid für die HSB5 in 8-10 Wochen alte *Rosa26^{mTmG}*-Mäuse beiden Geschlechts injiziert wurden. Nach 12 Tagen wurde bei allen Mäusen an drei konsekutiven Tagen Tamoxifen intraperitoneal appliziert. Während die Experimentalgruppe anschließend für sechs Tage Doxycyclin-Sucrose erhielt (Doxy+), erhielt die Kontrollgruppe weiterhin Trinkwasser (Doxy-).

Anschließend folgten Sektion, Färbung und Quantifizierung wie beschrieben.

4.2.1 Promotorabhängige *in vivo* YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten

Als erstes sollte die Überexpression eines mit FLAG markierten YAPs getestet werden. Zunächst wurde die induzierbare *in vivo* YAP-FLAG Überexpression mit der ursprünglichen Tet-Kassette aus dem pSLIK-Hygro-Konstrukt getestet: Dabei wird der rtTA3 von einem UbiC-Promotor kontrolliert (**vgl. Abbildung 10a**) (Shin et al. 2006).

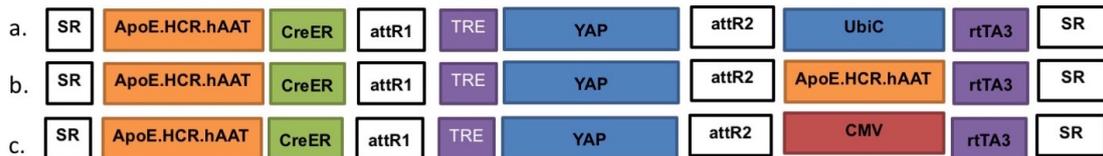


Abbildung 10 Vektoren für die YAP-Überexpression *in vivo*.

UbiC-pTACSLIK-YAP (a.), ApoE.HCR.hAAT-pTACSLIK-YAP (b.) und CMV-pTACSLIK-YAP (c.) für die promotorabhängige *in vivo*-Überexpression von YAP. Die Vektoren werden im Folgenden mit UbiC-YAP, ApoE-YAP und CMV-YAP abgekürzt.

Hier lässt sich jedoch lediglich in 0,4 Prozent der transfizierten mG-positiven-Zellen das FLAG-markierte YAP mit der Immunfluoreszenz nachweisen (**vgl. Abbildung 11 und 12, links**). Entsprechend wurde der Ubiquitin-C-Promotor, unter der Hypothese, dass dieser nicht ausreichend für eine induzierbare *in vivo*-Genexpression sei, durch einen CMV- und ApoE.HCR.hAAT-Promotor ersetzt. Somit wurde die Überexpression des YAP-FLAGs auch mit Konstrukten, bei denen ein CMV-, bzw. ApoE.HCR.hAAT-Promotor den rtTA3 kontrolliert getestet (**vgl. Abbildung 10b und c**). Während sich dabei mit dem CMV-YAP Konstrukt ein kaum höheres Expressionsniveau als mit dem UbiC-YAP Konstrukt zeigt, ist mit dem ApoE-YAP Konstrukt eine deutliche induzierbare Transgenexpression in der Leber möglich (**vgl. Abbildungen 11 und 12**). Dabei zeigt sich in den Doxycyclin-naiven (Doxy-) Gruppen bei keinem der getesteten Konstrukte eine mit der Immunfluoreszenz nachweisbare Transgenexpression (**vgl. Abbildungen 11 und 12**).

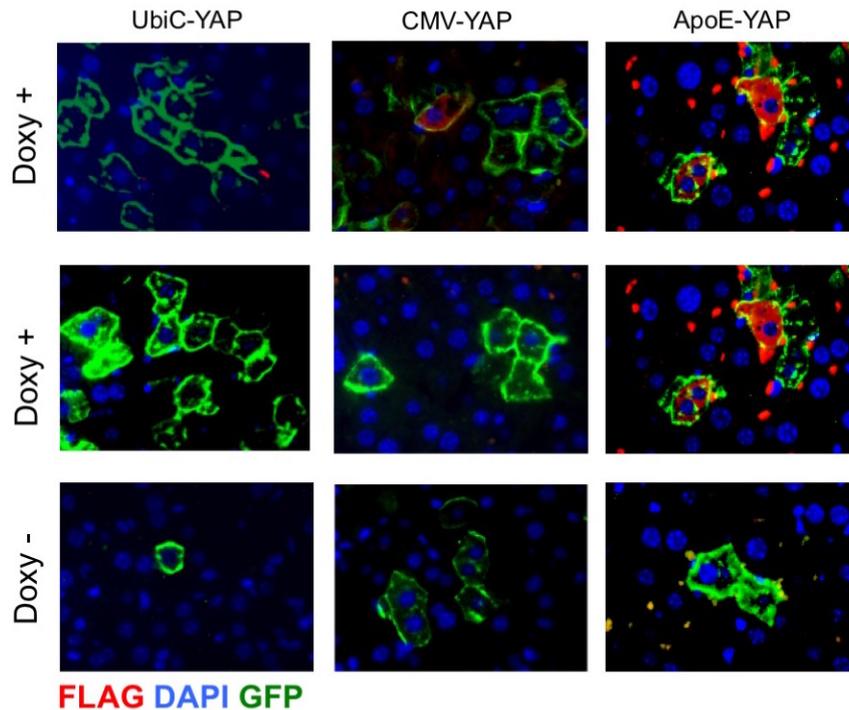


Abbildung 11 Promotorabhängige induzierbare *in vivo*-YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten.

Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Lebern nach hydrodynamischer Schwanzveneninjektion des pTACSLIK-Systems mit unterschiedlichen rTA3 Promotoren: UbiC, CMV und ApoE. Nach Aktivierung der CreER mit Tamoxifen wurde das Trinkwasser der Versuchsgruppe durch Doxycyclin-Sucrose ersetzt (Doxy+), während die Kontrollgruppe weiterhin Trinkwasser erhielt (Doxy-). Färbung gegen den FLAG-Tag in rot, gegen GFP in grün dargestellt.

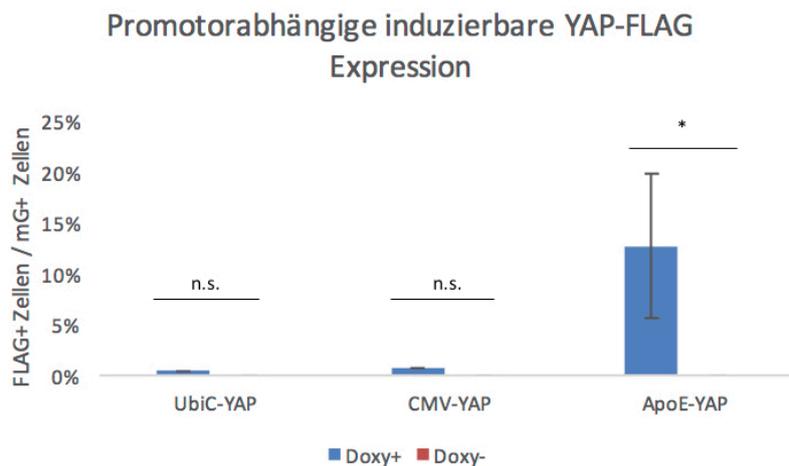


Abbildung 12 Quantifizierung der promotorabhängigen *in vivo*-YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten.

Induzierbare YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten mit den Plasmiden UbiC-YAP (n=3;3), CMV-YAP (n=3;3) und ApoE-YAP (n=4;4). Quantifiziert sind die FLAG-positiven Zellen pro transfizierte Zellen (mG-positive-Zellen) in der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe (Doxy+) und der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe (Doxy-). In den Doxy-Gruppen zeigen sich keine FLAG-positiven Zellen. n.s.=nicht signifikant, *= p<0,05.

Wie **Abbildung 11 und 12** zeigen, ist eine Doxycyclin-abhängige *in vivo* YAP-Überexpression mit dem neuen pTACSLIK-System möglich. Die Expressionseffektivität ist dabei von dem Promotor des rtTA3 abhängig und lediglich für den ApoE.HCR.hAAT-Promotor gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$). In den Doxycyclin-naiven Kontrollgruppen lassen sich keine FLAG-positiven Zellen nachweisen.

4.2.2 Promotorabhängige *in vivo* YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten in der YAP-Färbung

Um die Ergebnisse der induzierbaren YAP-Expression mit dem ApoE-YAP-Plasmid zu bestätigen wurde Lebergewebe dieser Versuchsgruppe noch einmal mit Antikörpern gegen YAP und GFP gefärbt. In der Quantifizierung zeigt sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der YAP- und der FLAG-Färbung, die YAP-Färbung bestätigt somit die Ergebnisse der FLAG-Färbung (**vgl. Abbildungen 13 und 14**).

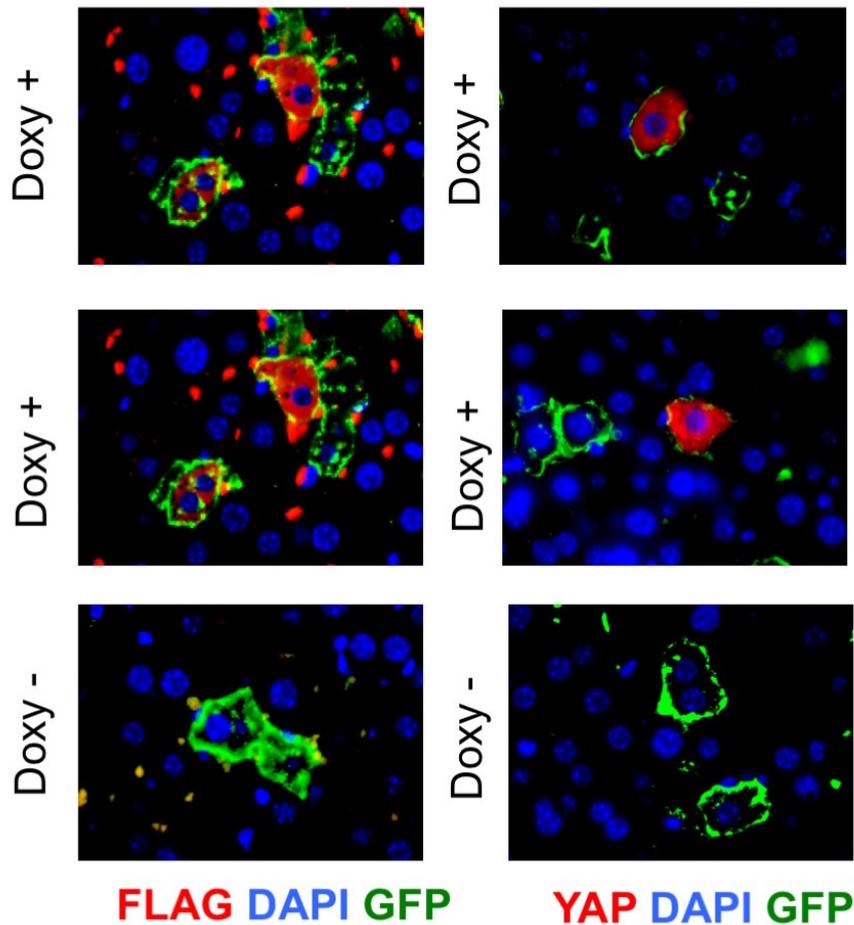


Abbildung 13 *In vivo* YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten mit dem ApoE-YAP-Plasmid in der FLAG- und YAP-Färbung.

