

Der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit wurde im ZAUM, Zentrum für Allergie und Umwelt an der Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München unter der Leitung von Frau Professor Heidrun Behrendt durchgeführt

Meinen lieben Eltern in großer Dankbarkeit

Danksagung

Zuerst und vor allem danke ich Herrn Privat Dozenten Dr. Markus Braun-Falco, Medizinische Fakultät der Universität Freiburg, der mir das Thema für meine Dissertation überlassen hat.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. Johannes Bucher, Leiter des Lehrstuhls für Biotechnologie an der Technischen Universität München, für die freundliche Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Ebenso danke ich Frau Professor Dr. Heidrun Behrendt, Leiterin des Zentrums für Allergie und Umwelt, an der Poliklinik für Dermatologie am Biederstein der Technischen Universität München, in deren Labor ich arbeiten durfte und Frau Alexandra Rizos, Mitarbeiterin des Zentrums für Allergie und Umwelt für ihren großartigen Einsatz bei der Virusherstellung, sowie für die tatkräftige Unterstützung.

Weiterhin geht mein Dank an Herrn Dr. Arndt Embacher, Mitarbeiter der Fakultät für Bodenökologie an der GSF in Neuherberg, für die freundliche Einweisung und Bereitstellung des Fluorometers.

Für die Unterstützung bei der Virustiterbestimmung danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Hallek im Genzentrum München.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Zentrums für Allergie und Umwelt für die moralische Unterstützung und zahlreichen Hilfestellungen während meiner gesamten experimentellen Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich über die gesamte Zeit motiviert und unterstützt haben.

1.	Einleitung	1
1.1.	Überblick	1
1.2.	Gentherapie	1
1.2.1.	Gentransferstrategien	2
1.2.2.	Die Entwicklung der Gentherapie	2
1.3.	Hautgentherapie Gentherapie der Haut	4
1.3.1.	Sjögren-Larsson Syndrom	6
1.3.1.1.	Überblick	6
1.3.1.2.	Genomische Organisation und Expression von ALDH3A2	7
1.3.1.3.	Mutationen im SLS-Gen	7
1.3.1.4.	FALDH-Protein	8
1.3.1.5.	Diagnosestellung	10
1.3.1.6.	Fettalkohole und Fettalkoholzyklus	11
1.4.	Voraussetzungen für einen stabilen Gentransfer	12
1.5.	Für den Gentransfer verwendbare Vektoren und ihre Eigenschaften	13
1.5.1.	Virale Vektoren	14
1.5.2.	Wildtyp Adeno-assoziiertes-Virus (AAV)	14
1.5.3.	Rekombinante AAV-2 Partikel als virales Vektorsystem	16
1.6.	Zielstellung der Dissertation	17
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Material	18
2.1.1.	Zellkulturmedien und Supplemente	18
2.1.2.	Bakterienstämme	18
2.1.3.	Eukaryontische Zellen	18
2.1.4.	Zelllinien	18

2.1.5.	Primäre humane Keratinozyten	19
2.1.6.	Plasmide	20
2.1.7.	Enzyme	20
2.1.8.	Chemikalien.....	20
2.1.9.	Lösungen	22
2.1.10.	Geräte und sonstige Materialien.....	22
2.2.	Methoden.....	26
2.2.1.	Bakterienkultur	26
2.2.2.	Flüssigkultur	26
2.2.3.	Plattenkultur	27
2.2.4.	Glycerinkulturen.....	27
2.2.5.	Herstellen transformationskompetenter <i>E.coli</i> TOP 10 Bakterien.....	27
2.2.6.	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i>	29
2.2.7.	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	29
2.2.8.	DNA-Extraktion mittels alkalischer Bakterienlyse.....	29
2.2.9.	Reinigung der isolierten Plasmid-DNA	30
2.2.10.	Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol	31
2.2.11.	Elution und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.2.12.	Reinigung der DNA durch Phenolextraktion	33
2.2.13.	DNA-Analyse.....	33
2.2.13.1.	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.13.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.2.13.3.	DNA-Restriktionsanalyse.....	34
2.2.13.4.	Herstellung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten	34
2.2.13.5.	Dephosphorylierung von DNA-Enden eines Fragmentes vor einer Ligation	35
2.2.13.6.	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.13.7.	Digoxigenin-Markierung von DNA	36
2.2.14.	Hybridisierung filtergebundener DNA.....	36
2.2.15.	Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA.....	37
2.2.16.	Herstellung von rAAV-2 Vektoren (rAAV-2 Verpackung).....	38
2.2.17.	Trippeltransduktion in 293-Zellen.....	39
2.2.17.1.	Aufreinigung von rAAV-2 Partikel über Ammoniumsulfapräzipitation und Iodixonal-Zentrifugation	40
2.2.18.	Bestimmung des physikalischen rAAV-2-Titers mittels Dot-Blot	41

2.3.	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	42
2.3.1.	Allgemeine Kulturbedingungen	42
2.3.2.	Bestimmung der Zellzahl	43
2.3.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
2.3.4.	Präparation primärer, humaner Keratinozyten	44
2.3.4.1.	Präparation von Keratinozyten aus Hautproben.....	44
2.3.4.2.	Präparation von Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide	45
2.3.5.	Kultivierung von Keratinozyten.....	46
2.3.5.1.	Keratinozytenkultur auf Feederzellen	46
2.3.5.2.	Keratinozytenkultur ohne Feederzellen.....	46
2.3.6.	Passagieren von Keratinozyten	47
2.3.7.	Herstellung von Zellhomogenaten aus Keratinozyten oder CHO-Zellen	47
2.3.8.	Bestimmung des Proteingehaltes von Keratinozyten und CHO-Zellen mittels BCA-Test.....	47
2.3.9.	Dreidimensionale Hautkultur	48
2.3.10.	Transduktion mit rAAV-2 Vektoren	49
2.3.11.	Reguläre rAAV-2 Transduktion von Keratinozyten	49
2.3.12.	Methoden zur Steigerung der Transduktionseffizienz bei rAAV-2 Transduktionen in Keratinozyten	50
2.3.12.1.	rAAV-2 Transduktion mit Proteasomen-Inhibitoren	50
2.3.12.2.	rAAV-2 Transfektion mit dem EGF-R PTK-Inhibitor AG 1478.....	50
2.3.12.3.	Doppeltransduktion/Tripeltransduktion	51
2.3.13.	Histologische Methoden.....	51
2.3.13.1.	Herstellung Paraffin-fixierter Routineschnittpräparaten.....	51
2.3.13.2.	Herstellung von Kryostatschnitten	51
2.3.14.	Nachweismethoden für FALDH	52
2.3.14.1.	FALDH-Aktivität aus Keratinozytenhomogenaten.....	52
2.3.14.2.	FALDH-Aktivität von CHO- und FAA.K1-Homogenaten.....	53
2.3.14.3.	Fettaldehyd-Selektionsversuch mit Keratinozyten.....	53
2.3.14.4.	Histochemischer in situ Nachweis epidermaler FALDH	53
2.3.15.	Toxizitätsversuche.....	54
2.3.15.1.	Zytotoxizitätsversuch mit Coomassie-Blau-Färbung.....	54
2.3.15.2.	Zytotoxizitätsversuch mit Sulforhodamin B bei CHO- und FAA.K1-Zellen	55
2.3.16.	Nachweis von grün-fluoreszierendem Protein (GFP)	56

3.	Ergebnisse	57
3.1.	Herstellung des Expressionsplasmids pTR-UF/C-FALDH	57
3.1.1.	Klonierung von pTR-UF/C	57
3.1.2.	Klonierung von pTR-UF/C-FALDH.....	59
3.2.	Virusverpackung und Charakterisierung von rAAV-2-Lysaten.....	61
3.2.1.	Charakterisierung von rAAV-2-Lysaten.....	63
3.2.1.1.	Bestimmung des genomischen rAAV-2 Titers	63
3.3.	Rekonstitution des FALDH-Defekts im CHO-Zellsystem.....	65
3.3.1.	FALDH-Aktivität gesunder CHO- und defekter FAA.K1-Zellen	65
3.3.2.	rAAV-2 Gentransfer in CHO- und FAA.K1-Zellen	66
3.3.3.	Transduktion FALDH-defekter FAA.K1-Zellen mit rAAV-2/C-GFP	66
3.3.4.	Rekonstitution defekter FAA.K1-Zellen durch Transduktion mit rAAV-2/C-FALDH.....	66
3.3.5.	Toxizität von Octadecanal auf defekte FAA.K1-Zellen	68
3.3.6.	Überlebensvorteil rAAV-2/C-FALDH transfizierter FAA.K1-Zellen gegenüber nicht transfizierten FAA.K1-Zellen	69
3.4.	Isolierung und Kultivierung von SLS-Keratinocyten.....	70
3.4.1.	Etablierung der Keratinocytenkultivierung aus der äußeren Haarwurzelscheide (ORS).....	70
3.4.2.	Etablierung der SLS-Keratinocytenkultivierung aus der äußeren Haarwurzelscheide	71
3.4.3.	Etablierung der SLS-Keratinocyten-Isolierung aus Hautproben.....	73
3.5.	<i>In-vitro</i> Rekonstitution des FALDH-Defektes in SLS-Keratinocyten	73
3.5.1.	FALDH-Aktivität von gesunden-, heterozygoten und SLS-Keratinocyten.....	73
3.5.2.	Transduzierbarkeit defekter SLS-Zellen mit rAAV-2/C-GFP	74
3.5.3.	Rekonstitution des FALDH-Defektes in defekten SLS-Keratinocyten	75
3.5.3.1.	Transduktion defekter SLS-Zellen mit rAAV-2/C-FALDH.....	75
3.5.3.2.	Steigerung der FALDH-Expression durch Mehrfachtransduktionen.....	76

3.5.3.3.	Steigerung der FALDH-Expression durch Proteasomeninhibitor MG132	78
3.5.3.4.	Steigerung der FALDH-Expression durch EGF-R TK-Inhibitor AG1478	79
3.6.	Toxizitätsversuche	80
3.6.1.	Überlebensvorteil FALDH-transfizierter SLS-Zellen nach Inkubation mit Octadecanal	81
3.7.	Rekonstitution des FALDH-Defekts in dreidimensionalen Epidermiskulturen	83
3.7.1.	Dreidimensionale Epidermiskultur aus gesunden Keratinozyten	83
3.7.2.	Kultivierung dreidimensionaler SLS-Epidermiskulturen.....	83
3.7.3.	GFP-Expression in dreidimensionalen Epidermiskulturen aus rAAV-2/C-GFP- transfizierten SLS-Zellen	84
3.7.4.	Nachweis epidermaler FALDH in dreidimensionaler Epidermiskulturen	85
4.	Diskussion.....	87
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	87
4.1.1.	Bisher mögliche Therapieoptionen für SLS	90
4.1.2.	Genkorrektur als neue Therapieoption für SLS	91
4.1.3.	Gentherapie von autosomal-rezessiven Genodermatosen.....	91
4.1.4.	Gentherapie bei Defekten des Fettstoffmetabolismus.....	93
4.1.5.	Probleme bei der Weiterentwicklung.....	94
4.1.6.	Vorraussetzungen für einen langfristigen Gentransfer.....	95
4.1.7.	rAAV-2 Vektoren im Vergleich zu anderen viralen Vektoren	95
4.1.8.	AAV-2 zur Genkorrektur von SLS	97
4.1.9.	Rekonstitution des FALDH-Defekts im CHO-System mit rAAV-2.....	98
4.1.10.	<i>In-vitro</i> Rekonstitution defekter SLS-Keratinozyten durch Transduktion mit rAAV-2.....	99
4.1.11.	Einfluß des Virustiters auf die Transduktionseffizienz.....	99
4.1.12.	Steigerung der FALDH-Transduktionseffizienz durch Hemmung von Proteasomen	100
4.1.13.	Steigerung der FALDH-Transduktionseffizienz durch Steigerung der Doppelstrangsynthese.....	101

4.1.14.	Steigerung der Genexpression durch Selektion?.....	103
4.1.15.	Rekonstitution des SLS-Defekts in dreidimensionalen Epidermiskulturen.....	103
4.1.16.	Nachweis von FALDH in dreidimensionalen Epidermiskulturen aus korrigierten SLS-Keratinocyten	105
4.2.	Ausblick.....	106
4.3.	Zusammenfassung der Arbeit	108
5.	Literatur	110
6.	Lebenslauf	126
7.	Veröffentlichungen	128

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AD	Adenovirus
ADA-Mangel	Adenosin-Desaminasemangel
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDH	Aldehyddehydrogenase
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
°C	Grad in Celsius
CHO-K.1	chinesische Ovarialkarzinomzelllinie
CHO-FAA.K1	FALDH-defekte chinesische Ovarialkarzinomzelllinie
DEB	Dystrophe Epidermolysis bullosa
DIG	Digoxigenin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Epidermolysis bullosa
EBS	Epidermolysis bullosa simplex
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FALDH	Fettaldehyddehydrogenase
FADH	Fettalkoholdehydrogenase
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H-MRI	Wasserstoffmagnetresonanzspektroskopie
IRD	Infantile Refusumkrankheit
ITR	invertierte terminale Repetitionen
JEB	Junktionale Epidermolysis bullosa
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LacZ	β -Galactosidase
LBamp	Luria Bruth-Medium mit Ampicillin
LTR-Vektor	Lentiviraler Vektor
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
NAD ⁺	Nikotinamiddinukleotid
NADH	Nikotinamiddinukleotidwasserstoff
NADP	Nikotinamiddinukleotidphosphat
N-alkyl-PE	Stickstoff alkyliertes Phosphatidylethanolamin
FAO:NAD ⁺	Fettalkoholnikotinamidadenindinukleotid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

MOI	Multiplizität der Infektion
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PE	Phosphatidylethanolamin
rAAV	rekombinanter AAV
RCDP	Rhizomelic Chonrodysplasia Punctata
RT	Raumtemperatur
SCID	Schweres Immundefiziente Krankheit
Sec	Sekunde
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
SLS	Sjögren-Larsson Syndrom
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
XLI	x-assoziierte
XP	Xeroderma Pigmentosum
X-SCID	x-chromosomal gebundenes, schweres Immundefizienzsyndrom
ZW	Zellweger Syndrom

1. Einleitung

1.1. Überblick

Unter dem Begriff Gentherapie versteht man das Einbringen eines definierten genetischen Materials in Zellen oder in Gewebe von Patienten mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens möglichst spezifisch am Ort seines Bedarfes therapeutischen Nutzen zu erlangen [Dranoff und Mulligan, 1995; Morgan und Anderson, 1993; Leiden, 1995]. Mit der Gentherapie eröffnet sich im Vergleich zu der klassischen Arzneimitteltherapie ein neues Therapiekonzept, da von einem anderen Ansatzpunkt ausgegangen werden kann. Bei der klassischen Arzneimitteltherapie werden systemische oder topische Wirkungen durch einen von außen zugefügten Wirkstoff erreicht, wohingegen bei der Gentherapie durch das Einschleusen eines oder mehrerer Gene in die Zielzelle die Eigenproduktion der gewünschten Proteine verursacht werden kann. Durch die Gentherapie stehen für zahlreiche Krankheiten, vor allem bei genetisch vererbten Krankheiten, neue Therapiekonzepte zur Verfügung. Diese Krankheiten konnten bisher nur symptomatisch behandelt werden. Dadurch sind theoretisch kausale Therapien möglich, die den Betroffenen eine deutliche Verbesserung ihrer Lebensqualität und -erwartung bieten können.

Die Haut ist ein attraktives Gewebe für Gentherapie [Braun-Falco und Hallek, 1998; Fenjves, 1994; Greenhalgh et al., 1994], da sowohl dermatologische, als auch systemische Erkrankungen behandelt werden können.

Als günstig für einen Langzeitgentransfer erscheinen virale Vektoren, insbesondere adeno-assoziierten-Virusvektoren (AAV), die gegenüber anderen viralen und nicht viralen Methoden Vorteile bieten. Bisher wurden AAV-Vektoren noch nicht bei der Rekonstitution von Genodermatosen verwendet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand einer ausgewählten Hautkrankheit, dem Sjögren-Larsson Syndroms (SLS), exemplarisch die Wiederherstellung des genetischen Defekts mittels AAV-Vektoren zu evaluieren.

1.2. Gentherapie

Prinzipiell wird zwischen der somatischen Gentherapie und der Keimbahntherapie unterschieden. Bei der somatischen Gentherapie soll das Gen nur in bestimmte Körperzellen eingeschleust werden, bei der Keimbahntherapie gelangt das Gen direkt in die Keimzellen.

Da auch ungewollte Veränderungen in den Keimzellen an die Nachkommen weiter vererbt werden, ist die Keimbahntherapie derzeit verboten.

Um therapeutische Gene bei der somatischen Therapie in ausreichender Menge in die Zielzellen zu transportieren werden unterschiedliche Gentransferstrategien verfolgt.

1.2.1. Gentransferstrategien

Was die Gentherapie zu therapeutischen Zwecken betrifft, unterscheidet man zwischen der *ex-vivo* und der *in-vivo* Gentherapie. Bei der *ex-vivo* Therapie werden aus dem Körper entnommene Zellen genetisch verändert und dann durch Infusion oder Transplantation dem Patienten rückgeführt. Man hat dieses Verfahren bei einzelnen Immunerkrankungen und der Hämophilie mit Erfolg durchgeführt. Bei der *in-vivo* Gentherapie soll das Gen direkt in den Körper eingebracht werden.

In-Vivo

Ex-Vivo

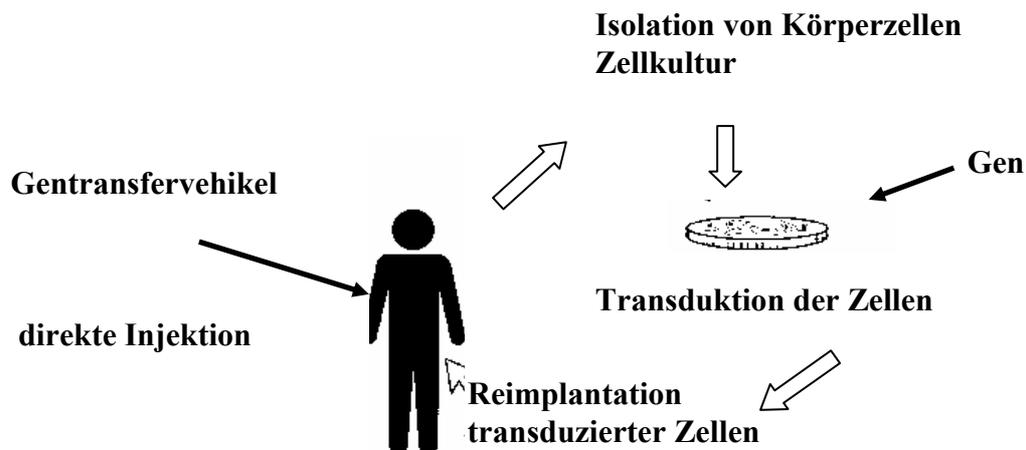


Abb. 1.1: Darstellung unterschiedlicher Gentransferstrategien

Bei der *in-vivo* Therapie werden in den Organismus direkt rekombinant veränderte Vektoren eingebracht. Bei der *ex-vivo* Gentherapie werden eigene defekte Körperzellen isoliert, gezüchtet in Kultur transduziert und korrigierten Zellen dem Körper reimplantiert.

1.2.2. Die Entwicklung der Gentherapie

1990 wurde die erste humane Gentherapie bei einer damals 4-jährigen Patientin mit angeborenem Adenosin-Desaminase (ADA)-Mangel durchgeführt. Dieser Krankheit liegt ein genetisch bedingter Mangel an ADA zu Grunde, wodurch die Proliferation von B- und

T-Lymphozyten gehemmt wird. In den Zellen liegt ein deutlich erhöhter Spiegel an d'ATP vor, wodurch die DNA-Replikation gestört ist. Die Patienten haben eine sehr kurze Lebenserwartung mit einer stark eingeschränkten Lebensqualität. Die Patientin erhielt als erste eine Infusionen autologer T-Lymphozyten, in die zuvor ein funktionsfähiges ADA-Gen (*ex-vivo* Gentransfer) eingebracht worden war [Blaese et al., 1993]. Dieser Vorgang wurde nach 4 Monaten wiederholt. Gleichzeitig erhielt das Kind PEG-ADA-Spritzen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das Prinzip der Genterapie funktioniert: Normale Zellgene können als Therapeutikum eingesetzt werden und für eine korrekte Funktion vorher gestörter Stoffwechselwege sorgen. Das behandelte Kind lebt seitdem ein normales Leben und muß seltener mit PEG-ADA behandelt werden. Auch wenn eine effektive Standardtherapie erst nach einer Weiterentwicklung der Technik zu erwarten sein wird, war mit dieser Genterapie ein erster Behandlungserfolg verbunden.

In den vergangenen sechzehn Jahren wurden 953 klinische Studien zur Genterapie am Menschen initiiert (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website, Stand Oktober 2005).

In der Bundesrepublik Deutschland sind bei der Kommission Somatische Genterapie (KSG) des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer seither insgesamt 71 Anträge auf Beurteilung einer klinischen Gentransferstudie eingegangen (Gene Therapy Clinical Trials, The Journal of Gene Medicine-Website Stand 10/05). Diese Kommission berät die lokalen, nach Landesrecht gebildeten, zuständigen Ethikkommissionen bei der Begutachtung derartiger Anträge, um in dieser jungen medizinischen Disziplin auf eine einheitliche Begutachtungspraxis hinzuwirken.

Ein tragischer Zwischenfall der somatischen Genterapie ereignete sich am 18.9.1999, als ein junger Patient im Rahmen einer Phase-I-Studie zur Therapie eines Ornithintranscarbimasemangels eine sehr hohe Dosis Adenovirus-Vektoren erhielt, wodurch eine generalisierte Immunreaktion auf adenovirale Kapsidproteine ausgelöst wurde, an welcher der Patient verstarb [Miller, 2000; Stephenson, 2001]. Im Jahre 2002 ereigneten sich zwei weitere tragische Zwischenfälle während einer Phase-II-Studie zur Therapie von X-SCID (x-chromosomal gebundenes schweres kombiniertes Immundefizienz-Syndrom) in Frankreich, bei der 2 von 9 Kindern im Laufe der Therapie mit retroviralen Vektoren eine schwere Leukämie entwickelten [Check, 2003; Fox, 2003; Kaiser, 2003; Kohn et al., 2003; Marshall, 2002; 2003]. Der jüngste Zwischenfall ereignete sich erst kürzlich, bei dem ein weiterer Patient aus derselben Phase-II-Studie in Frankreich an einem Tumor erkrankte [Paul Ehrlich Institut, 28/1/05] und die Studie erneut abgebrochen wurde.

Trotz dieser Zwischenfälle konnten durch die somatische Gentherapie vor allem bei rezessiv bedingten Erbkrankheiten, wie ADA-Mangel, genetisch bedingter Hypercholesterinämie, Zystischer Fibrose und Hämophilie gute Fortschritte erzielt werden [High, 2004; Onodera, Driskell und Engelhardt, 2003; 1998; Grossman et al., 1994;].

Die meisten viralen Gentherapiestudien werden derzeit mit Retroviren durchgeführt. Studien mit adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV) werden aktuell bei der Therapie der Mucoviszidose durch Transfektion bronchialer Epithelzellen [Flotte et al., 2003], bei Morbus Parkinson durch Vektorinjektion in das Striatum [During et al., 2001] (Informationen von Avigen, Alameda, USA) und bei der Therapie der Hämophilie durch Transduktion von Leber und Muskelzellen eingesetzt [Manno et al., 2003] (Information von Avigen).

1.3. Hautgentherapie

Die Haut als Zielorgan für eine Gentherapie bietet zahlreiche Vorteile. Als notwendige Voraussetzung für eine Langzeitgentherapie besitzt sie Stammzellen. Desweiteren besitzt sie sowohl das Potential zur Therapie von dermatologischen, als auch von systemischen Erkrankungen. Die Haut kann bei einem *in-vivo* Gentransfer gut erreicht werden. Eine leichte Gewebegewinnung ist für einen *ex-vivo* Gentransfer möglich. Klinisch sind sowohl Zellkulturmethoden, als auch Transplantationsmethoden gut etabliert. Durch zelleigene Promotoren sind dauerhafte Genexpressionen möglich. Modifizierte Hautareale können leicht kontrolliert werden und bei auftretenden Nebenwirkungen entfernt werden. Unbestritten bietet die Haut hierdurch im Vergleich zu anderen Geweben ein hohes Maß an Sicherheit. Ein Aspekt, der gerade im Rückblick auf den tödlichen Zwischenfall nach systemischer AD-Vektor-Applikation und die Entstehung zweier Leukämie-Erkrankungen nach systemischer retroviraler Vektorgabe nicht zu vernachlässigen ist [Stephenson, 2001; Kohn, 2003]. Die Epidermis untergliedert sich in Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Granularzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalzellschicht). Im Anschluß an die Epidermis befindet sich die Dermis, durch die Kapillar- und Lymphgefäße verlaufen. Der äußerlich sichtbare Teil der Epidermis besteht aus dem Stratum corneum, welches aus abgestorbenen Zellen gebildet wird. In der Basalzellschicht erfolgt durch Zellteilung die Neubildung der Keratinozyten. Die epidermale Erneuerungsphase, in der die Keratinozyten aus der Regenerationsschicht in die Hornschicht wandern dauert ca. 28 Tage.

Bei Keratinozyten lassen sich drei unterschiedliche Typen nach ihrem Differenzierungsverhalten unterscheiden: Stammzellen, transient amplifizierende Zellen, die

sich noch einige Male teilen können, wobei aus dem größten Teil der Tochterzellen Übergangszellen gebildet werden, und Übergangszellen [Barrandon et al., 1989], die keine Teilungsaktivität mehr haben und dem terminalen Differenzierungsprogramm unterliegen. Eine wesentliche Voraussetzung für einen Langzeitgentransfer ist die Anwesenheit von Stammzellen. Durch die Anwesenheit von Keratinozytenstammzellen in der Epidermis und den Haarfollikeln erfüllt die Haut eines der wichtigsten Kriterien für eine Langzeitgentherapie [Jensen, 2004].

Da die Haut ein sehr gut erreichbares Organ darstellt, sind sowohl *in-vivo*, als auch *ex-vivo* Gentherapien durchführbar. Bei der *in-vivo* Gentherapie findet die Therapie direkt an der Haut des Patienten statt. Virale Partikel, die das zu exprimierende Gen tragen, können direkt in die Epidermis injiziert werden.

Bei der *ex-vivo* Gentherapie werden Keratinozyten von Patienten entnommen und auf Zellkulturschalen expandiert. Das gewünschte Gen kann durch unterschiedliche Gentransfermethoden in die Zellen geschleust werden. Hier ist von Vorteil, dass die Kultivierung primärer Keratinozyten auf Zellkulturschalen seit 1975 bekannt ist und sich diese kultivieren und vermehren lassen [Rheinwald und Green, 1975].

Aus transfizierten Keratinozyten kann ein dünnes Häutchen, bzw. Epidermisäquivalent, gezüchtet werden, welches dem Patienten transplantiert wird. Diese Methode ist mittlerweile etabliert und so verfeinert, dass es unter optimalen Bedingungen möglich ist, aus 1 cm² Haut in 3-4 Wochen 1m² Zellkulturepithel zu erhalten [Navsaria et al., 1995; Holzmann et al., 1994]. Nachdem das Häutchen auf der Transplantationsstelle des Patienten angewachsen ist, können rekombinante Keratinozyten das gewünschte Protein sezernieren, das in die Blutbahn abgegeben werden kann.

Seitdem bekannt ist, dass Keratinozyten Proteine sezernieren [Khavari et al., 2002; Cao et al., 2000], die anschließend in die Blutbahn abgegeben werden können, ist es denkbar, dass Therapien von systemischen Erkrankungen über die Haut, bzw. durch Gentransfer in Keratinozyten, möglich sind [Agrawal et al., 2004].

Viele Genodermatosen werden durch das Fehlen einzelner Enzyme, oder Proteine verursacht und könnten durch das Wiedereinbringen der funktionellen cDNA in Keratinozyten gentherapeutisch korrigiert werden [Irvine und McLean, 2003; Uitto und Pulkkinen, 2000; Khavari, 1998; 2000]. Bei vererbaren Genodermatosen unterscheidet man zwischen denen, die dominant und denen, die rezessiv vererbt werden. Defekte autosomal-rezessiver (AR) Genodermatosen können durch Gentransfer des intakten Gens wiederhergestellt werden.

Für eine Korrektur autosomal-dominanter Defekte (AD) ist es notwendig das mutierte Allel zu inaktivieren oder zu korrigieren. Dies wurde bisher durch die Entwicklung von Antisense-

Oligonukleotiden, bzw. DNA-RNA Oligonukleotiden-Chimären und durch RNA Interferenz (RNAi) erreicht [Xia et al., 2004, Waight et al., 2000; Kren et al., 1998; Alexeev et al., 2000].

1.3.1. Sjögren-Larsson Syndrom

1.3.1.1. Überblick

Das Sjögren-Larsson Syndrom (SLS) ist eine autosomal-rezessive Genodermatose, deren Ursache in dem für die Fettsaldehyddehydrogenase (FALDH) kodierenden Gen FALDH3A2, liegt. Dadurch kommt es zu einem Ausfall von FALDH, die Teil des Fettsaldehyd-nikotinamiddinukleotidoxidoreduktasekomplexes (FAO:NAD⁺-Oxidoreduktasekomplexes) ist, wodurch es zu einer Anreicherung von Fettsaldehyden im Körper kommt. Klinisch ist die Krankheit durch die Trias einer generalisierten Ichtyose, mentaler Retardierung und Spastiken gekennzeichnet, die bis hin zur Di- oder Tetraplegie gehen können, je nachdem wie ausgeprägt der Enzymdefekt ist [Rizzo, 1993].

Die generalisierte Ichtyose ist von Geburt an vorhanden und äußert sich vor allem bei Kleinkindern mit einem starken Juckreiz [Möhrenschläger et al., 2000]. Die neurologischen Erscheinungen entwickeln sich innerhalb der ersten 2 Jahre [Carney et al., 2004].

Die Muskulatur ist zunächst hypoton, aus der sich im Lauf der Jahre eine progrediente Spastik bis hin zur Di- oder Tetraplegie entwickelt. Durch die meist vorhandene Spitzfußstellung und aufgrund von Kontrakturen der Knie und Hüftgelenke sind die Betroffenen oft an den Rollstuhl gebunden und können sich nicht mehr ohne fremde Hilfe bewegen. Minderwuchs, zerebrale Krampfanfälle und Kyphose können erschwerend hinzukommen.

Die mentale Retardierung äußert sich sowohl in einer Störung der expressiven Sprachentwicklung, wodurch es den Betroffenen meist nur möglich ist, einzelne Wörter zu sprechen, als auch in einer stark geistig behinderten Form, bei der die Patienten den Wissensstand eines Kleinkindes nicht überschreiten.

Als weitere äußere charakteristische Erscheinung des Krankheitsbildes werden glitzernde Einlagerungen im Makulabereich der Retina angesehen [Van Domburg et al.; 1999, Willemsen et al., 2000; 2001]. Die Betroffenen kommen meist als Frühgeburten auf die Welt.

Die Prävalenz ist ortsbezogen und insgesamt äußerst variabel. Im Durchschnitt ist 1 von 100000 Personen betroffen, wobei in der schwedischen Region Västerbotten die Rate mit 8,3

auf 100.000 Einwohner am höchsten liegt. Aufgrund dieser Erscheinung wurde die Krankheit auch oft als „Västerbottenkrankheit“ bezeichnet [Iselius und Jagell, 1989].

1.3.1.2. Genomische Organisation und Expression von ALDH3A2

Das FALDH-Gen ist auf Chromosom 17q11.2 lokalisiert [De Laurenzi et al., 1996], besteht beim Menschen aus 11 Exons, 10 Introns und erstreckt sich über einen Bereich von 31 kb [Chang und Yoshida, 1997; Rogers et al., 1997].

Durch Insertion eines zusätzlichen Exon 9` zwischen Exon 9 und 10 entstehen bei der Translatation zwei unterschiedliche Transkripte. Das Haupttranskript besteht aus 485 Aminosäuren, das Nebentranskript besteht aus maximal 10 % des Haupttranskriptes, wobei die Funktion dieser Isoform, genannt vFALDH bisher nicht vollständig bekannt ist [Lin et al., 2000]. Das Nebentranskript hat anstelle der 4-carboxyterminalen Aminosäuren des Haupttranskriptes, 27 andere hydrophobe Aminosäurereste. Eventuell hat vFALDH dadurch eine alternative mikrosomale Membraninteraktion [Rizzo et al., 2001].

Es werden drei unterschiedliche Transkripte, 2,0 3,8 und 4,0 kb, die sich in ihren Polyadenylierungsseiten unterscheiden, und die in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander je nach Gewebe auftreten, exprimiert.

cDNA von FALDH wurde aus Ratten [Miyachi et al., 1991], Maus [Vasiliou et al., 1996] und Menschen [de Laurenzi et al., 1996] geklont, wobei die Sequenzen der jeweiligen FALDH große Übereinstimmungen haben [Rizzo et al., 2001].

1.3.1.3. Mutationen im SLS-Gen

Durch verschiedene Mutationen im FALDH-Gen, ALDH3A2, resultiert eine nicht funktionsfähige FALDH [De Laurenzi et al., 1996].

Bisher wurden über 70 verschiedene Mutationen auf diesem Gen beobachtet [Carney et al., 2004]. Missense und Deletionsmutationen kommen am häufigsten vor [Sillen et al., 1998]. Beobachtet wurden auch Insertions-, Punkt- und Splicesitemutationen, sowie Komplexmutationen [De Laurenzi et al., 1996; 1997; Rizzo et al., 1997; Sillen et al., 1997; Tsukamoto et al., 1997; Willemsen et al., 1999; Aoki et al., 2000; Kraus et al., 2000; Willemsen et al., 2001].

Es gibt 5 Sequenzvariationen im FALDH-Gen, die keine Krankheit hervorrufen. Hierzu gehören vier SNP (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus) [Rizzo et al., 1999; 2001] und eine polymorphe TG-Wiederholung [de Laurenzi, 1997]. Alle Polymorphismen sind in den

Introns lokalisiert, außer einem stillen SNP, welcher sich auf dem dritten Nukleotid auf Codon 481 in Exon 10 befindet. Hierdurch findet kein Austausch der Aminosäuren statt [Chang und Yoshida, 1997; Sillen et al., 1998].

1.3.1.4. FALDH-Protein

FALDH gehört zu der Familie der Aldehyddehydrogenasen (ALDH).

ALDH sind NAD(P)-abhängige Enzyme, die Aldehyde, sowie intermediär entstehende Metabolite oxidieren und für die Entgiftung bestimmter exogener Xenobiotika verantwortlich sind [Lindahl, 1992]. Sie haben eine individuelle, subzelluläre Lokalisation und Verteilung. Einige ALDH können nur eine limitierte Anzahl von Substraten oxidieren, andere haben eine breitere Substratspezifität. Bei Menschen wurden mindestens 12 unterschiedliche ALDH identifiziert.

Je nach Verteilung, biophysischen und kinetischen Ähnlichkeiten, sowie Ähnlichkeiten in den Primärsequenzen werden die Säugetier-ALDH in 3 Klassen eingeteilt [Lindahl, 1992].