Vergleichende repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach Färbung des gleichen Lebergewebes nach Injektion des ApoE-YAP-Plasmids einmal mit Antikörper gegen FLAG und GFP bzw. gegen YAP und GFP. Nach Injektion des Plasmids erfolgte die Aktivierung der CreER durch Tamoxifen-Injektionen. Schließlich erhielt die Versuchsgruppe Doxycyclin-Sucrose (Doxy+) oral zur Aktivierung der induzierbaren Genexpression während die Kontrollgruppe (Doxy-) weiterhin Trinkwasser erhielt.

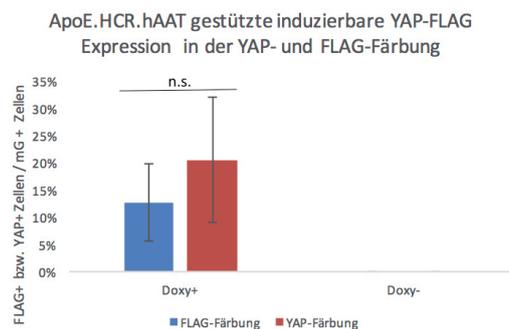


Abbildung 14: YAP-Überexpression mit dem ApoE.HCR.hAAT-Promotor in der FLAG- und YAP-Färbung.

Quantifizierung der *in vivo* YAP-Überexpression in murinen Hepatozyten mit dem ApoE-YAP-Plasmid in einer Färbung mit Antikörpern gegen FLAG bzw. YAP in der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe (Doxy+) und der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe (Doxy-). n.s. = nicht signifikant.

4.2.3 *In vivo* GFP-Überexpression als Marker der shHNF4 α -Expression in murinen Hepatozyten

Das ApoE-shHNF4 α -Plasmid exprimiert als Marker der miR-shHNF4 α -Expression Doxycyclin-abhängig ein intrazelluläres GFP (vgl. **Abbildung 15**). Somit kann über den Nachweis der Expression des intrazellulären GFPs durch Immunfluoreszenz relativ einfach die induzierbare Expression der miR-shHNF4 α nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung 16**).



Abbildung 15 Vektor für die *in vivo* GFP- und miR-shHNF4 α -Überexpression.

Expressionsvektor ApoE.HCR.hAAT-pTACSLIK-miR-shHNF4 α für die *in vivo* GFP-Überexpression und HNF4 α -Suppression. Der Vektor wird im Folgenden mit ApoE-shHNF4 α abgekürzt.

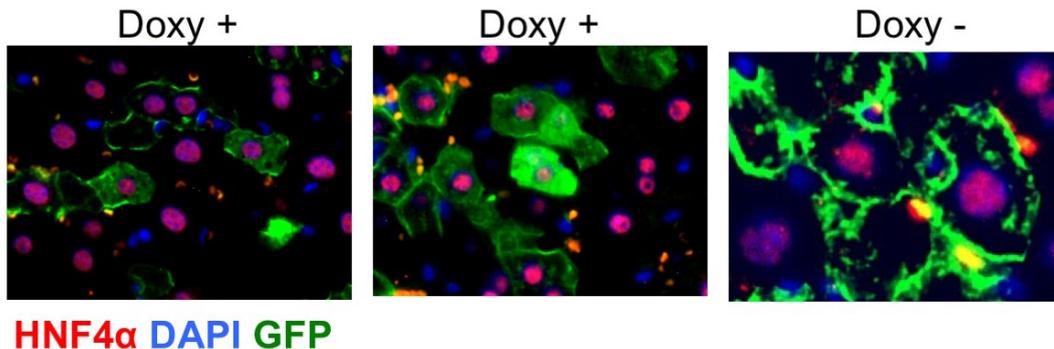


Abbildung 16: Doxycyclin-abhängige *in vivo* GFP-Überexpression in murinen Hepatozyten als Marker der miR-shRNA-Expression.

Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Lebern nach hydrodynamischer Schwanzveneninjektion des ApoE-shHNF4 α -Plasmids. Die Aktivierung der CreER mit Tamoxifen führt zum Nachweis der Transfektion durch Farbumschlag der Membranen zu einem membrangebundenen GFP. Anschließend wird das Trinkwasser der Versuchsgruppe durch Doxycyclin-Sucrose ersetzt (Doxy+), was zu einer induzierbaren Expression eines intrazellulären GFPs (grün) als Marker der shHNF4 α -Expression führt, während die Kontrollgruppe (Doxy-) weiterhin Trinkwasser erhält. Färbung mit Antikörpern gegen HNF4 α in rot und mit Antikörpern gegen GFP in grün dargestellt.

Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der Zellen, die ein intrazelluläres GFP exprimieren gegen die Anzahl der transfizierten Zellen, d.h. gegen die Anzahl der Zellen, die ein membrangebundenes GFP (mG) exprimieren, ausgezählt (vgl. **Abbildung 17**). Dabei zeigt sich eine statistisch signifikante Expression des GFPs in der Doxycyclin-Versuchsgruppe im Vergleich zur Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe. Dies legt die Vermutung nahe, dass mit dem ApoE-shHNF4 α -Plasmid eine induzierbare Expression einer miR-shRNA in murinen Hepatozyten *in vivo* möglich ist.

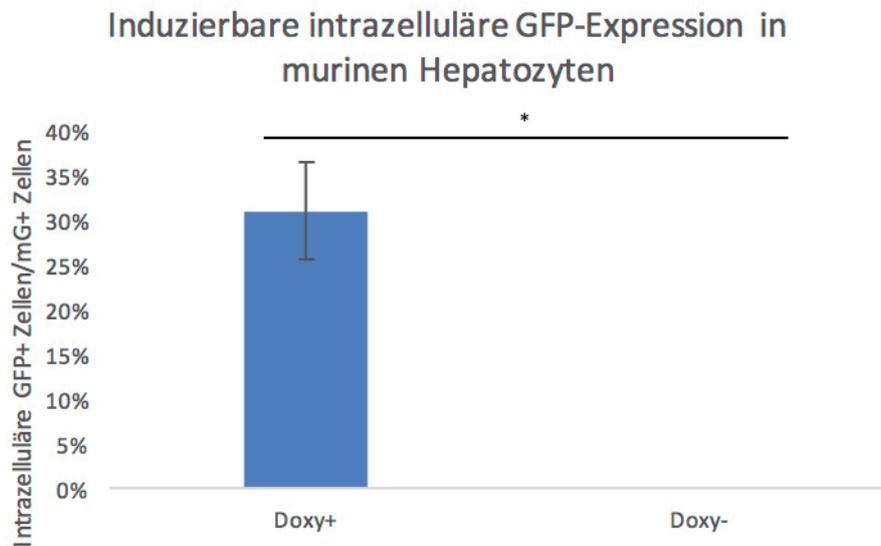


Abbildung 17: Induzierbare intrazelluläre GFP-Expression in murinen Hepatozyten mit dem ApoE-shHNF4 α -Plasmid.

Quantifizierung der Zellen mit intrazellulärer GFP-Expression als Marker der miR-shHNF4 α -Expression relativ zu den mG-positiven transfizierten Zellen in der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe (Doxy+) und der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe (Doxy-) (N =3;3).
 *=p<0,05.

4.2.4 Induzierbare *in vivo* HNF4 α -Suppression

Als nächstes wurde überprüft, ob eine induzierbare Suppression von HNF4 α mit dem ApoE-pTACSLIK-System möglich ist. Dafür wurde eine bereits etablierte shRNA gegen HNF4 α verwendet (vgl. Material und Methoden). Dass eine induzierbare Expression einer miR-shHNF4 α mit dem ApoE-shHNF4-Plasmid (**vgl. Abbildung 15**) in murinen Hepatozyten *in vivo* prinzipiell möglich ist, zeigt die induzierbare Expression des intrazellulären GFPs als Reporter der miR-shHNF4 α -Expression (**vgl. Kapitel 4.2.3**). Eine Suppression der HNF4 α -Expression lässt sich mit der Methode der Immunfluoreszenz mit einer Färbung mit Antikörpern gegen HNF4 α jedoch nicht nachweisen (**vg. Abbildung 18**). Hierbei zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der HNF4 α -Expression zwischen der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe und der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe. Mögliche Gründe dafür sind die Insuffizienz der miR-shRNA in der *single copy*-Anwendung im Transposon-System oder die fehlende Sensitivität der Immunfluoreszenz (**vgl. Diskussion Kapitel 5.4**).

HNF4 α -Expression in murinen Hepatozyten nach Expression des ApoE-shHNF4 α -Plasmids

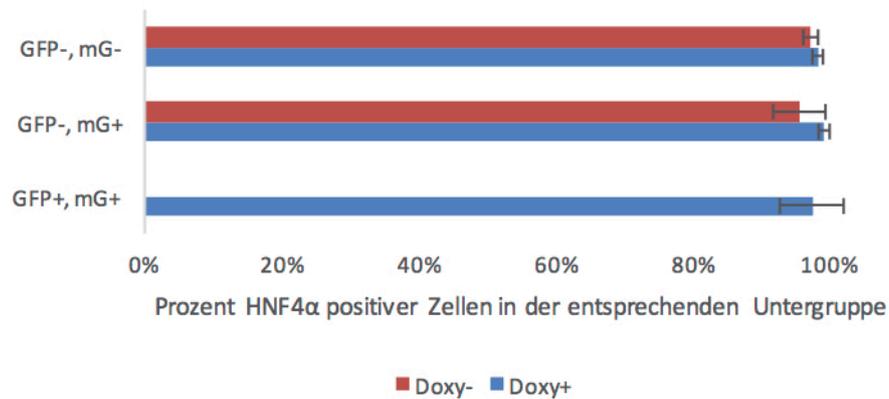


Abbildung 18 Quantifizierung der HNF4 α -Expression mit der Immunfluoreszenz nach Transfektion mit dem ApoE-shHNF4 α -Plasmid.