Zu Klasse 1 ALDH gehören die zytosolisch lokalisierten, konstitutiven und induzierbaren ALDH, zu Klasse 2 ALDH gehören die mitochondrialen ALDH. Beide Klassen oxidieren kurzkettige aliphatische und aromatische Aldehyde [de Laurenzi et al., 1996]. Zu Klasse 3 ALDH zählen tumorspezifische und induzierbare zytosolische ALDH, sowie mikrosomale FALDH, die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [Lindahl und Petersen, 1991; Kelson et al., 1992]. Im Gegensatz zu Klasse 1 und 2 ALDH ist nur wenig über mikrosomale Klasse 3 ALDH bekannt.

Evolutionsbedingt zeigen ALDH eine große Übereinstimmung in den Primärminosäuresequenzen auf, wodurch ALDH in verwandte Familien eingeteilt werden konnten. ALDH 3, 7, 8 und FALDH haben ähnliche Strukturen über weite Teile des Proteins [Perozich et al., 1999].

FALDH wird an freien Ribosomen synthetisiert und post-translational in das Endoplasmatische Retikulum eingebaut [Takagi et al., 1985]. Durch eine carboxyterminale, aus 35 Aminosäuren bestehende, hydrophobe Aminosäuresequenz, die essentiell für die Bindung an die Membran ist, erfolgt eine Kopplung an diese [Masaki et al., 1994]. Der 241-Cystein Rest in FALDH wurde als katalytisches Cystein identifiziert [De Laurenzi et al., 1996].

Native FALDH hat eine Größe von 54 kDa und liegt wahrscheinlich als Homodimer vor, das sich zu größeren Aggregaten polymerisiert [Nakayasu et al., 1978; Kelson et al., 1997].

FALDH ist Teil des Fettalkoholnikotinamiddinukleotidoxidoreduktasekomplexes (FAO-Komplex), der aus zwei separaten Proteinen, der Fettalkoholdehydrogenase (FADH) und der Fetaldehyddehydrogenase (FALDH) besteht. Der FAO-Komplex katalysiert die Oxidation langkettiger Fettalkohole in einer ersten Stufe über die FADH zu einem instabilen Fetaldehydintermediat, welches in der zweiten Stufe über FALDH zu der korrespondierenden Fettsäuren oxidiert wird. Die Enzyme aus denen der FAO-Komplex besteht sind räumlich von denen getrennt, die die Oxidation kurzkettiger Fettalkohole umsetzen.

Mikrosomale FALDH wurde aus der Rattenleber [Nakayasu et al., 1978; Mitchell und Peterson, 1989], dem Hasendarm [Ichihara et al., 1986], menschlicher Leber [Koivula, 1975] und menschlichen polymorphonuklearen Leukozyten [Sutyak et al., 1989] isoliert, wobei festgestellt wurde, dass menschliche und Ratten FALDH 84 % Sequenzähnlichkeiten im Aufbau ihrer Enzyme zeigen [Miyachi et al., 1991].

Intakte FALDH katalysiert die Oxidation langkettiger aliphatischer Aldehyde [Kelson et al., 1997], Fetaldehyde [Nakayasu et al., 1978; Kelson et al., 1997], langkettiger Fettalkohole [Rizzo et al., 1987], Glyceroletherlipiden [Rizzo und Craft, 2000], Leukotrien B4 (LTB 4) [Willemsen et al., 2001] und Phytansäure [Verhoeven et al., 1998].

Durch den Ausfall der FALDH kommt es daher zu Akkumulationen dieser Substanzen im Plasma von SLS-Patienten.

Es wurden bis zu einer 25-fachen Erhöhung der Plasma-Fettalkoholwerte [Rizzo und Craft, 2000], erhöhte Phytol (3, 7, 11, 15-tetramethyl-hexadec-2-en-1-ol) konzentrationen [van den Brink et al., 2005] und erhöhten Konzentrationen an LTB4 und dessen Metaboliten [Willemsen et al. 2001] bei SLS-Patienten festgestellt. Die gesteigerten LTB4-Spiegel und dessen Metabolite werden für den Pruritus und die Schmerzen bei den Patienten verantwortlich gemacht [Levine et al., 1984; Andoh et al., 1998].

Jedoch sind Akkumulationen freier Fetaldehyde weder im Blut, noch in kultivierten Fibroblasten bei SLS-Patienten vorhanden. Es wird angenommen, dass neben dem Ausfall der FALDH auch FADH teilweise betroffen ist, wodurch die Produktion von Fetaldehyden aus Fettalkoholen limitiert wird.

Außerdem sind die intermediär entstehenden Aldehyde eine chemisch instabile, sehr reaktive Gruppe, die schnell in andere Metabolite divergieren können, wie z.B Schiffsche-Base Formation mit PE (Phosphatidylethanolamin).

Eine Erhöhung von N-alkyl-PE [Rizzo und Craft, 2000], bzw. Addukte, die mit anderen Komponenten des zentralen Nervensystems, der Haut und der Retina gebildet werden [Rizzo

und Craft, 1991; Kelson et al., 1997; Rizzo et al., 1993; 2000; James und Zoeller, 1997] sind bei SLS-Patienten zu finden.

1.3.1.5. Diagnosestellung

Die bei SLS-Patienten auftretende Ichthyose ist nicht alleine ausreichend für eine Diagnosestellung von SLS [Lacour et al., 1996; Koone et al., 1990]. Eines der Standardverfahren zur Diagnosestellung bei SLS besteht in der Messung der FALDH-Aktivität aus Fibroblasten.

Neben dem FALDH-Aktivitätstest werden Mutationsanalysen zur Diagnose herangezogen [Willemsen et al., 2001].

Durch Magnetresonanzuntersuchung (MRI) des Gehirnes können verspätete Myelinisierung und ein unterschiedlicher Grad an Dysmyelinisierung festgestellt werden [van Domburg et al., 1999].

Untersuchungen durch Wasserstoffmagnetresonanzspektroskopie (H-MRS) zeigen eine Anreicherung der periventriculären weißen Angelegenheitsverletzung, noch vor dem Grad der sichtbaren Dysmyelinisierung.

Durch Entnahme einer kleinen Hautbiopsie ist es möglich, relativ schnell eine Abgrenzung zwischen einer Ichthyose und dem SLS zu finden. Die Methode ist ein histochemischer Nachweis der Hexanol-Dehydrogenase-Aktivität in der Haut und erlaubt eine schnelle Differenzierung [Lake et al., 1991, Judge et al., 1990; Rizzo, 1988; 1989]. Lichtmikroskopisch sind bei SLS-Patienten vor allem Akanthose, Papillomatose und Orthohyperkeratose, sowie Hypergranulose oder Hypogranulose auffällig [Rizzo, 1993; Kawakami, 1999].

Elektronenmikroskopisch sind Membraneinschlüsse in der Hornschicht zu erkennen [Matsuoka et al., 1982].

Bei genetischer Prädisposition wurde früher in der 23-ten Schwangerschaftswoche eine Hautprobe von dem Fötus entnommen und dieser histologisch auf Abnormalitäten untersucht [Kouseff et al., 1982]. Diese Methode ist jedoch riskant.

Wesentlich sicherer ist die Diagnose über FALDH und FAO-Aktivitätsbestimmung aus entnommenen und kultivierten Chorionzotten oder Amniozyten, von denen Mutationsanalysen durchgeführt werden [Rizzo et al., 1993; 1994; Tabsh et al., 1993; Sillen et al., 1997].

1.3.1.6. Fettalkohole und Fettalkoholzyklus

Inwieweit eine Akkumulation von Fettalkoholen und anderen Metaboliten des Fettstoffwechsels die schweren Symptome bei SLS-Patienten verursacht, ist noch nicht genau geklärt. Man vermutet, dass durch Anreicherung langkettiger, freier Fettalkoholintermediate eine verspätete Myelinisierung und eine Dysmyelinierung im Gehirn resultiert [van Domburg et al., 1999].

Fettalkohole, die als Zwischenprodukt im Fettstoffwechsel anfallen, entstehen entweder aus der Reduktion von Fettsäuren oder durch Oxidation von Alkanen. Fettalkohole werden zu Wachsestern, Glyceroletherlipiden, oder über die Zwischenstufe der Fetaldehyde weiter zu Fettsäuren oxidiert. Diese biochemischen Vorgänge beschreiben einen Kreislauf, der als Fettalkoholzyklus bezeichnet wird [Kelson et al., 1997; Verhoeven et al., 1998; Möhrenschräger et al., 2000; Willemsen et al., 2000]. Erst durch angeborene Defekte im Fettstoffmetabolismus, wie bei SLS, bei dem es zum Ausfall des FAO-Komplexes im Zyklus kommt, wurde der Fettalkoholzyklus (Abb.:1.2) bekannt [Rizzo, 1998].

Der Initialschritt der Oxidation wird durch eine NAD-abhängige Fettalkoholdehydrogenase (FADH) katalysiert und ist wahrscheinlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [Rizzo und Craft, 1991; Rizzo et al., 1987; Lee, 1979; Ichihara et al., 1986].

Isoenzyme der FADH, die für diese Reaktion verantwortlich sind, wurden noch nicht gefunden. Die anschließende Oxidation der intermediär entstandenen Fetaldehyde zu Fettsäuren wird durch FALDH katalysiert, wobei verzweigte und unverzweigte aliphatische Aldehyde mit einer Kettenlänge zwischen 6 und 24 Kohlenstoff (C) oxidiert werden können [Nakayasu et al., 1978; Kelson et al., 1997]. Auch wenn der Komplex bisher noch nicht isoliert wurde, so wurde durch *in-vitro* Versuche festgestellt, dass sich beide Komponenten des FAO-Komplexes in der Zelle räumlich nahe liegen.

Erneuerungsphase die Genexpression nach 28 Tagen verloren geht. Außerdem ist die Auswahl eines geeigneten Vektors entscheidend für die Weiterentwicklung.

1.5. Für den Gentransfer verwendbare Vektoren und ihre Eigenschaften

Unter Gentransfer, auch Transduktion genannt, versteht man das Einschleusen eines Gens in eine Zelle, das in dieser exprimiert werden soll. Um das Gen in die Zelle einschleusen zu können, wird ein geeignetes Vehikel bzw. ein Vektor benötigt.

Die Wahl des geeigneten Vektors richtet sich nach dem jeweiligen Therapieziel, der Zielzelle, nach der Art des Gentransfers (*in-vivo* oder *ex-vivo*), der Größe des einzuschleusenden Gens, bzw. der Transgen-Kapazität, der Effizienz, Selektivität, Expressionsdauer, Sicherheit, dem Aufwand in der Herstellung und Handhabung der Vektoren.

Für die Transduktion von Keratinozyten können virale, chemische und physikalische Gentransfermethoden verwendet werden.

Physikalische Gentransfermethoden haben den Vorteil einer einfachen Handhabung und Herstellung. Sie werden vorzugsweise *in-vivo* angewendet. Das einzuschleusende Gen wird mittels Plasmid-Injektion [Sawamura et al., 2002], einer Genpistole, Elektroporation oder Magnetofektion in die jeweiligen Zellen gebracht. Bei der Plasmid-Injektion und der Genpistole ist eine Anwendung *in-vivo* möglich, die Transduktionseffizienz ist jedoch niedrig und es werden zudem nur transiente Expressionen erreicht. Da kein Einbau in das Genom erfolgt, ist das Risiko einer Mutagenese niedrig.

Bei der Genpistole wird Plasmid-DNA an Goldpartikel gebunden, die dann über Luftdruck in die Haut geschossen werden [Lin et al., 2001].

Die Elektroporation und die Magnetofektion können sowohl *in-vivo*, als auch *ex-vivo* angewendet werden und dienen zur Erhöhung der Gentransfereffizienz nach Einbringen von Plasmiden in die Haut. Bei dieser Methode wird ein transfiziertes Hautareal mit 2 Elektroden versehen und mit Elektrostößen bearbeitet. Hierdurch soll die transmembranöse Permeabilität erhöht werden, wodurch eine größere Menge an Plasmid-DNA in die Keratinozyten gelangen kann [Zhang, et al., 2002].

Bei der Magnetofektion werden die transduzierenden Partikel mit Hilfe von Eisennanopartikeln in einem Magnetfeld in die Zelle gebracht. Bei den transduzierenden Partikeln kann es sich um Plasmid-DNA, aber auch um virale Vektoren handeln [Plank et al., 2003].

Zu den chemischen Gentransfermethoden gehört die Lipofektion. Bei dieser Methode wird das Gen umhüllt von chemischen lipophilen Reagentien in die Zielzelle eingeschleust.

Da mit den physikalischen und chemischen Gentransfermethoden nur ein temporärer Effekt bezüglich der Genexpression erzielt werden kann, sind diese Methoden im Hinblick auf einen Langzeitgentransfer nur bedingt geeignet.

1.5.1. Virale Vektoren

Um Viren gentherapeutisch verwenden zu können, müssen zuvor die virusreplizierenden Sequenzen entfernt werden, um das Virus vermehrungsunfähig zu machen. Das gewünschte Therapiegen kann in die freie Stelle des Virus eingebaut werden, wobei die Größe des Therapiemens durch die Ursprungsgröße des Vektors limitiert ist.

Derzeit verwendet werden Retro-, Lenti, Adeno- und adeno-assoziierte Virusvektoren.

Virale Vektoren haben gegenüber den physikalischen und chemischen Transfektionsmethoden den Vorteil, dass einige von ihnen, wie Lenti-, Retro und Adeno-assoziierte Viren in der Lage sind, sich in das Wirtsgenom integrieren zu können und somit für einen Langzeitgentransfer prinzipiell besser geeignet sind. Außerdem kann mit viralen Vektoren eine größere Transfektionseffizienz erreicht werden.

1.5.2. Wildtyp Adeno-assoziiertes-Virus (AAV)

Adeno-assoziierte-Viren (AAV) sind einzelsträngige, hüllenlose DNA-Viren aus der Familie der *Paraviridae* und werden dem Genus der Dependoviren zugeordnet. Diese wurden erstmals 1965 in einer Adenoviruspräparation als Verunreinigung in Form kleiner virusähnlicher Partikel gefunden und daher Adeno-assoziierte Viren genannt [Archetti et al., 1966; Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966].

Nach dem internationalen Komitee für Taxonomie von Viren (ICTV) unterscheidet man heute zwischen 10 unterschiedlichen Serotypen, von denen 5 bei Menschen und 5 bei anderen (wir Menschen sind auch Primaten) Primaten vorkommen. Am besten untersucht wurde beim Mensch der Serotyp AAV-2.

AAV-2 ist ein natürlich-replikationsdefizientes Virus und benötigt für seine Replikation zusätzlich Helferviren, wie z.B. Adenoviren [Siegl et al., 1985]. Alternativ können Epstein-Barr-, Herpes Simplex- und Cytomegalievirus diese Funktion übernehmen [Buller et al., 1981; Mc Pherson et al., 1985; Muzyczka, 1992].

Die Helferfunktion, die von den Adenoviren ausgeübt wird, wurde mittlerweile identifiziert und den Genfunktionen E1a, E1b, E2a, VA RNA und E4 [Xiao et al., 1998] zugeordnet.

Infiziert AAV-2 ohne Helfervirus eine Zelle, wird das Genom über eine Kopf-Schwanz-Formation in die DNA integriert. Es wird auch von der latenten Phase des Virus gesprochen. [Cheung et al., 1980; Kotin und Berns, 1989; Laughlin et al., 1986].

Die Integration in die chromosomale DNA findet zu 70% an einer spezifischen Stelle auf dem Chromosom 19q13.3-qter statt. Diese Stelle wird als AAVS1 bezeichnet [Samulski et al., 1991].

Der Übergang von der latenten in die produktive Phase findet statt, wenn die Zelle zu einem späteren Zeitpunkt mit dem Helfervirus superinfiziert wird, wodurch der Teil des integrierten Genoms freigesetzt wird und die AAV-2-Partikel sich vermehren können [Nahreini und Srivastava, 1989].

Untersuchungen am Menschen zeigten, dass ein großer Teil der Bevölkerung (40-70 %) Antikörper gegen AAV-2 im Blut hatten, das heißt, dass sie schon einmal mit dem Virus in Kontakt gekommen sind. Bisher konnten keine Krankheiten in Zusammenhang mit AAV-2 in Verbindung gebracht werden. Es wird daher angenommen, dass AAV-2 nicht humanpathogen ist, was eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung am Mensch darstellt [Hallek und Wendtner, 1996].

In einem Mausmodell kam es nach sehr hohen Dosen von AAV-2-Wildtyp zu einem Abort von schwangeren Mäusen bis zum 7.Tag der Schwangerschaft [Botquin et al., 1994].

AAV-2 besitzt zwei offene Leserahmen, die für Rep- und Cap-Proteine kodieren. Eingeschlossen sind die offenen Leserahmen auf beiden Seiten von den invertierten terminalen Repetitionssequenzen (ITR), die jeweils eine Größe von 145 Nukleotiden haben [Koczot et al., 1973; Gerry et al., 1973]. Die ITR sind notwendig für die Replikation der viralen DNA und das Freisetzen der im Genom integrierten viralen Sequenzen [Samulski et al., 1983; 1987].

Die Rep-Proteine steuern die Integration der Virus-DNA in die Wirtszelle und die Cap-Proteine steuern die Verpackung der viralen DNA in Kapside [Mc Laughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989]. Zudem besitzen sie eine intrinsische transkriptionelle Promoter-Aktivität [Flotte et al., 1993]. Das Rep-Gen kodiert für vier Rep-Proteine, die von 2 Promotoren (p5 und p19) transkribiert werden. Die Rep-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Replikation und Transkription.

Rep 78 und Rep 68 besitzen sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität, mit der sie unter anderem an die ITR, die über spezielle Rep-Bindungsstellen (RBS) verfügen, binden können. Das für eine Replikation notwendige Aufwinden der ITR wird durch ATP-

abhängige DNA-Helikase-Aktivität und eine strang- und sequenzspezifische Endonuklease-Aktivität bewirkt, wodurch Strangbrüche entstehen. In ähnlicher Weise können Rep-Protein an AAVS1 binden und dort über Strangbruch und Komplexbildung zwischen ITR, Rep-Protein und AAVS1 die Integration in das Genom bewirken. In Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Helferviren können Rep-Proteine einen positiven oder negativen Einfluß auf die Replikation haben [Labow und Berns, 1998].

Die Cap-Gene codieren für drei Kapsid-Proteine VP1, VP2 und VP3, die das gesamte ca. 25 nm große, ikosahedrische Virus-Kapsid aufbauen [Rose et al., 1971]. Die Proteine haben unterschiedliche Längen und unterschiedliche Molekulargewichte.

1.5.3. Rekombinante AAV-2 Partikel als virales Vektorsystem

Zur Vektorherstellung können alle kodierenden Sequenzen aus dem AAV-2 Genom entfernt werden. Die ITRs sind die einzigen ursprünglichen viralen Sequenzen, die erhalten bleiben müssen. Diese müssen bei der Vektorherstellung in *cis*-Stellung zur Verfügung stehen [Samulski et al., 1989].

Therapiegene mit einer Größe zwischen 4,1 und 4,9 kb können zwischen die ITR kloniert werden und effizient in rAAV-2 Partikel verpackt werden [Dong et al., 1996].

Die notwendigen adenoviralen Helferfunktionen können *in trans* zur Verfügung gestellt werden [Xiao et al., 1998]. Die hergestellten Vektorlysate sind frei von AD-Helferviren, wodurch das Immunogenitätsrisiko durch Ad-Kapsidproteine eliminiert wurde. Außerdem kann eine Kontamination mit dem Wildtyp-AAV verhindert werden [Allen et al., 1997].

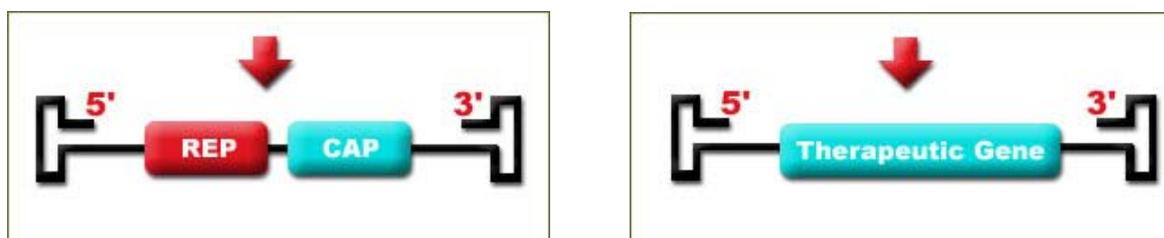


Abb. 1.3: Struktur AAV-2 Wildtyp (A) und AAV-2 Vektor mit Therapiegen (B)

1.6. Zielstellung der Dissertation

Zunächst sollten Nachweismethoden für FALDH, sowie der Gentransfer intakter FALDH mittels rAAV-2 Vektoren in FALDH-defekte Zelllinien untersucht werden, um dies später in das humane System übertragen zu können.

Inwieweit FALDH-transfizierte Zellen einen Überlebensvorteil in Anwesenheit von toxischem Fettaldehyd gegenüber unbehandelten Zellen zeigen, sollte in einem Toxizitätsversuch kontrolliert werden. Die Versuche sollten dann im humanen System, an defekten SLS-Keratinocyten durchgeführt werden, um festzustellen, inwieweit eine Korrektur mittels AAV-2-Vektoren möglich ist, bzw. ob sich die FALDH-Aktivität in den korrigierten Zellen steigern lässt.

Das endgültige Ziel der Arbeit bestand in der *in-vitro* Rekonstitution primärer, defekter SLS-Keratinocyten mittels rekombinanten-adeno-assoziierten Virusvektoren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturmedien und Supplemente

Biochrom KG, Seromed[®], Berlin, Deutschland

DMEM, Hams F12, MCDB 153, EGF (Epidermal Growth Factor) (5 mg/ml), Ethanolamin (0,1 mM), Hydrocortison (1,4 μ M), L-Glutamin (200 mM), Insulin (10 mg/ml), Phosphoethanolamin (0,1 mM), Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 mg/ml)

GibcoBRL, Life Technologies GMBH, Eggenstein, Deutschland

KSFM, DMEM mit Glutamin, Fetales Kälber Serum (FCS), Rinderhypophysenextrakt (25 mg/Einheit)

Sigma Chemie, München, Deutschland

Adenin Hydrochlorid, Cholera toxin

2.1.2. Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10

One Shot Top10 competent cells von Invitrogen Cor., Carlsbad, CA, USA

Eigenschaften: F-mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15DlacX74 deoR recA1 araD139 D (ara-leu) 7679 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

2.1.3. Eukaryontische Zellen

2.1.4. Zelllinien

CHO-K1 und CHO-FAA.K1A

Chinesische Hamster Ovarialkarzinomzelllinie

Geschenk von Prof. Zoeller, USA [James et al., 1997].

HeLa-Zellen

Humane Cervix-Karzinomzelllinie eines epithelialen Cervixkarzinom einer 31 jährigen Frau. Kultiviert seit 1951 [Scherer et al., 1953], von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 57), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 [Graham et al., 1977]. Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 305), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

NIH3T3

Kontakt-inhibierte embryonale Maus-Fibroblasten Zelllinie [Jainchill et al., 1969]. Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 59), Catalogue of Human and Animal Cell Lines, Braunschweig, Deutschland, erworben.

2.1.5. Primäre humane Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten von gesunden Spendern

Primäre, humane Keratinozyten wurden von Kindern nach Zirkumzision erhalten, die freundlicherweise von Dr.med Dr.med habil. Thomas Angerpointner, Kinderchirurgische Praxis, München, zur Verfügung gestellt wurden.

Alternativ wurden Keratinozyten aus den äußeren Haarwurzelscheiden von freiwilligen Probanden gewonnen.

Primäre, humane Keratinozyten von heterozygoten Trägern des SLS-Defektes und homozygoten SLS-Patienten

Die Hautbiopsie der Spenderin A wurde in der Dermatologischen Klinik der Technischen Universität München von Herrn Dr. Braun-Falco, entnommen.

Die Biopsie des Spenders B wurde dankenswerterweise von Frau Prof. Dr. Beyerl aus dem Dermatologischen Klinikum in Mannheim zur Verfügung gestellt.

Aus den Hautstanzen, die einen Durchmesser von ca. Ø 6 mm besaßen wurden die Keratinozyten isoliert.

2.1.6. Plasmide

pCEP4

Invitrogen Cor., Carlsbad, CA, USA.

phrGFP

Stratagene, La Jolla, CA, USA.

pTR-UF2

geschenkt von R. Samulski [Xiao et al., 1998].

pXX6

geschenkt von R. Samulski [Xiao et al., 1998].

pRC

geschenkt von A. Girod [Braun-Falco et al., 1999].

S-FALDH-pCIneo

geschenkt von Prof. Rizzo [Rizzo et al., 1999]

2.1.7. Enzyme

New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Alkalische Phosphatase (CIP), T4 DNA Polymerase, T4 DNA Ligase

Restriktionsenzyme:

Acc I, BamH I, Bgl II, EcoR, Hind III, Kpn I, Mlu I, Nae I, Not I, NheI, XhoI,
Nukleotidlösung

MP Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA

RNase A

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland

Benzonase 25 U/ μ

2.1.8. Chemikalien

Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene

Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, Großhansdorf

Octadecanal, 21,3 mM in n-Hexan gelöst

Calbiochem[®], La Jolla, CA, USA

MG 132, MOPS, free acid, Tyrphostin AG 1478, Tyrphostin 1

GibcoBRL, Life Technologies GMBH, Eggenstein, Deutschland

Agarose, 1 kb DNA Leiter

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

DMRIE-C-Reagenz

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland

Borsäure, Calciumchlorid, EDTA, Glycin, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumphosphat, Natriumhydroxid Plätzchen, SDS, Triton X-100

Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany

DIG-DNA-Labeling-Kid

Roth, C., Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin-Natriumsalz

Bacto Agar

Ethidiumbromid 1 %

Hefe-Extrakt; Hepes

Trypton / Pepton aus Casein

Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Pyrazol, 98 %; MTT; Hexan

Sigma Chemie, München, Deutschland

Adenin (6-Aminopurin) Hydrochlorid, Albumin aus bovinem Serum, Albumin Solution

7,5 % Fraktion 5, Ammoniumsulfat; L-Ascorbinsäure, BSA, Fettsäurefrei, Zellkulturgetestet

CoCl₂, Formamid, Hexadecanal; Hexanol, LiCl, DL-Maleinsäure, NADH; NAD⁺

Optiprep, Phenolrot, Protease X, Proteinase K, SSC-Puffer, Sulforhodamin B

Pierce, Boston Technology Center, USA

Sodiumphosphat, BCA-Protein-Assay Kit

2.1.9. Lösungen

Biochrom KG, Seromed[®], Berlin, Deutschland

EDTA (1 %), PBS, PBS (Pulverform) 10 l, Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %), Trypsin/EDTA (0,25 % /0,02 %)

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm, Deutschland

Isopropanol, Methanol

Leica, Instruments GMBH, Nussloch, Deutschland

OTC-Einbettmedium für Gefrierschnitte

Merck, E. AG, Darmstadt, Deutschland

Aceton, Chloroform, Dimethylsulfoxid (DMSO)

Riedl-de-Häen

Essigsäure, Ethanol 98 %

Sigma Chemie, München, Deutschland

Trypanblau Solution 0,4 %, endotoxinfreies Wasser, Iodixanol

Sigma Diagnostics, St.Louis, USA

Poly-L-Lysine-Lösung

2.1.10. Geräte und sonstige Materialien

Beckmann, München, Deutschland

Festwinkelrotor Ti70, Ultrazentrifuge L80, Ultrazentrifugationsröhrchen Quick Seal
Polyallomer 25 x 89 mm

Becton Dickinson and Company Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Zellkultureinlagen (0,4 µm Porengröße), Zellkulturplatten (6 Vertiefungen), Falcon-Röhrchen, konische 15 ml, 50 ml (aus Polypropylen), Falcon-Röhrchen, konische 15 ml, 50 ml (aus Polystyren), Mikrolance 3-Injektionskanüle, Pipetten (Polystyren) 10 ml, 25 ml, Sterile Spritzen 30 ml, 10 ml Syringe-Spritzen

Bio-Rad. Hercules, CA, USA

Gel Doc Dokumentationssystem Quantity One Version 4.1, Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, Power Pac 300 System

Brand GMBH + Co KG, Wertheim, Deutschland

Transferpipette, 8-Kanal 30-300 µl

Corning Costar Cor., Cambridge, MA, USA

sterile Zellschaber

Cromatocol, LTD, Welwyn Garden City, UK

1,8 ml braune Glasflaschen, Septen und Deckel

Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland

Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl

Pipettenspitzen weiß, gelb, blau,

Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml und 2,2 ml

Thermomixer 5437

Gerhardt, Königswinter, Deutschland

Thermoshake TH05

Greiner GmbH, Nürtingen, Deutschland

Petrischalen 10 cm unbeschichtet, für Bakterienkultur, Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl

Reagenzröhrchen 10 ml, 50 ml, Reaktionsgefäß 1,5 ml mit Deckel

Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge Universal 32R Rotanta

H + P, Oberschleißheim, Deutschland

Dampfsterilisator Varioclav

Integra biosciences, Chur, Schweiz

Pipetboy acu

Julabo, Seelbach, Deutschland

Wasserbad Typ F12

Kendro, Hanau, Deutschland

CO₂-Begasungsbrutschrank Hera Cell; Heraeus Megafuge 1,0; Heraeus Megafuge 1,0 R; Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HSP 12; Sorvall Zentrifuge RC 26 Plus; Sorvall SA-300 Rotor

Kern und Sohn Waagen, Balingen, Deutschland

770 Feinwaage

Kodak, Stuttgart, Deutschland

Ektochrome 160T Professional

Menzel GmbH+CoKG, Braunschweig, Deutschland

Menzel Objektgläser, geschnitten mit Mattrand

Moulinex, Solingen, Deutschland

Microchef FM 3915

Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland

Kryo-Gefäß 1,8 ml Innengewinde und U-Boden; Impfnadeln; Multidish Nunclon-SI zellkulturbeschichtet mit 6, 12 und 24 Vertiefungen; Zellkulturpetrischalen 40 x 12 mm, 58 x 15 mm, 92 x 17 mm

Peske, Aindling, Deutschland

Zellkulturschalen (für 293-Zellen) 15 cm; Kanülen BD Mikrolance

Pfm, Köln, Deutschland

Skalpell Feather

Plastibrand

Einmal-Küvetten, Halbmikro 1,5-3 ml, PS

Quiagen, Hilden, Deutschland

Endo free Plasmid Kit, Gel Extraction Kit (50), Plasmid Kit Mini und Maxi

Ricoh, Tokyo, Japan

XR X 3000 Fotokamera

Roth, C., Karlsruhe, Deutschland

Drigalski Spatel, sterile Kanülen 100 Sterican

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Minisart Sterilfilter; Porengröße 0,2 µm, Waage C 420 p

Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Bio Trap Membrane 1 und 2

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Vortex-Genie 2

Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

Laborzentrifuge Typ 1-15

Thermo Labsystems, Egelsbach, Deutschland

ELISA-Reader, MRX Revelation

Wagner und Muntz, München, Deutschland

Deckgläschen, Dumont Pinzetten gebogen, Handzähler, Neubauer Zählkammer,

Wheaton Homogenisator nach Fenbroeck, Skalpelle Cutfix 22

Varian, Malgrave, Victoria, Australien

Cary Eclipse-Fluoreszenz Spektrometer, Cary Single-Cell Peltier Accessory

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25, Microm HM 500 O-Kryostat-Mikro

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterienkultur

Die meisten mikrobiologischen Arbeiten wurden, soweit nichts anderes angegeben wurde, nach Standardprotokollen durchgeführt [Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989]. Zur Vermehrung superhelikaler Plasmid-DNA wurden transformationskompetente Bakterien des *E. coli* Stammes TOP10 eingesetzt.

2.2.2. Flüssigkultur

Dem autoklavierten LB-Medium wurde Ampicillin-Natrium in einer Endkonzentration von 80 µl/ml zugesetzt (LBamp).

Dieses Medium wurde mit Bakterien angeimpft und über Nacht für 12-14 h bei 37 °C im Schüttler bei 180-250 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert. Beim Übergang der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase der Bakterien hatten diese die optimale Konzentration erreicht. Bei 600 nm konnte die optische Dichte photometrisch gemessen werden. Werte zwischen 0,8 – 1 entsprachen einer Bakterienkonzentration von ca. 8×10^8 Bakterien/ml.

Zusammensetzung des Flüssigmediums:

LB-Medium:	10	g	Bacto Trypton
	5	g	Hefe Extrakt
	5	g	NaCl
ad	1.000	ml	Aquabidest

Ampicillinstocklösung:

800 µl der Ampicillinlösung wurden in einer Konzentration von 80 mg/ml in Ethanol gelöst, in 1,5 ml Eppendorf Gefäße aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.3. Plattenkultur

Zur Herstellung von Plattenkulturen wurde frisch autoklavierter LB-Agar unter Rühren in einem Eisbad auf 50 °C abgekühlt, bevor Ampicillin in einer Konzentration von 80 µl/ml hinzugegeben wurde. Unter ständigem Rühren wurde das fertige Medium auf sterile Ø 10 cm Platten ausgegossen. Das Medium erhärtete sich rasch bei Raumtemperatur. Die fertigen Platten wurden bei 4 °C im Kühlschrank und nicht länger als maximal 6 Wochen gelagert.

Zusammensetzung des Plattenmediums:

LB-Agar:	10	g	Bacto Trypton
	5	g	Hefe Extrakt
	6	g	NaCl
	15	g	Bacto Agar
	ad 1000	ml	Aqua bidest.

2.2.4. Glycerinkulturen

Zum dauerhaften Einfrieren von transformierten Bakterien wurde ein spezielles Einfriermedium hergestellt. Dieses bestand aus gleichen Teilen autoklaviertem LB-Medium und 87 %-igem Glycerin.

Von den Übernachtskulturen wurde ein 500 µl-Aliquot entnommen und mit 500 µl des Einfriermediums versetzt. Diese wurden in 1,8 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20° C bzw. -80 °C eingefroren.

2.2.5. Herstellen transformationskompetenter *E.coli* TOP 10 Bakterien

Zum Herstellen transformationskompetenter *E.coli* TOP 10 Bakterien wurde eine Einzelkolonie oder eine eingefrorene Glycerinkultur in 50 ml LBamp-Medium überimpft und über Nacht für 12 h bei 37 °C und 200 Upm vermehrt.

Aus dieser Übernachtskultur wurde ein Aliquot entnommen und entsprechend einer 1:100 bis 1:500 Verdünnung in TYM-Medium ohne Selektion überführt. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 200 Upm solange weiterkultiviert, bis die OD bei 600 zwischen 0,5 und 0,8 lag. Die Bakterienkulturen wurden in Zentrifugationsbecher gefüllt und auf einem NaCl-Eisbad abgekühlt, bevor sie 10 min bei 3000 Upm und 0 °C abzentrifugiert wurden. Die Überstände wurden bei 4 °C im Kühlraum abgegossen, das Bakterienpellet in 30 ml Tfb I Puffer pro 100 ml TYM-Medium aufgenommen und mit einer 25 ml Pipette vollständig resuspendiert und anschließend 10 weitere Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 10 min bei 4 °C und 3000 Upm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml Tfb II-Puffer pro 30 ml Tfb I-Puffer aufgenommen und so lange resuspendiert, bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte. Die Bakteriensuspension wurde bei 4 °C mit Hilfe eines Verteilers zügig zu 400 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfröhrchen verteilt und bei -80 °C eingefroren.

Durch gleichzeitige Transformation einer bekannten Plasmidmenge in ältere und in frisch hergestellte kompetente Bakterien wurde die Transformationskompetenz getestet.

Zusammensetzung des Mediums und der Puffer:

TYM-Medium:	2,0	%	Bacto-Trypton
	0,5	%	Hefe-Extrakt
	100	mM	MgCl ₂
Tfb I:	30	mM	KOAc
	50	mM	MnCl ₂
	100	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin
Tfb II	10	mM	MOPS
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	KCl
	15	%	Glycerin

2.2.6. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*

Kompetenten Bakterien wurden vor Versuchsbeginn langsam auf Eis aufgetaut. Für einen Transformationsansatz wurden 20 µl Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten Bakterien vorsichtig in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt und 30-45 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde bei 37 °C für exakt 5 min in einem Wasserbad durchgeführt. Die Lösung wurde in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium gefüllt und in 10 ml Greiner Röhrchen für 1 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 50 und 500 µl des Ansatzes mit Hilfe eines Drigalskispatels auf die vorgewärmten LBamp Platten ausgestrichen und für 12 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Von den gewachsenen Klonen wurde mit einer Impföse ein Klon gepickt und weiterverarbeitet.

2.2.7. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden spezielle käuflich erhältliche Säulen, nach einem standardisierten Verfahren verwendet.

Plasmid-DNA für die Virusverpackung wurde in speziell LPS-freien Säulen (Lipopolysaccharid) aufgereinigt.

2.2.8. DNA-Extraktion mittels alkalischer Bakterienlyse

Das DNA-Extraktionsverfahren ist ein modifiziertes Standardverfahren nach der Originalarbeit von Birnboim und Doly [Birnboim und Doly, 1979].

Hierbei wurden 5 ml oder 1 l der über Nacht vermehrten Bakterienkulturen, bei 5.000 Upm und Raumtemperatur, 10 min abzentrifugiert.

Das Pellet der 5 ml Kultur wurde in 300 µl P1-Puffer + *RNase A* aufgenommen, gut resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Das Pellet der 1 l Übernachtkultur wurde in 10 ml P1-Puffer + *RNase A* resuspendiert und in spezielle 7 ml bakteriologische Plastikröhrchen mit Rundboden überführt.

Die Lösungen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 300 µl, bzw. 10 ml P2-Puffer hinzugegeben wurde. Die Röhrchen wurden durch vorsichtiges Schütteln exakt für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das in P2-Puffer enthaltene SDS verursachte eine

alkalische Lyse, wodurch die übrigen Zellbestandteile präzipitiert und von der DNA getrennt werden konnten.

Durch Zugabe von 300 µl bzw. 10 ml eisgekühltem P3-Puffer wurde die Reaktion unter Schütteln beendet. Die Röhrchen wurden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 Upm für 30 min bei 0 °C zentrifugiert.

Im entstandenen Niederschlag waren Proteine und genomische DNA gefällt, im Überstand befand sich die gelöste Plasmid-DNA.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe des 0,7-0,8- fachen Volumens an Isopropanol bei 5 °C, 5.000 Upm, 30 min gefällt.

Das entstandene, gallertenartige Pellet wurde unter einer sterilen Werkbank getrocknet und in 25 µl bzw. 500 µl H₂O oder TE- Puffer aufgenommen. Für Restriktionsanalysen wurde 1 µl der DNA-Lösung eingesetzt.

Für die alkalische Lyse verwendete Puffer:

Puffer 1:	50	mM	Tris HCl (ph 8,0)
	10	mM	EDTA (ph 8,0)
	100	µg/ml	<i>RNase A</i> (erst vor Gebrauch dazugeben)
Puffer 2:	200	mM	NaOH
	1	%	SDS (w/v)
Puffer 3:	3	M	KOAc (ph 5,5)

2.2.9. Reinigung der isolierten Plasmid-DNA

Die Reinigung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte nach dem Anionenaustauscherprinzip über kommerziell erhältliche Säulen von der Firma Qiagen. Hierfür wurde der Überstand nach dem Abzentrifugieren der Proteine und der chromosomalen DNA auf Qiagen Säulen mit passendem Volumen gegeben, die zuvor mit QBT-Puffer equilibriert worden waren. Die Säulen wurden durch dreimaliges hintereinander Auffüllen mit QC-Puffer gewaschen. Im anschließenden Eluationsschritt wurde die DNA mit QF-Puffer aus den Säulen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe des 0,7-0,8-fachen Volumens an Isopropanol gefällt und bei

5.000 Upm für 30 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde unter der sterilen Werkbank kurz getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder LPS-freiem Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Puffer-QBT:	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS (ph 7,0)
	15	%	Ethanol
	0,15	%	Triton X 100

Puffer-QC:	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS (ph 7,0)
	15	%	Ethanol

Puffer-QF:	1,2	M	NaCl
	50	mM	MOPS (ph 8,5)
	15	%	Ethanol

TE-Puffer:	10	mM	Tris HCl (ph 7,5)
	1	mM	EDTA

TE-Puffer wurde autoklaviert.

2.2.10. Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol

Durch Zugabe des 0,1-fachen Volumens an 3 M KOAc (ph 5,2) und des 2,5-fachen Volumens an -20 °C gekühltem Ethanol wurde DNA aus wässrigen Lösungen gefällt. Das Gemisch wurde für 30-60 min bei -80 °C inkubiert und 30 min bei 4 °C und 15.000 Upm zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit eisgekühltem 70 % Ethanol gewaschen und für weitere 30-60 min bei gleicher Temperatur und gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde unter der sterilen Werkbank kurz getrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.11. Elution und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels eines DNA-Elutionskit, von der Firma Qiagen. Das Prinzip beruhte auf einer Bindung der DNA an eine Silikamembran, die von pH-Wert und Salzkonzentration abhängig war. Andere Verunreinigungen, wie Enzymreste, Ethidiumbromid, nicht verbrauchte Nukleotide und Salze wurden nicht an die Membran gebunden und ausgewaschen.

Hierfür wurde das gewünschte Fragmentstück mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorfgefäß gewogen. Die 3-fache Menge an QC-Puffer wurde zu der Gelmasse gegeben. Dem Puffer wurde ein Farbindikator zugesetzt, der bei pH Werten unter 7,5 eine gelbe Farbe anzeigte. Bei 50 °C wurde das Eppendorfgefäß mit Puffer und Gelstück unter mehrmaligem vortexen auf dem Wasserbad für 10 min erhitzt, bis das Stück aufgelöst war. Falls sich die Farbe des Indikatorpuffers orange oder violett verfärbte, wurden 10 µl Natriumacetat hinzugefügt, um den pH-Wert unter 7,5 zu senken, wodurch der Indikator wieder gelb umschlug. Dem einfachen Volumen des Reaktionsgemisches wurde das einfache Volumen an Isopropanol absolut hinzugefügt. Die Lösung wurde auf die Säule gegeben, wobei jede einzelne Säule maximal mit 800 µl Flüssigkeit beladen werden konnte. Die Säulen wurden auf ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt und bei Raumtemperatur, 13000 Upm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurde 0,5 ml QC-Puffer auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurden alle Agarosereste entfernt. Das Eluat wurde wieder verworfen.

Nach Zugabe von 0,75 ml PE-Puffer wurden die Säulen für 2-5 min vor der nächsten Zentrifugation bei 13000 Upm stengelassen. Das Eluat wurde nach der Zentrifugation verworfen und die Säule wurde erneut ohne Pufferzusatz bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein steriles, sauberes Eppendorfgefäß gestellt. Es wurden jeweils 50 µl EB-Puffer in die Mitte der Säulen pipettiert und 1 min inkubiert, bevor sie für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wurden. Das Eluat enthielt die DNA, von der die Konzentration UV-spektroskopisch bestimmt wurde. Die DNA wurde bei -70 °C gelagert.

Zusammensetzung der Puffer:

QG-Puffer:

QC-Puffer:

EB-Puffer: 10 mM Tris HCl, pH 8,5

2.2.12. Reinigung der DNA durch Phenolextraktion

Diese Methode ist eine weitere Möglichkeit, DNA nach Isolation aus Agarosegelen, oder nach Behandlung mit *alkalischer Phosphatase*, aufzureinigen. Durch Zugabe des einfachen Volumens von TE (pH 7,0) gesättigte Phenole zu einer DNA-Lösung wurden in Abhängigkeit vom Volumen das Gefäß eine Minute geschwenkt. Durch Zentrifugation bei 5.000 g für 30 sec. erfolgte die Phasentrennung. In der oberen, wässrigen Phase sammelte sich DNA an, welche vorsichtig abgenommen wurde und in ein frisches Gefäß überführt wurde. Bei starker Phenolverunreinigung wurde der Vorgang wiederholt. Um kleinere Phenolreste zu entfernen, wurde das einfache Volumen eines Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) zu der Lösung gegeben. Nach kräftigem Mischen wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt, wobei die obere wässrige Phase DNA enthielt. Diese wurde abgenommen und die Konzentration mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Die DNA wurde bei -70 °C gelagert.

2.2.13. DNA-Analyse

2.2.13.1. Agarosegelelektrophorese

Je nach Länge des zu untersuchenden DNA-Stückes wurden 0,6-2 %-ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die Agarose in TE-Puffer unter Wärme und mehrmaligem Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5-1 µg/ml der Lösung zugefügt und in eine Form zur Herstellung von Gelen gegossen. Nach dem Erhärten wurde das fertige Gel in die dafür vorgesehene Gelkammer gelegt und komplett mit TBE-Puffer bedeckt.

Die DNA wurde mit dem 0,2-fachen Volumen an Auftragepuffer gemischt und auf ein Volumen von 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und vorsichtig in die vorgesehenen Geltaschen aufgetragen. Parallel wurde ein Längenmarker mit 1 kb DNA-Länge in eine separate Geltasche aufgetragen. Durch die von außen angelegte Spannung erfolgte die Auftrennung der Fragmente nach der Größe. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm Gel-Länge. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnten die Fragmente bei 366 nm unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Die Fragmentlängen wurden anhand des zugesetzten Längenmarkers abgeschätzt.

TBE-Puffer:	89	mM	Tris
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
Auftragepuffer:	10	mM	Tris HCl
	50	mM	EDTA (ph 8,0)
	10	%	Ficoll
	0,01	%	Bromphenolblau
	0,01	%	Xylencyanol
	10	%	Glycerin

2.2.13.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde UV-spektrometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Für doppelsträngige DNA entsprach eine OD (260) von eins 50 ng/µl DNA.

2.2.13.3. DNA-Restriktionsanalyse

Für die Restriktionsanalyse wurden Enzyme mit den entsprechenden Puffern von der Firma New England Biolabs verwendet. Für eine Restriktionsanalyse wurden 1 µg DNA mit 1 µl des entsprechenden Restriktionspuffers und 1-5 Enzymeinheiten (U), Aqua dest. ad 10 µl Reaktionsvolumen in ein Eppendorfgefäß gegeben. Bei der vom Hersteller vorgeschriebenen Temperatur (meistens 37 °C) wurde der Restriktionsansatz auf dem Wasserbad für 1-2 h inkubiert.

Für präparative Ansätze mit größeren DNA-Mengen (100-300 µg), wurden die verwendeten Enzymmengen und Puffer entsprechend vervielfacht. Der Restriktionsverdau wurde meistens über Nacht für 12 h bei vorgeschriebener Temperatur durchgeführt. Die Restriktion wurde am nächsten Morgen in einer Agarosegelaufreinigung überprüft.

2.2.13.4. Herstellung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten

Das Enzym *T4-DNA-Polymerase* hat die Eigenschaft 3' überhängende Fragmentenden in glatte Enden zu überführen. Ebenso können 5' überhängende Enden unter geeigneten

Bedingungen aufgefüllt werden. Für die Reaktion wurden 1 µg DNA mit 1 U *T4-Polymerase* in 10 µl gepufferte Lösung bei 16 °C, 30 min inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C gestoppt. Bei Auffüllreaktionen wurden zusätzlich 200 mM dNTP's (Desoxynukleotidtriphosphat) pH 7,0 hinzugegeben.

10 x T4-Puffer:	100 mM	Tris HCl
	100 mM	Mg Cl
	ad 500 µl	Aqua dest.

2.2.13.5. Dephosphorylierung von DNA-Enden eines Fragmentes vor einer Ligation

Das längere Fragmentstück wurde vor einer Ligation dephosphoryliert, um einen Eigenringschluß zu verhindern. Für die Dephosphorylierung wurde eine Einheit (1 U) *alkalische Phosphatase* aus dem Kälberdarm mit 1 µg DNA-Fragment, 1 µl 10-fachem Dephosphorylierungspuffer in 9 µl Aqua dest. gemischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die *alkalische Phosphatase* wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 200 mM EDTA und durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min gestoppt. Die Aufreinigung bzw. das Entfernen der *alkalischen Phosphatase* aus der Lösung erfolgte durch DNA-Aufreinigungssäulen von der Firma Qiagen oder durch Phenolextraktion.

2.2.13.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden Fragmente wurden mit *T4 DNA-Ligase* inkubiert. Bei dieser Reaktion wurde ein Phosphatrest-tragendes Fragmentstück mit einem dephosphorylierten DNA-Fragment verbunden, das in einem äquimolaren Verhältnis in der Lösung vorlag. Für einen Ligationsansatz wurden die Fragmente in entsprechender Konzentration mit 4 µl Ligase-Puffer und 1 µl *T4-DNA-Ligase* versetzt und in 15 µl Aqua dest. aufgenommen. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

5 x Ligase Puffer:	250	mM	Tris HCl (pH 7,6)
	50	mM	MgCl ₂
	5	mM	ATP
	5	mM	DTT
	25	%	PEG 6000

2.2.13.7. Digoxigenin-Markierung von DNA

Zur Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin wurde ein käuflich erhältliches Labeling-Kit von der Firma Boehringer-Mannheim GmbH verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

Der Start der Markierungsreaktion verlief zufällig. Hierzu wurden Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz als Primer für die *DNA-Polymerase* eingesetzt.

Für eine Sondenherstellung wurden 300 ng des isolierten DNA-Fragments in 15 µl Volumen verwendet.

Die DNA wurde in kochendem Wasser 10 min lang denaturiert und anschließend sofort auf einem Eisbad abgekühlt. Der Reaktionsansatz enthielt: 2 µl Hexanukleotid Mischung, 2 µl dNTP Mischung und 2 U *Klenow-Polymerase*. Die Reaktion wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert, und wurde mit 2 µl EDTA gestoppt. Das markierte DNA-Fragment wurde bei -20 °C gelagert.

10 x Hexanukleotide:	1,56	mg/ml	Hexanukleotide
	500	mM	Tris HCl (ph 7,2)
	100	mM	MgCl ₂
	1	mM	DTE
	2	mg/ml	BSA
10 x dNTP`s:	1	mM	je ATP/ CTP/ GTP
	0,65	mM	dTTP
	0,35	mM	dUTP, Digoxigenin markiert
Stop-Puffer:	200	mM	EDTA

2.2.14. Hybridisierung filtergebundener DNA

Für die Bindung der DNA auf der Membran wurde eine positiv geladene Membran verwendet. Nach der Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese in spezielle Glasrohre für Rollenhybridisierung mit 20 ml ausreichend auf 42 °C vorgewärmte Prähybridisierungspuffer eingelegt und mindestens 15 min bei 42 °C in einem Rollenhybridisierer prähybridisiert. DNA-Fragmente wurden als Digoxigenin markierte

Sonden eingesetzt und zur Hybridisierung in Hybridisierungspuffer aufgenommen (20 ng/ml). Die Denaturierung der Sonden erfolgte für 10 min in kochendem Wasser. Die denaturierten Sonden wurden in einem NaCl-Eisbad rasch abgekühlt. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte mit 10 ml Sondenhybridisierungslösung und der DNA-fixierten Membran über Nacht bei 42 °C im Rollinkubator. Am nächsten Morgen wurde die Sonden-Hybridisierungslösung in einem Falcongefäß aufgefangen und bis zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert.

Die hybridisierte Membran wurde in dem Rundglasgefäß dreimal mit 2 x Waschlösung 5 min bei 42 °C, danach zweimal 15 min mit 0,1 x Waschlösung bei 64 °C gewaschen.

Hybridisierungspuffer:	125	mM	Na _x H _x PO ₄ (ph 7,2) (Äquimolares Gemisch aus NaH ₂ PO ₄ und Na ₂ HP0 ₄)
	250	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	45	%	Formamid
	7	%	SDS
20 x SSC:	3	M	NaCl
	0,3	M	Trinatriumcitrat, ph 7,0
2 x Waschlösung:	2	x	SSC
	0,1	%	SDS
0,1 x Waschlösung:	0,1	%	SSC
	0,1	%	SDS

2.2.15. Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA

Nach der Hybridisierung und den Waschschritten mit den Waschlösungen wurde die Digoxigenin-markierte-DNA über eine Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung eines kommerziellen Kits nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim GmbH) nachgewiesen. Hierbei wurde zunächst das unspezifische Bindungsverhalten der Membran mit einem Blockierungspuffer blockiert. Im nächsten Schritt wurde Digoxigenin mit einem

gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, an den alkalische Phosphatase konjugiert war (Anti-Dig-AP Antikörper), nachgewiesen. Im letzten Schritt reagiert die alkalische Phosphatase mit einem chemilumineszierenden Substrat (CSPD[®]). Das entstandene chemilumineszierende Signal konnte auf einem Röntgenfilm (Kodak) dokumentiert werden. Die noch feuchte Membran wurde nach der Hybridisierung in einem Waschpuffer 5 min bei Raumtemperatur im Rollinkubator gewaschen und anschließend für 60 min bei Raumtemperatur in einem Blockierungspuffer im Rollinkubator inkubiert. Nach Abgießen des Puffers wurde die Membran mit Anti-DIG-AP Antikörper, verdünnt auf 75 U / ml in Blockierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 15 min erfolgte die Äquilibration der Membran in Detektionspuffer für 5 min. Anschließend wurde die Membran auf eine Plastikfolie gelegt und mit 0,25 ml CSPD[®] verdünnt in Detektionspuffer überschichtet. Aus dem Folienstück wurde um die Membran eine geschlossene Tüte mit einem Einschweißgerät hergestellt. Die eingeschweißte Membran wurde für 5 min bei Raumtemperatur, gefolgt von 15 min bei 37 °C, mit der Lösung inkubiert und auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Chemilumineszenzreaktion konnte durch Entwickeln des Filmes dargestellt werden.

Maleinsäurepuffer:	100	mM	Maleinsäure
	150	mM	NaCl, ph 7,5, einzustellen mit NaOH
10 x Blockierungslösung:	0,1	mg/ml	Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Waschpuffer:	99,7	%	Maleinsäurepuffer
	0,3	%	Tween [®] 20
Blockierungspuffer:	90	%	Maleinsäurepuffer
	10	%	10 x Blockierungspuffer
Detektionspuffer:	100	mM	Tris HCl (ph 9,5)
	100	mM	NaCl

2.2.16. Herstellung von rAAV-2 Vektoren (rAAV-2 Verpackung)

Die Herstellung von rAAV-2 Partikeln erfolgte nach einer Methode aus dem Labor von Professor Samulski [Xiao et al., 1998].

Durch eine Trippeltransfektion des ITR-Transgenplasmids (pTR-UF/C-X), mit dem Helferplasmid (pRC) und dem adenoviralen Kofaktorplasmid (pXX6) konnten in 293-Zellen Vektorpartikel hergestellt werden. Die Virusverpackung erfolgte adenovirus-frei. Nach der Virusverpackung in den 293-Zellen wurden die fertigen Viruspartikel geerntet und mittels Iodixonal-Zentrifugation aufgereinigt [Zolotukhin et al., 1999].

2.2.17. Trippeltransduktion in 293-Zellen

293-Zellen wurden in Ø 15cm Petrischalen ankultiviert, bei 70-80 %-iger Konfluenz jeden zweiten Tag gesplittet, um eine optimale Proliferation der Zellen zu erreichen. Hierbei wurden ausschließlich Kulturschalen von der Firma TPP verwendet, mit denen die besten Ergebnisse erzielt wurden. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen mit einer optimalen Proliferationsphase war für eine erfolgreiche Virusverpackung obligat.

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden die 70-80 %- konfluenten 293-Zellen in 3 x Ø 15cm Petrischalen frisch auf 12 x Ø 15cm Petrischalen passagiert.

Am ersten Tag der Verpackung wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen in frische Ø 15cm Platten ausgesät und für 24 h ankultiviert. Am zweiten Tag der Verpackung erfolgte 3 Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel und eine drei- stündige Regeneration der Zellen. Anschließend erfolgte die Trippeltransfektion mittels Calciumphosphat. Hierfür wurden jeweils 112,5 µg Plasmid-DNA des ITR-Transgenplasmids, 112,5 µg pRC-Plasmid und 337,5 µg pXX6-80-Plasmid in einem äquimolaren Verhältnis zueinander eingesetzt. Der Reaktionspuffer bestand aus 1 ml 250 mM CaCl₂ und 1 ml HBS-Puffer. Die Plasmide wurden mit dem Puffer gemischt und für 2 min auf Eis inkubiert, bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wurde.

Am dritten Tag, ungefähr 20-22 h nach Transfektion, erfolgte ein Mediumwechsel.

Am vierten Tag wurden die Zellen mit den fertigen Vektorpartikeln geerntet, indem die Zellen mit sterilen Schabern von den Platten gelöst wurden. Die geernteten Zellen wurden in einem Zentrifugationsröhrchen gesammelt, auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 7,5-10 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen wurde durch die „Freeze-Thaw- Methode“ erreicht, bei der die Zellen dreimal hintereinander für 10 min in flüssigem Stickstoff gefroren wurden und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut wurden. Anschließend wurden die lysierten Viruspartikel bei -70 °C eingefroren.

Lysis-Puffer:	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris HCl
HBS-Puffer:	50 mM	Hepes
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	NaP (ph 7,2)

2.2.17.1. Aufreinigung von rAAV-2 Partikel über Ammoniumsulfaprzäzipitation und Iodixonal-Zentrifugation

Das bei -80 °C eingefrorene Viruslysate wurde bei 37 °C aufgetaut und für 10 min inkubiert. Die Lösung wurde mit 50 U/ml *Benzonase* in SS34-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 37 °C inkubiert, bevor sie in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 3.700 g, 4 °C für 20 min zentrifugiert, wodurch die Zellbestandteile der 293-Zellen pelletiert wurden. Der Überstand, der den Virus enthielt, wurde in frischen SS34-Röhrchen gesammelt, mit 35 % Ammoniumsulfat gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 7.650 g für 20 min zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Viruspartikel wurden mit 55 % Ammoniumsulfat versetzt und nach 20 minütiger Inkubation auf Eis bei 4 °C und 17000 g zentrifugiert. Der im Überstand befindliche Virus wurde vorsichtig abgekippt und in 7,5 ml PBS/MK-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Für die Herstellung des Iodixonal-Gradienten wurden Ultrazentrifugationsröhrchen verwendet. Bei der Schichtung des Gradienten wurde als erstes die Vektor-enthaltende PBS/MK-Lösung in das Röhrchen einpipettiert. Diese wurde mit 7 ml 15 % Iodioxanol unterschichtet. Die folgenden Lösungen wurden nacheinander vorsichtig unterschichtet: 5 ml 25 % Iodixanol, 5 ml 40 % Iodixanol und 6 ml 60 % Iodixanol. Zuletzt wurde das Röhrchen mit PBS/MK so überschichtet, dass das Röhrchen komplett mit Flüssigkeit, ohne Blasen, gefüllt war. Das Röhrchen wurde verschweißt und für eine Stunde bei 70.000 Upm und 20 °C in einem Ti 70-Rotor gefahren. Nach der Zentrifugation wurde die 40 % Iodixanolphase, in der sich der Virus befand, vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt. Die isolierten Viruspartikel wurden auf Eis gekühlt, und vor dem Aliquotieren gut resuspendiert und möglichst zügig in Eppendorfgefäße zu 100-200 µl pipettiert. Die fertigen Aliquots wurden bei -70 °C gelagert.

PBS/MK-Puffer: 50 ml 10 x PBS

	0,5	ml	1 M	MgCl ₂
	0,5	ml	2,5 M	KCl
ad	500	ml	Aqua dest.	

Puffer für den Iodixanol-Gradienten:

15 % Iodixanol	12,5	ml	Iodixanol	75	µl	0,5 % Phenolrot
25 %	20	ml		100	µl	
40 %	33,3	ml		0	µl	
60 %	50	ml		25	µl	
jeweils in	5	ml	PBS 10 x			
	50	µl	1	M	MgCl ₂	
	50	µl	2,5	M	KCl	
	10	ml	5	M	NaCl	
Ad	50	ml	Aqua dest.			

2.2.18. Bestimmung des physikalischen rAAV-2-Titers mittels Dot-Blot

Zur Bestimmung des physikalischen Titers von rAAV-2 wurden die Virusstocks seriell in 2er Schritten verdünnt und die Viruskapside durch NaOH zerstört. Die denaturierte rAAV-2-DNA wurde anschließend auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Der Nachweis der DNA-Menge erfolgte über die Hybridisierung digoxigenin-markierter Sonden aus dem Transgen und deren Nachweis über Chemilumineszenz.

In eine 96-Loch Platte mit Rundboden wurden 100 µl 0,5 M NaCl pipetiert. In die oberste Reihe der Lochplatte wurden zusätzlich 100 µl 0,5 M NaCl und 4 µl Viruslysat bzw. DNA-Standardkontrolle gegeben. Die serielle 1:2 Verdünnung erfolgte durch Pipetieren mit einer 8-Loch Multikanalpipette von 100 µl Volumen aus der 1. Reihe in die 2. Reihe, Mischen und Weiterpipetieren in die 3. Reihe usw. bis nach der letzten Reihe die verbliebenen 100 µl verworfen wurden. Anschließend wurde in jedes Loch 100 µl 0,5 M NaCl zugeführt und die Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Lösungen in den jeweiligen Löchern wurden anschließend mit Hilfe eines Dot-Blot-Filtrationssystems (Gibco) durch eine Nylon-Membran, mit Whatman-Papier umwickelt, gesaugt. Die Fixierung der rAAV-2 Partikel auf der Membran erfolgte bei 80 °C eine Stunde lang. Bis zur Hybridisierung der Membran wurde diese bei Raumtemperatur gelagert.

2.3. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

2.3.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Alle verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zelllinien wurden mit folgenden Standardzusätzen in das jeweilige Grundmedium versorgt:

Glutamin 2 mM

Penicillin (100 U/ml)

Streptomycin (100 µg/ml)

Die Medien wurden alle 2-3 Tage erneuert.

Zelllinien:

HeLa-Zellen und NIH3T3:

DMEM, supplementiert:	90	%	DMEM
	10	%	FCS

CHO-K1 und CHO-FAA.K1-Zellen

Hams`F12, supplementiert:	90	%	Hams F12
	10	%	NBS

293-Zellen:

DMEM, supplementiert:	90	%	DMEM
	10	%	NCS

Primärzellen

Humane primäre Keratinozyten wurden entweder ohne, oder mit Feederzellen in supplementiertem Medium mit Zusatz von kultiviert:

Penicillin	(100 U/ml)
Streptomycin	(100 µg/ml)
Rinderhypophysenextrakt	25 mg
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	10 ng/ml
Glutamin	2 mM

Humane primäre Keratinozyten, ohne Feederzellen:

KFSM-Keratinocytenmedium: 100 % KFSM

Humane Primäre Keratinocyten auf Feederzellen kultiviert:

KGM-Medium:

375	ml	DMEM
125	ml	Hams F12
50	ml	FCS
		ADP
10	ng/ml	Epidermaler Wachstumsfaktor
5	µg/ml	Insulin
500	ng/ml	Hydrocortison
0,1	mM	Ethanolamin
0,1	mM	Phosphoethanolamin
0,1	mM	Choleratoxin

2.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Abzentrifugierte Zellen wurden in einem bekannten Volumen Vollmedium aufgenommen und gründlich resuspendiert. Ein kleines Aliquot wurde entnommen und 20 µl Zellsuspension mit 20 µl 10 %-igem Trypan-Blau 1:1 gemischt. 10 µl dieses Gemisches wurden in eine Neugebauer-Zählkammer pipettiert und die vier eckständigen Quadranten wurden ausgezählt. Die Gesamtzahl wurde durch vier dividiert, um den Mittelwert zu erhalten. Durch die Trypan-Blau Zugabe hatte man zuvor eine 1:2 Verdünnung hergestellt, weshalb der ermittelte Mittelwert mal Faktor 2 genommen wurde. Die resultierende Zellzahl entsprach der Zellzahl mal 10^4 pro ml Zelllösung. Durch Multiplikation dieser Zellzahl/ml mit dem Resuspensionsvolumen konnte die absolute Zellzahl bestimmt werden.

2.3.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Beim Split einer zu 80 % konfluenten Ø 10 cm, oder Ø15 cm Platte wurde das Pellet gut resuspendiert und ungefähr 1/10 des Resuspensionsvolumens wurde zur Weiterkultivierung auf die entsprechende Platte aufgetragen. Die restlichen Zellen wurden bei 1.500 Upm

erneut abzentrifugiert und in dem gut vorgekühlten Einfriermedium resuspendiert und anschließend auf 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff dauerhaft eingefroren wurden.

Beim Auftauen von Zellen wurde ein auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Wasserbad vorbereitet, in welches das Kryoröhrchen unmittelbar nach dem Herausnehmen aus dem flüssigen Stickstoff eingelegt wurde. Sobald sich das Medium langsam verflüssigte, wurde das Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit dem 10-fachen Volumen an Medium verdünnt. Die Zellen wurden bei 1.500 Upm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen, gut resuspendiert und in eine Kulturschale zum Kultivieren überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

Einfriermedium:	90	%	FCS
	10	%	DMSO

2.3.4. Präparation primärer, humaner Keratinozyten

2.3.4.1. Präparation von Keratinozyten aus Hautproben

Primäre, gesunde, humane Keratinozyten wurden aus Zirkumzisionen nach der Methode aus dem Kompendium von I. Leigh und F. Watt präpariert [Leigh und Watt, 1994]. Analog wurden auch die Keratinozyten von Sjögren-Larsson Patienten aus \varnothing 6 mm Hautstanzen präpariert.

Das Fettgewebe wurde von der Innenseite des Hautstückes bis zur Dermis mit einem Skalpell entfernt. Das Hautpräparat wurde mit 10 ml Betaisodonna-Lösung für 5 min bei leichtem Schwenken desinfiziert. Die Betaisodonna-Reste wurden durch mehrmaliges Spülen mit jeweils 10 ml PBS-Puffer für jeweils 5 min aus dem Hautstück gespült.

Das desinfizierte und gereinigte Hautstück wurde auf eine \varnothing 10 cm Platte gelegt und mit einem Skalpell in 5 x 5 mm große Hautstücke zugeschnitten. Die fertig geschnittenen Hautstücke wurden in ein Falcon-Röhrchen mit 0,5 mg/ml *Protease X* gelegt und im Kühlschrank für 24 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 Petrischalen mit PBS-Puffer und Trypsin/EDTA gefüllt. Von jedem Hautstückchen wurde mit zwei Dumont-Pinzetten vorsichtig die Epidermis von der Dermis mechanisch abgezogen und die Innenseite zur Flüssigkeit in PBS-Puffer für 5 min gelegt. Die hauchdünnen Epidermisstücke

wurden mit der Dumont-Pinzette glatt gestrichen und mit der Innenseite in die Schale mit Trypsin/EDTA überführt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde Trypsin durch die Zugabe eines Isovolumens an 10 %-FCS-haltigem DMEM deaktiviert.

Die Epidermishäutchen wurden mit einer 5 ml Pipette zweimal ein und auspipettiert und die Lösung in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1.500 Upm abzentrifugiert und wurden in Kulturmedium resuspendiert und in den entsprechenden Kulturschalen weiterkultiviert.

Thermolysin-Puffer:	142	mM	NaCl
	10	mM	Hepes
	6,7	mM	Kcl
	1,0	mM	CaCl
	0,43	mM	NaOH, ph 7,4

2.3.4.2. Präparation von Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide

Bei der Kultivierung von Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide wurden ca. 40 Haare in der Anagenphase benötigt [Limat et al., 1989; Moll, 1996].

Den Probanden wurden mit Hilfe einer Haarzange Haarbüschel durch ruckartiges Ziehen der Zange vom Kopf hinweg entfernt. Teilweise wurden die Haare auch einzeln mit einer Pinzette entfernt, wobei mindestens 40 Haare gezogen wurden.

Haare, die sich in der Anagenphase befanden, wurden unter dem Mikroskop zur weiteren Verarbeitung ausgewählt. Von diesen Haaren wurde die Haarpapille und der nach außen stehende Haarschaft abgetrennt. Das restliche Haarstück wurde wie oben beschrieben in Betaisodonna-Lösung desinfiziert und anschließend mehrmals gründlich mit PBS-Puffer gewaschen. Durch 20-30-minütige Inkubation der gereinigten Haare in Trypsin/EDTA wurden die Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide gelöst. Durch mehrmaliges Aufziehen in einer 5 ml Pipette konnte die Vereinzelung der Haarwurzelscheidenzellen vermehrt werden.

Die isolierten Zellen wurden in Petrischalen mit und ohne Feederzellen gegeben und nach Zugabe des entsprechenden Mediums für 5 Tage in Ruhe stengelassen. Am fünften Tag erfolgte der erste Mediumwechsel, anschließend wurde das Medium alle 2-3 Tage erneuert.

2.3.5. Kultivierung von Keratinozyten

Keratinozyten wurden sowohl auf Feederzellen als auch ohne Feederzellen kultiviert.

2.3.5.1. Keratinozytenkultur auf Feederzellen

Die Kultivierung von Keratinozyten auf Feederzellen entspricht der klassischen Methode von Rheinwald und Green [Rheinwald und Green, 1975] mit der es 1975 erstmals möglich wurde, Keratinozyten seriell zu expandieren.

Als Feederzellen wurden NIH 3T3-Zellen eingesetzt, welche sich vor Versuchsbeginn in einer optimalen Proliferationsphase befanden. 24 h vor Beginn der Keratinozytenkultivierung wurden 80-90 % konfluent gewachsene Feederzellen passagiert und gezählt. Je nach gewählter Größe der Petrischale wurde ein ausreichend großes Aliquot von den Zellen entnommen und in ein Falconröhrchen pipettiert. Es folgte eine Bestrahlung der Feederzellen mit 8.000 rad für 17,3 min. Die bestrahlten Zellen wurden direkt im Anschluß in den vorgesehenen Kulturschalen in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² Kulturoberfläche ausgesät und konnten für 5-6 h in dem entsprechenden Fibroblastenmedium wachsen.

Die Keratinozyten wurden in KGM-Medium resuspendiert und nach dem Absaugen des Mediums vorsichtig auf den Feederzellen verteilt.

Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Kultur bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 %, oder spätestens nach 12-14 Tagen passagiert.

2.3.5.2. Keratinozytenkultur ohne Feederzellen

Die Kultivierung von Keratinozyten ohne Feederzellen wurde 1993 durch die Entwicklung von serum-freiem, speziell mit niedriger Calcium-Konzentration angepasstem Medium durch Boyce und Ham [Boyce und Ham, 1983] möglich.

Die Keratinozyten wurden nach dem Ablösen von der Zellkulturschale mittels Trypsin/EDTA bei 1.500 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in KFS-Medium, voll supplementiert, aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellen wurden bei einer 70-80 %-iger Konfluenz in einem 1/10-Split passagiert.

2.3.6. Passagieren von Keratinozyten

Grundsätzlich verhalten sich Keratinozyten bei dem Passagieren wie andere adhärenente Zellen. Bei Keratinozyten, welche auf Feederzellen kultiviert wurden, mussten zunächst die Feederzellen durch 30 Sekunden Inkubation mit EDTA und Bespritzen mit PBS-Puffer entfernt werden. Bei Keratinozyten ohne Feederzellen, also in serum-freiem-Medium, wurden die Zellen nach Deaktivierung von Trypsin mit FCS zusätzlich einmal in 10 ml PBS-Puffer gewaschen, um den Rest an FCS zu minimieren.