Nach Transfektion des ApoE-shHNF4 α -Plasmids mit der Methode der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion erfolgte zunächst die Aktivierung der CreER mit Tamoxifen. Anschließend erfolgte die Doxycyclingabe in der Versuchsgruppe (Doxy+), während die Kontrollgruppe (Doxy-) weiterhin Trinkwasser erhielt. Hier wurde die HNF4 α -Expression in nicht transfizierten Zellen (mG-) und in transfizierten Zellen (mG+) mit (intrazelluläres GFP+) und ohne (intrazelluläres GFP-) Expression des Markers für die Expression der miR-shHNF4 α quantifiziert.

5 Diskussion

5.1 *In vivo*-Transfektionsmodell zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten

Diese Arbeit erweitert ein etabliertes Konstrukt, bei dem mit der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion in Kombination mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System exogene Gene stabil in murine Hepatozyten gebracht werden (Yant et al. 2000, Ehmer et al. 2014). Die erfolgreiche Transfektion zeigt sich dabei durch einen Farbumschlag der Membranen von mT nach mG der in den Versuchen verwendeten *Rosa26^{mTmG}*-Reporterermäuse nach Aktivierung der CreER durch Tamoxifen. Dies bestätigt im Wesentlichen Vorversuche mit der konstitutiven Expression einer CreER mit dem gleichen System (Ehmer et al. 2014).

Das Hauptziel dieser Arbeit, die *in vivo* induzierbare Genexpression in murinen Hepatozyten, wurde erreicht. So konnte nachgewiesen werden, dass die Doxycyclin-abhängige Expression von YAP in murinen Hepatozyten mit dem ApoE.HCR.hAAT-pTACSLIK-Plasmid möglich ist. Die Expression von YAP ist dabei sowohl in der FLAG- als auch in der YAP-Färbung in der Doxycyclin-Versuchsgruppe gegenüber der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Ergebnisse der YAP-Färbung bestätigen die Ergebnisse der FLAG-Färbung, es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Färbungen in der Quantifizierung ($p = 0,38$). Die leicht höheren Expressionslevel in der YAP-Färbung könnten, da nicht statistisch signifikant, entweder durch statistischen Fehler erklärt werden oder dadurch, dass geringe Expressionslevel von Proteinen häufig der FLAG-Färbung entgehen (Sasaki et al. 2012).

Somit konnte die Funktionsfähigkeit des pTACSLIK-Systems mit dem leberspezifischen ApoE.HCR.hAAT-Promotor durch eine Überexpression des YAP-FLAG-Proteins gezeigt werden.

5.2 Strikt Doxycyclin-abhängige induzierbare *in vivo*-Transgenexpression in murinen Hepatozyten

Die Vorteile eines induzierbaren Systems bestehen gerade darin, dass das Transgen in Abwesenheit des induzierenden Agens, im Falle des Tet-On-

Systems also Doxycyclin, nicht exprimiert wird. Dies hat vor allem Vorteile, wenn Proteine mit einer hohen biologischen Aktivität oder Toxizität exprimiert werden sollen (Reboredo et al. 2008). Ein Nachteil der ersten Versionen des Tet-On Systems war die Expression von Transgenen auch ohne Doxycyclin, was man als *Leakiness* bezeichnet (Zhu et al. 2001, Delerue et al. 2014). Hier wird der rtTA3 aus dem pSLIK System verwendet, mit dem sich im lentiviralen *in vitro* System bei Shin et al. keine Expression ohne Doxycyclin-Zugabe zeigt (Shin et al. 2006). Bei dem rtTA3 handelt es sich dabei um eine Weiterentwicklung des Transkriptionsfaktors rtTA, der von Das et al. durch virale Evolution in einem HIV_{rtTA}-System durch rtTA-abhängige Replikation und natürliche Selektion entwickelt wurde und eine neue potente F86Y Mutation enthält (Das et al. 2004). Ferner enthält der rtTA3 eine vorher entdeckte zufällige S12G Mutation (Urlinger et al. 2000). Diese Kombination führt *in vitro* zu optimaler Transgenexpression in Anwesenheit von Doxycyclin, während bei Abwesenheit von Doxycyclin keine Transgenexpression nachgewiesen werden kann (Das et al. 2004, Shin et al. 2006). Hier kann gezeigt werden, dass mit dieser Generation des Tet-On-Systems ebenfalls eine zuverlässige Transgenexpression in der Doxy+ Gruppe *in vivo* möglich ist, während gleichzeitig in der Doxycyclin-naiven Gruppe keine Transgenexpression nachweisbar ist. Somit ist – unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz – das System als nicht-*leaky* für den Einsatz *in vivo* zu bezeichnen.

5.3 Promotorabhängige *in vivo*-YAP-Expression in murinen Hepatozyten

Wie diese Arbeit zeigen konnte, ist die *in vivo*-YAP-Expression in murinen Hepatozyten vom Promotor abhängig. Der dem pSLIK-System entstammende UbiC-Promotor führte nur in 0,4% aller transfizierten Zellen in der FLAG-Färbung in der Doxycyclin-Versuchsgruppe zu einer YAP-Expression und somit im Vergleich zur Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe nicht zu einer statistisch signifikanten Expression ($p > 0,05$). Dies deckt sich mit anderen Versuchen die zeigten, dass der UbiC-Promotor in der Leber eine niedrige Aktivität hat. So zeigten Agca et al., dass das menschliche Amyloid-Vorläuferprotein (APP) mit dem UbiC-Promotor in einem lentiviralen System

in Ratten in der Leber deutlich weniger exprimiert wird als im Gehirn, in der Niere und in der Lunge (Agca et al. 2008). Swenson et al. bestätigen die Probleme mit diesem Promotor in der Leber, da ein GFP in UbiC-GFP Mäusen in Hepatozyten nicht sicher nachweisbar ist (Swenson et al. 2007).

Als nächstes wurde versucht, YAP mit dem CMV-Promotor in murinen Hepatozyten *in vivo* zu exprimieren. Der CMV-Promotor hat eine starke Aktivität in *in vitro*-Experimenten (Arita et al. 2008), die Expressionseffektivität *in vivo* ist aber schwer vorherzusagen (Mehta et al. 2009, Chen et al. 2015). Hier exprimieren 0,7% aller transfizierten Zellen mit dem CMV-Promotor YAP in der Versuchsgruppe bei der Quantifizierung mit dem Antikörper gegen den FLAG-Tag. Dies ist im Vergleich zur Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Gründe für ein Versagen des CMV-Promotors in der Leber sind vermutlich Deaktivierung des Promotors durch epigenetische Regulierung (Mehta et al. 2009). Brooks et al. konnte mit Bisulfat-Sequenzierung in Rattenmuskeln zeigen, dass der rasche Abfall der hFGF4- mRNA-Level zum Großteil mit Methylierung des verwendeten CMV-Promotors einhergeht und nicht allein auf dem Abfall der viral transduzierten DNA zurückzuführen ist (Brooks et al. 2004). Chen et al. konnte wiederum zeigen, dass bei einem viral transduzierten CMVlacZ Histon-Deacetylierung eine wichtige Rolle bei der Gen-Stillegung spielt und durch den HDAC-Inhibitor Trichostatin A die Transkription wiederum aktiviert werden kann (Chen et al. 2000, Lai et al. 2010). Somit ist zu vermuten, dass auch in dem hier vorgestellten pTACSLIK Transposon-System eine signifikante YAP-Expression mit dem CMV-Promotor *in vivo* auf Grund von epigenetischer Regulation nicht möglich ist. Dies wird unterstützt von einer Publikation von Magnusson et al., die zeigen konnte, dass der CMV-Promotor in der Leber nach hydrodynamischer Schwanzveneninjektion episomal zwar eine hohe Aktivität hat, diese aber nach gerade mal zwei Tagen abfällt (Magnusson et al. 2011).

Eine gute *in vivo* YAP-Expression ist hingegen mit dem leberspezifischen ApoE.HCR.hAAT-Promotor möglich und die Expression war sowohl in der YAP- als auch in der FLAG-Färbung statistisch gegenüber der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$). Dies ist wenig überraschend, da dieser Promotor als leberspezifischer Promotor von Miao et

al. für die hepatische Faktor IX Überexpression zur Gentherapie der Hämophilie B entwickelt wurde und bereits in unserer Arbeitsgruppe für die hepatische *in vivo*-Expression der CreER etabliert ist (Miao et al. 2000, Ehmer et al. 2014).

Auffällig ist jedoch, dass die YAP-Überexpression mit dem ApoE.HCR.hAAT-Promotor mit 13% aller transfizierten Zellen (Minimum 7%, Maximum 23%) deutlich weniger effektiv ist als die Expression der ebenfalls durch den ApoE.HCR.hAAT-Promotor gesteuerten CreER-Expression zur Vermittlung des mG-Reporters der *Rosa26^{mTmG}*-Reportermause. Für diese Ergebnisse gibt es mehrere denkbare Gründe. Zum einen ist es möglich, dass die ApoE.HCR.hAAT-gesteuerte Gendosis für eine einmalige CreER-vermittelte Rekombination ausreicht, aber nicht für eine langfristige rtTA3-vermittelte induzierbare Genexpression. Die hohe Effizienz der CreER-vermittelten Rekombination deckt sich mit einer Studie von Undeutsch et al., die in Thyreozyten mit einer vom Thyreoglobulin-Gen-Promotor-gesteuerten CreER zeigen konnten, dass es in allen Thyreozyten zu einer Rekombination kommt (Undeutsch et al. 2014). Eine weitere Erklärung könnte in der Wahl des überexprimierten Transgenes liegen. So ist die zytosolische Expression von YAP durch die Inaktivierung durch LATS1/2 instabil (Zhang et al. 2010, Jie et al. 2013, Kong et al. 2015, Ehmer et al. 2016), was den Nachweis eines exogen überexprimierten YAPs erschweren könnte. Dies wird auch von den Ergebnissen der GFP-Überexpression als Marker der miR-HNF4 α -Expression unterstützt, die mit einer durchschnittlichen Expression von 31% aller transfizierten Zellen wesentlich höher ist als die des labilen YAP-Transgenes. Ein weiterer Grund könnte in der fehlenden Sensitivität des Nachweises der Transgenexpression mit der Immunfluoreszenz sein, die gerade in der Leber bei starker Autofluoreszenz einen Nachteil hat. Auch eine insuffiziente Doxycyclin-Dosis könnte eine Ursache für eine unzureichende induzierbare Transgenexpression sein. Dies wird im Detail später diskutiert (**vgl. Diskussion 5.5.2**).