2.3.7. Herstellung von Zellhomogenaten aus Keratinozyten oder CHO-Zellen

Vor dem Ernten der auf Ø 10 cm- oder Ø 15 cm-Gewebekulturschalen kultivierten Keratinozyten, bzw. CHO-Zellen, wurden die Platten zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden geerntet, bei 1.500 Upm, Raumtemperatur, pelletiert, in 5 ml eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen und erneut bei 1.500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 300-500 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen, gut resuspendiert und auf Eis gestellt. In einem manuellen Teflon-beschichteten Homogenisator nach Tenbroeck erfolgte, durch 15-malige Auf-und Abbewegung, das Homogenisieren der Zellen. Von den Homogenaten wurden Aliquots für die Proteinbestimmung entnommen. Die Homogenate wurden in sterile Eppendorfgefäße gefüllt und bei -70 °C gelagert, maximal für 4 Wochen.

Homogenisierungspuffer:	25	mM	Tris-HCl, ph 8,0
	0,25	mM	Sucrose
	0,1	%	Triton X-100

2.3.8. Bestimmung des Proteingehaltes von Keratinozyten und CHO-Zellen mittels BCA-Test

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde mit Hilfe eines käuflichen Kits von der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehaltes basiert auf einer modifizierten Methode nach Lowry [Lowry et al., 1951]. Der Test erlaubt die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in alkalischer Lösung. Hierbei entsteht durch die Biuret-Reaktion in der ersten Stufe Cu^{1+} , welches anschließend durch Bicinchonin-Säure kolorimetrisch detektiert werden kann. Durch Chelatbildung

zweier BCA Moleküle mit einem Kupferion entsteht ein violettees Reaktionsprodukt, welches bei 562 nm absorbiert. Die Absorption nimmt linear mit steigender Proteinkonzentration zu (in einem Bereich von 20 µg bis 2.000 µg/ml).

Der BSA Stockstandard wurde im Homogenisierungspuffer gelöst und entsprechend der Herstellerangaben verschiedene Verdünnungen hergestellt. Das bei -70 °C gelagerte Aliquot des Zellhomogenates wurde auf Eis aufgetaut und in einem Ultraschallbad auf Eis für 15 sek. sonifiziert. Es wurden eine 1:1 und eine 1:2 Verdünnung hergestellt.

Die Standards und die Homogenate wurden in eine 96-Lochplatte aufgetragen. In jedes Loch wurden 200 µl BCA Arbeitsreagenz pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt für 30 sek. auf dem Schüttler bewegt und bei 37 °C im Wärmeschrank für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte im ELISA Reader bei 562 nm gemessen.

Anhand der Standardkurve konnte der Proteingehalt für jede Probe ermittelt werden. Analog wurde der Proteingehalt bei den CHO- und FAA.K1-Zellen bestimmt.

BCA-Reagenz A:	Na ₂ CO ₃ , Na(CO ₃) ₂ , Bicinchoninic Säure, Na-Tartrat in 0,1 M	NaOH
BCA-Reagenz B:		Kupfersulfatlösung
BCA-Arbeitslösung (WR):	50 Teile	BCA Reagenz-A
	1 Teil	BCA Reagenz-B

2.3.9. Dreidimensionale Hautkultur

Die dreidimensionale Hautkultur wurde nach einer Methode aus dem Labor von Professor F. Watt durchgeführt [Rikimaru et al., 1997].

Hautproben, welche meistens aus der plastischen Chirurgie stammten, wurden in 1,5 cm² große Stücke zugeschnitten und deepidermisiert, um DED-Stücke zu erhalten.

Hierfür mussten die Hautproben bei 56 °C 20-30 min erhitzt werden, um die Epidermis abziehen zu können. Die einzelnen deepidermisierten Stücke wurden in feste Alufolie umwickelt. In 10 Zyklen, die aus einem Wechsel zwischen 5-minütiger Inkubation in flüssigem Stickstoff und bei Raumtemperatur bestanden, wurden die Dermisstücke behandelt, wodurch diese nicht mehr proliferationsfähig waren. Die Lagerung der Dermisstücke erfolgte bei -70 °C.

Für die Herstellung einer dreidimensionalen Epidermis auf der Grundlage einer humanen Dermis wurden Keratinozyten aus der ersten oder einer späteren Passage, sowie Keratinozyten von Sjögren-Larsson-Patienten, verwendet. Die nullte Passage wurde nie verwendet, da nach dem ersten Splitt sehr viele Zellen nicht mehr adhärirten. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA gelöst, zentrifugiert und nach der Aufnahme in KSFM gezählt. Die ca. $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$ großen Dermisstücke wurden mit der Fettseite nach unten auf je eine Zellkultureinlage in der 6-Loch-Platte mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ gelegt. Die Einlage wurde um die Dermis einige Male mit einer Nadel durchstoßen. 5×10^5 Zellen wurden durch erneutes Zentrifugieren und Absaugen des Überstands in $15 \mu\text{l}$ KSFM aufgenommen und vorsichtig auf die Mitte des Dermisstücks pipettiert. Danach wurde das Loch mit dem Insert am Rand mit ca. $2,5 \text{ ml}$ KGM aufgefüllt. Das Dermisstück wurde 7 Tage lang bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert, wobei der erste Mediumwechsel erst nach 3 Tagen stattfand. Anschließend wurde alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Das Hautäquivalent wurde nach 7 Tagen bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ für weitere 7-14 Tage kultiviert.

Nach Ende der Kultivierung wurden die fertigen dreidimensionalen Hautäquivalente sofort weiterverarbeitet, oder bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3.10. Transduktion mit rAAV-2 Vektoren

2.3.11. Reguläre rAAV-2 Transduktion von Keratinozyten

Die Transduktionen wurden in 12-, 24- und 6-Loch-Platten durchgeführt. Für die Transduktionen wurden Keratinozyten aus der zweiten oder dritten Passage verwendet. Die optimale Zelldichte lag zum Zeitpunkt der Transduktion bei 80 %. Vor der Transduktion wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Der verwendete Virusstock wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Das entnommene Viruslysate wurde mit Medium so verdünnt, dass die Zelloberfläche mit Flüssigkeit gerade dünn bedeckt war. Der Transduktionsansatz wurde im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 h inkubiert. Anschließend wurde mit Medium auf das normale, vorgeschriebene Volumen aufgefüllt.

Nach einer 12-stündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt, Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend entsprechend dem einzelnen Versuch gesplittet. Genauere Angaben waren aus den einzelnen Versuchen zu entnehmen.

2.3.12. Methoden zur Steigerung der Transduktionseffizienz bei rAAV-2 Transduktionen in Keratinozyten

2.3.12.1. rAAV-2 Transduktion mit Proteasomen-Inhibitoren

Zur Transfektion mit Proteasomeninhibitoren wurden 8.000-10.000 SLS-Keratinozyten auf eine 24-Loch-Platte ausplattiert und in voll supplementiertem KFS-Medium bis zum Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Die Transfektion erfolgte in 500 µl EGF-freiem KSF-Medium, welches zuvor in ein Eppendorfgesäß pipettiert wurde. In dieses wurden 30-50 µl rAAV-2-Viruslysate und 100 nM MG132 zugefügt. Die Lösung wurde vorsichtig durchmischt, bevor sie auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für exakt 12 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen und mit voll supplementiertem KFS-Medium für mindestens 12 h weiterkultiviert, bevor die Zellen passagiert wurden.

2.3.12.2. rAAV-2 Transfektion mit dem EGF-R PTK-Inhibitor AG 1478

Für die Transfektion mit AG1478 wurden 4.000-5.000 Keratinozyten pro Loch einer 24-Loch-Platte ausplattiert und in voll supplementiertem KFS-Medium kultiviert, bis sich viele kleine Klone gebildet hatten, was meistens 2 Tage dauerte. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Es erfolgte ein zwei-tägiger EGF-Entzug der Zellen in KFS-Medium, supplementiert, ohne EGF. Bei Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz wurden die Zellen transduziert.

Vor der Transfektion wurden 500 µl EGF-freies Medium in einem Eppendorfgesäß mit AG 1478 gemischt, so dass sich eine Konzentration von 100 µM ergab. Diese Mischung wurde auf die Zellen verteilt und bei 37 °C im Brutschrank für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer für 5 min gewaschen, bevor die entsprechende Viruslösung in 500 µl EGF-freiem Medium auf die Zellen gegeben wurde. Es erfolgte eine Inkubation der Viruslösung auf den Zellen für 12 Stunden. Am nächsten Tag wurden die Zellen passagiert.

2.3.12.3. Doppeltransduktion/Trippltransduktion

Nach der ersten Transfektion wurden 5.000 transduzierte Keratinozyten erneut in eine 24-Lochplatte ausplattiert und erneut in voll supplementiertem Medium kultiviert. Nachdem sich einige Klone gebildet hatten, wurde dem Medium EGF entzogen und die Zellen wurden bis zum Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz in serumfreien Medium kultiviert. Die Zellen wurden 2 h vor Transfektion erneut mit der selben Menge AG 1478 für 2 Stunden behandelt, anschließend gut mit PBS Puffer gewaschen und mit 30-50 µl Viruslysate in 500 µl EGF-freiem Medium transfiziert.

12 Stunden nach Transfektion wurde die Lösung abgesaugt, die Zellen wurden gewaschen und passagiert.

Analog erfolgten die Trippltransfektionen.

2.3.13. Histologische Methoden

2.3.13.1. Herstellung Paraffin-fixierter Routineschnittpräparaten

Die Hautäquivalente wurden in 3 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µM dicke Schnitte hergestellt, die auf Glasobjektträger gezogen wurden.

Diese wurden automatisch entparaffinisiert und mit Hematoxylin und Eosin gefärbt.

2.3.13.2. Herstellung von Kryostatschnitten

Die Gewebestücke bzw. die Hautäquivalente wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -25 °C in einem Kryostat-Mikroton in 4-12 µM dicke Scheiben geschnitten, welche anschließend auf *Poly-L-Lysin*-beschichtete Objektträger, gezogen wurden.

Schnitte für den GFP-Nachweis wurden sofort unter dem Fluoreszenzlicht untersucht.

Schnitte für den FALDH-Nachweis wurden sofort weiterverarbeitet.

2.3.14. Nachweismethoden für FALDH

2.3.14.1. FALDH-Aktivität aus Keratinozytenhomogenaten

Die FALDH-Aktivität wurde fluorometrisch durch die FALDH-abhängige Produktion von NADH nach einer Methode aus dem Labor von Professor Rizzo gemessen [Rizzo und Craft, 1991; Kelson et al., 1997].

Das bei -70 °C eingefrorene Zellhomogenat wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend auf Eis für 15 sek. sonifiziert. 100 µg des Zellhomogenates wurde in einem Dehydrogenasemedium unter Zusatz von NAD⁺, Pyrazol, BSA und Tris-Puffer in einem absoluten Volumen von 800 µl, pH 7,4 für 2 min bei 37 °C vorgewärmt, bevor die Reaktion gestartet wurde. Durch Zugabe von 8 µl einer 21,5 mM Octadecanallösung wurde die Reaktion gestartet. Die Endkonzentration betrug 160 µM Octadecanal in dem Reaktionsansatz. Dieses wurde durch FALDH zur korrespondierenden Carbonsäure oxidiert, wobei unter Reduktion von NAD⁺, NADH entstand.

Zusätzlich wurde die Eigenfluoreszenz der Probe durch Zugabe von Ethanol anstelle des Fettaldehydes gemessen.

Die Fluoreszenzintensitäten (FI) wurden über einen Zeitraum von 30-40 min in einem Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrometer von der Firma Varian bei einer Erregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. In einem Zeitintervall von 5-10 min wurden die Messwerte entnommen.

Um die absoluten FI zu ermitteln, wurden die gemessenen FI der Negativkontrolle mit Ethanol von den FI des Substratansatzes mit Octadecanal zu jedem Zeitpunkt subtrahiert.

Die katalytische Aktivität von FALDH kann unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge und durch Division der erhaltenen FI durch den jeweiligen Zeitpunkt ermittelt werden.

Da es in der vorliegenden Arbeit nicht um Absolutwerte ging, sondern um die Relation der FI zwischen gesunden, defekten und transfizierten Zellen, wurde auf die Umrechnung der FI in die FALDH-Aktivität in pmol/min/mg verzichtet.

Bei den Messungen wurden die Differenzwerte der FI angegeben, von denen auf die FALDH-Aktivität geschlossen werden kann, da diese in einem proportionalen Verhältnis zueinander stehen. Die Aktivitäten können auch durch Angabe der Differenzwerte geteilt durch 60 min in Units/min dargestellt werden.

Reaktionspuffer/Dehydrogenasemedium:

25	mM	Glyzin-NaOH-Puffer, ph 9,0
10	mM	Pyrazol
0,2	mg / ml	fettsäure-freies Rinderserum Albumin
1,5	mM	NAD ⁺

2.3.14.2. FALDH-Aktivität von CHO- und FAA.K1-Homogenaten

Die fluorometrische Messung der FALDH-Aktivität von CHO und FAA.K1-Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wie bei den Keratinozyten beschrieben nach einer Methode aus dem Labor von Zoeller [James et al., 1990].

Pro Meßansatz wurde 150 µg Zellhomogenat eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl einer 21,5 mM Octadecanollösung gestartet und über 30-40 min gemessen.

Reaktionspuffer/Dehydrogenasemedium:

50	mM	Glyzin-NaOH-Puffer, ph 9,0
10	mM	Pyrazol
0,25	mg / ml	fettsäure-freies Rinderserum Albumin
0,5	mM	NAD ⁺

2.3.14.3. Fettaldehyd-Selektionsversuch mit Keratinozyten

Zur Selektion rAAV-2/C-FALDH-transfizierter Zellen wurden 20.000 Keratinozyten pro Loch einer 6-Loch-Platte ausplatiert und für 24 h in voll supplementiertem Medium kultiviert. In jede Vertiefung wurde eine Mischung aus 20 µM Octadecanal in 2 ml KFS-Medium gegeben und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Zellen wurden gründlich gewaschen und bis zu einer 80 %-igen Konfluenz weiterkultiviert. Die Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und erneut ausplatiert.

Der Versuch wurde 2-3-mal wiederholt.

Von den selektionierten Zellen wurden die FALDH-Intensitäten bestimmt.

2.3.14.4. Histochemischer in situ Nachweis epidermaler FALDH

Der histochemische in situ Nachweis epidermaler FALDH wurde nach einer Methode von Judge und Kollegen [Judge et al., 1990; Lake et al., 1991] durchgeführt.

Kultivierte, dreidimensionale Hautäquivalente von gesunden, SLS- und transfizierten Keratinozyten wurden nach Kultivierung in Hexan schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder gleich weiter verarbeitet. Aus den Hautstücken wurden im Kryostaten $12\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnittpräparate hergestellt, die auf einen mit *Poly-L-Lysin* beschichteten Objektträger aufgezogen wurden. Die Objektträger mit den Schnitten wurden in eiskaltem Azeton für 8-10 min entfettet und danach durch einen Luftstrom bei Raumtemperatur schnell getrocknet. Einem Milliliter aufgetautem Dehydrogenasemedium, ph 7,4 wurden $0,1\text{ ml } 1\text{ M}$, neutralisiertes Hexanol, 2 mg NAD^+ hinzugegeben und gut gemischt. Für die Negativkontrollen wurden dem Dehydrogenasemedium anstelle des Hexanols Ethanol, in gleichen Teilen, zugegeben. Jeder Objektträger wurde mit einigen Tropfen Dehydrogenasemedium bzw. mit der Negativkontrolle betropft und mit einem Deckglas für 90 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Schnitte wurden nach der Inkubation für einige Minuten in Leitungswasser gewaschen.

Die Objektträger wurden mit Glycerin-Gelatine eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Das Dehydrogenasemedium wurde in größeren Mengen hergestellt und in $1,5\text{ ml}$ Eppendorfgefäße aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Dehydrogenase-Medium:	5	ml	0,05	M	Tris-HCl
	5	ml	1	mg / ml	MTT
	1	ml	0,5	M	Cobalt-Chlorid
	5	ml			H ₂ O, dest.

2.3.15. Toxizitätsversuche

2.3.15.1. Zytotoxizitätsversuch mit Coomassie-Blau-Färbung

Um den toxischen Effekt langkettiger Aldehyde auf defekten FAA.K1-Zellen darzustellen, wurde der Versuch nach James und Kollegen [James und Zoeller, 1997] durchgeführt. In einer 24-Loch-Platte wurden 4×10^3 defekte FAA.K1- und CHO-Zellen/ml in $0,4\text{ ml}$ Ham`s F12-Medium ausplattiert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch $0,4\text{ ml}$ Medium mit den entsprechenden Aldehydkonzentrationen ersetzt, das für 20 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf den Zellen inkubierte. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Ham`s-Medium für weitere 5-7 Tage kultiviert. Die überlebenden Zellen wurden mittels Coomassie-Blau-Färbung visualisiert.

Hierfür wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen wurden hintereinander mit 2 ml PBS, und anschließend mit 0,5 ml einer 0,5 % (w/v) Coomassie-Blau-Fixierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 2 ml einer Waschlotion gewaschen, um restliche Färbung zu entfernen. Die überlebenden Zellen waren als blaue Niederschläge auf den Platten fixiert und konnten visuell ausgewertet werden.

0,5 % Coomassie-Blau-Fixierlösung:	0,5	%	Coomassie-Blau
	45	g	Methanol
	10	g	Essigsäure
	45	g	Aqua dest.
Waschlotion	45	g	Methanol
	45	g	Aqua dest.
	10	g	Essigsäure

2.3.15.2. Zytotoxizitätsversuch mit Sulforhodamin B bei CHO- und FAA.K1-Zellen

Bei dieser Methode wurden die Zellen mit Octadecanal in verschiedenen Konzentrationen behandelt, wie unter Coomassie-Blau-Färbung beschrieben.

Die Inkubation mit Octadecanal erfolgte nach der Idee von James und Zoeller [James und Zoeller, 1997]. Der zelluläre Proteingehalt adhärenter, überlebender Zellen wurde nach einer Methode von Skehan und Kollegen [Skehan et al., 1990] erfasst. Es wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte 600 CHO- und FAA.K1-Zellen oder 1.000 Keratinozyten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert.

Es wurden für jede ausgewählte Aldehydkonzentration vier Löcher mit derselben Zellart ausplattiert, von denen bei der späteren Auswertung die größte Abweichung gestrichen wurde. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 0,2 ml Medium mit steigenden Aldehydkonzentrationen versetzt. Die Zellen wurden mit der Mischung 20 h bei 37 °C inkubiert.

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. 1 ml Ham's-Medium für weitere 5-7 Tage kultiviert, bis die Zellen in den Kontrolllöchern der Platte nahezu konfluent gewachsen waren. Das Wachstum wurde durch Zugabe von

25 %-iger Trichloressigsäure und einer 30 minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C gestoppt. Die Lösung wurde von den Platten entfernt und diese mit Aqua dest. mehrmals gewaschen. Die überlebenden Zellen, bzw. der zelluläre Proteingehalt, wurden durch 30-minütige Inkubation mit jeweils 100 µl Sulforhodamin B bei Raumtemperatur angefärbt. Die Lösung wurde von den Platten genommen, welche mehrmals gründlich mit einer 1 %-igen Schwefelsäure gewaschen wurden, um alle Reste des Sulforhodamin B zu entfernen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 12 h getrocknet. Über die optische Dichte bei 570 nm im ELISA-Reader wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen ermittelt. Die Kontrolle wurde als 100 % gesetzt, von der auf die Überlebensrate der anderen Zellen rückgeschlossen werden konnte.

Sulforhodamin B-Lösung: 0,4 % Sulforhodamin B
In 1 % Essigsäure

25 % TCA-Lösung: 25 % Trichloressigsäure
In 100 ml Aqua dest.

1 % Schwefelsäure: 1 % Schwefelsäure, konz.
In 100 ml Aqua dest.

2.3.16. Nachweis von grün-fluoreszierendem Protein (GFP)

Das verwendete GFP emittierte bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm ein Licht der Wellenlänge von 506 nm.

RAAV-2/C-GFP-transduzierte Keratinozyten konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einem Filter von 525 nm als grün-leuchtende Zelle identifiziert und fotografiert werden.

Zur Detektion von GFP in kultivierten Hautäquivalenten wurden keine paraffin-fixierten Schnitte hergestellt, da das verwendete Paraffin eine Eigenfluoreszenz hatte. Es wurden 4 µM dicke Cryostatschnitte angefertigt, die nach dem Schneiden direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung des Expressionsplasmids pTR-UF/C-FALDH

3.1.1. Klonierung von pTR-UF/C

Das Plasmid pTR-UF ist die Weiterentwicklung von psub 201 als transgentragendes Verpackungsplasmid. Dieses enthält als einzige ursprüngliche virale Sequenzen des AAV-2-Wildtyps die ITRs, die für die Virusherstellung notwendig sind. Zwischen die ITRs, die in *cis* notwendigen Sequenzabschnitten angeordnet sein müssen, kann jede eukaryontische Expressionskassette eingebaut werden. Um eine effiziente Verpackung zu gewährleisten, dürfen die ITRs zusammen mit der eingebauten Expressionskassette eine Länge von 4680 bp nicht überschreiten [Dong et al., 1996]. Die ITRs besitzen mit ihren angrenzenden Klonierungssequenzen eine Größe von 145 Basenpaaren. Folglich sollte die eingebaute Expressionskassette nicht länger als 4340 bp sein. Die Expressionskassette (C) des Expressionsplasmids pCEP4 enthielt einen Cytomegalovirus immediate-early Promoter (CMV-P), ein SV40 Polyadenylierungssignal (SV40 Poly A) mit einer dazwischenliegenden multiplen Klonierungsstelle (MKS). Diese Expressionskassette wurde zwischen die ITRs von pTR-UF kloniert. pCEP4 wurde mit *SalI* geschnitten, wodurch ein 1308 bp großes Fragmentstück mit der Expressionskassette C freigesetzt wurde. pTR-UF wurde mit *KpnI* und *BamHI* geschnitten, so dass folgende Fragmente erhalten wurden: 78 bp, 208 bp, 605 bp, 644 bp, 1291 bp und 3427 bp. Das 3427 bp Fragmentstück enthielt beide ITRs, welche für die Virusherstellung obligat sind. Beiden Fragmenten wurde ein Nukleotidgemisch zugesetzt, um die Enden zu glätten. Das längere Fragment wurde vor der Ligation dephosphoryliert. Der Einbau des CEP4-Fragmentes konnte in 2 Orientierungen erfolgen. Die Leserichtung wurde so gewählt, dass der CMV-Promoter zur *KpnI*- und das Polyadenylierungssignal zur *BamHI*-Schnittstelle gerichtet war. Der klonierte Vektor ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. In die MKS könnten Transgene bis zu einer Größe von 3032 bp eingebaut werden.

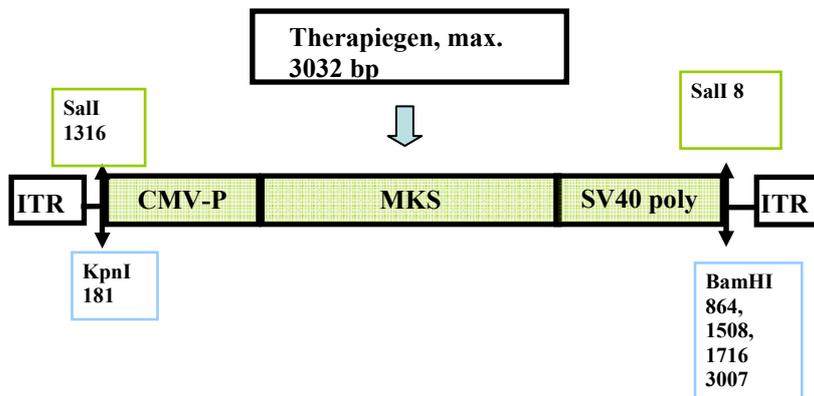


Abb. 3.1: Schematische Darstellung von pTR-UF/C

Der Backbone des pTR-UF/C-Plasmids enthält als einzige virale Ursprungssequenz die ITRs, welche die Expressionskassette des pCEP4 (grün markiert) mit CMV-Promoter, MKS und SV40 Poly A Seite von beiden Seiten umschließen. In die MKS kann ein Therapiegen mit maximal 3032 bp kloniert werden.

Die verschiedenen Ligationsansätze wurden in kompetente Bakterien transformiert und ausplattiert. Es wurden 20 Klone gepickt, hochgeschüttelt und aufgereinigt. Die Klone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen auf Anwesenheit der Expressionskassette C geprüft. Von 20 ausgewählten Klonen enthielten 3 Klone das gewünschte Fragment. Diese wurden mit jeweils 8 unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelt um die gewünschte Orientierung des Inserts in dem Backbone festzustellen. Die gefundenen Klone 1 und 6, dargestellt in Abb. 3.2 stimmten in denen für sie berechneten Fragmentmustern überein und enthielten das CEP4 Fragment in richtiger Richtung. Klon 6 wurde zur Klonierung von pTR-UF/C-FALDH weiterverwendet. Klon 4 enthielt das CEP4-Fragment, jedoch in der falschen Orientierung.

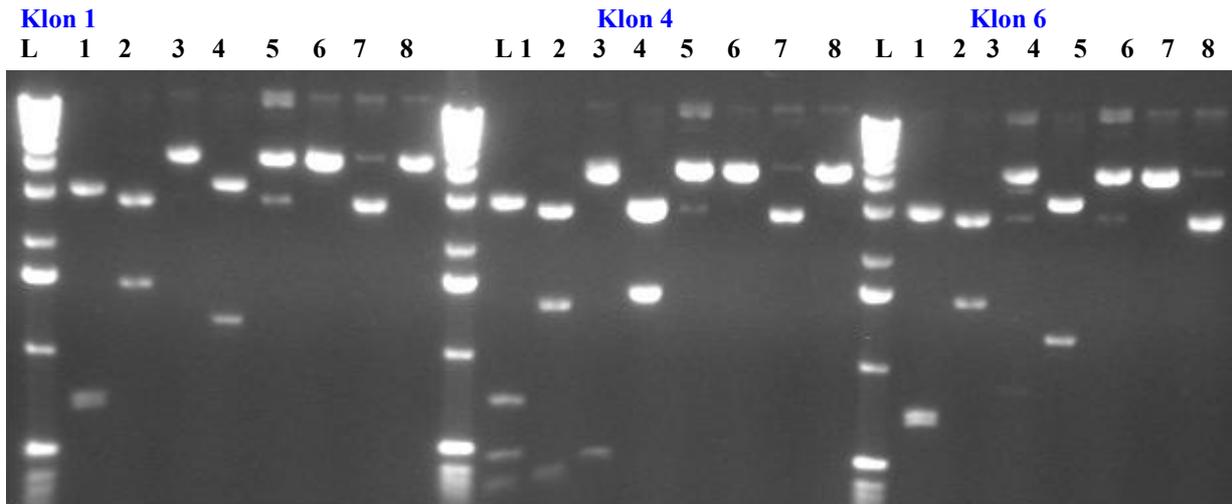


Abb. 3.2: Restriktionsanalyse der gefundenen Klone aus der pTR-UF/C-Klonierung

Aus ursprünglich 20 Ligationsklonen wurden Klon 1, 4 und 6 ausgewählt. Diese wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, um die richtige Orientierung des Inserts zu prüfen. Hierbei zeigten Klon 1 und 6 bei dem *BglII*-Verdau in den ersten Reihen (1) charakteristische Banden bei 3167, 753, 710 und 105. Bei Klon 4 lag das Insert in der falschen Orientierung, wodurch sich ein verändertes Bandenmuster ergab. Diese lagen bei 3167, 753, 428 und 331.

In den Reihen 2 wurden die Klone mit *PstI* verdaut, wobei sich bei den Klonen 1 und 6 ein Bandenmuster bei 2830, 1667 und 230 zeigte.

Klon 4 zeigte mit dem *PstI* Verdau veränderte Banden, die bei 2830, 1432 und 4732 lagen.

In den Reihen 3 wurden die Klone mit *NdeI* geschnitten, wobei sich bei Klon 1 und 6 Bandenmuster bei 3583 und 1162 ergaben.

Klon 4 zeigte bei dem *NdeI* Restriktionsverdau in Reihe 3 Banden bei 3192 und 1508.

Die Restriktionen mit *NaeI*, *XhoI* und *NotI* ergaben keine Bandenmuster, da sich die Plasmide linearisierten (Reihen 4, 5 und 6).

Klon 1 und 6 enthielten das CEP4-Insert in richtiger Orientierung.

3.1.2. Klonierung von pTR-UF/C-FALDH

Zur Klonierung von pTR-UF/C-FALDH wurde das *NotI-NheI* Fragment aus pCIneo-FALDH in die *NotI-NheI* Schnittstelle der MKS von pTR-UF/C (Klon 6) richtungsorientiert einkloniert. Das fertige Plasmid wurde in Abb. 3.3 schematisch dargestellt.

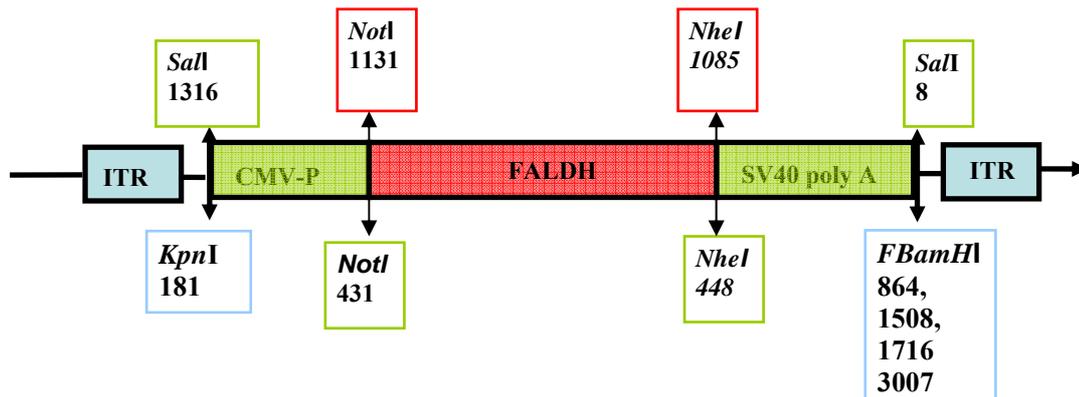


Abb. 3.3: Schematische Darstellung von pTR-UF/C-FALDH

Grün markiert sind die Teile von pCEP4, in dessen MKS das Therapiegen FALDH (rot markiert) kloniert wurde. Die gesamte Expressionskassette wird von den ITRs, die Teile des Backbones des Plasmids sind, links und rechts (blau markiert) eingerahmt.

Aus verschiedenen Ligationsansätzen wurden 20 Klone gewählt und hochgeschüttelt. Die Klone wurden mit *NotI/NheI* geschnitten um auf die Anwesenheit des gewünschten FALDH-Inserts zu prüfen.

Die Klone in Reihe 4 und 12 zeigten bei dem Versau das charakteristische Bandenmuster mit einem Fragment bei 1500 bp. Diese Klone wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

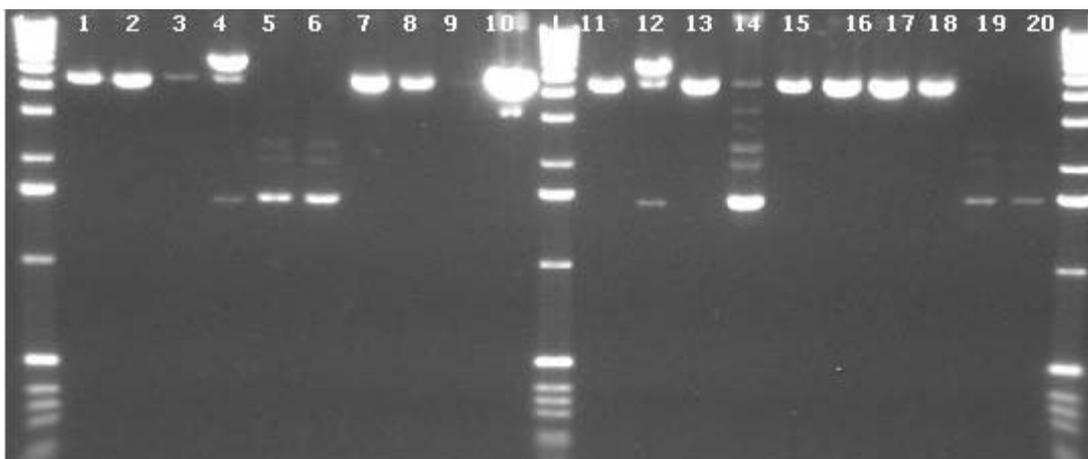


Abb. 3.4: Insertkontrolle von pTR-UF/C-FALDH

20 gepickte Ligationsklone wurden mit *NotI-NheI* geschnitten. Aus Klon 4 und Klon 12, Reihe 4 und 12, löste sich ein ca.1500 bp Fragmentstück heraus, das dem FALDH Fragment entspricht.

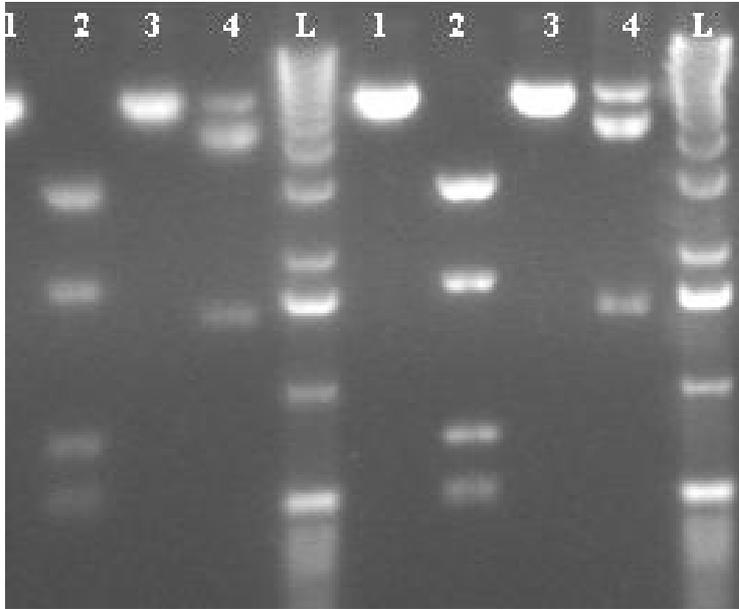


Abb. 3.5: Kontrolle der Insert-Leserichtung von Klon 4 und 12

Die gefundenen Klone 4 und 12 wurden mit 4 weiteren Restriktionsenzymen jeweils in den Reihen 1-4 auf Anwesenheit des FALDH-Inserts untersucht.

In den zweiten Reihen wurden die Klone jeweils mit *BglII* geschnitten, woraus sich charakteristische Bandenmuster bei 863 bp, 2367 bp und 3000 bp ergaben.

In den Reihen drei wurden die Klone mit *NheI* und *NotI* geschnitten, wobei sich hierbei keine Bandenmuster ergaben, da die Plasmide zirkuliert vorlagen.

In der vierten Reihe wurden die Plasmide mit *NotI* und *XbaI* geschnitten, wobei sich Fragmentmuster bei 1477 bp und 4700 bp ergaben.

3.2. Virusverpackung und Charakterisierung von rAAV-2-Lysaten

Um eine gute Virusausbeute zu erzielen, musste sich die 293-Verpackungszelllinie in einer optimalen Wachstumsphase befinden. Die verwendete DNA musste Endotoxin-frei sein. Die Zellen mussten sich zum Zeitpunkt der Transduktion mit größtmöglicher Verteilungsdichte auf den Platten befinden. Der pH-Wert des Calcium-Phosphat-Gemisches für die Dreifachtransduktion musste für eine erfolgreiche Transduktion auf einen bestimmten pH-Wert eingesellt sein, der eingehalten werden mußte. 24 h nach Transduktion (n.T) sollten 40 % (Abb.:3.6) und 48 h n.T 80 % der Zellen bei annähernd 100 % Konfluenz mit dem Transgen transfiziert sein.

Falls diese Werte nicht erhalten wurden, wurde mit der Aufreinigung des fertigen Virus nicht begonnen und die transfizierten Zellen wurden verworfen und der Versuch wiederholt

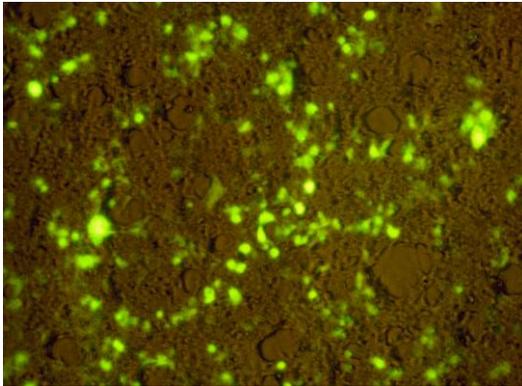
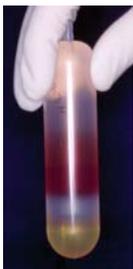


Abb. 3.6: Calciumphosphat Trippeltransduktion mit GFP als Transgen, pRC und pXX6-80

24 Stunden nach Transfektion erreichten pAAV/C-GFP-Transfektanten Transfektionseffizienzen zwischen 40-50 %.

Beim Abnehmen der 40 % Bande, die den Virus enthielt, war darauf zu achten, dass die Ausbeute möglichst groß war und dass es zu keiner Kontamination durch die benachbarten Banden kam. Abbildung 3.6 zeigt einen hergestellten Gradienten mit unterschiedlichen Phasen. Das abgezogene reine Viruslysate wurde vorsichtig auf dem Vortexer gemischt um eine möglich gleichmäßige Verteilung des Virus in der Flüssigkeit zu erreichen.

Um ein häufiges Auf- und Abtauen, welches die Virusqualität verschlechtert, zu verhindern, wurde das Lysat zu 200 µl, später zu 100 µl aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Für die Verpackung und Herstellung der Viruspartikel musste ein Zeitraum von 10 Tagen eingerechnet werden. Insgesamt wurden 4 rAAV-2/C-FALDH- und 5 rAAV-2/C-GFP-Stocks hergestellt.



40 %-Phase mit Viruspartikeln

Abb. 3.7: Frisch hergestellter Iodixanolgradient mit unterschiedlich gefärbten Phasen

3.2.1. Charakterisierung von rAAV-2-Lysaten

Infektiöse rAAV-2 Partikel wurden nach der Herstellung charakterisiert, indem der physikalische Titer bestimmt wurde. Insgesamt wurden 4 unterschiedliche Verpackungen für rAAV/C-FALDH und 5 für rAAV/C-GFP untersucht.

3.2.1.1. Bestimmung des genomischen rAAV-2 Titers

Die Anzahl physikalischer rAAV-2 Partikel wurde mittels Dot-Blot-Verfahren ermittelt. Zum Nachweis von rAAV-2 Genomen wurde ein Fragment aus dem Transgen verwendet. Als Sonde zum Nachweis der rAAV-2/C-FALDH-Genome wurde das *NotI/NheI* Fragment mit einer Größe von 1477 bp verwendet. Als Positivkontrollen wurden nicht markierte Sondenfragmente für pTR-UF/C-FALDH und für pTR-UF/C-GFP verwendet. Als Negativkontrollen wurde ein Plasmid mit einem fremden Insert pTR-UF/C-LEKTI verwendet. Alle Kontrollen wurden in einer Konzentration von 1×10^8 doppelsträngigen Fragmenten/ μl eingesetzt. In Abb. 3.8 (A) sind die physikalischen Titer eines repräsentativen Experiments mit 5 voneinander unabhängig hergestellten rAAV-2/C-GFP-Lysaten und in Abb. 3.8 (B) sind die physikalischen Titer eines repräsentativen Experiments mit 4 voneinander unabhängig hergestellten rAAV-2/C-FALDH-Lysaten abgebildet.

Der infektiöse Titer wurde nicht bestimmt, da kein Markergen in dem FALDH-Konstrukt vorhanden war.

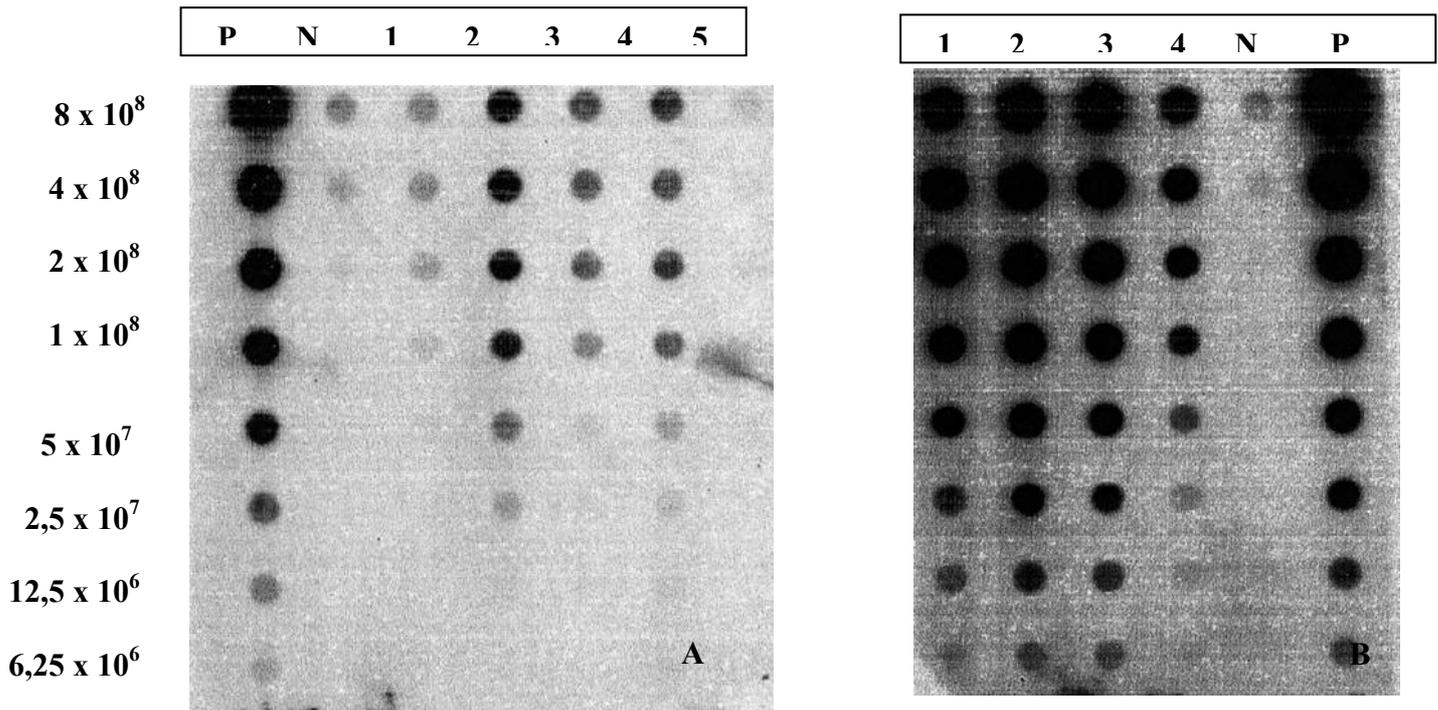


Abb. 3.8: Physikalische Titerbestimmung von rAAV-2/C-GFP und rAAV-2/C-FALDH mittels Dot-Blot-Analysen

Dot-Blot Analysen von 4 hergestellten rAAV-2/C-FALDH-(B) und 5 rAAV-2/C-GFP-(A) Verpackungen. Das Ergebnis wurde jeweils im Verhältnis zu dem Standard P verglichen. In den ersten Reihen wurde eine Konzentration von 8×10^8 einzelsträngiger Sondenfragmente aufgetragen, die in Folge einer 1:2 Verdünnungsreihe nach unten abnahm. Als Negativkontrolle (N) wurden pTR-UF/C-LEKTI Sondenfragmente in gleicher Anzahl verwendet, bei denen kein Signal zu erkennen war. In den Reihen 1, 2, 3 und 4 sind die Verdünnungsreihen der jeweiligen rAAV-2/C-GFP- (A) und rAAV-2/C-FALDH-Verpackungen (B) zu sehen.

Die resultierenden Ergebnisse der Dot-Blots sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Reihe	1	2	3	4
rAAV-2/C-FALDH	5×10^{11}	$6,4 \times 10^{11}$	$6,4 \times 10^{11}$	8×10^{10}
rAAV-2/C-GFP	4×10^4	$3,2 \times 10^{11}$	8×10^{10}	5×10^9

Tab.: 3.1 Physikalische Titer von rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP

3.3. Rekonstitution des FALDH-Defekts im CHO-Zellsystem

3.3.1. FALDH-Aktivität gesunder CHO- und defekter FAA.K1-Zellen

FALDH-Aktivitäten gesunder CHO- und defekter FAA.K1-Zellen wurden fluorometrisch aus deren Zellhomogenaten bestimmt.

Gesunde CHO-Zellen erreichten über den gemessenen Zeitraum von 40 min einen linearen Anstieg der FALDH-Aktivität, welche 100 % entsprach. FAA.K1-Zellen erreichten im Vergleich zu gesunden CHO-Zellen 10 % der Aktivität.

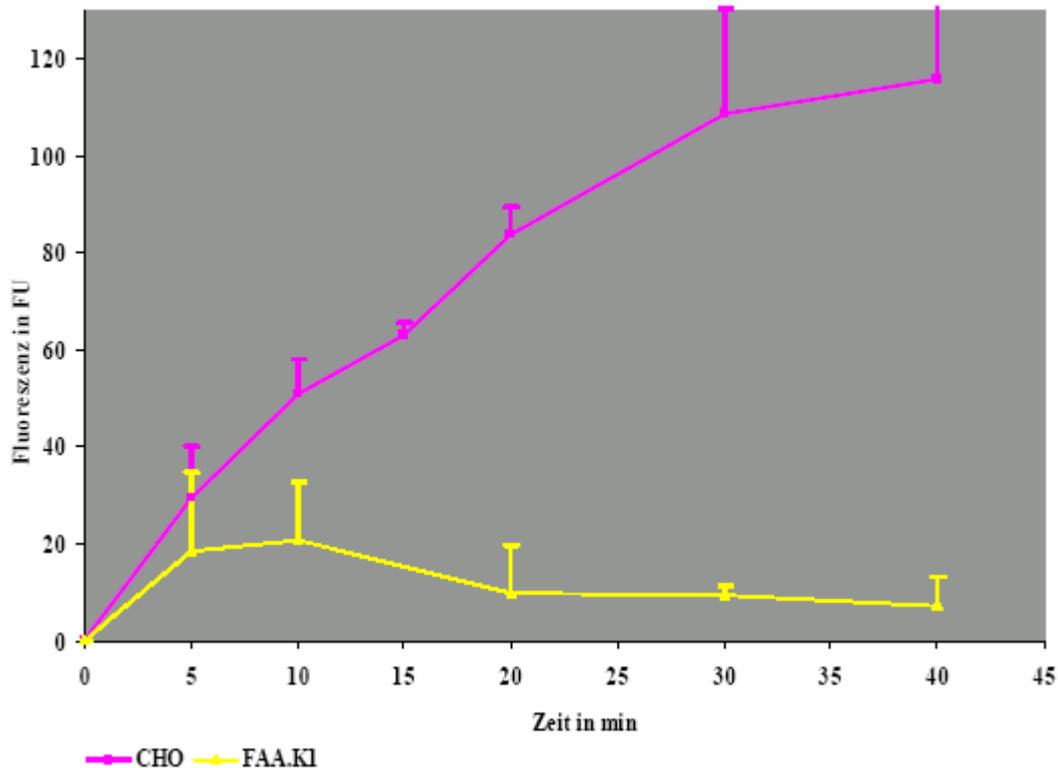


Abb. 3.9: FALDH-Aktivität gesunder CHO- und mutanter FAA.K1-Zellen

Aus 2-3 voneinander unabhängigen FALDH-Aktivitätsbestimmungen wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. CHO-Zellen (rosa) zeigten einen fast linearen Anstieg der FALDH-Aktivität im Zeitraum von 40 min, die mutanten FAA.K1-Zellen erreichten eine Aktivität von etwa 10 % im Vergleich zu derjenigen gesunder CHO-Zellen.

3.3.2. rAAV-2 Gentransfer in CHO- und FAA.K1-Zellen

3.3.3. Transduktion FALDH-defekter FAA.K1-Zellen mit rAAV-2/C-GFP

Inwieweit defekte FAA.K1-Zellen permissiv für Transduktionen mit rAAV-2 Vektoren sind wurden durch Transduktion mit je 50 μ l rAAV/C-GFP-Partikeln geprüft.

GFP-transfizierte Zellen zeigten 24 h nach Transduktion starke Fluoreszenzen, die bis zum siebten Tag zunahmten. In Abb. 3.10 A und B sind Fluoreszenzen der GFP-Transfektanten sieben Tage nach Transduktion abgebildet.

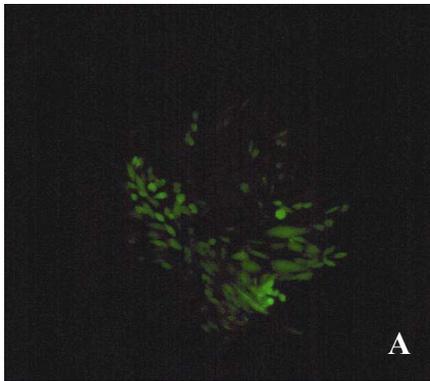


Abb. 3.10: rAAV-2 Transduktion von FAA.K1-Zellen

Defekte FAA.K1-Zellen wurden mit 50 μ l rAAV-2/C-GFP transduziert und für 7 Tage kultiviert. GFP-Expressionen nahmen bis zum siebten Tag zu. 100-fache Vergrößerung der GFP-expression in (A) und 200-fache Vergrößerung in (B).

3.3.4. Rekonstitution defekter FAA.K1-Zellen durch Transduktion mit rAAV-2/C-FALDH

In 6 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten wurden 4×10^5 defekte FAA.K1-Zellen pro Ansatz je Loch einer 6-Loch-Platte mit 50 μ l rAAV-2/C-FALDH und 50 μ l rAAV-2/C-GFP transduziert. Als Negativkontrolle wurden defekte nicht transduzierte FAA.K1-Zellen und als Positivkontrolle nicht transduzierte CHO-Zellen mit der gleichen Zellzahl kultiviert.

4, 7, 11 und 21 Tage nach Transduktion wurden FALDH-Aktivitäten von FALDH-, GFP-Transfektanten und den nicht transduzierten CHO- FAA.K1-Zellen bestimmt.

Wie in Abb.3.11 dargestellt, zeigten alle rAAV-2/C-FALDH-Transfektanten eine FALDH-Aktivität von mindestens 100 % im Vergleich zu FALDH-intakten CHO-Zellen. 7 und 21 Tage nach Transduktion erreichten FALDH-Transfektanten FALDH-Aktivitäten, die über

derjenigen der CHO-Zellen lagen. Aktivitäten der rAAV-2/C-GFP-transduzierter Zellen und der unbehandelten FAA.K1-Zellen lagen unter 10 % im Vergleich zu denjenigen gesunden CHO-Zellen.

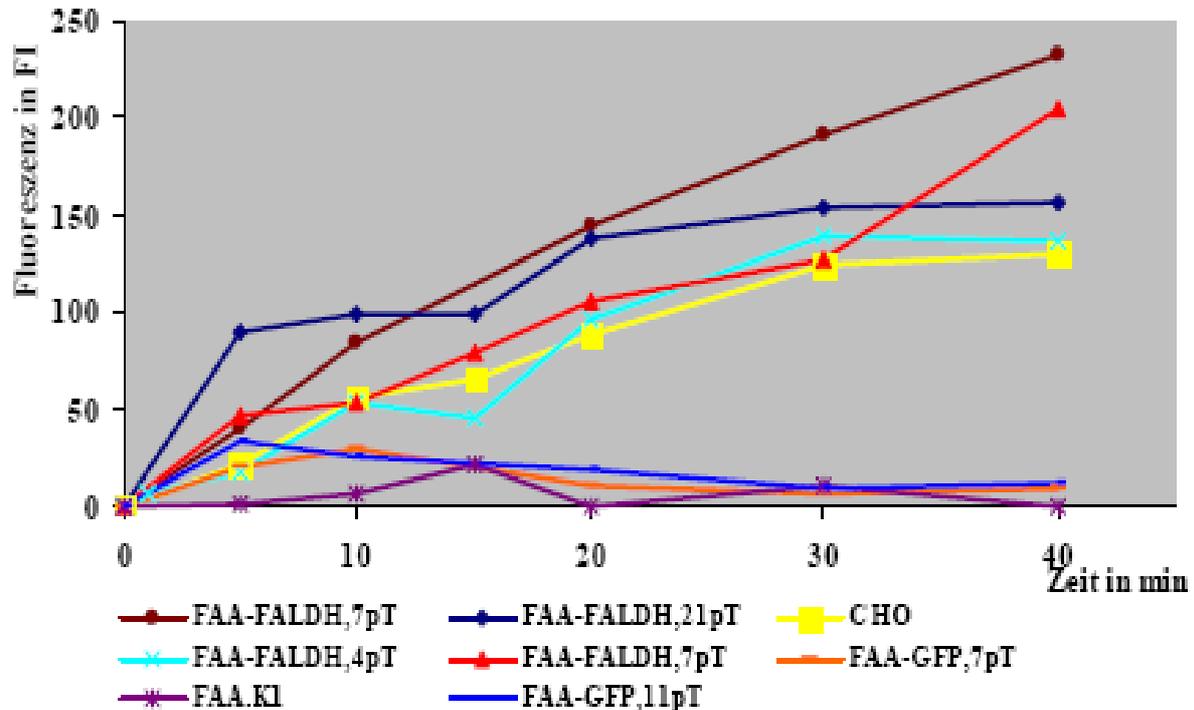


Abb. 3.11: FALDH-Aktivitäten gesunder CHO-, FALDH-, GFP-transfizierter FAA.K1- und unbehandelter FAA.K1-Zellen

Defekte FAA.K1-Zellen wurden mit jeweils 50 μ l rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP transduziert und für 4, 7, 11 und 21 Tage kultiviert bevor FALDH-Aktivitäten gesunder CHO-, der Transfektanten und defekter FAA.K1-Zellen gemessen wurden.

CHO-Zellen besaßen 100 % FALDH-Aktivität (gelb), wohingegen unbehandelte FAA.K1-Zellen im Vergleich unter 10 % (violett) erreichten. FALDH-Transfektanten erreichten 4 Tage nach Transduktion 100 % (türkis), 7 Tage nach Transduktion einen leichten Anstieg über 100 % (rot) und 11 (braun), bzw. 21 (blau) Tage nach Transduktion lagen die gemessenen FALDH-Aktivitäten deutlich über denjenigen der gesunden CHO-Zellen. GFP-Transfektanten erreichten 7 und 11 Tage nach Transduktion FALDH-Aktivitäten von 10 % (blau, orange). Die Messungen wurden über einen Zeitraum von 40 min aufgenommen.

3.3.5. Toxizität von Octadecanal auf defekte FAA.K1-Zellen

In einer 24-Loch-Platte wurden jeweils 1.500 CHO- und FAA.K1-Zellen pro Loch ausplatiert und für 24 h kultiviert, bevor sie für insgesamt 20 h mit C18-Fettaldehyd inkubiert wurden. In den oberen beiden Reihen wurden CHO-Zellen ausplatiert, in den unteren defekte FAA.K1-Zellen. Die Zellen wurden für weitere 5-6 Tage kultiviert, bis die Kontrolllöcher, die nicht mit Octadecanal inkubiert wurden, konfluent gewachsen waren.

Die Auswertung erfolgte über eine Coomassie-Blau-Färbung der überlebenden, adhärenen Zellen, die durch eine Blaufärbung auf den Platten visuell ausgewertet werden konnten. In dem Versuche zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 60 μM Octadecanal FALDH-defiziente Zellen starben. CHO-Zellen waren in der Lage bis zu einer Konzentration von 120 μM Octadecanal das zugeführte Aldehyd zu metabolisieren, ohne zytotoxische Effekte zu zeigen. Erst ab einer Konzentration von 180 μM wurden die toxischen Effekte durch eine reduzierte Zellzahl sichtbar.

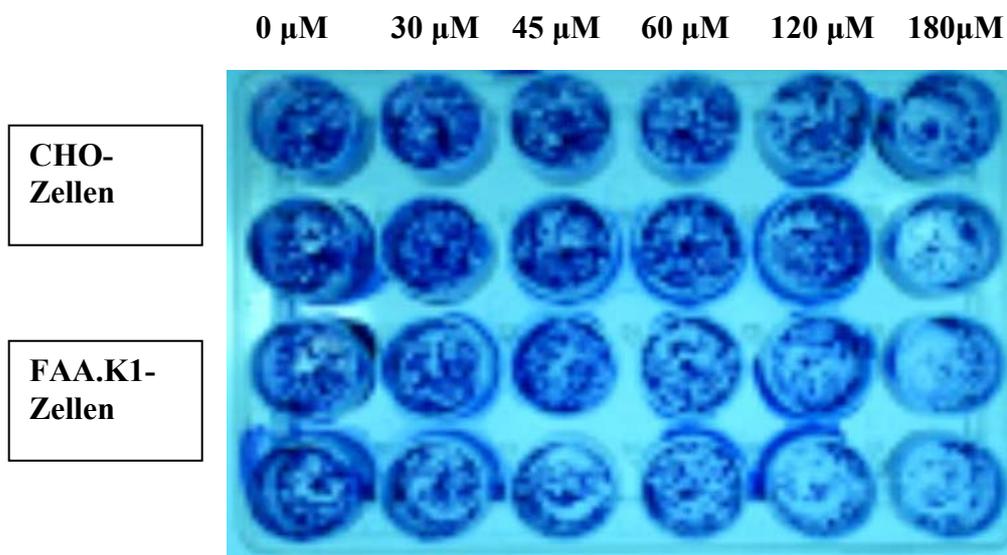


Abb. 3.12: Coomassie-Blau Färbung überlebender Zellen nach Inkubation mit Octadecanal

CHO- und FAA.K1-Zellen wurden nach dem Ausplattieren für 24 h kultiviert und anschließend für weitere 20 h mit zunehmenden Octadecanalkonzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend so lange weiterkultiviert, bis die Kontrolllöcher, die nicht mit Octadecanal inkubiert wurden konfluent gewachsen waren. Mittels einer Coomassie-Blau-Färbung konnten überlebende, vitale Zellen durch eine Blaufärbung auf der Platte visualisiert werden. Tote Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit einem Waschpuffer von der Platte gewaschen. Ab einer Konzentration von 60 μM Octadecanal starben FALDH-defiziente Zellen. CHO-Zellen waren in der Lage bis zu einer Konzentration von 120 μM

Octadecanal das zugeführte Aldehyd zu metabolisieren, ohne zytotoxische Effekte zu zeigen. Erst ab einer Konzentration von 180 μ M wurden die toxischen Effekte durch eine reduzierte Zellzahl sichtbar.

3.3.6. Überlebensvorteil rAAV-2/C-FALDH transfizierter FAA.K1-Zellen gegenüber nicht transfizierten FAA.K1-Zellen

Für diesen Versuch wurden 600 FAA.K1-Zellen in der ersten und zweiten Passage nach Transfektion mit rAAV-2/C-FALDH pro Loch einer 96-Loch-Platten ausplattiert und für 24-48 h kultiviert. Als Negativkontrollen wurden die gleichen Anzahlen an GFP-transduziert- FAA.K1-Zellen ausplattiert. Zusätzlich wurden CHO-Zellen und mutante FAA.K1-Zellen in gleicher Zellzahl ausgesät. Es wurden von jedem Ansatz jeweils Tripletansätze ausplattiert, wobei ein Tripletansatz nicht mit Octadecanal inkubiert wurde und als Kontrollansatz diente. Die restlichen Zellen wurden mit 60 μ M Octadecanal für 20 h inkubiert und anschließend in Ham's F12 Medium für 4-6 Tage weiterkultiviert, bis die Kontrolllöcher, die nicht mit Octadecanal inkubiert wurden, nahezu 100 % konfluent gewachsen waren. Um den prozentualen Anteil überlebender Zellen genauer zu erfassen, wurden Zellen mit Sulforhodamin B gefärbt und mittels ELISA Reader ausgewertet.

11 Tage nach Transduktion überlebten 82 % der FALDH-transfizierten FAA.K1-Zellen, 14 Tage nach Transduktion 70 % und 18 Tage nach Transduktion 71 %. Von den GFP-transduzierten Zellen überlebten im Durchschnitt 9 % und von den CHO-Zellen 96 %.

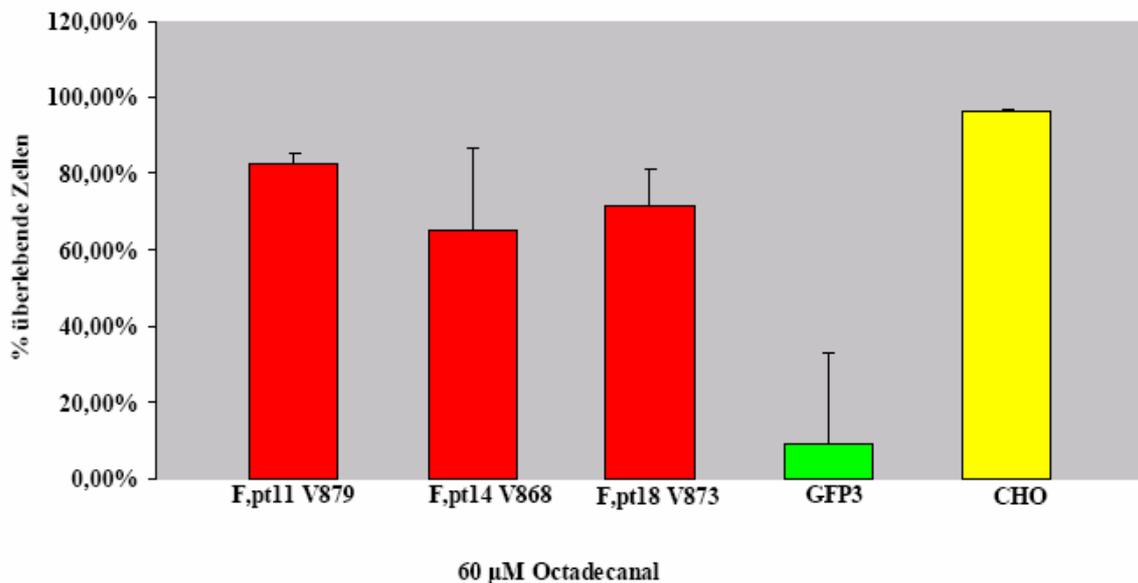


Abb. 3.13: Überlebensvorteil FALDH-transduzierter Zellen nach Inkubation mit 60 µM Octadecanal

Gesunde CHO-Zellen, FALDH-, GFP-Transfektanten und defekte FAA.K1-Zellen wurden 11, 14 und 18 Tage nach Transduktion mit 60 µM Octadecanal für 20 h inkubiert und anschließend so lange kultiviert bis die jeweiligen Kontrollzellen, die nicht mit Octadecanal inkubiert wurden, 100% konfluent gewachsen waren. 11 Tage nach Transduktion überlebten 82 % der FALDH-transfuzierten Zellen, 14 Tage nach Transduktion 70 % und 18 Tage nach Transduktion 71 %. Von den GFP-transfuzierten Zellen überlebten im Durchschnitt 9 % und von den CHO-Zellen 96 %. Ein Überlebensvorteil rAAV-2/C-FALDH-transduzierter FAA.K1-Zellen konnte im Vergleich zu unbehandelten Zellen und zu GFP-transduzierten FAA.K1-Zellen dargestellt werden.

3.4. Isolierung und Kultivierung von SLS-Keratinocyten

3.4.1. Etablierung der Keratinocytenkultivierung aus der äußeren Haarwurzelscheide (ORS)

Da die Kultivierung von Keratinocyten aus der Haut mit einem operativen Eingriff verbunden ist, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diesen Eingriff bei SLS-Patienten zu umgehen. Eine Möglichkeit stellte die Isolation von Keratinocyten aus der äußeren Haarwurzelscheide dar, die anschließend in der Kulturschale expandiert werden. In ersten Vorversuchen wurden Haare mittels Epilation von der Kopfhaut gesunder Spender entfernt, um die Methode zu etablieren.

Für die Kultivierung von Keratinocyten wurden 2 unterschiedliche Methoden versucht.

Bei der ersten Methode wurden die Haarschäfte vom restlichen Haar entfernt. Die Haarschäfte wurden direkt auf Feederzellen gelegt, um ein Auswachsen der Zellen aus der äußeren Haarwurzelscheide zu ermöglichen.

In der zweiten Methode wurden frisch epilierte Haare vom Haarschaft getrennt, welcher in einer Trypsin/EDTA-Lösung für 20-30 min inkubiert wurde, wodurch sich einzelne Zellen aus dem Gewebe der Haarwurzelscheide lösen konnten. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese mit und ohne Feederzellen kultiviert.

Bei der ersten Methode gelang es nicht einzelne Keratinozyten in Kultur zu bringen.

Die zweite Methode führte erfolgreich zum Anheften von Keratinozyten mit und ohne Feederzellen. Mit dieser Technik konnten von 5 unterschiedlichen Spendern sowohl vom Kopf, als auch von den Beinhaaren Keratinozyten isoliert und expandiert werden.

In Abbildung 3.14 ist ein auf Feederzellen kultivierter Keratinozytenklon dargestellt.

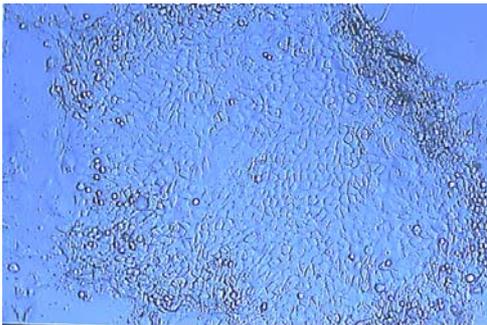


Abb. 3.14: Aus der äußeren Haarwurzelscheide kultivierter Keratinozytenklon

Haarschäfte wurden von frisch epilierten Haaren abgetrennt und in einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Aus den äußeren Haarwurzelscheiden herausgelöste Keratinozyten wurden auf Feederzellen für 21 Tage kultiviert, bis das Wachstum einiger Keratinozytenklone zwischen Feederzellen eintrat. Um eine Keratinozytenreinkultur zu erhalten, wurden die Feederzellen anschließend durch mehrmaliges Abspritzen mit PBS-Puffer von den Keratinozyten getrennt.

3.4.2. Etablierung der SLS-Keratinozytenkultivierung aus der äußeren Haarwurzelscheide

Nachdem die Kultivierung von Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide bei gesunden Spendern etabliert werden konnte, wurden von zwei nicht verwandten SLS-Patienten (A und B) in mehreren unabhängigen Versuchen Haare in unterschiedlichen Mengen durch Epilation genommen.

Zusätzlich wurden von einer heterozygoten Trägerin in einem Versuch Haare epiliiert.

Von Patientin A wurden in vier unterschiedlichen Versuchen bis zu 100 Haare epiliiert. Auffällig war, dass ein großer Teil der epiliierten Haare von keiner Haarscheide umgeben war. Deshalb wurde die Kopfhaut der Patientin bei dem letzten Epilationsversuch 12 h zuvor mit einer 5 %-igen harnstoffhaltigen DAC-Basiscreme eingerieben, um die Hornschicht etwas abzulösen.

Patient B wurden in 2 voneinander unterschiedlichen Versuchen mit einer Haarzange, ohne Vorbehandlung der Kopfhaut, jeweils Haarbüschel mit 100 Haaren gezogen.

Auffällig war, dass auch bei Patient B nicht ausreichend viele Haare in der Anagenphase vorhanden waren. Die Haarschäfte wurden von dem übrigen Haar entfernt und diese wurden wie beschrieben behandelt.

Von Patientin A gelang es nur in einem von vier Versuchen Keratinozyten zu isolieren, aus denen ein Keratinozytenklon wuchs. Auch die Behandlung mit harnstoffhaltiger Creme brachte keine Besserung. Nach Passagieren der Zellen konnten die Keratinozyten nicht weiter kultiviert werden, da es zu einem Proliferationsstopp der Zellen kam.

Von Patient B gelang es in keinem von zwei Experimenten, Keratinozyten zu kultivieren.

Keratinozyten der heterozygoten Trägerin ließen sich gut kultivieren und es konnten Keratinozyten in der 2-ten Passage im flüssigen Stickstoff, bis zur weiteren Verwendung, eingefroren werden. Bei Inkulturnahme nach Stickstoffkonservierung ließen sich die Keratinozyten jedoch nach weiterem Passagieren nicht weiter kultivieren, da es auch hier zu einem Proliferationsstopp der Zellen kam. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich zu wenige entnommene Haare in der Anagenphase befanden.

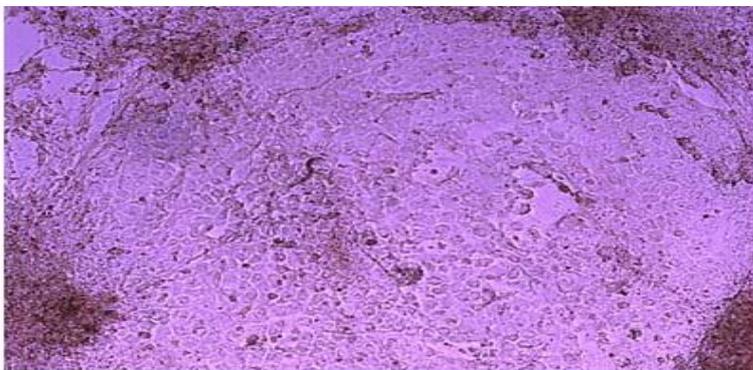


Abb. 3.15: Aus der äußeren Haarwurzelscheide kultivierter SLS-Keratinozytenklon

Nach 21 Tagen Kultivierung auf Feederzellen konnte das Wachstum des Keratinozytenklons zwischen Feederzellen beobachtet werden.

3.4.3. Etablierung der SLS-Keratinozyten-Isolierung aus Hautproben

Nachdem die Isolierung von Keratinozyten aus der äußeren Haarwurzelscheide von SLS-Patienten nicht gelungen war, wurden Ø6 mm Hautproben mittels Stanzzylinder von beiden Patienten entnommen und isoliert.