5.4 Induzierbare miR-shRNA *in vivo*-Expression in murinen Hepatozyten

Wie durch die statistisch signifikante Expression des intrazellulären GFPs durch das ApoE-shHNF4 α -Plasmid in der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe gezeigt werden kann, ist eine induzierbare Expression von miR-shRNAs in murinen Hepatozyten *in vivo* möglich. Jedoch kann der HNF4 α -Knockdown mit der Methode der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden, es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Zellen in der Doxycyclin-positiven Gruppe, die ein intrazelluläres GFP als Marker der miR-shRNA-Expression exprimieren, und GFP-negativen Zellen. Ebenso zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu den nicht transfizierten mG-negativen Zellen oder zu der Doxycyclin-naiven Kontrollgruppe. In dem adenoviralen System, in dem die shRNA ursprünglich evaluiert wurde, ist die Expression der shRNA vermutlich um ein Vielfaches effizienter als in einem Transposon-System mit *Single-Copy* Integration (Turchiano et al. 2014). Auch in diesem System führte die shRNA-Transfektion lediglich zu einer Reduktion der HNF4 α -mRNA Expression um 67% (Yin et al. 2011). Es ist daher plausibel, dass mit der unsensitiven Methode der Immunfluoreszenz auch bei induzierbarer Expression der miR-shRNA keine Unterschiede in der Expression des HNF4 α zwischen der Doxycyclin-positiven und der Doxycyclin-naiven Gruppe nachgewiesen werden kann. Zusammenfassend scheint die induzierbare Expression einer miR-shRNA in murinen Hepatozyten mit einem Transposon-System über die hydrodynamische Schwanzveneninjektion *in vivo* durchaus möglich zu sein, ein vermuteter Gen-Knockdown kann aber mit der hier verwendeten Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden. Der Gen-Knockdown scheint angesichts der GFP-Expression als Marker der miR-shRNA-Expression, aber auch auf Grund von vorangehenden Arbeiten, die einen erfolgreichen Gen-Knockdown mit ähnlichen Methoden, wenn auch nicht mit induzierbarer shRNA-Expression, bereits nachweisen konnten, wahrscheinlich. So konnten Wuestefeld et al. zeigen, dass eine shRNA gegen die Kinase MKK4, die mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System und der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion in die Leber gebracht wurde, in einem Knockout-Modell für Leberversagen die Regenerationskapazität der Leber erhöht

(Wuestefeld et al. 2013). Zwar wurde weder der Expressionslevel der shRNA, noch der mRNA-Knockdown in dieser Publikation quantifiziert, jedoch legen Phänotyp und Protein-Knockdown im Western-Blot nahe, dass ein System mit einer shRNA-Expression in *Single Copy* prinzipiell funktioniert (Wuestefeld et al. 2013).

Eine mögliche Methode den HNF4 α -*Knockdown* in den hier gezeigten Versuchen nachzuweisen wäre die quantitative reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) für HNF4 α nach durchflusszytometrischer Selektion (FACS) der GFP-positiven Zellen gewesen. Dies ist jedoch vergleichsweise technisch aufwendig, da die Leber zunächst bei Erhalt der Vitalität der Hepatozyten lysiert werden muss. Im Anschluss müssen die vitalen Zellen in einem eingeschränkten Zeitfenster durchflusszytometrisch sortiert werden. Auch hier kann es bei fehlerhaften technischen Einstellungen zu einem Versagen des Experiments kommen. Im Anschluss muss bei den sortierten Zellen eine qRT-PCR durchgeführt werden um die Menge der HNF4 α -mRNA zu quantifizieren. Zusammengefasst ist die Etablierung eines experimentellen Versuchsaufbaus zum Nachweis des *Knockdowns* von HNF4 α alleine um die Funktionstüchtigkeit des pTACSLIK-Systems zu zeigen zu aufwendig.

5.5 Ausblick

Hier konnte gezeigt werden, dass mit dem pTACSLIK-System die konstitutive Expression einer CreER in Kombination mit der induzierbaren Expression eines exogenen Transgens oder einer miR-shRNA möglich ist. Es besteht jedoch mit einer durchschnittlichen Expression des YAP-Transgens in 13% der transfizierten Zellen bzw. des GFPs als Reporter der miR-shRNA in 31% der transfizierten Zellen noch Potential für Verbesserungen des Systems. Hier sollen im Folgenden als Ausblick mögliche Verbesserungen des pTACSLIK-Systems, wie die Einklonierung eines universellen Promotors, eine effizientere Doxycyclin-Administration oder eine bessere Vorselektion von miR-shRNAs dargestellt werden. Abschließend folgt eine Vorstellung von möglichen Anwendungen des Systems.

5.5.1 Einklonierung eines universellen Promotors

Das hier vorgestellte neue *in vivo*-Transfektionsmodell zur induzierbaren Genexpression zeigte die höchste Expressionseffektivität mit dem ApoE.HCR.hAAT-Promotor. Dies war zu erwarten, ist der Promotor ja als leberspezifischer Promotor konstruiert worden (Miao et al. 2000). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung des entsprechenden Promotors ist ein vielfach beschriebener Mechanismus der molekularen Tumorgenese (Mittag et al. 2006, Zou et al. 2009). Bei Anwendung des Transfektionsmodells mit einem leberspezifischen Promotor im Rahmen eines HCC-Modells könnte es im Laufe der Karzinogenese ebenfalls zur Promotorinaktivierung und somit zum Transgenverlust kommen. Insgesamt scheint es daher ratsam das pTACSLIK-System bei zukünftigen derart komplexen Systemen um ein Konstrukt mit einem ubiquitär aktiven Promotor zu erweitern. *In vivo*-Versuche haben gezeigt, dass der CAGGS- und der EF1 α -Promotor eine gute Aktivität in der Leber haben (Nguyen et al. 2008). Diese könnten in Zukunft somit eine gute Alternative zum ApoE.HCR.hAAT-Promotor darstellen.

5.5.2 Optimierung der Doxycyclin-Gabe

Sowohl in *in vitro*- (Koponen et al. 2003) wie in *in vivo*- (Saitoh et al. 1998) Versuchen zeigte sich, dass die Genexpression des TRE-kontrollierten Transgens von der Doxycyclin-Dosis abhängt. Eine sichere und effiziente Doxycyclin-Administration für die Mäuse ist daher grundlegende Voraussetzung für die effiziente induzierbare Genexpression mit dem Tet-On System *in vivo*. In diesem Versuchsaufbau wird Doxycyclin im Trinkwasser mit einer Konzentration von 1mg/ml gegeben. Die zugegebene Sucroslösung soll den Geschmack für die Mäuse verbessern (Hojman et al. 2007). Für kürzere Versuche ist diese Methode gut etabliert (Yao et al. 2016). Bei längerer Versuchsdauer bestehen jedoch Bedenken, dass die Mäuse durch die Zuckerlösung dehydrieren, oder dass Doxycyclin in flüssiger Lösung zu instabil ist. Während Versuche zeigen konnten, dass Doxycyclin in Trinkflaschen über sieben Tage stabil bleibt (Redelsperger et al. 2016), bestätigen andere Studien jedoch, dass es durch die Sucrose zu Polydipsie und Dehydratation kommt (Cawthorne et al. 2007, Hojman et al. 2007). Bei

längerer Versuchsdauer sollte daher aus ethischen Gründen und zur Sicherstellung von konstanten Versuchsbedingungen auf Doxycyclin-Futter als einfachste und sicherste Methode zur Doxycyclin-Administration bei Mäusen zurückgegriffen werden (Cawthorne et al. 2007).

5.5.3 Identifizierung von effizienteren miR-shRNAs für den Gen-Knockdown *in vivo*

Obwohl eine induzierbare miR-shRNA-HNF4 α -Expression mit dem ApoE-HNF4 α -Plasmid, wie die Expression des intrazellulären GFPs als Marker zeigt, möglich ist, ist in der Doxycyclin-positiven Versuchsgruppe leider kein HNF4 α -Knockdown mit der Immunfluoreszenz nachweisbar. Die shHNF4 α wurde von Yin et al. mit dem *BLOCK-iT RNAi Designer* (Fa. Invitrogen) erzeugt und zeigte in der Originalpublikation lediglich eine Reduktion der mRNA-Expression um 67% (Yin et al. 2011). Die Funktionsfähigkeit der mRNA in der Originalpublikation konnte zwar sowohl durch den Proteinknockdown im Western-Blot als auch durch den Phänotyp mit Leberverfettung bestätigt werden (Yin et al. 2011). Es ist jedoch denkbar, dass der im adenoviralen System suffiziente mRNA-Knockdown für die Anwendung im *single copy*-Transposonsystem nicht ausreichend ist. Effizientere RNAi-Modelle schaffen eine Reduktion der mRNA-Expression um über 90% (Chen et al. 2015). Durch die Erzeugung von shRNAs mit Algorithmen lässt sich oft nur schwer deren Effizienz vorhersagen (Fellmann et al. 2011). Eine Möglichkeit die Effizienz des Gen-Knockdowns mit dem pTACSLIK System zu verbessern, wäre die vorherige *in vitro* Testung der miR-shRNAs, beispielsweise in einem Fluoreszenz-„Sensor Assay“ (Fellmann et al. 2011, Kojima et al. 2014). Dabei wird die Effizienz der shRNA *in vitro* über die Expression eines fluoreszierenden Proteins bestimmt, das im 3'UTR eine Zielsequenz für die shRNA hat (**vgl. Abbildung 19**) (Du et al. 2004, Fellmann et al. 2011, Kojima et al. 2014). Fellmann et al. konnten zeigen, dass ihr System dabei shRNAs identifiziert, die besonders effektiv bei *single copy*-Integration die Genexpression supprimieren (Fellmann et al. 2011). Dies ist besonders wichtig, da mit dem *Sleeping Beauty*-Transposon-System häufig nur eine sehr geringe Anzahl von Kopien des Konstruktes in das

Zielgenom integriert. Turchiano et al. zeigte für ein Modell mit der *Sleeping Beauty*-Transposase SB100X in Keratinozyten, dass die durchschnittliche Kopienzahl bei lediglich 1,3 liegt (Turchiano et al. 2014).



Abbildung 19 Prinzip des Fluoreszenz-„Sensor Assays“.

Die Expression der miR-shRNA führt zu einer Suppression des Fluoreszenzreporters über die in die 3'UTR inklonierte miR-shRNA-Zielsequenz (modifiziert nach Fellmann et al. 2011, Kojima et al. 2014).

5.5.4 Anwendung des neuen *in vivo*-Transfektionsmodells zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten in Kombination mit induzierbaren Mausmodellen

Durch die Kombination einer konstitutiv exprimierten Tamoxifen-induzierbaren-CreER und der Doxycyclin-induzierbaren Expression eines Transgenes oder einer miR-shRNA ist der Einsatz in vielfältigen translationalen Mausmodellen denkbar. Durch die CreER kann ein LSL-kontrolliertes Protein in einer Mauslinie im Sinne eines Krebsmodelles, beispielsweise ein Onkogen, aktiviert oder ein gefloxtes Tumorsuppressorgen inaktiviert werden (Ikenoue et al. 2016). Auf gleiche Art und Weise kann das System auch für Modelle der Leberregeneration angewendet werden (Wuestefeld et al. 2013). Durch die Induzierbarkeit der Transgen- bzw. miR-shRNA-Expression wird eine flexiblere Kontrolle über die Überexpression bzw. Suppression des Zielgenes erreicht.

Eine flexible Kontrolle über die Expression des Transgens bzw. der miR-shRNA kann für bestimmte Modelle wichtig sein, da einzelne Gene oft eine unterschiedliche Rolle zu gewissen Zeitpunkten der Tumorentwicklung spielen. So wurde zum Beispiel bei einer Exom-Sequenzierung von 243 Lebertumoren festgestellt, dass TERT Promotor-Mutationen frühe Ereignisse der Tumorgenese sind, während FGF3, FGF4 und FGF19/CCND1-Amplifikationen hingegen in fortgeschritteneren Stadien bei aggressiveren Tumoren auftreten (Schulze et al. 2015). Mit diesem Transfektionssystem kann man Modelle entwickeln, die neben dem kanzerogenen Effekt einer Mutation auch die Auswirkung der Umkehrbarkeit der Mutation im weiteren

Verlauf der Tumorentwicklung erforschen, um dieses Gen als mögliches Ziel für eine Therapie zu untersuchen. Das dahinter stehende Konzept, *oncogene addiction*, beschreibt die Idee, dass bei manchen Tumoren ein einzelnes Gen für Wachstum und Überleben verantwortlich ist, und dass dessen Hemmung therapeutisch wirkt (Torti et al. 2011). Ein Beispiel dafür ist eine Publikation von Feldser et al., die zeigen konnte, dass p53 nicht nur Mutationen, die zur Tumorentstehung führen unterdrückt, sondern dass p53 auch, wenn es im Verlauf der Tumorentwicklung in einem translationalen Modell des Lungenkarzinoms reaktiviert wird, wieder zu einer „inkompletten Regression“ des Tumorwachstums führen kann (Feldser et al. 2010).

Eine weitere Anwendung für ein Transposonsystem zur induzierbaren miR-shRNA-Expression könnte die Entwicklung eines gepoolten shRNA-Screens sein um onkogene Mutationen zu identifizieren oder wie in einer Publikation von Rudalska et al., Gene die zu Resistenzentwicklung bei der Therapie des HCCs mit Sorafenib beitragen (Rudalska et al. 2014). Rudalska et al. verwenden dafür ein HCC-Modell, bei dem ein $Nras^{G12V}$ mit einem Transposon-System hydrodynamisch in $p19^{Arf}$ -defiziente Mäuse gebracht wird. In diesem wurde ein Transposon-basierter Screen mit über 253 shRNAs gegen fokale genomische Amplifikationen, die aus ca. 100 menschlichen HCC-Proben identifiziert wurden (Sawey et al. 2011), in Mäusen mit und ohne Sorafenib durchgeführt. Durch *Deep Sequencing* wurden dann die Proportionen der shRNAs zwischen der Sorafenib- und der Kontrollgruppe ermittelt und verglichen. Dabei zeigte sich für die shRNAs gegen die MAPK14 eine besondere Erniedrigung in der Sorafenib-Gruppe was die Vermutung nahe legt, dass ein Knockdown der MAPK14 die Tumoren für Sorafenib empfindlicher macht (Rudalska et al. 2014).

Mit dem hier vorgestellten Transfektionsmodell zur induzierbaren Genexpression sind vergleichsweise komplizierte translationale Tumor- und Therapiemodelle möglich. Die Vorteile des hier vorgestellten Modells sind jedoch, dass die Expression der miR-shRNAs Doxycyclin-induzierbar und durch die konstitutive Expression der CreER die Kombination mit konditionellen Mausmodellen möglich ist.

5.6 Schlussfolgerung

Das hier vorgestellte pTACSLIK *in vivo*-Transfektionsmodell zur induzierbaren Genexpression in murinen Hepatozyten ist ein vielseitiges System zur Gen- und miR-shRNA-Überexpression in der Mäuseleber. Durch die konstitutive Expression der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase lässt sich die induzierbare Expression eines Transgens oder einer miR-shRNA mit induzierbaren Cre-Lox-Mauslinien kombinieren. Durch weitere Verbesserungen wie die Einklonierung eines universellen Promotors oder ein System zur besseren Identifizierung von effizienteren miR-shRNAs sind somit Grundlagen für weitere Projekte zur Erforschung von Leberkrankheiten in translationalen Mausmodellen gelegt.

Teile dieser Arbeit wurde zur Veröffentlichung akzeptiert:

Hubner EK, Lechler C, Kohnke-Ertel B, Zmoos A-F, Sage J, Schmid RM, Ehmer U. An *in vivo* transfection system for inducible gene expression and gene silencing in murine hepatocytes. J Gene Med. 2017.

Hubner EK, Lechler C, Rösner TN, Kohnke-Ertel B, Schmid RM, Ehmer U. Constitutive and Inducible Systems for Genetic *In Vivo* Modification of Mouse Hepatocytes Using Hydrodynamic Tail Vein Injection. J Vis Exp. 2018.

6 Bibliographie

Agca, C., J. J. Fritz, L. C. Walker, A. I. Levey, A. W. Chan, J. J. Lah und Y. Agca (2008). "Development of transgenic rats producing human beta-amyloid precursor protein as a model for Alzheimer's disease: transgene and endogenous APP genes are regulated tissue-specifically." BMC Neuroscience **9**: 28.

Albanese, C., A. T. Reutens, B. Bouzahzah, M. Fu, M. D'Amico, T. Link, R. Nicholson, R. A. Depinho und R. G. Pestell (2000). "Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice." FASEB Journal **14**(7): 877-884.

Arhel, N. J., S. Souquere-Besse und P. Charneau (2006). "Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels." Retrovirology **3**: 38.

Arita, E., M. Kondoh, K. Isoda, H. Nishimori, T. Yoshida, H. Mizuguchi und K. Yagi (2008). "Evaluation of promoter strength in mouse and rat primary hepatocytes using adenovirus vectors." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **70**(1): 1-6.

Bachmann, H. S., W. Siffert und U. H. Frey (2003). "Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique." Pharmacogenetics **13**(12): 759-766.

Belcher, J. D., J. V. Vineyard, C. M. Bruzzone, C. Chen, J. D. Beckman, J. Nguyen, C. J. Steer und G. M. Vercellotti (2010). "Heme oxygenase-1 gene delivery by Sleeping Beauty inhibits vascular stasis in a murine model of sickle cell disease." Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany) **88**(7): 665-675.

Benachenhou, F., G. O. Sperber, E. Bongcam-Rudloff, G. Andersson, J. D. Boeke und J. Blomberg (2013). "Conserved structure and inferred evolutionary history of long terminal repeats (LTRs)." Mob DNA **4**(1): 5.

Boden, D., O. Pusch, R. Silbermann, F. Lee, L. Tucker und B. Ramratnam (2004). "Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins." Nucleic Acids Research **32**(3): 1154-1158.

Bowen, G. P., S. L. Borgland, M. Lam, T. A. Libermann, N. C. Wong und D. A. Muruve (2002). "Adenovirus vector-induced inflammation: capsid-dependent induction of the C-C chemokine RANTES requires NF-kappa B." Human Gene Therapy **13**(3): 367-379.

Brooks, A. R., R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu und G. M. Rubanyi (2004). "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle." Journal of Gene Medicine **6**(4): 395-404.

Brummelkamp, T. R., R. Bernards und R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296**(5567): 550-553.

Budker, V., G. Zhang, S. Knechtle und J. A. Wolff (1996). "Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes." Gene Therapy **3**(7): 593-598.

Capecchi, M. R. (1989). "The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting." Trends in Genetics **5**(3): 70-76.

Cawthorne, C., R. Swindell, I. J. Stratford, C. Dive und A. Welman (2007). "Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model." J Biomol Tech **18**(2): 120-123.

Chen, B. D., C. H. He, X. C. Chen, S. Pan, F. Liu, X. Ma, X. M. Li, M. T. Gai, J. Tao, Y. T. Ma, Y. N. Yang und X. M. Gao (2015). "Targeting transgene to the heart and liver with AAV9 by different promoters." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **42**(10): 1108-1117.

Chen, W. Y. und T. M. Townes (2000). "Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and

chromatin condensation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(1): 377-382.