Es wurde für die Isolierung der Keratinozyten das Protokoll von gesunden Keratinozyten verwendet, da keine Erfahrung in der Isolation defekter SLS-Keratinozyten aus der Epidermis vorlag. Zudem war nicht bekannt, wie sich die Zellen bezüglich des Wachstums und der Differenzierung verhalten würden. Die Isolation der Keratinozyten vom Rücken der Patientin A verlief unproblematisch. Ein Teil der Keratinozyten wurde auf Feederzellen platiert, der andere Teil wurde in normalen 6-cm Gewebekulturschalen kultiviert. Nach der ersten Passage wurden die Zellen auf einer 10-cm Kulturschale expandiert. In der zweiten Passage wurde der Großteil der Zellen für nachfolgende Experimente eingefroren, die restlichen Zellen wurden nach der dritten Passage in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Es waren weder morphologische Unterschiede zu gesunden Keratinozyten erkennbar, noch zeigten sie eine auffällige Wachstumsrate.

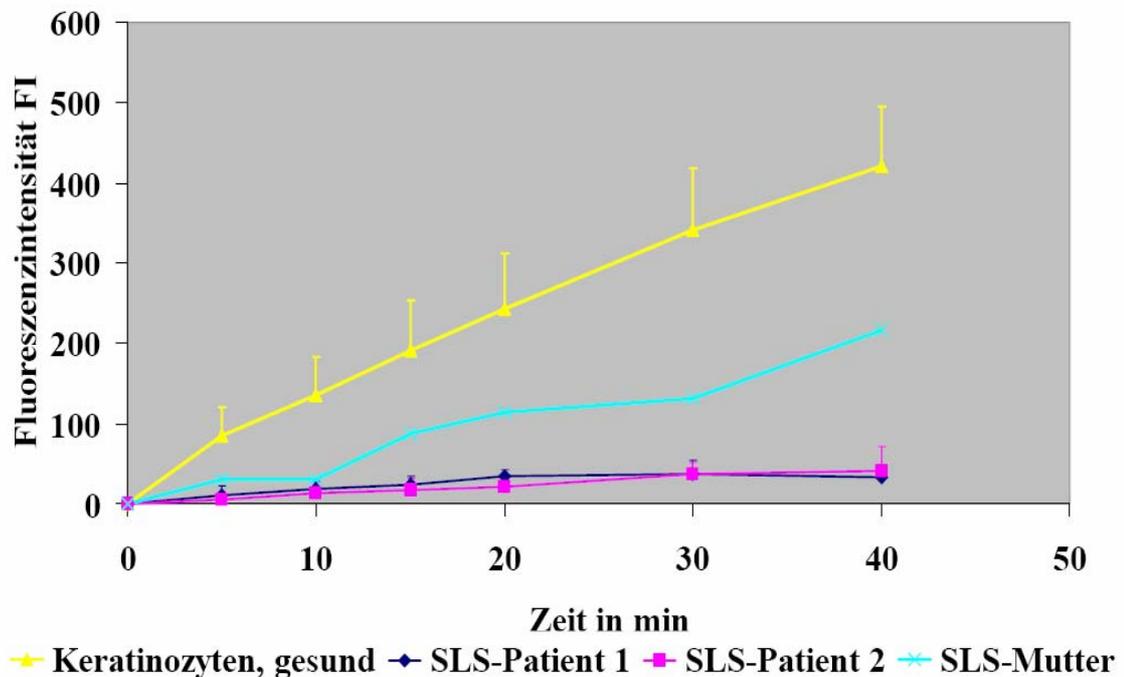
Die Isolierung von Keratinozyten aus dem stark verhornten Hautstück des Bauches von Patient B verlief problematisch und es konnten weniger Keratinozyten als bei Patientin A kultiviert werden.

3.5. *In-vitro* Rekonstitution des FALDH-Defektes in SLS-Keratinozyten

3.5.1. FALDH-Aktivität von gesunden-, heterozygoten und SLS-Keratinozyten

FALDH-Aktivitäten aus SLS (Spender A und B)-, heterozygoten- und von gesunden Keratinozyten wurden fluorometrisch bestimmt. Hierfür wurden FALDH-Aktivitäten aus neun unterschiedlichen, gesunden Keratinozytenkulturen gemessen und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen gebildet.

SLS-Keratinozyten erreichten in dem dargestellten Zeitraum von 30 min FALDH-Aktivitäten von unter 10 % im Vergleich zu gesunder Keratinozyten. FALDH-Aktivitäten der heterozygoten Keratinozyten lagen zwischen 50 und 60 %, im Vergleich zu gesunden Keratinozyten.



3.16: FALDH-Aktivitäten von gesunden, heterozygoten- und SLS- Keratinozyten

Mittelwerte der FALDH-Aktivitäten von gesunden Keratinozyten (n=9, gelb) erreichten 100 %. Gemessene FALDH-Aktivitäten aus SLS-Keratinozyten von Spendern (A und B, braun) lagen unter 10 % und die aus heterozygoten Keratinozyten (türkis) lagen zwischen 50 % und 60 % im Vergleich zu den gesunden Keratinozyten (gelb).

3.5.2. Transduzierbarkeit defekter SLS-Zellen mit rAAV-2/C-GFP

Um eine eventuelle Defizienz der intrazellulären Prozessierung von AAV-2 in Patienteneratinozyten zu erkennen, wurden defekte SLS-Zellen in 24-Loch-Platten ausplattiert mit 100 µl rAAV-2/C-GFP-Vektoren transduziert. Eine Woche nach Transduktion zeigten nur einzelne Zellen GFP-Fluoreszenzen unter dem Mikroskop (Daten nicht gezeigt).

In folgenden Transduktionsansätzen wurden weitere SLS-Zellen transduziert, wobei ein Teil der Zellen 2 h vor Transduktion mit 100 mM AG1478, der andere Teil während der Transduktion mit 10 nM Mg132 behandelt wurden. In der ersten Passage nach Transduktion zeigten die Transfektanten, die mit MG132 behandelt wurden zunächst viele positiv-grün-

leuchtende Zellen. Dieser Effekt nahm aber drastisch in der zweiten und dritten Passage nach Transduktion ab (Abb. 3.17, B).

Mit AG1478 vorbehandelte Keratinozyten zeigten eine Zunahme grün-leuchtender Zellen 10-15 Tage nach Transduktion, die auch nach 34 Tagen nach noch anhielt (Abb. 3.17, A).

Bei beiden Transduktionsmethoden leuchteten unter dem Fluoreszenzlicht ein Großteil der Zellen grün, was bedeutet, dass SLS-Keratinozyten grundsätzlich permissiv für rAAV-2 Vektoren sind. und kein Prozessierungsdefekt vorliegt.

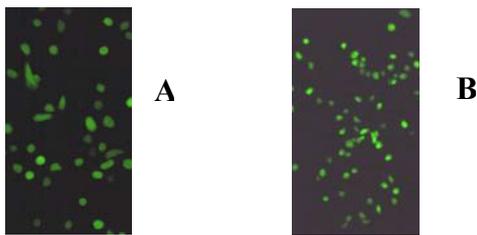


Abb. 3.17: rAAV-2/C-GFP transduzierte SLS-Zellen

Defekte SLS-Keratinozyten wurden mit 100 μ l rAAV-2/C-GFP transduziert, wobei ein Ansatz 2 h vor Transduktion mit 100 mM AG1478 (A), der andere während der Transduktion mit 10 nM MG1478 (B) behandelt wurde. Bis zu 34 Tage nach Transfektion zeigten GFP-Transfektanten, die zuvor mit AG1478 behandelt wurden grün-leuchtende transduzierte Zellen (A). GFP-Transfektanten, die zuvor mit MG132 behandelt wurden zeigten 9 Tage nach Transduktion viele positiv-leuchtende Zellen (B), wodurch gezeigt werden konnte, dass SLS-Keratinozyten prinzipiell für rAAV-2 Vektoren permissiv waren.

3.5.3. Rekonstitution des FALDH-Defektes in defekten SLS-Keratinozyten

3.5.3.1. Transduktion defekter SLS-Zellen mit rAAV-2/C-FALDH

7×10^4 SLS-Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausplattiert und für 2 Tage kultiviert, bevor sie jeweils mit 100 μ l rAAV-2/C-FALDH und 100 μ l rAAV-2/C-GFP transduziert wurden. Parallel wurden unbehandelte SLS-Zellen und gesunde Keratinozyten kultiviert. Die Zellen wurden nach Transduktion für 7 und 24 Tage weiterkultiviert.

Messungen der FALDH-Aktivitäten von rAAV-2/C-FALDH- und rAAV-2/C-GFP-transduzierten Zellen wurden 7 und 24 Tage nach Transduktion durchgeführt und lagen bei beiden FALDH-Transduktion unter 10 % im Vergleich zu derjenigen gesunder Keratinozyten. GFP-Transfektanten lagen im Vergleich unter 10 %.

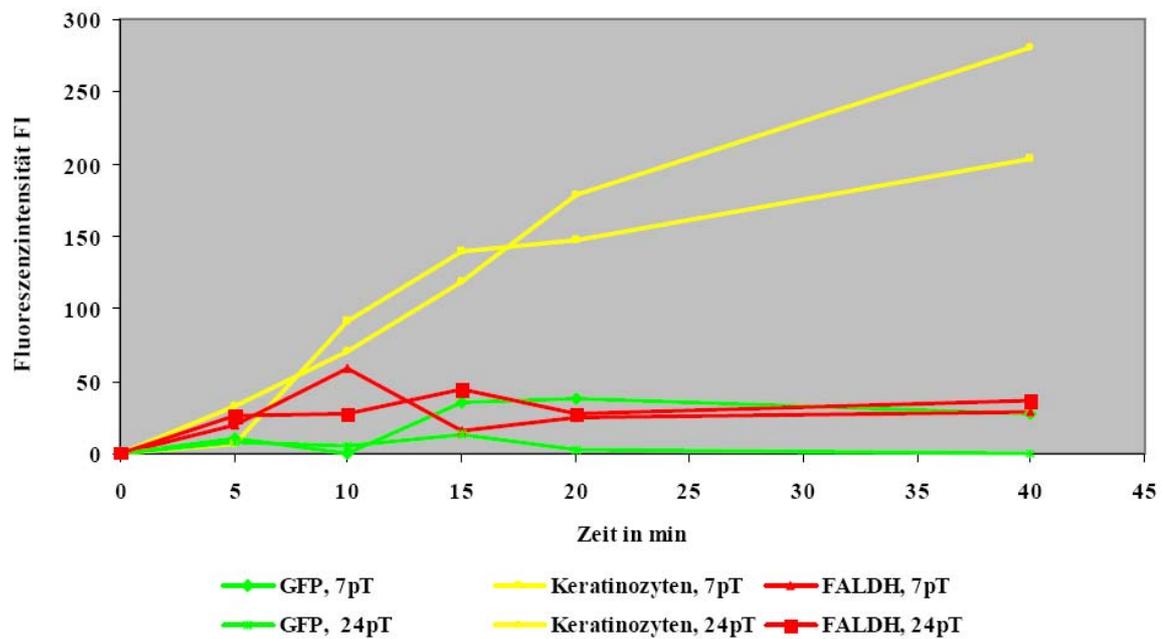


Abb. 3.18: FALDH-Aktivitäten von rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP-transduzierten SLS- Zellen.

Defekte SLS-Keratinozyten wurden in 2 Ansätzen jeweils mit 100 µl rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP transduziert und für 7 bzw. 24 Tage nach Transduktion kultiviert. Messungen der FALDH-Aktivitäten von FALDH-transduzierten Zellen 7 und 24 Tage nach Transduktion lagen jeweils bei 10 % (rot), GFP-transduzierten Zellen erreichten 7 und 24 Tage nach Transduktion Aktivitäten von unter 10 % (grün) im Vergleich zu derjeniger gesunder Zellen (gelb).

3.5.3.2. Steigerung der FALDH-Expression durch Mehrfachtransduktionen

Um den Anteil transduzierte Zellen zu erhöhen, wurden defekte SLS-Zellen insgesamt 2-3-mal mit der gleichen Virusmenge transduziert.

Für diesen Versuch wurden $4,5 \times 10^4$ Zellen in einer 24-Loch-Platte ausplattiert und nach 5-6 Tagen in zwei getrennten Transduktionsansätzen mit jeweils 50 µl rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP transduziert. Nach 12 h Inkubationszeit wurde ein Teil der Zellen auf eine 6-Loch-Platte gesplittet und der restliche Teil der Zellen wurde für eine zweite Transduktion, erneut in eine 24-Loch-Platte ausplattiert. Nach 5-6 Tagen wurden diese erneut mit jeweils 50 µl rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP Viruslysate für 12 h transduziert. Nach dem Zellsplit wurde ein Teil der Doppeltransduktion für eine dritte Transduktion auf eine 24-Loch-Platte ausplattiert und die restlichen Zellen der Doppeltransfektante wurden weiterkultiviert.

Nach 5-6 Tagen wurden die Doppeltransfektanten mit jeweils 50 µl Viruslösung transduziert und als Trippeltransfektanten kultiviert.

17 Tage nach Transduktion wurden alle Transfektanten geerntet und deren FALDH-Aktivitäten bestimmt. Die Doppel- und Trippeltransfektanten erreichten nach 30 Minuten eine FALDH-Aktivität von 33 % (rot) bzw 30 % (orange) im Vergleich zu gesunden Keratinozyten. Es konnte im Vergleich zu dem vorhergehenden Transduktionsversuch eine Steigerung der FALDH-Aktivität erzielt werden.

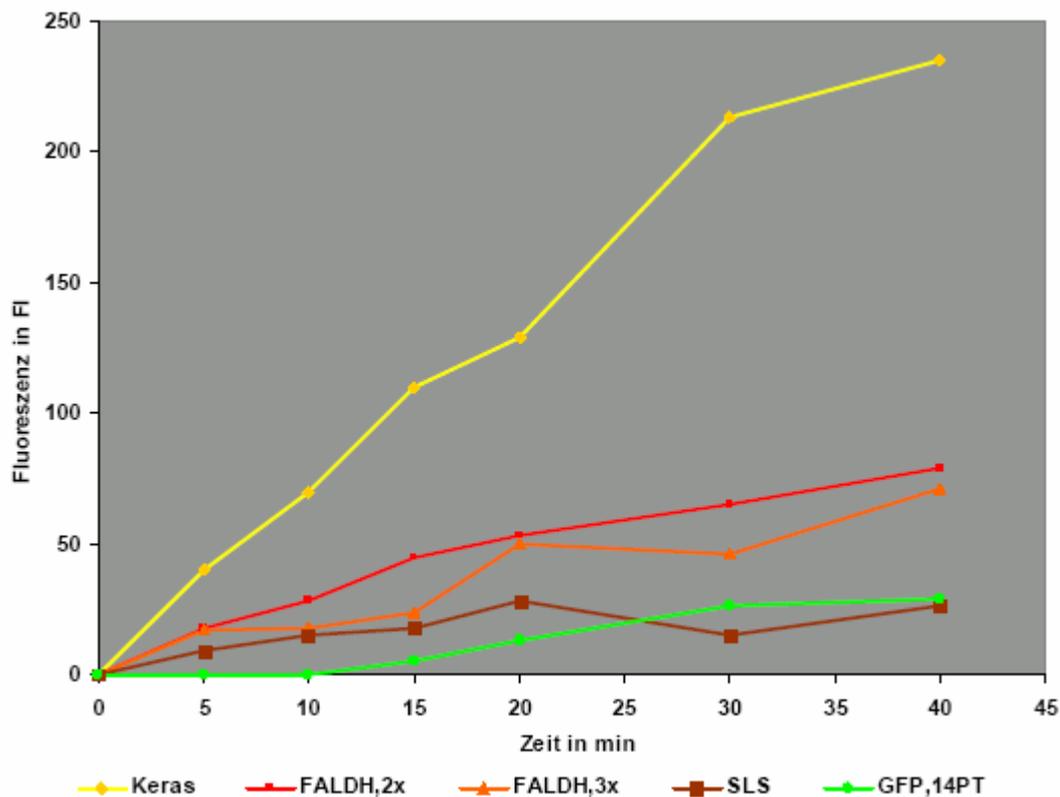


Abb. 3.19: FALDH-Aktivität doppel- und trippeltransduzierter SLS-Zellen 17 Tage nach Transduktion

In 2 getrennten Transduktionsansätzen wurden SLS-Zellen jeweils mit 50 µl rAAV-2/C-GFP und rAAV-2/C-FALDH transduziert. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal im Abstand von 5-6 Tagen wiederholt, so dass Doppeltransfektanten und Trippeltransfektanten erhalten wurden. 17 Tage nach Transduktion wurden alle Zellen geerntet. FALDH-Aktivitäten defekter SLS-Zellen (braun) erreichten 10 %, doppeltransduzierte Zellen (rot) 33 %, trippeltransduzierte Zellen 30 % (orange) im Vergleich zu derjenigen Aktivität gesunder Zellen (gelb).

3.5.3.3. Steigerung der FALDH-Expression durch Proteasomeninhibitor MG132

Inwieweit eine Steigerung der Transduktionseffizienz durch Zugabe von MG132 möglich ist, wurde in drei voneinander unabhängigen Transduktionsversuchen bei defekten SLS-Zellen untersucht.

$1,3 \times 10^4$ SLS-Zellen wurden pro Loch einer 24-Loch-Platte ausplattiert und bis zu einer 80 %-igen Konfluenz kultiviert. Transduktionen erfolgten mit jeweils 50 μ l rAAV-2/C-FALDH bzw. rAAV-2/C-GFP und 10 nM MG132 für 12 Stunden. Transduzierte Zellen wurden für weitere 20 h regeneriert und anschließend passagiert. Im ersten Transduktionsversuch wurden die Zellen 12 und 18 Tage, im zweiten Versuch 11 Tage und im dritten Versuch 14 Tagen nach entsprechender Transduktion geerntet und die FALDH-Aktivitäten der Transduktion fluorometrisch bestimmt.

12 und 18 Tage nach Transduktion wurden FALDH-Aktivitäten von 27 % und 17 %, im 11 Tage nach Transduktion 24 % und 14 Tagen nach Transduktion 25 % Aktivität im Vergleich zu derjenigen gesunder Keratinozyten erreicht. FALDH-Aktivitäten unbehandelter SLS-Zellen (n=4) lagen im Mittelwert bei 8,3 % und die der GFP-Transfektanten (n=4) lagen im Durchschnitt bei 4,4 %.

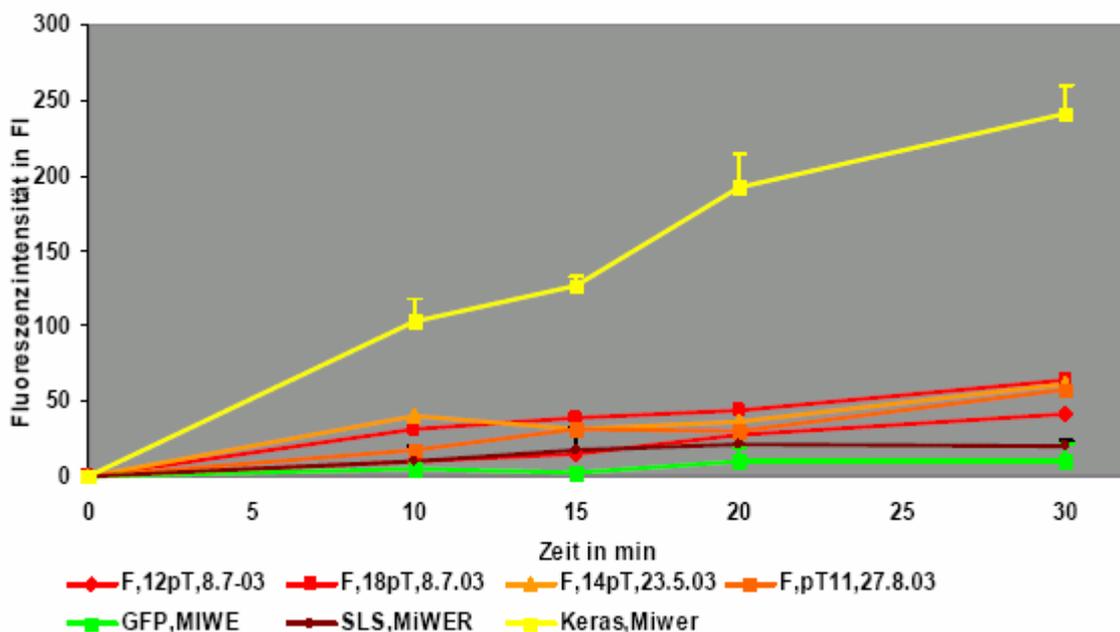


Abb. 3.20: FALDH-Aktivitäten FALDH-transfizierter SLS-Zellen, die mit MG132 behandelt wurden

In drei voneinander unabhängigen Transduktionsversuchen mit jeweils 50 μ l rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP wurden defekte SLS-Zellen während der Transduktion mit 10

nM MG132 inkubiert. Transduktion wurden für 12 und 18 Tage, bzw. 14 Tage und 11 Tage nach Transduktion kultiviert und anschließend deren FALDH-Aktivitäten bestimmt. Nach 30 min erreichten FALDH-transduzierte Zellen 18 Tage nach Transduktion (18pT) 27 % (rot mit Raute), 14 pT erreichten 25 % (orange mit Dreieck), 11 pT erreichten 24 % (dunkelorange mit Raute), 12 pT erreichten 17 % der FALDH-Aktivität im Vergleich zu derjenigen gesunder Keratinozyten (gelb) (bezogen auf den Mittelwert bei 30 min). Der Mittelwert der SLS-Zellen lag bei 30 min bei 8,3% (braun) und der der GFP-Transfektanten lag bei 4,4 % (grün).

3.5.3.4. Steigerung der FALDH-Expression durch EGF-R TK-Inhibitor AG1478

Inwieweit eine Steigerung der FALDH-Expression durch Inkubation von AG1478 vor der Transduktion möglich ist, wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen geprüft.

6×10^3 SLS-Zellen wurden pro Loch einer 24-Loch-Platte ausplattiert. Vor Transduktion wurden die Zellen für zwei Stunden mit 100 μ M AG1478 inkubiert und anschließend mit jeweils 50 μ l rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP, transduziert, wobei die Inkubationszeiten zwischen 12 und 18 h betragen. Gesunde Keratinozyten, FALDH-GFP-Transfektanten und defekte SLS-Zellen wurden für 24, 25 und 34 Tage nach Transduktion kultiviert und anschließend deren FALDH-Aktivitäten fluorometrisch bestimmt.

Insgesamt wurde dieses Experiment in drei voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt und die Ergebnisse in der Abbildung 3.21 dargestellt. Nach 30 min erreichten rAAV-2/C-FALDH-transduzierte Zellen 34 pT 92 % (rot), 24 pT 63 % (orange), und 24 pT 54 % der FALDH-Aktivität im Vergleich zu gesunden Keratinozyten (gelb). Unbehandelte SLS-Keratinozyten (violett) erreichten 13 %, GFP-transduzierte Zellen 16 % (grün) im Vergleich zu gesunden Keratinozyten. Die Werte für die Keratinozyten, SLS-Zellen und GFP-transduzierte Zellen ergaben sich aus 6 voneinander unabhängigen Messungen aus denen die Mittelwerte mit resultierenden Standardabweichungen ermittelt wurden. Durch Zusatz des EGF-R TK-Inhibitors AG1478 wurde eine Steigerung der FALDH-Aktivität in den transduzierte Zellen auf über 50 % erzielt. 24 Tage nach Transduktion wurden 54 % und 25 Tage nach Transduktion wurden 63 % der FALDH-Aktivität im Vergleich zu Keratinozyten erreicht. Eine 92 %-ige Wiederherstellung der FALDH-Aktivität konnte in einem Versuch bei einer FALDH-Transfektanten fünf Wochen nach Transduktion (rot) erreicht werden.

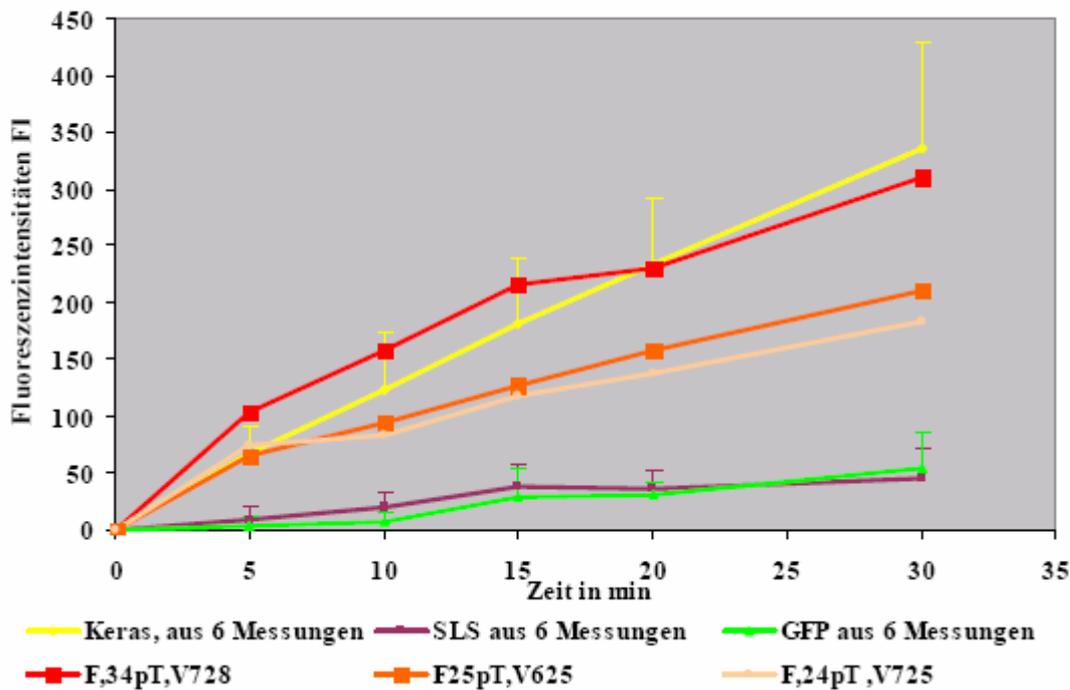


Abb. 3.21: FALDH-Aktivitäten AG1478 vorbehandelter, FALDH-transfizierter SLS-Zellen

In drei voneinander unabhängigen Transfektionsversuchen wurden SLS-Keratinocyten vor Transfektion für 2 h mit 100 μM AG1478 behandelt und anschließend jeweils mit 50 μl rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP transfiziert. FALDH- und GFP-Transfektanten wurden für 24, 25 und 34 Tage nach Transfektion kultiviert und anschließend deren FALDH-Aktivitäten fluorimetrisch bestimmt. Nach 30 min erreichten FALDH-Transfektanten 34 pT 92 % (rot), 25 pT 63 % (orange), und 24 pT 54 % der FALDH-Aktivität im Vergleich zu derjenigen gesunder Keratinocyten (gelbe). GFP transfizierte Zellen erreichten 16 % (grün) und unbehandelte SLS-Keratinocyten (violett) 13 %. Die Werte für die Keratinocyten, SLS-Zellen und die GFP-transfizierter Zellen ergaben sich aus 6 voneinander unabhängigen Messungen aus denen die Mittelwerte mit resultierenden Standardabweichungen ermittelt wurden.

3.6. Toxizitätsversuche

1×10^3 Keratinocyten und SLS-Keratinocyten wurden in 96-Loch-Platten ausgesät, wobei jeweils Tripplettansätze für jeden Konzentrationsbereich ausplatiert wurden.

Für die Octadecanalinkubation wurden 0 μM -30 μM -60 μM -90 μM -180 μM -360 μM eingesetzt. Nach einer 20-stündigen Inkubation wurden die Zellen so lange weiterkultiviert, bis die Kontrolltripplets, die nicht mit Octadecanal inkubiert wurden konfluent gewachsen waren. In der Abbildung 3.22 wurden die Octadecanalkonzentrationen gegen den prozentualen Anteil überlebender Zellen aufgetragen. Bei einer Konzentration von 90 μM waren noch 80 % gesunde Keratinocyten (rosa) und 20 % der SLS-Zellen (blau) vital. Die

größte Differenz zwischen dem Anteil überlebender Keratinozyten und SLS-Keratinozyten trat bei einer Konzentration von 60 μM auf.

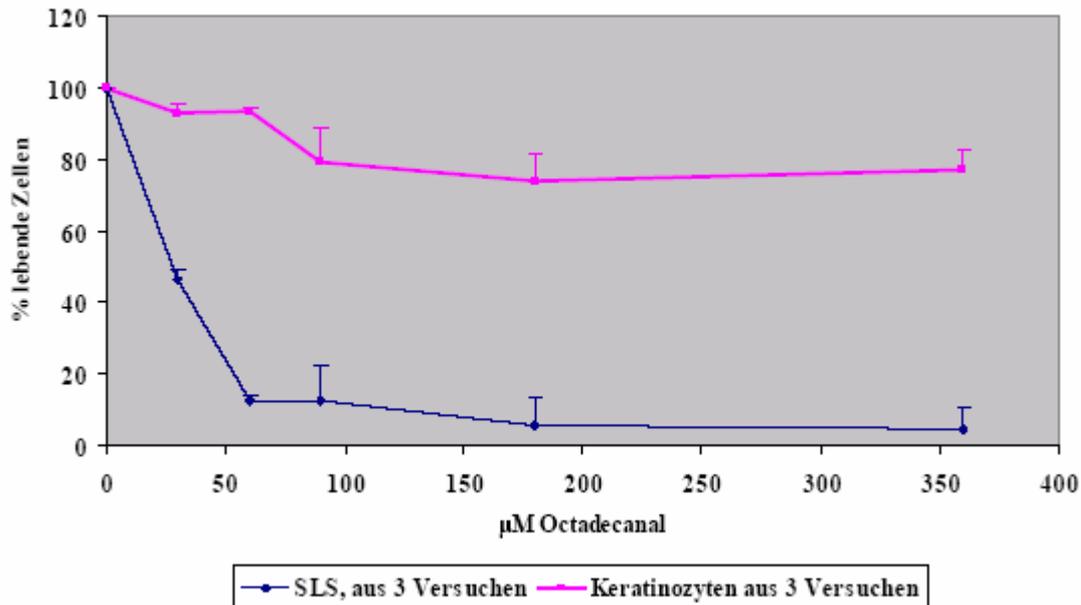


Abb. 3.22: Octadecanalinkubation von gesunden Keratinozyten und SLS-Zellen

SLS-defekte Keratinozyten und gesunde Keratinozyten wurden für 20 h mit unterschiedlichen Octadecanalkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an überlebenden Zellen durch Sulforhodamin-B-Färbung mittels ELISA dargestellt, tote Zellen wurden von der Platte gewaschen. Bei 30 μM Octadecanal war der Anteil überlebender SLS-Zellen (blau) auf unter 50 % gesunken und der Anteil an vitalen Keratinozyten (rosa) fast 100 %. Die größte Differenz zwischen überlebenden Keratinozyten und SLS-Keratinozyten trat bei 60 μM Octadecanal auf.

3.6.1. Überlebensvorteil FALDH-transfizierter SLS-Zellen nach Inkubation mit Octadecanal

Wie in Abbildung 3.22 dargestellt besaßen Keratinozyten gegenüber SLS-Zellen einen größeren Überlebensvorteil bei Inkubation mit Octadecanal. Bei einer Aldehydkonzentration von 60 μM schien die Differenz zwischen dem Anteil überlebender SLS-Zellen und gesunder Keratinozyten optimal zur Untersuchung des Effektes transduzierte SLS-Zellen auf die Vitalität.

In 4 voneinander unabhängigen Transduktionsversuchen wurden SLS-Zellen mit rAAV-2/C-GFP und rAAV-2/C-FALDH transduziert. Zellen wurden vor der Transduktion 2 h mit AG1478 behandelt. Transfektanten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der

Transduktion mit 60 μM Octadecanal für 20 h inkubiert und anschließend für weitere 4-6 Tage kultiviert.

FALDH-transduzierte Zellen besaßen 17, 19, 20 und 27 Tage nach Transduktion gegenüber den GFP-transduzierte SLS-Zellen einen höheren Prozentsatz lebender Zellen. Aus mehreren Versuchen wurden die Mittelwerte der prozentual überlebenden Keratinozyten, SLS-Keratinozyten bei 60 μM mit den entsprechenden Standardabweichungen gebildet, um ein möglichst repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Bei Keratinozyten waren durchschnittlich 91 % der Zellen und bei unbehandelten SLS-Zellen waren nach der Octadecanalinkubation 17 % der Zellen vital.

FALDH-transduzierte Zellen erreichten zwischen 63 % und 87 % vitale Zellen, GFP-transduzierte Zellen hatten Überlebensraten zwischen 12 % und 32 %.

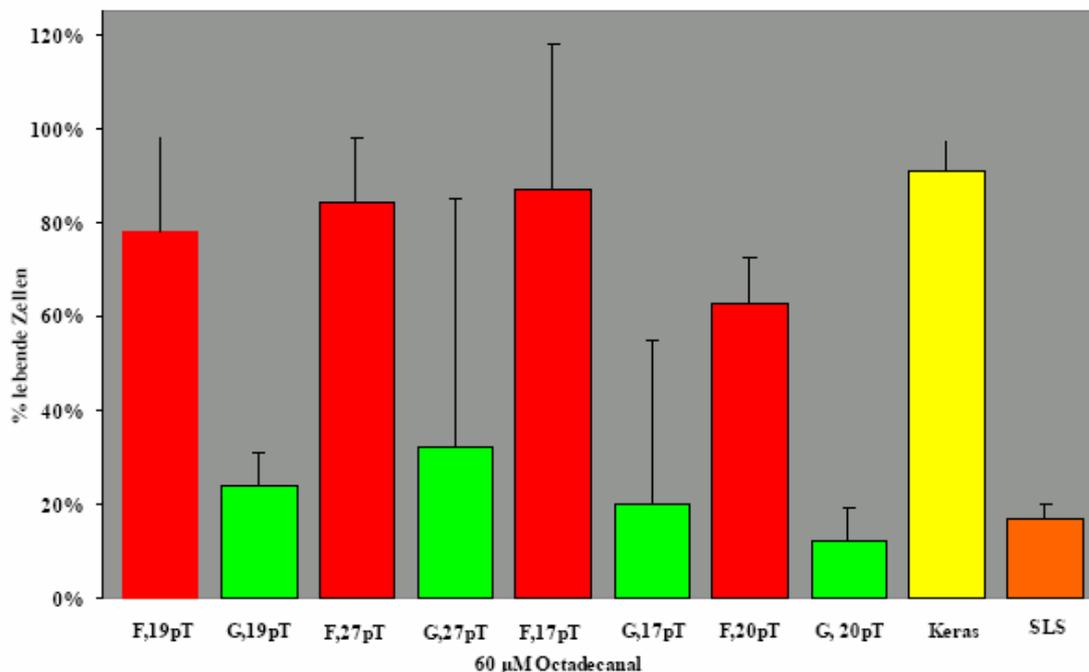


Abb. 3.23: Überlebensvorteil FALDH-transfizierter SLS-Keratinozyten

SLS-defekte Keratinozyten wurden mit 50 μl rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP transduziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion in Triplettsätzen mit 60 μM Octadecanal für 20 h inkubiert. Parallel wurden gesunde Keratinozyten und SLS-Keratinozyten mit dergleichen Octadecanalkonzentration für 20 h inkubiert. Überlebende Zellen wurden mit Sulforhodamin B-Färbung sichtbar gemacht und im ELISA-Reader ausgewertet. FALDH-transduzierte Zellen (rot) zeigten Überlebensraten zwischen 63 % und 87 % gegenüber nicht transduzierten SLS-Zellen (orange) mit 17 % und GFP-transduzierten Zellen (grün) mit 12 %-32 %.