Chen, Z., B. Luo, T. Q. Cai, A. Thankappan, Y. Xu, W. Wu, J. DiMuzio, T. Lifsted, M. DiPietro, J. Disa, B. Ng, K. Leander, S. Clark, L. Hoos, Y. Zhou, N. Jochnowitz, C. Jachec, P. Szczerba, M. E. Gindy, W. Strapps, L. Sepp-Lorenzino, D. A. Seiffert, L. Lubbers und M. Tadin-Strapps (2015). "Proof-of-concept Studies for siRNA-mediated Gene Silencing for Coagulation Factors in Rat and Rabbit." Mol Ther Nucleic Acids **4**: e224.

Cheng, J., Y. Han und J. D. Jiang (2014). "Establishment of drug-resistant HBV small-animal models by hydrodynamic injection." Acta Pharm Sin B **4**(4): 270-276.

Chung, S. I., H. Moon, D. Y. Kim, K. J. Cho, H. L. Ju, Y. Kim do, S. H. Ahn, K. H. Han und S. W. Ro (2016). "Development of a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma with a liver fibrosis background." BMC Gastroenterology **16**: 13.

Connelly, S. (1999). "Adenoviral vectors for liver-directed gene therapy." Current Opinion in Molecular Therapeutics **1**(5): 565-572.

Couturier, M., M. Bahassi el und L. Van Melderen (1998). "Bacterial death by DNA gyrase poisoning." Trends in Microbiology **6**(7): 269-275.

Das, A. T., X. Zhou, M. Vink, B. Klaver, K. Verhoef, G. Marzio und B. Berkhout (2004). "Viral evolution as a tool to improve the tetracycline-regulated gene expression system." Journal of Biological Chemistry **279**(18): 18776-18782.

De Paola, V., S. Arber und P. Caroni (2003). "AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks." Nature Neuroscience **6**(5): 491-500.

Delerue, F., M. White und L. M. Ittner (2014). "Inducible, tightly regulated and non-leaky neuronal gene expression in mice." Transgenic Research **23**(2): 225-233.

Dong, J. Y., P. D. Fan und R. A. Frizzell (1996). "Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus." Human Gene Therapy **7**(17): 2101-2112.

Dow, L. E. und S. W. Lowe (2012). "Life in the fast lane: mammalian disease models in the genomics era." Cell **148**(6): 1099-1109.

Dow, L. E., Z. Nasr, M. Saborowski, S. H. Ebbesen, E. Manchado, N. Tasdemir, T. Lee, J. Pelletier und S. W. Lowe (2014). "Conditional reverse tet-transactivator mouse strains for the efficient induction of TRE-regulated transgenes in mice." PLoS One **9**(4): e95236.

Doyle, A., M. P. McGarry, N. A. Lee und J. J. Lee (2012). "The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease." Transgenic Research **21**(2): 327-349.

Du, Q., H. Thonberg, H. Y. Zhang, C. Wahlestedt und Z. Liang (2004). "Validating siRNA using a reporter made from synthetic DNA oligonucleotides." Biochemical and Biophysical Research Communications **325**(1): 243-249.

Ehmer, U. und J. Sage (2016). "Control of Proliferation and Cancer Growth by the Hippo Signaling Pathway." Molecular Cancer Research **14**(2): 127-140.

Ehmer, U., A. F. Zmoos, R. K. Auerbach, D. Vaka, A. J. Butte, M. A. Kay und J. Sage (2014). "Organ Size Control Is Dominant over Rb Family Inactivation to Restrict Proliferation In Vivo." Cell Rep **8**(2): 371-381.

Einhauer, A. und A. Jungbauer (2001). "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **49**(1-3): 455-465.

Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger und P. Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(20): 10887-10890.

Feil, R., J. Wagner, D. Metzger und P. Chambon (1997). "Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains." Biochemical and Biophysical Research Communications **237**(3): 752-757.

Feldser, D. M., K. K. Kostova, M. M. Winslow, S. E. Taylor, C. Cashman, C. A. Whittaker, F. J. Sanchez-Rivera, R. Resnick, R. Bronson, M. T. Hemann und T. Jacks (2010). "Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression." Nature **468**(7323): 572-575.

Fellmann, C., J. Zuber, K. McJunkin, K. Chang, C. D. Malone, R. A. Dickins, Q. Xu, M. O. Hengartner, S. J. Elledge, G. J. Hannon und S. W. Lowe (2011). "Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay." Molecular Cell **41**(6): 733-746.

Festa, F., J. Steel, X. Bian und J. Labaer (2013). "High-throughput cloning and expression library creation for functional proteomics." Proteomics **13**(9): 1381-1399.

Fink, D., S. Wohrer, M. Pfeffer, T. Tombe, C. J. Ong und P. H. Sorensen (2010). "Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice." Genesis **48**(12): 723-729.

Follenzi, A., G. Sabatino, A. Lombardo, C. Boccaccio und L. Naldini (2002). "Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors." Human Gene Therapy **13**(2): 243-260.

Frese, K. K. und D. A. Tuveson (2007). "Maximizing mouse cancer models." Nature Reviews: Cancer **7**(9): 645-658.

Froger, A. und J. E. Hall (2007). "Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method." J Vis Exp(6): 253.

Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa und F. H. Ruddle (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(12): 7380-7384.

Guichard, C., G. Amaddeo, S. Imbeaud, Y. Ladeiro, L. Pelletier, I. B. Maad, J. Calderaro, P. Bioulac-Sage, M. Letexier, F. Degos, B. Clement, C. Balabaud, E. Chevet, A. Laurent, G. Couchy, E. Letouze, F. Calvo und J. Zucman-Rossi (2012). "Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma." Nature Genetics **44**(6): 694-698.

Guidotti, L. G. und F. V. Chisari (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response." Annual Review of Immunology **19**: 65-91.

Hackett, P. B., D. A. Largaespada, K. C. Switzer und L. J. Cooper (2013). "Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy." Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine **161**(4): 265-283.

Hamilton, D. L. und K. Abremski (1984). "Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites." Journal of Molecular Biology **178**(2): 481-486.

Hausl, M. A., W. Zhang, N. Muther, C. Rauschhuber, H. G. Franck, E. P. Merricks, T. C. Nichols, M. A. Kay und A. Ehrhardt (2010). "Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B." Molecular Therapy **18**(11): 1896-1906.

Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward und F. J. Gonzalez (2001). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis." Molecular and Cellular Biology **21**(4): 1393-1403.

He, C. X., D. Shi, W. J. Wu, Y. F. Ding, D. M. Feng, B. Lu, H. M. Chen, J. H. Yao, Q. Shen, D. R. Lu und J. L. Xue (2004). "Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration." World Journal of Gastroenterology **10**(4): 567-572.

Hendrickx, R., N. Stichling, J. Koelen, L. Kuryk, A. Lipiec und U. F. Greber (2014). "Innate immunity to adenovirus." Human Gene Therapy **25**(4): 265-284.

Hojman, P., J. Eriksen und J. Gehl (2007). "Tet-On induction with doxycycline after gene transfer in mice: sweetening of drinking water is not a good idea." Animal Biotechnology **18**(3): 183-188.

Hu, C., R. W. Busuttil und G. S. Lipshutz (2010). "RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy." Journal of Gene Medicine **12**(9): 766-778.

Hutvagner, G. und P. D. Zamore (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." Current Opinion in Genetics and Development **12**(2): 225-232.

Ikenoue, T., Y. Terakado, H. Nakagawa, Y. Hikiba, T. Fujii, D. Matsubara, R. Noguchi, C. Zhu, K. Yamamoto, Y. Kudo, Y. Asaoka, K. Yamaguchi, H. Ijichi, K. Tateishi, N. Fukushima, S. Maeda, K. Koike und Y. Furukawa (2016). "A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion." Scientific Reports **6**: 23899.

Irion, S., H. Luche, P. Gadue, H. J. Fehling, M. Kennedy und G. Keller (2007). "Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells." Nature Biotechnology **25**(12): 1477-1482.

Ivics, Z. und Z. Izsvak (2015). "Sleeping Beauty Transposition." Microbiol Spectr **3**(2): Mdna3-0042-2014.

Izsvak, Z., Z. Ivics und R. H. Plasterk (2000). "Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates." Journal of Molecular Biology **302**(1): 93-102.

Jager, L., M. A. Hausl, C. Rauschhuber, N. M. Wolf, M. A. Kay und A. Ehrhardt (2009). "A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors." Nature Protocols **4**(4): 547-564.

Jie, L., W. Fan, D. Weiqi, Z. Yingqun, X. Ling, S. Miao, C. Ping und G. Chuanyong (2013). "The hippo-yes association protein pathway in liver cancer." Gastroenterol Res Pract **2013**: 187070.

Kawabata, K., Y. Takakura und M. Hashida (1995). "The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake." Pharmaceutical Research **12**(6): 825-830.

Kay, M. A., J. C. Glorioso und L. Naldini (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nature Medicine **7**(1): 33-40.

Keng, V. W., B. R. Tschida, J. B. Bell und D. A. Largaespada (2011). "Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system." Hepatology **53**(3): 781-790.

Kim, I. H., A. Jozkowicz, P. A. Piedra, K. Oka und L. Chan (2001). "Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(23): 13282-13287.

Kojima, S. und G. G. Borisy (2014). "An image-based, dual fluorescence reporter assay to evaluate the efficacy of shRNA for gene silencing at the single-cell level." F1000Res **3**: 60.

Kong, D., Y. Zhao, T. Men und C. B. Teng (2015). "Hippo signaling pathway in liver and pancreas: the potential drug target for tumor therapy." Journal of Drug Targeting **23**(2): 125-133.

Koponen, J. K., H. Kankkonen, J. Kannasto, T. Wirth, W. Hillen, H. Bujard und S. Yla-Herttuala (2003). "Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo." Gene Therapy **10**(6): 459-466.

Krek, W., M. E. Ewen, S. Shirodkar, Z. Arany, W. G. Kaelin, Jr. und D. M. Livingston (1994). "Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase." Cell **78**(1): 161-172.

Lai, M. D., C. S. Chen, C. R. Yang, S. Y. Yuan, J. J. Tsai, C. F. Tu, C. C. Wang, M. C. Yen und C. C. Lin (2010). "An HDAC inhibitor enhances the antitumor activity of a CMV promoter-driven DNA vaccine." Cancer Gene Therapy **17**(3): 203-211.

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczký, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump,

H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen und J. Szustakowki (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.

Lehner, B., A. G. Fraser und C. M. Sanderson (2004). "Technique review: how to use RNA interference." Brief Funct Genomic Proteomic **3**(1): 68-83.

Lewandoski, M. (2001). "Conditional control of gene expression in the mouse." Nat Rev Genet **2**(10): 743-755.

Li, M., H. Zhao, X. Zhang, L. D. Wood, R. A. Anders, M. A. Choti, T. M. Pawlik, H. D. Daniel, R. Kannangai, G. J. Offerhaus, V. E. Velculescu, L. Wang, S. Zhou, B. Vogelstein, R. H. Hruban, N. Papadopoulos, J. Cai, M. S. Torbenson und K. W. Kinzler (2011). "Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma." Nature Genetics **43**(9): 828-829.

Li, Q., X. Cao, H. Y. Qiu, J. Lu, R. Gao, C. Liu, M. X. Yuan, G. R. Yang und J. K. Yang (2016). "A three-step programmed method for the identification of causative gene mutations of maturity onset diabetes of the young (MODY)." Gene **588**(2): 141-148.

Liu, F., Y. Song und D. Liu (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." Gene Therapy **6**(7): 1258-1266.

Liu, Q. und D. A. Muruve (2003). "Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors." Gene Therapy **10**(11): 935-940.

Lundstrom, K. (2003). "Latest development in viral vectors for gene therapy." Trends in Biotechnology **21**(3): 117-122.

Magnusson, T., R. Haase, M. Schleef, E. Wagner und M. Ogris (2011). "Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhancer combinations." Journal of Gene Medicine **13**(7-8): 382-391.

Mahler Convenor, M., M. Berard, R. Feinstein, A. Gallagher, B. Illgen-Wilcke, K. Pritchett-Corning und M. Raspa (2014). "FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units." Laboratory Animals **48**(3): 178-192.

Malik, P., S. A. McQuiston, X. J. Yu, K. A. Pepper, W. J. Krall, G. M. Podsakoff, G. J. Kurtzman und D. B. Kohn (1997). "Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line." Journal of Virology **71**(3): 1776-1783.

Markusic, D., R. Oude-Elferink, A. T. Das, B. Berkhout und J. Seppen (2005). "Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter." Nucleic Acids Research **33**(6): e63.

Martinez-Salas, E., A. Pacheco, P. Serrano und N. Fernandez (2008). "New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression." Journal of General Virology **89**(Pt 3): 611-626.

Maruyama, H., N. Higuchi, Y. Nishikawa, S. Kameda, N. Iino, J. J. Kazama, N. Takahashi, M. Sugawa, H. Hanawa, N. Tada, J. Miyazaki und F. Gejyo (2002). "High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection." Journal of Gene Medicine **4**(3): 333-341.

McClure, C., K. L. Cole, P. Wulff, M. Klugmann und A. J. Murray (2011). "Production and titring of recombinant adeno-associated viral vectors." J Vis Exp(57): e3348.

Mehta, A. K., S. S. Majumdar, P. Alam, N. Gulati und V. Brahmachari (2009). "Epigenetic regulation of cytomegalovirus major immediate-early promoter activity in transgenic mice." Gene **428**(1-2): 20-24.

Miao, C. H., K. Ohashi, G. A. Patijn, L. Meuse, X. Ye, A. R. Thompson und M. A. Kay (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." Molecular Therapy **1**(6): 522-532.

Mittag, F., D. Kuester, M. Vieth, B. Peters, B. Stolte, A. Roessner und R. Schneider-Stock (2006). "DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis." Cancer Letters **240**(1): 69-75.

Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F. H. Gage und I. M. Verma (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." Journal of Virology **72**(10): 8150-8157.

Muzumdar, M. D., B. Tasic, K. Miyamichi, L. Li und L. Luo (2007). "A global double-fluorescent Cre reporter mouse." Genesis **45**(9): 593-605.

Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.

Nakai, H., S. R. Yant, T. A. Storm, S. Fuess, L. Meuse und M. A. Kay (2001). "Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo." Journal of Virology **75**(15): 6969-6976.

Nault, J. C., S. Datta, S. Imbeaud, A. Franconi, M. Mallet, G. Couchy, E. Letouze, C. Pilati, B. Verret, J. F. Blanc, C. Balabaud, J. Calderaro, A. Laurent, M. Letexier, P. Bioulac-Sage, F. Calvo und J. Zucman-Rossi (2015). "Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas." Nature Genetics **47**(10): 1187-1193.

Nguyen, A. T., A. C. Dow, J. Kupiec-Weglinski, R. W. Busuttil und G. S. Lipshutz (2008). "Evaluation of gene promoters for liver expression by hydrodynamic gene transfer." Journal of Surgical Research **148**(1): 60-66.

O'Riordan, C. R., A. Lachapelle, C. Delgado, V. Parkes, S. C. Wadsworth, A. E. Smith und G. E. Francis (1999). "PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo." Human Gene Therapy **10**(8): 1349-1358.

Oka, T., V. Mazack und M. Sudol (2008). "Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP)." Journal of Biological Chemistry **283**(41): 27534-27546.

Okabe, S. (2001). "Gene expression in transgenic mice using neural promoters." Current Protocols in Neuroscience **Chapter 3**: Unit 3.16.

Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon und D. S. Conklin (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." Genes and Development **16**(8): 948-958.

Park, F., K. Ohashi, W. Chiu, L. Naldini und M. A. Kay (2000). "Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo." Nature Genetics **24**(1): 49-52.

Peck-Radosavljevic, M. (2014). "Drug therapy for advanced-stage liver cancer." Liver Cancer **3**(2): 125-131.

Pfeifer, A., T. Kessler, M. Yang, E. Baranov, N. Kootstra, D. A. Cheresch, R. M. Hoffman und I. M. Verma (2001). "Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging." Molecular Therapy **3**(3): 319-322.

Ray, P., W. Tang, P. Wang, R. Homer, C. Kuhn, 3rd, R. A. Flavell und J. A. Elias (1997). "Regulated overexpression of interleukin 11 in the lung. Use to dissociate development-dependent and -independent phenotypes." Journal of Clinical Investigation **100**(10): 2501-2511.

Reboredo, M., M. G. Kramer, C. Smerdou, J. Prieto und J. De Las Rivas (2008). "Transcriptomic effects of Tet-on and mifepristone-inducible systems in mouse liver." Human Gene Therapy **19**(11): 1233-1247.

Redelsperger, I. M., T. Taldone, E. R. Riedel, M. L. Lephherd, N. S. Lipman und F. R. Wolf (2016). "Stability of Doxycycline in Feed and Water and Minimal Effective Doses in Tetracycline-Inducible Systems." J Am Assoc Lab Anim Sci **55**(4): 467-474.

Rekas, A., J. R. Alattia, T. Nagai, A. Miyawaki und M. Ikura (2002). "Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity." Journal of Biological Chemistry **277**(52): 50573-50578.

Rezvani, M., R. Espanol-Suner, Y. Malato, L. Dumont, A. A. Grimm, E. Kienle, J. G. Bindman, E. Wiedtke, B. Y. Hsu, S. J. Naqvi, R. F. Schwabe, C. U. Corvera, D. Grimm und H. Willenbring (2016). "In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis." Cell Stem Cell **18**(6): 809-816.

Roudot-Thoraval, M. B. H. L. M. P.-R. D.-C. V. F. o. (2013). The Burden of Liver Disease in Europe: A review of Available epidemiological data, European Association for the Study of the Liver.

Rudalska, R., D. Dauch, T. Longerich, K. McJunkin, T. Wuestefeld, T. W. Kang, A. Hohmeyer, M. Pesic, J. Leibold, A. von Thun, P. Schirmacher, J.

Zuber, K. H. Weiss, S. Powers, N. P. Malek, M. Eilers, B. Sipos, S. W. Lowe, R. Geffers, S. Laufer und L. Zender (2014). "In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer." **20**(10): 1138-1146.

Saez, E., M. C. Nelson, B. Eshelman, E. Banayo, A. Koder, G. J. Cho und R. M. Evans (2000). "Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(26): 14512-14517.

Saitoh, Y., Y. Eguchi, Y. Hagihara, N. Arita, M. Watahiki, Y. Tsujimoto und T. Hayakawa (1998). "Dose-dependent doxycycline-mediated adrenocorticotropin hormone secretion from encapsulated Tet-on proopiomelanocortin Neuro2A cells in the subarachnoid space." Human Gene Therapy **9**(7): 997-1002.

Sasaki, F., T. Okuno, K. Saeki, L. Min, N. Onohara, H. Kato, T. Shimizu und T. Yokomizo (2012). "A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein-coupled receptor study." Analytical Biochemistry **425**(2): 157-165.

Sawey, E. T., M. Chanrion, C. Cai, G. Wu, J. Zhang, L. Zender, A. Zhao, R. W. Busuttil, H. Yee, L. Stein, D. M. French, R. S. Finn, S. W. Lowe und S. Powers (2011). "Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening." Cancer Cell **19**(3): 347-358.

Schiedner, G., N. Morral, R. J. Parks, Y. Wu, S. C. Koopmans, C. Langston, F. L. Graham, A. L. Beaudet und S. Kochanek (1998). "Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity." Nature Genetics **18**(2): 180-183.

Schulze, K., S. Imbeaud, E. Letouze, L. B. Alexandrov, J. Calderaro, S. Rebouissou, G. Couchy, C. Meiller, J. Shinde, F. Soysouvanh, A. L. Calatayud, R. Pinyol, L. Pelletier, C. Balabaud, A. Laurent, J. F. Blanc, V. Mazzaferro, F. Calvo, A. Villanueva, J. C. Nault, P. Bioulac-Sage, M. R.

Stratton, J. M. Llovet und J. Zucman-Rossi (2015). "Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets." Nature Genetics **47**(5): 505-511.

Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer und R. Y. Tsien (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." Nature Biotechnology **22**(12): 1567-1572.

Shayakhmetov, D. M., A. Gaggar, S. Ni, Z. Y. Li und A. Lieber (2005). "Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity." Journal of Virology **79**(12): 7478-7491.

Shen, Y. C., Z. Z. Lin, C. H. Hsu, C. Hsu, Y. Y. Shao und A. L. Cheng (2013). "Clinical trials in hepatocellular carcinoma: an update." Liver Cancer **2**(3-4): 345-364.

Shimomura, O., F. H. Johnson und Y. Saiga (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." Journal of Cellular and Comparative Physiology **59**: 223-239.