3.7. Rekonstitution des FALDH-Defekts in dreidimensionalen Epidermiskulturen

3.7.1. Dreidimensionale Epidermiskultur aus gesunden Keratinozyten

Um dreidimensionale Epidermiskulturen zu kultivieren, wurden mehrere Parameter, wie unterschiedliche Zellzahl, verschiedene Medienzusätze (mit und ohne EGF), unterschiedliches Mediumfüllvolumen, sowie zwei Temperaturbereiche ausgetestet (33 °C und 37 °C).

Die morphologisch besten Ergebnisse wurden beim Ausplattieren von 5×10^5 Keratinozyten aus Passage 2 oder 3 auf ein DED, welches aus der plastischen Chirurgie stammte, kultiviert in KGM-Medium mit der Hälfte des vorgeschriebenen EGF, erhalten.

In der ersten Woche wurde das ankultivierte DED bei 37 °C und 5 % CO₂ in 2 ml KGM-Medium kultiviert. Ab Tag 8 wurde das DED bei 33 °C und 5 % CO₂ in 2,5-3 ml Medium für weitere 7-14 Tage kultiviert. Durch den Temperaturwechsel und die Erhöhung der Mediummenge konnte die bei ankultivierten DEDs häufig auftretende Hyperproliferation gestoppt werden.

3.7.2. Kultivierung dreidimensionaler SLS-Epidermiskulturen

Durch Kultivierung dreidimensionaler Hautkulturen aus SLS-Keratinozyten und gesunden Keratinozyten sollte zum einen die Epidermis der SLS-Patienten „*in-vitro*“ dargestellt werden und zum anderen charakteristische morphologische Unterschiede zwischen Hautkulturen aus gesunden- und Hautkulturen aus SLS-defekten Keratinozyten hervorgehoben werden. Hautkulturen aus gesunden Keratinozyten zeigten über weite Teile des Schnittpräparates einen korrekten Schichtaufbau der Epidermis (Abb.:3.25 A). Kulturen aus SLS-Keratinozyten zeigten in untersuchten Schnittpräparaten für SLS charakteristische Verhornungen (Abb.:3.25 B). Dies war jedoch nur fokal erkennbar und nicht mit Sicherheit reproduzierbar.

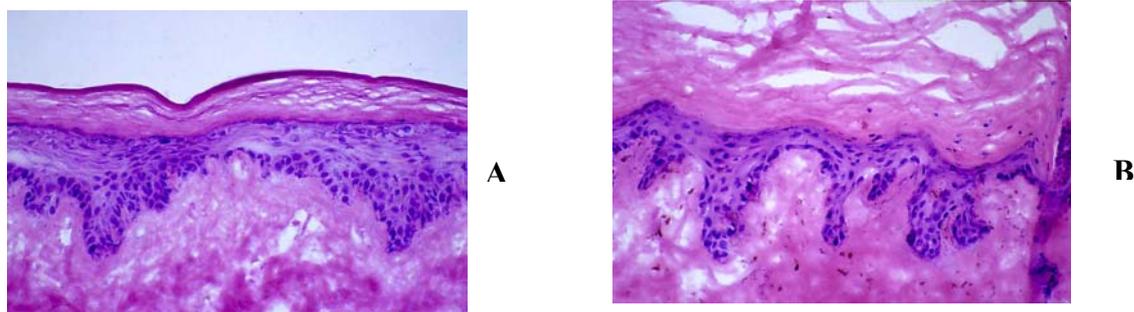


Abb. 3.25: Kultivierte Epidermis aus gesunden Keratinozyten (A) und aus SLS-defekten Keratinozyten (B).

Gesunde und FALDH-defekte Keratinozyten wurden auf deepidermisierte Dermis aufgetragen und für 14-21 Tage an der Medium/Luftgrenze kultiviert. In Abbildung (A) ist eine dreidimensionale Epidermiskultur aus gesunden Keratinozyten dargestellt. Die kultivierte Epidermis zeigte über weite Teile des Deds einen korrekten Schichtaufbau der Epidermis. In Abbildung (B) ist eine dreidimensionale Epidermiskultur aus defekten SLS-Keratinozyten dargestellt, welches teilweise ähnliche charakteristische Merkmale wie die Epidermis von SLS-Patienten zeigte.

3.7.3. GFP-Expression in dreidimensionalen Epidermiskulturen aus rAAV-2/C-GFP-transfizierten SLS-Zellen

Nachdem defekte SLS-Zellen in der Lage waren, auf deepidermisierte Dermis eine dreidimensionale Epidermisäquivalente zu bilden, wurde in den folgenden Versuchen eine Kultur aus GFP-transfizierten SLS-Zellen kultiviert. Hierfür wurden rAAV-2/C-GFP transfizierten SLS-Zellen in der ersten Passage nach Transduktion auf deepidermisierte Dermis ausplattiert und für 14 Tage an der Medium/Luftgrenze kultiviert. Die gebildete Epidermis geschnitten und unfixiert unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. GFP-transduzierte SLS-Zellen waren hauptsächlich im oberen Teil der Epidermis lokalisiert, wobei über weite Teile des Epidermisäquivalents grün-leuchtende Zellen zu finden waren. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass prinzipiell Epidermisäquivalente aus transduzierten SLS-Zellen herstellbar sind, wodurch die Voraussetzung für die Herstellung von Epidermisäquivalenten aus FALDH-transduzierten SLS-Zellen gegeben war.



Abb. 3.26: Gefrierschnitt durch ein Epidermisäquivalent aus rAAV-2/C-GFP-transduzierten SLS-Zellen

Defekte SLS-Keratinocyten wurden mit rAAV-2/C-GFP-Vektoren transduziert und anschließend auf deepidermisierte Dermis aufgetragen und für 14 Tage an der Medium/Luftgrenze kultiviert. In der gebildeten Epidermis waren über weite Teile des Epidermisäquivalents grün-leuchtende Zellen zu finden, die hauptsächlich in den oberen Schichten der Epidermis lokalisiert waren. Gezeigte Abbildung in 100-facher Vergrößerung.

3.7.4. Nachweis epidermaler FALDH in dreidimensionaler Epidermiskulturen

Defekte SLS-Keratinocyten wurden vor Transduktion mit jeweils 100 μ l rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP, 2 h mit 100 μ M AG1478 behandelt und in der ersten Passage nach Transduktion auf deepidermisierte Dermis ausgesät und für 14-21 Tage an der Medium/Luftgrenze kultiviert.

Die Darstellung epidermaler FALDH in angefertigten Schnittpräparaten erfolgte in einem Dehydrogenasemedium, in Anwesenheit von MTT und NAD^+ . In Epidermiskulturen aus gesunden Keratinocyten zeigten sich schwarze Formazan Niederschläge über die gesamte Epidermis verteilt, die auch in der Basalmembran lokalisiert waren (Abb. 3.27, d).

Kulturen aus unbehandelten SLS-Zellen zeigten geringe blau-schwarze Niederschläge (Abb. 3.27, f). Schnittpräparate aus rAAV-2/C-FALDH transduzierten Epidermisäquivalenten zeigten immer wieder verteilt in der Epidermis blau-schwarze Formazan Niederschläge.

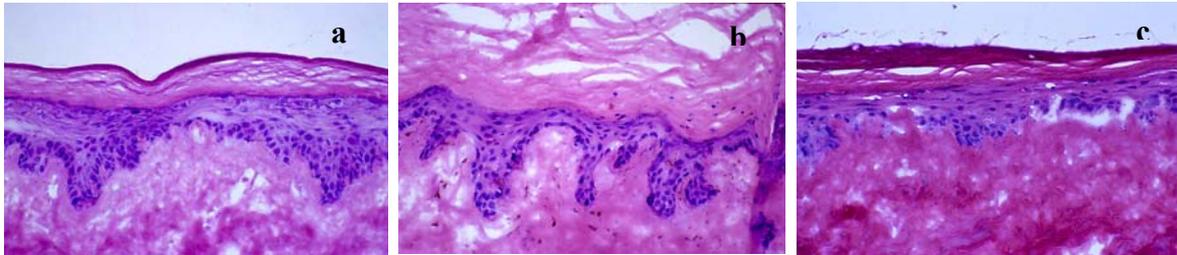


Abb. 3.27: Morphologische *in-vitro* Darstellung kultivierter Epidermisäquivalente

SLS-defekte Keratinozyten wurden 2 h vor Transduktion mit 100 μ M AG1478 inkubiert und anschließend mit jeweils 100 μ l rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP-Vektoren transduziert. Gesunde Keratinozyten (a), defekte SLS-Keratinozyten (b), FALDH-transduzierte Keratinozyten (c) wurden für 14-21 Tage an der Medium/Luftgrenze auf deepidermisierter Dermis kultiviert um eine *in-vitro* Epidermis herzustellen. Die kultivierte Epidermis aus SLS-Keratinozyten (b) zeigte starke Verhornungen und Parakeratose, in der aus rAAV-2/C-FALDH transduzierten SLS-Zellen (c) konnte fokale Reduktion des Stratum Corneum und keine Parakeratose erkannt werden (Hämatoxyllin-Eosin-Färbung a-c).

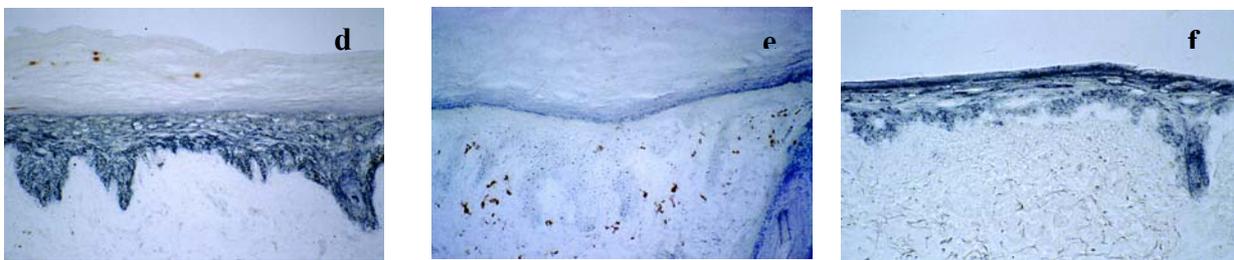


Abb. 3.28: *In-situ* Darstellung epidermaler FALDH in kultivierten Epidermisäquivalenten

Kultivierte Epidermisäquivalente aus gesunden Keratinozyten (d), SLS-Keratinozyten (e) und FALDH-transfuzierten SLS-Keratinozyten (f) wurden in 12 μ M dicke Scheiben geschnitten. Die Darstellung epidermaler Alkoholdehydrogenase erfolgte in Anwesenheit von MTT in einem Dehydrogenasemedium, wodurch sich blau-schwarze Formazan-Niederschläge in der Epidermis bildeten. Kultivierte Epidermis aus gesunden Keratinozyten (d) zeigten blau-schwarze Niederschläge. Vereinzelt schwache Niederschläge, bzw. fehlende waren in den Schnittpräparaten aus SLS-Keratinozyten zu erkennen (e). In der Epidermis aus FALDH-transfuzierten SLS-Keratinozyten (f) zeigten sich fokale deutliche Formazan-Niederschläge entlang der Epidermis. Gezeigte Schnittpräparate in 200 x-facher Vergrößerung, aus einem von zwei unabhängigen Versuchen.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit einer Aktivitätssteigerung von SLS-Zellen mittels rAAV-2 Vektoren durch Gentransfer funktionsfähiger c`DNA auszutesten. Als erstes wurde in mehreren Klonierungsstufen ein funktionsfähiges Plasmid konstruiert, das lediglich die ITRs als ursprünglich virale Sequenzen enthielt, die für eine Virusverpackung obligat sind (3.1.1, Abb. 3.1). In dieses Plasmid wurde die funktionsfähige FALDH-c`DNA aus dem Vektor pCIneo-FALDH mittels „Sticky-End-Ligation“ einkloniert, woraus pTR-UF/C-FALDH resultierte (3.1.2, Abb.3.3, 3.5). RAAV-2 Vektoren wurden mittels Trippeltransduktion in 293-Zellen nach einer Methode von Xiao generiert [Xiao et al., 1998]. Durch mehrere Aufreinigungsschritte konnten rAAV-2/C-FALDH Partikel aufgereinigt werden. Die hergestellten Vektoren wurden charakterisiert, indem ihre genomischen Titer mit Hilfe eines Dot-Blots-Verfahrens bestimmt wurden (3.2.1.1, Abb. 3.8).

Das CHO-FAA.K1-System trägt eine Mutation im FALDH-Gen, welche den Defekt von SLS-Zellen simuliert und war für die Etablierung der FALDH-Nachweise und ersten Transduktionsexperimenten eine wichtige Grundlage für humane SLS-Zellen.

Da bekannt ist, dass CHO-Zellen prinzipiell permissiv für rAA-2 Vektoren sind, musste im ersten Versuchsteil ausgetestet werden, inwieweit mutante FAA.K1-Zellen für rAAV-2 Vektoren permissiv waren. Hierfür wurden Zellen in parallelen Ansätzen mit rAAV-2/C-GFP transduziert, wobei etwa gleich viele Zellen beider Ansätze positiv grün gefärbt waren und Transduktionseffizienzen von etwa 70 % erreicht wurden.

Die FALDH-Aktivitätssteigerung in defekten Zellen wurde 4, 7, 11 und 21 Tage nach Transduktion mit rAAV-2/C-FALDH und rAAV-2/C-GFP gemessen. RAAV-2/C-FALDH transduzierte Zellen erreichten nach 7 und 21 Tagen FALDH-Aktivitäten von 100 %, im Vergleich zu FALDH-Aktivitäten intakter CHO-Zellen. FALDH-Aktivitäten der GFP-Kontrollen lagen unter 10 % (3.3.4, Abb. 3.11).

Langkettige Aldehyde haben einen toxischen Effekt auf FALDH-defekte Zellen, da diese nicht mehr metabolisiert werden können. Mittels eines Zytotoxizitätsversuches wurde die Octadecanalkonzentration ermittelt, bei der die größte Differenz zwischen dem Anteil überlebender FAA.K1- und CHO-Zellen bestand. Diese lag bei 60 μ M Octadecanal, da

unbehandelte SLS-Zellen 8,3 % im Vergleich zu FALDH-Aktivitäten gesunder Keratinozyten erreicht werden (3.5.2.3, Abb. 3.20).

Die besten Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen durch zuvor zweistündige Inkubationen der SLS-Zellen mit 100 μM AG1478 erreicht. FALDH-Transfektanten erreichten nach 24, 25 und 34 Tage FALDH-Aktivitäten von 54 %, 63 % und 92 %, GFP-Transfektanten erreichten im Durchschnitt 16 % und unbehandelte SLS-Keratinozyten 11 % der Aktivität gesunder Keratinozyten (3.5.2.4, Abb. 3.21).

Inwieweit FALDH-transfizierte Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber GFP-transfizierten SLS-Zellen besaßen, wurde durch einen Zytotoxizitätsversuch mit Octadecanal dargestellt. Um die größtmögliche Differenz zwischen dem prozentualen Überlebensanteil von SLS- und Keratinozyten zu ermitteln, wurden die Zellen für 20 h in einem Konzentrationsbereich von 0, 15, 30, 60, 90, 180, 240 und 360 μM mit Octadecanal inkubiert. Schon bei Konzentrationen ab 30 μM war eine 50 %-ige Abnahme überlebender SLS-Zellen zu beobachten, wohingegen gesunde Keratinozyten erst ab einer Konzentration von 90 μM einen Rückgang der überlebenden Zellen auf 80 % zeigten. Bei einer Konzentration von 60 μM Octadecanal war die größte Differenz zwischen überlebenden Keratinozyten und SLS-Zellen erreicht (3.6, Abb. 3.22).

In vier voneinander unabhängigen Transduktionen wurden FALDH- und GFP-Transfektanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transduktion mit 60 μM Octadecanal inkubiert. Nach 17, 19, 20 und 27 Tagen zeigten FALDH-Transfektanten einen Überlebensanteil zwischen 63 % und 87 %. Bei den GFP-Kontrollen waren zwischen 12 % und 32 % der Zellen vital (3.6.1, Abb. 3.23). Hierdurch konnte ein Überlebensvorteil von FALDH-Transfektanten dargestellt werden.

Nach Kultivierung dreidimensionaler Epidermisäquivalente aus SLS-Keratinozyten und gesunden Keratinozyten wurden diese HE-gefärbt, wodurch für SLS fokal charakteristische histologische Merkmale, wie verstärkte Verhornung des Stratum Corneums und Parakeratose zugeordnet werden konnten. Das Epidermisäquivalent aus gesunden Keratinozyten zeigte über weite Teile des kultivierten Stückes einen korrekten Schichtaufbau der Epidermis und sah *in-vivo* gesunder Epidermis täuschend ähnlich (3.7.2, Abb. 3.25).

Inwieweit es möglich war, aus rAAV-2 transduzierten Zellen ein Hautäquivalent herzustellen, wurde mit rAAV-2/C-GFP transduzierten SLS-Zellen ausgetestet, die auf eine deepidermisierte Dermis ausplattiert wurden und für 21 Tage kultiviert wurden. Grün-

leuchtende Zellen waren hauptsächlich im oberen Teil der Epidermis lokalisiert und über das gesamte Hautpräparat verteilt (3.7.3, Abb. 3.26).

Bei dem Versuch, Epidermisäquivalente aus FALDH-transfizierten SLS-Zellen zu kultivieren, stand der Nachweis epidermaler FALDH in kultivierten rekombinanten Epidermisäquivalenten im Vordergrund. FALDH-transduzierte SLS-Zellen wurden vor Transduktion mit 100 μM AG1478 für 12 h behandelt, auf ein Dermisstück ausgesät und für 15-21 Tage kultiviert. FALDH wurde mit Hilfe eines histochemischen *in-situ* Versuches zur Darstellung epidermaler Alkoholdehydrogenase, bei dem sich bei Anwesenheit intakter FALDH Formazan-Niederschläge in der Epidermis bildet, nachgewiesen. In Epidermisäquivalenten aus SLS-Keratinocyten traten minimale Niederschläge auf, die auf eine FALDH-Restaktivität schließen ließen. Dreidimensionale Hautkulturen aus gesunden Keratinocyten zeigten deutlich schwarze Niederschläge und in Kulturen aus FALDH-transduzierten Zellen waren wiederholt Bereiche mit deutlich verstärkten Formazan-Niederschlägen zu sehen, im Vergleich zu den GFP-Kontrollen (3.7.4, Abb. 3.28). Morphologische Untersuchungen an HE-gefärbten Schnittpräparaten von FALDH-rekombinanten Epidermisäquivalenten zeigten fokale verminderte orthokeratotische Verhornungen (3.7.4, Abb.:3.27). Inwieweit von einer echten morphologischen Wiederherstellung FALDH-transduzierter SLS-Zellen zu sprechen war, ist auf Grund der Kultivierungsmethode, bei der verstärkte Verhornungen der Epidermis gehäuft auftreten können, schwierig zu beurteilen.

4.1.1. Bisher mögliche Therapieoptionen für SLS

Eine kausale Therapie ist derzeit für SLS-Patienten nicht verfügbar. Bislang wurde versucht, durch gezielte Ernährung eine Reduktion der totalen Fettzufuhr auf 30 % der Tageskaloriendosis zu erreichen, um den Anteil an langkettigen Fettsäuren zu reduzieren, bzw. den Anteil an zu metabolisierenden Fettalkoholen und Fettaldehyden zu verringern. Zusätzlich erfolgen Supplementierungen mit n-3 und n-6 Fettsäuren (Reduktion der delta-6-Desaturase-Defizienz) bis zu einer Linol/Linolen-Säure-Ratio von 6 durch Gabe von Rapsöl. Zugaben von hohen nicht-saturierten Fettsäuren mittels Milupa-Milch werden den Betroffenen verabreicht. Jedoch hat die Behandlung mit einer speziellen Diät bei vielen Patienten keinen Einfluß auf den Fettalkoholplasmaspiegel, und führt auch nicht zu einer Verbesserung der klinischen Symptome [Maaswinkel-Mooij et al., 1994]. Aufgrund der endogenen Fettalkoholproduktion ist es unklar, inwiefern die Patienten darauf reagieren.

Die unspezifische Behandlung mit Retinoiden, wie Acitretin und Etrétinate (0,25 mg/kg) verbesserte zwar den Hautzustand, hat aber keinen Einfluß auf die neurologischen Defekte [Rizzo WB 1993]. Topisch werden die Patienten täglich mit 10 % Urea in Basiscreme DAC behandelt. Im Forschungsvorhaben von E. Mayatepek aus Heidelberg werden den Patienten der 5-Lipoxygenase-Inhibitor, Zileuton[®], verabreicht, um die erhöhten LTB₄-Werte zu senken [Willemsen et al. 2001].

4.1.2. Genkorrektur als neue Therapieoption für SLS

SLS gehört zu den autosomal-rezessiven Genodermatosen, bei denen sich eine klinische Manifestation der Krankheit erst dann einstellt, wenn beide Allele betroffen sind. Heterozygote Träger, bei denen nur ein Allel defekt ist, sind genotypisch betroffen, aber phänotypisch gesund. Durch Einbringen des fehlenden funktionellen Gens in homozygot defekte Keratinozyten könnte der Gendefekt kompensiert bzw. unterdrückt werden, indem eine heterozygote Situation, und somit eine deutliche Besserung des Phänotyps, hergestellt werden würde. Prinzipiell sind alle Krankheiten, die nach einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus vererbt werden für eine Gentherapie geeignet [Spirito et al., 2001].

Eine kausale Therapieoption für SLS könnte in einer gentherapeutischen Korrektur bestehen, bei der intakte FALDH mittels Gentransfer in SLS-Zellen eingeschleust werden würde.

Bei SLS entwickeln sich die neurologischen Defekte erst im Laufe der ersten Lebensjahre, wodurch ein frühes therapeutisches Eingreifen durch gentherapeutische Korrektur theoretisch zu einem verminderten Auftreten der Symptome führen könnte [Rizzo, 1998]. Durch eine dauerhafte Korrektur des biochemischen Defekts sollte eine Restoration der Enzymfunktion zu 50-60 % im Vergleich zu gesunden Zellen erreicht werden. Für SLS-Patienten sollte diese FALDH-Aktivität ausreichend sein, da heterozygote Träger der FALDH-Mutationen einen partiellen Enzymdefekt mit FALDH-Aktivitäten zwischen 50 % und 60 % im Vergleich zu intakten Zellen aufweisen bei gleichzeitig gesundem Phänotyp ohne Krankheitsbild [James und Zoeller, 1997; Möhrenschräger et al., 2000].

4.1.3. Gentherapie von autosomal-rezessiven Genodermatosen

Da bisher in der Literatur noch keine gentherapeutischen Konzepte zur Rekonstitution des SLS-Defekts vorliegen, werden im Folgenden verschiedene Gentransferstrategien anderer

autosomal-rezessiven Genodermatosen diskutiert. Kandidaten autosomal-rezessiver Genodermatosen, bei denen bereits erste Fortschritte mittels gentherapeutischer Korrektur *in-vitro* und teilweise auch *in-vivo* erreicht werden konnten sind die Epidermis bullosa (EB), lamelläre und die X-assoziierte Ichtyose (XLI), sowie das Xeroderma Pigmentosum (XP).

Die Epidermolysis bullosa hereditaria stellt klinisch und genetisch eine heterogene Gruppe von Krankheiten da, bei denen es durch Berührungen zu Blisterbildung kommt [Pulkkinen et al., 1999; Aberdam et al., 1994; Borradori und Sonnenberg, 1999]. Bei Versuchen, den genetischen Defekt der Epidermolysis bullosa, Typ Junktionalis zu korrigieren, wurden von mehreren unterschiedlichen Trägern Keratinozyten isoliert und diese mittels retroviralen LTR-Vektoren, welche das funktionelle LAMB3 Gen enthielten, *in-vitro* transfiziert. Korrigierte Zellen zeigten in den Versuchen ähnliche Wachstumsraten wie gesunde Keratinozyten [Robbins et al., 2001]. In einem weiteren Versuch wurden kultivierte EB-Keratinozytenstammzellen mittels Retroviren, die das für Laminin 5 kodierende intakte Gen enthielten, transfiziert, wodurch eine vollständige Reversion des Phänotyps erreicht werden konnte, da korrigierte EB-Keratinozyten ein normales Adhäsions- und Migrationsverhalten aufwiesen [Dellambra et al., 2000].

Die Rezessive dystrophe Epidermis Bullosa (RDEB) wird durch eine Mutation in COL7A1 verursacht, welches für Kollagen VII kodiert, wodurch ein defektes extrazelluläres Kollagen VII entsteht [Woodley et al. 2004]. Es gelang der Gruppe von Chen, aus Kollagen VII, welches eine Größe von 9 kb hat und daher für einen viralen Gentransfer nicht in Frage kommt, ein rekombinantes Typ VII Minikollagen mit einer Größe von 230-kDa herzustellen. Dieses wurde mittels Retroviren in DEB-defekte Zellen *in-vitro* transduziert, wodurch die behandelte Zellen verstärktes Proliferationspotential, verminderte Zellbeweglichkeit und eine verstärkte Zellsubstratadhäsion, im Gegensatz zu unbehandelten DEB-Zellen hatten [Chen et al., 2000]. In einem anderen Versuch wurden DEB-defekte Keratinozyten und Fibroblasten *in-vitro* mittels Lentiviren, welche das für Kollagen VII kodierende Gen, COL7A1 trugen, transfiziert, wodurch die korrigierten Zellen eine normale Morphologie, ein normales Adhäsionsverhalten und Differenzierungsverhalten gegenüber nicht korrigierten Keratinozyten besaßen [Chen et al., 2002].

Die x-assoziierte Ichtyose (XLI) ist durch eine hypertrophe Epidermis und abnormale Schuppung gekennzeichnet [Bale et al., 1996; William und Elias, 1987], die durch einen Defekt der Steroidsulfatase (SS) verursacht wird, wodurch es zu einer Akkumulation von Cholesterolsulfat und stark verdickter Hornhaut kommt. Durch Transduktion XLI-defekter Zellen mittels retroviralen Vektoren, die das funktionelle Gen für die SS enthielten, konnte

eine 100%-ige Aktivität der Steroidsulfatase im Vergleich zu gesunden Keratinozyten *in-vitro* hergestellt werden [Freiberg et al., 1997].

Die Lamelläre Ichtyose (LI) wird durch einen Defekt der Keratinozytentransglutaminase (TGase1) verursacht, wodurch es zu fehlerhaften Ausdifferenzierungen der Keratinozyten kommt. Durch retroviralen Transfer des korrekten TGase1-Gens in defekte Keratinozyten konnten *in-vitro* normale Transglutaminaseaktivitäten im Vergleich zu gesunden Keratinozyten hergestellt werden [Choate et al., 1996, 1997].

Xeroderma Pigmentosum (XP) ist durch eine vermehrte Bildung von Hautkrebs gekennzeichnet [Zeng et al., 1997]. *In-vitro* konnte durch Transduktion primärer, XP-defekter Fibroblasten mittels rekombinanter, retroviraler Vektoren, die intakte XPA-, XPB- oder XPC- Gene trugen, eine Wiederherstellung des DNA-Reparaturmechanismus erreicht werden, wodurch ein vermindertes Hautkrebsrisiko in den korrigierten Zellen erzielt wurde [Zeng et al., 1997].

4.1.4. Genterapie bei Defekten des Fettstoffmetabolismus

Neben dem SLS-Syndrom gibt es weitere vererbare Krankheiten, aus denen ein defekter Fettalkoholmetabolismus resultiert, wodurch es zu Akkumulationen von Fettalkoholen in den Geweben der Betroffenen kommt. Als Folge treten bei allen Betroffenen schwere neurologische Erkrankungen auf, teilweise assoziiert mit Ichtyose, wobei noch nicht geklärt ist, inwieweit die Akkumulation von Fettalkoholen daran beteiligt ist. Zu diesen vererbaren Erkrankungen gehören zum einen isolierte Defekte in der Oxidation langkettiger Fettalkohole zu Fettsäuren, zu denen das SLS gehört und der defekte Einbau von Fettalkoholen in Etherlipide, zu denen der isolierte Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthese-Defekt zählt [Rizzo, 1998]. Zusätzlich zählen hierzu Erkrankungen peroxisomaler Biogenese, zu denen das Zellweger-Syndrom (ZW), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und infantile Refusum-Krankheit (IR) zählen [Reuber et al., 1997; Powers und Moser, 1998], sowie Erkrankungen des peroxisomalen Proteinimports zu der rhizomelische Chondrodysplasia Punctata (RCDP) gehört [Heymans et al., 1986; Hoefler et al., 1988]. Die klinischen Symptome der rhizomelischen Chondrodysplasia Punctata ähneln dem des Sjögren-Larsson Syndrom, da psychomotorische Behinderung und Ichtyose neben anderen Erscheinungen in den Vordergrund treten. Neben anderen Störungen kommt es zur Anreicherungen von Hexadecanol und Octadecanol im Plasma der Patienten [Rizzo et al., 1993].

Derzeit mögliche Therapien für vererbare Krankheiten des Fettalkoholmetabolismus beschränken sich, wie bei SLS darauf, die Symptome zu mildern. Durch eine bestimmte Fett-Diät und Einnahme von Glyceroltrioleat und Trierucat (Lorenzo's Öl) wird versucht die Fettsäurezusammensetzung bei ALD-Patienten zu verbessern [Cartier et al., 1995]. Bei IRD und ZS sollten langkettige Fettsäuren wie Docosahexaensäure und DHA vermieden werden [Moser et al., 1999].

Die Erkrankungen des Fettalkoholmetabolismus, ALD, ZW und IRD werden autosomal-rezessiv vererbt, wodurch auch hier prinzipiell die Möglichkeit einer genetischen Korrektur durch Transfektion mit dem intakten Gen gegeben ist. Ein wichtiges Hindernis für eine erfolgreiche Gentherapie sind die schon früh im Uterus beginnenden und irreversiblen neurologischen Defekte, die vor allem bei den peroxisomalen Krankheiten und bei RCDP auftreten und somit eine gentherapeutische Korrektur erschweren.

In ALD-Fibroblasten konnte der Phenotyp durch *in-vitro* Transfektion mit Retroviren, die das intakt kodierende Gen enthielten, wiederhergestellt werden. Bis zu 2 Monaten nach Transfektion konnte sowohl ein normaler ALDP-Status, als auch eine gesteigerte β -Oxidation in korrigierten Fibroblasten dargestellt werden [Cartier et al., 1995]. Ein zweiter Ansatzpunkt bestand darin, CD34+ Zellen mittels HIV das intakte ALD-Gen zu transfizieren, da mit Retroviren nur *in-vitro* gute Resultate erzielt werden konnten. ALD-korrigierten Zellen wurden SCID-Mäusen infundiert und es konnten Langzeitexpressionen beobachtet werden und eine *in-vivo* Rekonstitution dargestellt werden [Benhamida et al., 2003].

4.1.5. Probleme bei der Weiterentwicklung

Den Defekten des Fettstoffmetabolismus und dem SLS ist gemeinsam, dass Probleme bei der Weiterentwicklung von Therapiekonzepten, bzw. auftreten.

Sowohl für SLS, als auch für IRD wurden bisher keine gentherapeutischen Konzepte entwickelt. Für das ZW-Syndrom wurden verschieden Versuche angestrebt eine gentherapeutische Korrektur zu erreichen, bisher ist es jedoch noch nicht gelungen ein erfolgreiches Gentherapiekonzept zu erstellen.

Diese Entwicklung könnte zum einen daran liegen, dass die genannten Krankheiten zu selten auftreten und daher kein breites Interesse zur Heilung besteht, wie es z.B bei der Entwicklung von Gentherapiekonzepten bei verschiedenen malignen Erkrankungen der Fall ist.

4.1.6. **Vorraussetzungen für einen langfristigen Gentransfer**

Da der Gendefekt bei den genannten Krankheiten lebenslang vorhanden ist, sollte für eine langfristige Rekonstitution des Defektes ein stabiler Gentransfer angestrebt werden. Voraussetzung hierfür ist die Integration des Therapiegens in die chromosomale DNA der Zielzelle, da ansonsten die Genexpression im Laufe der Zellteilungen, durch die epidermale Erneuerungsphase nach 28 Tagen, verloren geht. Weiterhin ist ein Gentransfer in Stammzellen [Dellambra et al., 2000], sowie die Auswahl eines geeigneten Vektors für den Gentransfer, wichtig.

4.1.7. **rAAV-2 Vektoren im Vergleich zu anderen viralen Vektoren**

Die Auswahl eines geeigneten viralen Vektors für die Langzeitgentherapie autosomal-rezessiver Genodermatosen ist entscheidend. Wichtige Kriterien für die Auswahl eines Vektors sind seine Expressionseffizienz, Expressionsdauer, Selektivität, Immunogenität und Sicherheit. Bei den bereits genannten Gentransferstrategien autosomal-rezessiver Genodermatosen wurden vor allem Retro- und Lentiviren eingesetzt. Die Vor- und Nachteile der jeweiligen viralen Vektoren werden im Folgenden kurz diskutiert.

Retrovirale Vektoren sind die häufigsten bei humanen Gentherapiestudien eingesetzten Gentransfervehikel. Sie sind durch eine besonders hohe Transduktionseffizienz gekennzeichnet. Transduktionsraten bis zu 100 % konnten *in-vitro* bei Keratinozyten erreicht werden [Choate und Khavari, 1997; Mathor et al., 1996]. Da Retroviren nur proliferierende Zellen transfizieren können, ist der Anwendungsbereich bei *in-vivo* Anwendung in der Haut eingeschränkt, da die normale Mitoserate in der Epidermis zu gering ist [Kuhn et al., 2002], wodurch ihre Einsetzbarkeit in der Hautgentherapie beschränkt wird. Die Integration in die Wirtszelle findet randomisiert an mehreren unterschiedlichen und willkürlichen Stellen im Chromosom statt, wodurch das Risiko einer insertiellen Mutagenese besteht [Crystal et al., 1995]. Obwohl das Risiko über Jahre hinweg als niedrig eingestuft wurde, traten bei zwei Kindern in ersten Therapieversuchen mit Retroviren unerwartet T-Zell-Leukämien auf. Hier wird eine insertielle Mutagenese vermutet, die durch den ungerichteten Einbau ausgelöst werden kann [Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003; Kohn et al., 2003; Marshall, 2002; 2003].

Lentiviren gehören ebenfalls in die Gruppe der Retroviren, wobei diese in der Lage sind, auch ruhende Zellen zu transfizieren, wodurch sie auch für *in-vivo* Transfektionen geeignet

sind und den Retroviren damit überlegen sind [Kuhn et al., 2002]. In zahlreichen *in-vitro* Transfektionsversuchen an EB-Keratinocyten konnte mittels Lentiviren eine Reversion des Phänotyps erreicht werden [Chen et al., 2002, Ghazizadeh et al., 2004]. Mittels Lentiviren konnte humane Haut in einem Xerotransplantationsmodell erfolgreich *in-vivo* transfiziert werden [Baek et al., 2001; Kuhn et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden AAV-2 Vektoren verwendet, da diese in das Genom integrieren können und somit für einen Langzeitgentransfer zur Behandlung vererbter Krankheiten prinzipiell geeignet sind [Braun-Falco et al., 2005; Rizzo et al., 2000]. Außerdem ist sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* der Gentransfer möglich, wodurch rAAV-2 Vektoren gegenüber Retroviren im Einsatz bei der Hautgentherapie einen entscheidenden Vorteil haben.