Shin, K. J., E. A. Wall, J. R. Zavzavadjian, L. A. Santat, J. Liu, J. I. Hwang, R. Rebres, T. Roach, W. Seaman, M. I. Simon und I. D. Fraser (2006). "A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(37): 13759-13764.

Silva, J. M., M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R. J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge und G. J. Hannon (2005). "Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes." Nature Genetics **37**(11): 1281-1288.

Simonet, W. S., N. Bucay, S. J. Lauer und J. M. Taylor (1993). "A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice." Journal of Biological Chemistry **268**(11): 8221-8229.

Sinn, P. L., S. L. Sauter und P. B. McCray, Jr. (2005). "Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production." Gene Therapy **12**(14): 1089-1098.

Skipper, K. A., P. R. Andersen, N. Sharma und J. G. Mikkelsen (2013). "DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive." Journal of Biomedical Science **20**: 92.

Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nature Genetics **21**(1): 70-71.

Subleski, J. J., A. J. Scarzello, W. G. Alvord, Q. Jiang, J. K. Stauffer, A. Kronfli, B. Saleh, T. Back, J. M. Weiss und R. H. Wiltrot (2015). "Serum-based tracking of de novo initiated liver cancer progression reveals early immunoregulation and response to therapy." Journal of Hepatology **63**(5): 1181-1189.

Swenson, E. S., J. G. Price, T. Brazelton und D. S. Krause (2007). "Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker." Stem Cells **25**(10): 2593-2600.

Tao, J., E. Xu, Y. Zhao, S. Singh, X. Li, G. Couchy, X. Chen, J. Zucman-Rossi, M. Chikina und S. P. Monga (2016). "Modeling a Human HCC Subset in Mice Through Co-Expression of Met and Point-Mutant beta-Catenin." Hepatology.

Tchorz, J. S., T. Suply, I. Ksiazek, C. Giachino, D. Cloetta, C. P. Danzer, T. Doll, A. Isken, M. Lemaistre, V. Taylor, B. Bettler, B. Kinzel und M. Mueller (2012). "A modified RMCE-compatible Rosa26 locus for the

expression of transgenes from exogenous promoters." *PloS One* **7**(1): e30011.

Thomas, K. R. und M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-512.

Thompson, S. R. (2012). "Tricks an IRES uses to enslave ribosomes." *Trends in Microbiology* **20**(11): 558-566.

Torti, D. und L. Trusolino (2011). "Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils." *EMBO Molecular Medicine* **3**(11): 623-636.

Trichas, G., J. Begbie und S. Srinivas (2008). "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice." *BMC Biology* **6**: 40.

Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509-544.

Turchiano, G., M. C. Latella, A. Gogol-Doring, C. Cattoglio, F. Mavilio, Z. Izsvak, Z. Ivics und A. Recchia (2014). "Genomic analysis of Sleeping Beauty transposon integration in human somatic cells." *PloS One* **9**(11): e112712.

Undeutsch, H., C. Lof, S. Offermanns und J. Kero (2014). "A mouse model with tamoxifen-inducible thymocyte-specific cre recombinase activity." *Genesis* **52**(4): 333-340.

Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard und W. Hillen (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(14): 7963-7968.

Vanrell, L., M. Di Scala, L. Blanco, I. Otano, I. Gil-Farina, V. Baldim, A. Paneda, P. Berraondo, S. G. Beattie, A. Chtarto, L. Tenenbaum, J. Prieto und G. Gonzalez-Asequinolaza (2011). "Development of a liver-specific Tet-on

inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer." Molecular Therapy **19**(7): 1245-1253.

Vigna, E. und L. Naldini (2000). "Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy." Journal of Gene Medicine **2**(5): 308-316.

Vrancken Peeters, M. J., A. L. Perkins und M. A. Kay (1996). "Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer." Biotechniques **20**(2): 278-285.

Wang, H., X. Bian, L. Xia, X. Ding, R. Muller, Y. Zhang, J. Fu und A. F. Stewart (2014). "Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection." Nucleic Acids Research **42**(5): e37.

Wang, Y., F. Wang, R. Wang, P. Zhao und Q. Xia (2015). "2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*." Scientific Reports **5**: 16273.

Wilber, A., J. L. Frandsen, K. J. Wangensteen, S. C. Ekker, X. Wang und R. S. McIvor (2005). "Dynamic gene expression after systemic delivery of plasmid DNA as determined by in vivo bioluminescence imaging." Human Gene Therapy **16**(11): 1325-1332.

Wonganan, P., C. C. Clemens, K. Brasky, L. Pastore und M. A. Croyle (2011). "Species differences in the pharmacology and toxicology of PEGylated helper-dependent adenovirus." Molecular Pharmaceutics **8**(1): 78-92.

Wright, E., M. Bain, L. Teague, J. Murphy und J. Sinclair (2005). "Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells." Journal of General Virology **86**(Pt 3): 535-544.

Wu, M. S., J. C. Robbins, R. L. Bugianesi, M. M. Ponpipom und T. Y. Shen (1981). "Modified in vivo behavior of liposomes containing synthetic glycolipids." Biochimica et Biophysica Acta **674**(1): 19-29.

Wuestefeld, T., M. Pesic, R. Rudalska, D. Dauch, T. Longerich, T. W. Kang, T. Yevsa, F. Heinzmann, L. Hoenicke, A. Hohmeyer, A. Potapova, I. Rittelmeier, M. Jarek, R. Geffers, M. Scharfe, F. Klawonn, P. Schirmacher, N. P. Malek, M. Ott, A. Nordheim, A. Vogel, M. P. Manns und L. Zender (2013). "A Direct in vivo RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration." Cell **153**(2): 389-401.

Yant, S. R., Y. Huang, B. Akache und M. A. Kay (2007). "Site-directed transposon integration in human cells." Nucleic Acids Research **35**(7): e50.

Yant, S. R., L. Meuse, W. Chiu, Z. Ivics, Z. Izsvak und M. A. Kay (2000). "Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system." Nature Genetics **25**(1): 35-41.

Yao, M., X. Lu, Y. Lei, J. Yang, H. Zhao, Q. Qiao, P. Han, Z. Xu und W. Yin (2016). "Conditional Inducible Triple-Transgenic Mouse Model for Rapid Real-Time Detection of HCV NS3/4A Protease Activity." PloS One **11**(3): e0150894.

Yin, L., H. Ma, X. Ge, P. A. Edwards und Y. Zhang (2011). "Hepatic hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **31**(2): 328-336.

Zaiss, A. K., E. M. Foley, R. Lawrence, L. S. Schneider, H. Hoveida, P. Secret, A. B. Catapang, Y. Yamaguchi, R. Alemany, D. M. Shayakhmetov, J. D. Esko und H. R. Herschman (2016). "Hepatocyte Heparan Sulfate Is Required for Adeno-Associated Virus 2 but Dispensable for Adenovirus 5 Liver Transduction In Vivo." Journal of Virology **90**(1): 412-420.

Zambrowicz, B. P., A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr und P. Soriano (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America **94**(8): 3789-3794.

Zeng, Y. und B. R. Cullen (2003). "Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells." RNA **9**(1): 112-123.

Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier und P. Charneau (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-185.

Zhang, G., V. Budker und J. A. Wolff (1999). "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA." Human Gene Therapy **10**(10): 1735-1737.

Zhang, G., D. Vargo, V. Budker, N. Armstrong, S. Knechtle und J. A. Wolff (1997). "Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers." Human Gene Therapy **8**(15): 1763-1772.

Zhang, N., H. Bai, K. K. David, J. Dong, Y. Zheng, J. Cai, M. Giovannini, P. Liu, R. A. Anders und D. Pan (2010). "The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals." Developmental Cell **19**(1): 27-38.

Zhu, H. Z., J. Q. Chen, G. X. Cheng und J. L. Xue (2003). "Generation and characterization of transgenic mice expressing tamoxifen-inducible cre-fusion protein specifically in mouse liver." World Journal of Gastroenterology **9**(8): 1844-1847.

Zhu, X., L. A. Santat, M. S. Chang, J. Liu, J. R. Zavzavadjian, E. A. Wall, C. Kivork, M. I. Simon und I. D. Fraser (2007). "A versatile approach to multiple gene RNA interference using microRNA-based short hairpin RNAs." BMC Molecular Biology **8**: 98.

Zhu, Z., B. Ma, R. J. Homer, T. Zheng und J. A. Elias (2001). "Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene

leak in inducible overexpression transgenic mice." Journal of Biological Chemistry **276**(27): 25222-25229.

Zhukov, N. V. und S. A. Tjulandin (2008). "Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory." Biochemistry (Mosc.) **73**(5): 605-618.

Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo und J. E. Rabinowitz (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." Molecular Therapy **16**(6): 1073-1080.

Zou, X. P., B. Zhang, X. Q. Zhang, M. Chen, J. Cao und W. J. Liu (2009). "Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions." Human Pathology **40**(11): 1534-1542.

Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono und T. J. Hope (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." Journal of Virology **73**(4): 2886-2892.

Danksagung:

Über die mehr als drei Jahren in der diese Dissertation entstand haben mich eine Vielzahl von Leuten begleitet und unterstützt ohne die dieses Projekt niemals möglich gewesen wäre und denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Fabian Geisler für die Unterstützung und das Feedback zu meinem Projekt danken. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Roland M. Schmid für die Bereitstellung des Labors und der Materialien.

Besonderen Dank gilt meiner Projektbetreuerin und Arbeitsgruppenleiterin Dr. Ursula Ehmer die sich das Projekt überlegt hat und immer erreichbar war. Danken möchte ich auch für die Geduld mit der mir Ursula neue Methoden beigebracht hat und für die Unterstützung bei jeglichen Problemen während des Projektes.

Danken möchte ich auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Christian Lechler, Birgit Kohnke-Ertel und Thomas Rösner. Birgit möchte ich besonders für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz danken.

Gerade am Anfang des Projektes war ich auf die Erfahrung und die Tipps von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Geisler, Schneider und Saur angewiesen. Besonders danken möchte ich dabei Stephanie Dürl, Dr. Petia Jeliazkova, Julian Thalhammer und Dr. Simone Jörs.

Besonderer Dank geht auch an Sabine Klein für die Zurverfügungstellung der Rosa26^{mTmG}-Mäuse.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern für die Unterstützung danken, ohne die diese Dissertation niemals möglich gewesen wäre.