Zur Genkorrektur autosomal-rezessiver Genodermatosen wurden AAV-2 Vektoren bisher noch nicht eingesetzt. Ein Grund hierfür könnte die niedrigere Transduktionseffizienz primärer Keratinocyten, im Vergleich zu Retro- und Lentiviren, sein. Hierdurch sind die Erfahrungen vor allem im humanen Bereich gering.

Der Arbeitsgruppe von Hengge gelang es, nach Injektion von rAAV-2 Vektoren in die Haut von Schweinen einen *in-vivo*-Gentransfer in der Epidermis und Adnex-Strukturen mit einer Genexpression bis zu 6 Wochen zu erzielen [Hengge et al., 2000]. In Mäusen zeigte sich nach subkutaner Injektion eine Transduktion des Pannikulus Carnosus, die über 1 Jahr lang nachweisbar war [Donahue et al., 1999]. Zur Behandlung von Wundheilungen wurden rAAV-2 Vektoren bereits erfolgreich eingesetzt [Galeano et al., 2003; Deodato et al., 2002]. Durch rAAV-2 vermittelten Gentransfer von vaskulärem endothialen Wachstumsfaktor (VEGF) konnte sowohl bei Inzisionswunden von diabetischen Mäusen, als auch bei Exzisionswunden in Ratten und nach Verbrennungswunden in Mäusen die Angiogenese erhöht und die Heilungsdauer verkürzt werden.

Braun-Falco et al. konnten zeigen, dass mit AAV-2 ein effizienter Gentransfer von 70 % auch in menschlichen Keratinocyten möglich ist, wobei in diesen Experimenten Adenoviren anwesend waren, die durch Stimulation der DNA-Polymerase die Transduktionseffizienz stark steigern [Braun-Falco et al., 1999]. In weiteren Transduktionsversuchen ohne Adenoviren konnte ein GFP-Gentransfer bis zu 10 Wochen nach Transduktion in primären Keratinocyten nachgewiesen werden, womit bestätigt werden konnte, dass AAV-2 als Vektor prinzipiell für die Hautgentherapie geeignet ist [Braun-Falco et al., 2005; Büning et al., 2004].

AAV-2 Vektoren haben weiterhin den Vorteil, dass eine Reihe von unterschiedlichen Zelltypen sich transfizieren lassen. Hierzu zählen proliferierende und nicht-proliferierende, teilweise mit einer erhöhten Infektionsrate in Gehirn, Leber und Muskelzellen [Sanlioglu et al., 2001; Ponnazhagan et al., 1996; Nicklin et al., 2001]. Es wird vermutet, daß unterschiedliche zelluläre Bestandteile, die die Transduktions-effizienz von rAAV-2 beeinflussen können, hierfür verantwortlich sind.

Durch ihre günstigen Eigenschaften werden AAV-Vektoren bereits bei Menschen im Rahmen klinischer Prüfungen, sowohl in Phase-I, als auch in Phase-II bei unterschiedlichen Indikationen untersucht [Moss et al., 2004; High 2004; Mandel und Burger, 2004; Crystal et al., 2004; Janson et al., 2002; Wagner et al., 2002; Aitken et al., 2001]. In diesen Studien, die unter anderem zur Evaluierung der Toxizität von rAAV-2 Vektoren dienten, wurden keine bedeutsamen Nebenwirkungen beobachtet.

Neben den genannten Vorteilen hat AAV-2 zudem eine sehr geringe Immunogenität, da außer beiden ITRs alle ursprünglichen viralen Sequenzen aus dem Virus entfernt wurden. In Tierexperimenten wurden nach mehrmaliger Injektion von rAAV-2 Vektoren keine wesentlichen T-Zellantworten gefunden [Xiao et al., 1996]. Jedoch waren neutralisierende Antikörper gegen Kapsidproteine von rAAV-2 Partikeln nachweisbar. Durch kurzzeitige Immunsuppression mit CD4-Antikörpern konnte jedoch diese humorale Antwort unterdrückt werden, wodurch eine wiederholte Applikation von rAAV-2 Vektoren möglich war [Manning et al., 1998].

4.1.8. AAV-2 zur Genkorrektur von SLS

Neben der Haut ist das Gehirn das am stärksten betroffene Organ bei SLS-Patienten. Deßhalb ist AAV-2 zur Genkorrektur von SLS ein vielversprechender Vektor, da er beide Organe transfizieren kann [Vezzani, 2004]. Haut als Zielorgan des Gentransfers bei SLS-Patienten hat den Vorteil, dass die meisten Untersuchungen, die sich mit SLS auseinandersetzen an menschlichen Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt wurden. Zudem ist die Haut ein attraktives Gewebe für Hautgentherapie, da sie leicht erreichbar ist und die Methoden zur Kultivierung von humanen Primärzellen bekannt und gut etabliert sind.

4.1.9. Rekonstitution des FALDH-Defekts im CHO-System mit rAAV-2

Das gesamte Konzept wurde zuerst in einer mutanten Zelllinie, welche dem SLS sehr nahe kommt durchgeführt, da bei mutanten FAA.K1-Zellen der gleiche FALDH-Defekt wie in SLS-Fibroblasten vorliegt [James und Zoeller, 1997].

FALDH-Aktivitäten wurden fluorometrisch gemessen, wobei ein Anstieg der FALDH-Aktivität in FALDH-transduzierten FAA.K1-Zellen zum einen auf die Funktionalität exprimierter FALDH und zum anderen indirekt auf eine gesteigerte Genexpression schließen läßt.

FALDH-Aktivitätsbestimmungen defekter FAA.K1-Zellen zeigten, dass FAA.K1-Zellen durch den Ausfall der FALDH eine Enzymaktivität von 10 % im Vergleich zu gesunden CHO-Zellen hatten (3.3.1, Abb.:3.9). In dieser Arbeit gemessene FALDH-Aktivitäten entsprachen den Literaturangaben einer Arbeitsgruppe von Zoeller, die FALDH-Aktivitäten bei defekten FAA.K1-Zellen von unter 10 % im Vergleich zu gesunden CHO-Zellen durch fluorometrische Bestimmung festgestellt hatten [James et al., 1990].

Gesunde CHO-Zellen lassen sich prinzipiell mit rAAV-2 Vektoren transduzieren [Summerford und Samulski, 1998]. Theoretisch ist es jedoch möglich, dass bei FAA.K1-Mutanten Faktoren verlorengegangen sind, die für eine effiziente Transduktion mit rAAV-2 Vektoren notwendig sind. Inwieweit die Transduktionseffizienz der FALDH-defekten FAA.K1-Zellen mit derjenigen der CHO-Zellen zu vergleichen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit in drei voneinander unabhängigen Transduktionsversuchen ausgetestet. Hierfür wurden defekte FAA.K1-Zellen mit rAAV-2/C-GFP transfiziert und die Zunahme der GFP-Expression beobachtet, woraus geschlossen werden konnte, dass FAA.K1-Zellen prinzipiell permissiv für AAV-2-Vektoren sind (3.3.3, Abb.:3.10).

Eine *in-vitro* Restoration des FALDH-Defekts in FAA.K1-Zellen gelang im Rahmen dieser Arbeit durch rAAV-2/C-FALDH-Transduktion defekter FAA.K1-Zellen, wodurch FALDH-Transfektanten eine Aktivität von über 100 % im Vergleich zu gesunden CHO-Zellen erreichten. Aktivitäten unbehandelter FAA.K1-Zellen lagen unter 10 % (3.3.4, Abb.:3.11) [Haug et al., 2005]. Die gemessenen prozentualen FALDH-Aktivitäten der FAA.K1-Mutanten und der CHO-Zellen entsprachen den Daten aus der Literatur [James and Zoeller, 1997].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass FALDH-Transfektanten in der Lage waren, zugesetztes Octadecanal wieder komplett zu Fettsäure umzubauen. Sie erreichten Überlebensraten von 80 %, im Vergleich zu gesunden CHO-Zellen, nach einer

Octadecanalikubation von 60 μM . Mutante GFP-transduzierte FAA.K1-Zellen zeigten hingegen nur 9 % überlebende Zellen bei dieser Konzentration, womit die Wiederherstellung des FALDH-Defekts in defekten FAA.K1-Zellen belegt werden konnte (3.3.6, Abb.:3.13) [Haug et al., 2005]. Mit diesen Ergebnissen konnte einerseits ein Anstieg der FALDH-Aktivität in transfizierten FAA.K1-Zellen und andererseits ein Überlebensvorteil der FALDH-Transfektanten gegenüber GFP-Transfektanten, im CHO-System dargestellt werden [Haug et al., 2005].

Hierdurch sind erste Anhaltspunkte gegeben, dass der Gentransfer mittels rAAV-2 Vektoren ein vielversprechendes Behandlungskonzept darstellen könnte.

4.1.10. *In-vitro* Rekonstitution defekter SLS-Keratinocyten durch Transduktion mit rAAV-2

Defekte SLS-Keratinocyten wurden mittels AAV-2-Vektoren, die das funktionelle FALDH-Gen trugen, transduziert. In diesen Versuchen konnten keine deutlichen Steigerungen der FALDH-Aktivitäten in transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen erzielt werden (3.5.2; Abb. 3.18).

Hierfür können verschiedene Faktoren, wie ein zu niedrig verwendeter rAAV-2 Titer, ein beschleunigter Abbau des Vektors durch Proteasomen im Zytoplasma der Zielzelle nach Transfektion, sowie eine langsame virale Doppelstrangsynthese im Zellkern der Zielzellen verantwortlich sein.

4.1.11. Einfluß des Virustiters auf die Transduktionseffizienz

Für eine ausreichende Transduktionseffizienz ist ein entsprechender Virustiter notwendig. Der physikalische Titer gibt an, wie viele DNA-tragende Viruspartikel in dem Lysat vorhanden sind. Nach Vergleich der selber hergestellten physikalischen Virus-Titer mit der Literatur lagen diese um das 100 bis 1000-fache unter den Titern anderer Arbeitsgruppen (3.2.1; Abb. 3.8), [Snyder et al., 1997]. Teilweise traten größere Schwankungen innerhalb der hergestellten Virusstocks auf. Dies zeigte, dass trotz größter Genauigkeit bei der Virusherstellung, unterschiedliche Qualitäten der hergestellten Virusstocklösungen auftreten können.

Aus der Verpackung von Wildtyp-AAV ist bekannt, dass nur jeder 200. bis 500. physikalische Partikel infektiös ist [Tamayose et al., 1996]. Die Größe des hergestellten

Vektors ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Durch das Überschreiten der Wildtyp-Genomlänge von 4860 Basen kann es zu dem Phänomen kommen, dass die zu langen rAAV-2 Genome noch in Kapside eingebaut werden können, diese sich aber nicht mehr komplett verschließen können, wodurch es zu einem deutlichen Verlust der Infektiosität kommen kann. Die Genome werden aber bei dem DNS-Nachweis mittels Dot-Blot noch erkannt. Im Falle des verwendeten rAAV-2/C-FALDH, mit einer Transgenlänge von 1455 bp [Rizzo et al., 1999] konnte ein solches Phänomen ausgeschlossen werden. Die Größe des hergestellten Plasmids betrug 4501 bp, wodurch die Größe des Wildtyp AAV-2 nicht überschritten wurde.

4.1.12. Steigerung der FALDH-Transduktionseffizienz durch Hemmung von Proteasomen

Versuche an bronchialen Epithelzellen sowie an einzelnen Zelllinien zeigten, dass durch Hemmung von Proteasomen eine Erhöhung der rAAV-2 Transduktionseffizienz erreicht werden kann [Douar et al., 2001; Duan et al., 2000; Nicklin et al., 2001; Yan et al., 2002]. Der genaue Mechanismus ist nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass AAV-2 Partikel nach dem Entlassen aus den Endosomen vermehrt durch Proteasomen abgebaut werden, bevor sie in den Zellkern wandern können. Des Weiteren wird angenommen, dass die ubiquitinierten viralen Kapside von ihrem Weg in den Nucleus abkommen und in einer Art Sackgasse durch zelluläre Enzyme abgebaut werden [Yan et al., 2002]. Durch Steigerung der Ubiquitin-Proteasomenfunktion kann der intrazelluläre AAV-2 Transport vermehrt werden, wodurch sich die Transduktionseffizienz erhöhen lässt [Duan et al., 2000].

Die Arbeitsgruppe von Braun-Falco konnte bei Keratinozyten nachweisen, dass die Ubiquitinierung bei der Transfektion von Keratinozyten eine entscheidende Rolle spielt, da durch Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 die Transduktionseffizienz von AAV-2 Vektoren *in-vitro* drastisch gesteigert wurde. In diesen Versuchen wurden 37 % der Keratinozyten, im Vergleich zu den Kontrollen, mit GFP transduziert. Demnach spielt der intrazelluläre Transport der AAV-2 Partikel nach Transduktion bei Keratinozyten eine entscheidende Rolle. Der Effekt der Transduktionssteigerung war transient und in den ersten Tagen nach Transfektion am stärksten, wobei dieser im Laufe der Passagen stark abnahm [Braun-Falco et al., 2005].

Inwieweit durch den Proteasomeninhibitor MG132 eine Steigerung der Transduktionseffizienz in defekten SLS-Keratinozyten erreicht werden kann, wurde im Rahmen dieser

Arbeit untersucht. Die eingesetzte MG132 Konzentration richtete sich nach verwendeten Konzentrationen bei gesunden Keratinozyten [Braun-Falco et al., 2005].

FALDH-Aktivitäten transduzierter SLS-Zellen zeigten nach 11, 12, 14 und 18 Tagen Steigerungen der FALDH-Expressionen, im Vergleich zu unbehandelten SLS-Zellen, wobei Aktivitäten der FALDH-Transfektanten im Vergleich zu der gesunder Keratinozyten zwischen 17 % und 27 % lagen. Eine Abnahme der Enzymaktivität, was auf eine niedrigere Transduktionseffizienz schließen ließ, wurde in höheren Passagen beobachtet (3.5.2.1.2; Abb. 3.20).

4.1.13. Steigerung der FALDH-Transduktionseffizienz durch Steigerung der Doppelstrangsynthese

Seit langem ist bekannt, dass der limitierende Faktor bei Transduktionen mit rAAV-2 Vektoren die Doppelstrangsynthese ist, welche den viralen Einzelstrang in der Wirtszelle in einen Doppelstrang umschreibt [Alexander et al., 1994]. Durch Anwesenheit von Adenoviren, UV-Bestrahlung oder DNA-schädigende Agentien kann ein drastischer Anstieg der DNA-Polymerase innerhalb von 72 h nach Transduktion provoziert werden, wodurch die Expression des Transgenes gesteigert werden kann. Diese Methoden, sowie schädliche Gamma- Bestrahlung kommen jedoch für die Anwendung am Menschen nicht in Frage.

Es ist bekannt, dass einzelsträngige Virus-DNA nach Aufnahme in den Zellkern zunächst in ein Doppelstrangtranskript umgeschrieben werden muß, damit anschließend Proteine im Rahmen der Proteinbiosynthese an den Ribosomen gebildet werden können. Eine entscheidende Rolle bei der Doppelstrangsynthese spielt der Phosphorylierungszustand des Einzelstrang D-Sequenz-Bindungsproteins (ssD-BP), das ein zelluläres Protein ist und an das 3' Ende des AAV-Genoms bindet [Qing et al., 1997; 1998].

Die Doppelstrangsynthese von rAAV-2 Einzelsträngen wird blockiert, wenn der Phosphorylierungszustand von ssD-BP hoch ist. Ist umgekehrt der Phosphorylierungszustand niedrig, verliert sich die Bindung zur D-Sequenz, wodurch die Doppelstrangsynthese freigegeben wird. Die Phosphorylierung des ssD-BP-Proteins wird durch die Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R-TPK) beeinflusst [Mah et al. 1998]. Durch Hemmung des EGF-R-TPK wird der Phosphorylierungszustand von ssD-BP reduziert, wodurch die Doppelstrangsynthese zunimmt und die Transduktionseffizienz von AAV-2 gesteigert wird.

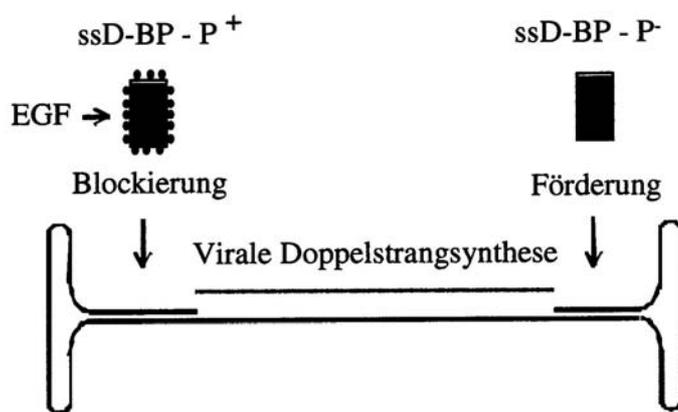


Abb. 4.1: Einfluß des Phosphorylierungszustands auf die virale Doppelstrangsynthese

Durch einen niederen Phosphorylierungszustand wird die virale Doppelstrangsynthese gefördert, der durch AG1478 gesteigert wird. Dieser Effekt wird gleichzeitig durch einen niedrigen EGF-Gehalt unterstützt.

Bei Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass EGF zu einer verstärkten Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase führt [Peus et al., 1997]. In Transduktionsversuchen an primären Keratinozyten mit AAV-2 Vektoren, die als Markergen GFP trugen, konnte gezeigt werden, dass AG1478 im Vergleich zu anderen Tyrosinkinaseinhibitoren die stärkste Potenz besaß, wodurch Expressionen, die bis über 10 Wochen hinweg stabil waren, erreicht wurden [Braun-Falco et al., 2005]. Entscheidend ist die gewählte Konzentration und Inkubationszeit der Zellen mit AG1478, da ab einer gewissen Dosis Wachstumstopp und Differenzierung bei den Keratinozyten induziert wird. Des Weiteren können die Zellen bei höheren Konzentrationen nicht mehr adhären und gehen in den Zelltod [Peus et al., 1997].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der verwendeten Dosis von 100 µM AG1478 und zweistündiger Inkubationszeit von AG1478 die besten Ergebnisse erzielt.

FALDH-transduzierte Zellen erreichten 34 Tage nach Transduktion 92 %, 25 Tage nach Transduktion, 63 % und 24 Tage nach Transduktion 24 % der FALDH Aktivität im

Vergleich zu gesunden Keratinozyten (3.5.2.4; Abb.:3.21). GFP-Expressionen SLS-transduzierter Keratinozyten wurden bis zu 34 Tage nach Transduktion mit rAAV-2/C-GFP beobachtet (3.5.1; Abb.:3.17).

4.1.14. Steigerung der Genexpression durch Selektion?

Eine weitere Möglichkeit Expressionssteigerung des Transgens zu erzielen besteht in der Selektion transduzierter Keratinozyten. Dies konnte bisher sowohl in einer *in-vitro* Hautkultur als auch *in-vivo* an einem Mausmodell erreicht werden. Bei dem verwendeten Vektor handelte es sich um einen bicistronischen Vektor, der neben dem Transgen noch ein Multiresistenzgen besaß, wodurch eine Selektion der positiven Zellen durch Inkubation mit Colchicin möglich war [Pfützner et al., 1999; 2002].

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass FALDH-transfizierte Zellen durch das Wiedereinbringen des FALDH-Gens gegenüber unbehandelten SLS-Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber von außen zugeführtem Octadecanal besitzen, wodurch eine Selektion der positiv-transfizierten Zellen möglich sein müsste (3.6.1, Abb.:3.23). Dadurch müsste sich auch der Anteil an positiv transfizierten Zellen steigern lassen, wohingegen nicht FALDH-transduzierte Zellen einen Wachstumsnachteil haben sollten.

4.1.15. Rekonstitution des SLS-Defekts in dreidimensionalen Epidermiskulturen

Dreidimensionale Epidermiskulturen stellen eine aus Keratinozyten kultivierte Epidermis dar, die im Aufbau den Schichten echter Epidermis täuschend ähnlich sein kann (3.7.2, Abb.:3.25). Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, künstlich ein Epidermisäquivalent zu züchten. Keratinozyten können hierbei entweder als einzelne Zellen oder als dünnes Häutchen im Zellverband transplantiert werden. Hautmodelle aus transgenen Keratinozyten, die mit einem Markergen transfiziert wurden, eignen sich zur schematischen Darstellung von Genexpressionen in der Epidermis. Säulenartig verlaufenden Expressionen (4.2.9, Abb.:4.4), die in der Basalmembran beginnen und durch die einzelnen Zellschichten des Hautmodells verlaufen, deuten darauf hin, dass Stammzellen in der Basalmembran getroffen wurden, wodurch eine Expression von über 40 Wochen erreicht werden konnte [Kolodka et al., 1998].

In dieser Arbeit wurden in Epidermisäquivalenten aus GFP-transduzierten SLS-Keratinocyten, grün-leuchtende Zellen in mehreren Epidermisschichten identifiziert, jedoch wurden keine säulenartigen Expressionen, wie in der unteren Grafik, festgestellt.

Hieraus könnte geschlossen werden, dass keine Stammzellen transduziert wurden (3.7.3, Abb.:3.26). Die Arbeitsgruppe von Braun-Falco konnte Langzeitexpressionen über 10 Wochen in GFP-transduzierten Keratinocyten feststellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein Langzeitgentransfer generell in Keratinocyten möglich ist [Braun-Falco et al., 2004; Büning et al., 2005].

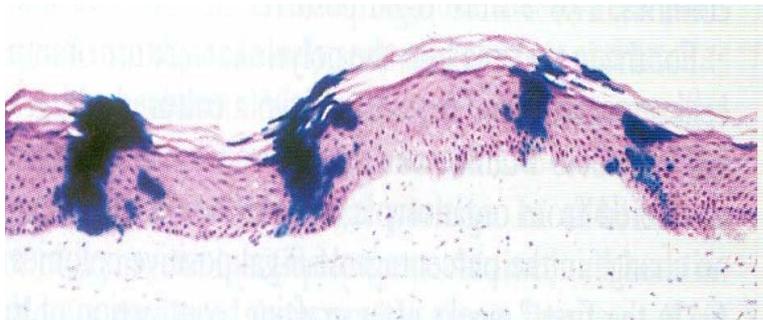


Abb.4.4: Säulenartige Expression von LacZ über einen Zeitraum von 40 Wochen [Kolodka et al., PNAS, 1998]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus rAAV-2/C-FALDH-transduzierten SLS-Keratinocyten, unbehandelten SLS-Keratinocyten und gesunden Keratinocyten dreidimensionale Hautkulturen hergestellt und versucht diese bezüglich ihrer Morphologie untereinander zu vergleichen, wobei auf Grund der Kultivierungsmethode hierzu keine klaren Aussagen zu treffen waren. Es zeigte sich, dass Kulturen aus FALDH-behandelten SLS-Zellen im Gegensatz zu Kulturen aus unbehandelten SLS-Zellen teilweise geringere Hyperkeratosen bildeten (3.7.2, Abb.:3.28).

Bisher stehen keine Arbeiten einer genetischen Rekonstitution des SLS-Defekts, weder *in-vitro* noch *in-vivo*, aus der Literatur zur Verfügung, wodurch es nicht möglich ist einen Vergleich zu ziehen.

In der Literatur gefundene *in-vitro* Genkorrekturen anderer autosomal-rezessive Genodermatosen werden nach dem selben Prinzip behandelt, wobei korrigierte dreidimensionale Epidermiskulturen häufig anschließend auf immundefiziente Mäuse, oder

Mäuse, die den selben Phänotyp der jeweiligen Genodermatose aufweisen, transplantiert werden, um eine *in-vivo* Genkorrektur darzustellen.

Aus korrigierten EBS-Zellen wurden nach erfolgreichem *in-vitro*-Gentransfer mittels LTR-Vektoren, die das funktionelle LAMB3-Gen enthielten, dreidimensionale Epidermisäquivalente hergestellt und diese auf SCID transplantiert. Nach 4-8 Wochen erfolgten histologische Untersuchungen, wobei in der Haut aus korrigierten Keratinozyten keine Trennung zwischen Dermis und Epidermis mehr zu finden waren. Im Gegensatz zeigte zu die Kultur aus nicht korrigierten Zellen eine Trennung, womit eine *in-vivo* Restoration der Haut aus Laminin 5 β 3-transfizierten Keratinozyten nachgewiesen werden konnte [Robbins et al., 2001]. COL7A1-korrigierte RDEB-Keratinozyten, und -Fibroblasten wurden nach Gentransfer mit lentiviralen Vektoren, zu dreidimensionalen Epidermisäquivalenten kultiviert und diese auf SCID-Mäuse transplantiert, wodurch eine *in-vivo* Restoration des Defekts dargestellt werden konnte [Chen et al., 2002].

XLI-Keratinozyten, die nach *in-vitro* Gentransfer mit Retroviren eine 100 % Aktivität der Steroidsulfatase erreichten, wurden als dreidimensionale Epidermisäquivalente auf SCID-Mäuse transplantiert, um eine *in-vivo*-Rekonstitution des Defekts darzustellen, wobei bis zu 5 Wochen nach Transplantation Steroidsulfatase durch Immunostaining nachgewiesen werden konnte [Freiberg et al., 1997].

4.1.16. Nachweis von FALDH in dreidimensionalen Epidermiskulturen aus korrigierten SLS-Keratinozyten

Bei SLS-Patienten kommt es durch Ausfall von FALDH gleichzeitig zu einer Reduktion der FADH, wobei diese bei SLS-Patienten unterschiedlich stark sein kann [Kawakami, 1999]. Hierdurch kommt es zu einer Ansammlung langkettiger Fettalkohole in der Epidermis, die wahrscheinlich für die Hauptsymptome in der Haut verantwortlich sind [Rizzo, 1993].

Histochemische Untersuchungen zeigten verminderte Alkoholdehydrogenaseaktivitäten (FADH) in der Epidermis von SLS-Patienten [Judge et al. 1990, Kobayashi 1999], die indirekt auf eine defekte FALDH schließen lassen. Hierbei zeigen Epidermisstücke von SLS-Patienten mit verminderten FALDH-Aktivitäten geringe bis überhaupt keine, blau-schwarze Formazanniederschläge, wohingegen in der Epidermis von gesunden Patienten deutlich blau-schwarze Niederschläge auftreten [Lake et al., 1991]. Diese Methode erlaubt eine schnelle Differenzierung zwischen gesunder und kranker Haut [Judge et al., 1990].

Durch den *in-situ* Nachweis epidermaler FALDH nach Judge konnte im Rahmen dieser Arbeit indirekt die Expression von FALDH in kultivierten Epidermisäquivalenten aus FALDH-korrigierten SLS-Zellen drei Wochen nach Transfektion nachgewiesen werden. In Epidermisstücken FALDH-rekombinanter Epidermiskulturen traten massive blau-schwarze Niederschläge auf, die deutlich intensiver waren, als in den Kontrollen aus SLS-Zellen, aber schwächer waren wie in den Kontrollen aus gesunden Zellen.

Hierdurch konnte fokale epidermale FALDH nachgewiesen werden und eine *in-vitro* Wiederherstellung gezeigt werden (3.7.2, Abb. 3.28).

Für das humane FALDH ist derzeit kein geeigneter Antikörper erhältlich [Rizzo et al., 1999]. Die erhältlichen Antikörper beschränken sich auf Ratten oder Mäuse-FALDH, die zwar in ihren Sequenzen über 84 % an Homologien aufweisen, aber keine 100 %ige Identität besitzen [Chang und Yoshida, 1996; Miyauchi et al., 1991; Vasiliou et al., 1996].

Sinnvoll wäre es, in fortführenden Forschungsarbeiten einen geeigneten FALDH-Antikörper zu entwickeln, um exprimiertes FALDH in der Epidermis direkt darstellen zu können.

4.2. Ausblick

Schwächen der Arbeit bestanden zum einen in der Darstellung morphologischer Unterschiede zwischen Hautkulturen aus SLS-, FALDH-transduzierten- und Keratinozyten, sowie in der Kultivierungsdauer rekombinant hergestellter Epidermiskulturen.

Bei der Darstellung morphologischer Unterschiede treten, bedingt durch die Kultivierungsmethode dreidimensionaler Hautäquivalente, vermehrt Hyperkeratosen auf. Deshalb ist es schwierig einen Vergleich zwischen den Kulturen zu ziehen.

Die Kultivierungsdauer der transfizierten Hautmodelle lag zwischen 14 und maximal 28 Tagen. Eine längere Kultivierung ist in diesem System nicht möglich, da die Hautkulturen bei längerer Kultivierungszeit starke Hyperkeratosen bilden. Um von einer Langzeitexpression sprechen zu können, sollte jedoch der Beobachtungszeitraum länger als 4 Wochen gewählt werden. Um von einer morphologischen *in-vivo* Rekonstitution des SLS-Defekts in dreidimensionalen Epidermiskulturen sprechen zu können, müssten die rekombinant kultivierten Epidermiskulturen auf ein entsprechendes Tiermodell transplantiert werden, um den Effekt über einen längeren Zeitraum beobachten zu können. Eine weitere Möglichkeit eine *ex-vivo* Wiederherstellung des FALDH-Defekts im Epidermisäquivalent darzustellen, könnte durch direkte Injektion rAAV-2 FALDH-Vektoren in die aus SLS-kultivierten Epidermiskulturen, bestehen.

Der Gruppe von Woodley gelang es, durch einen direkten *in-vivo* Gentransfer mittels inaktivierenden lentiviralen Vektoren, die ein funktionelles RDEB-Gen trugen, eine volle Reversion des RDEB-Phenotyps zu erreichen. Korrigierte RDEB-Zellen wurden direkt in die Haut von schweren immundefizienten Mäusen (SCID-Mäusen) injiziert, wodurch es möglich war, Transgenexpressionen bis zu 3 Monate nach Injektion zu beobachten [Woodley et al., 2004].

Weitere Forschungsarbeiten sollten daran anknüpfen ein geeignetes Mausmodell, mit dem morphologische Hautveränderungen, als auch neurologische Symptome nachverfolgt werden können, zu entwickeln. Zu befürchten ist, dass die Entwicklung eines solchen Mausmodells wahrscheinlich durch neonatalen Tod gekennzeichnet sein wird. Dies war der Fall bei einem Mausmodell das ähnliche klinische Erscheinungsbilder wie SLS-Patienten hatte. Bei diesen Mäusen liegt ein Defekt in dem *Fatp4*- Gen vor, welches für den Fettsäuretransport langkettiger Fettsäuren verantwortlich ist. Durch die gestörte Fettsäureaufnahme kommt es zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung langkettiger Fettsäuren in der Epidermis. Die Haut der *Fatp4*-null Mäuse ist durch eine hyperproliferative Hyperkeratose mit einer nicht mehr funktionsfähigen epidermalen Schutzfunktion gekennzeichnet. Zusätzlich zeigen die Mäuse eine verminderte Größe und Kontrakturen, wodurch ihre Bewegungen stark vermindert sind. Die Mäusen starben alle kurz nach Geburt [Herrmann et al., 2003].

Die gleichen Probleme traten in Mausmodellen auf, die das Erscheinungsbild einer rezessiven Ichtyose, oder das des Netherton-Syndroms widerspiegeln [Kuramoto et al., 2002; Hewett et al., 2005].

Eine alternative Strategie würde in der Xenotransplantation humaner SLS-Keratinocyten auf Nacktmäuse bestehen. In diesem Modell muß zunächst der Einfluß endogener, muriner FALDH auf humane SLS-Keratinocyten evaluiert werden.

Günstig erscheinen indizierbare Tiermodelle, die das jeweilige genetische Krankheitsbild repräsentieren. Erst kürzlich wurden zwei Mausmodelle mit einem Keratindefekt entwickelt. Bei den Mausmodellen von EBS und EHK wird das jeweilige Gen erst durch Auftragen einer toxischen Substanz induziert [Arin et al., 2001; Cao et al., 2001]. Diese Methode bietet den Vorteil, dass nur kleine Areale von der Mutation betroffen sind, so dass der Phänotyp nicht, wie bei den Tiermodellen bei denen sich die Mutation über das ganze Tier erstreckt, kurz nach der Geburt stirbt.

Denkbar wäre es, dass epidermal exprimierte FALDH auch andere Gewebe, bei denen ein FALDH-Defekt vorliegt, über die Blutbahn transportiert werden könnte, da die in der Epidermis produzierten Proteine über die Blutbahn sezerniert werden können [Fenjves et al.,

1989; Teumer et al. 1990; Gerrard et al., 1993]. Theoretisch könnten Patienten, die in einem sehr frühen Stadium, in dem das Krankheitsbild nur durch die generalisierte Ichtyosis geprägt ist und mentale Retardierung, sowie Spastiken noch nicht aufgetreten sind, durch Transplantation eines FALDH-korrigierten Epidermisstücks behandelt werden. Die Idee einer Gen-Creme [Hengge, 2001] würde optimale Voraussetzungen für die Therapie bieten, da der rAAV-2/C-FALDH-Vektor direkt auf die hauptsächlich betroffenen Hautstellen an Nacken und den Extremitäten aufgetragen werden könnte.

Weitere Schwächen lagen in der Transduktionseffizienz von SLS-Zellen mittels rAAV-2 Vektoren, ohne Zusatz von AG1478 (3.5.3.1; Abb.:3.18). Obwohl AAV-2 Vektoren durch weitere Fortschritte den nicht-viralen und teilweise den viralen Transfektionsmethoden überlegen sind, müssen bezüglich der Gentransfereffizienz, der Expressionsdauer und des spezifischen Zelltargetings epidermaler Stammzellen weitere Forschungsarbeiten betrieben werden [Büning et al., 2004].

Eine Möglichkeit, einen höheren Prozentsatz an Keratinozytenstammzellen zu erzielen, und dadurch eine höhere Effizienz und Expressionsdauer des gewünschten Transgens zu erreichen, könnte darin bestehen, an die Oberfläche des AAV-2 Vektors einen entsprechenden Antikörper, Anti-CD29, zu koppeln, der ausschließlich an β_1 -Integrin, welches von den Keratinozytenstammzellen vermehrt gebildet wird [Büning et al., 2004; Jones und Watt, 1993], bindet. Hierdurch wäre gleichzeitig ein gerichteter Gentransfer ausschließlich in Keratinozytenstammzellen möglich.

Alternative Gentransferstrategien könnten in der gerichteten Transduktion von neuronalem Gewebe oder in der systemischen Verteilung von FALDH nach intramuskulärem Gentransfer bestehen. Bei der Genkorrektur der Hämophilie wurde dies mittels Gentransfer von rAAV-2 Vektoren in Muskelzellen erreicht [Manno et al., 2003].

4.3. Zusammenfassung der Arbeit

Das Sjögren-Larsson Syndrom ist eine autosomal-rezessive-Genodermatose, die klinisch durch die Trias einer kongenitalen Ichtyose, mentaler Retardierung und Spastiken gekennzeichnet ist. Ursache dafür sind verschiedene Mutationen in dem für Fetaldehyddehydrogenase (FALDH) kodierenden Gen, woraus eine verminderte FALDH-Aktivität resultiert. FALDH ist ein mikrosomales Enzym, das Teil des Fattalkohol:-Nicotinamidadenindinukleotid-Oxidoreduktasekomplexes (FAO:NAD⁺-Oxidoreduktase) ist, der präferentiell langkettige Fattalkohole über Aldehydintermediate zu entsprechenden

Fettsäuren metabolisiert. Durch Ausfall der FALDH kommt es gleichzeitig zu einer Reduktion der Fettkoholdehydrogenase (FADH) wodurch es zu einer Anreicherung langkettiger Fettkohole und anderer Metaboliten aus dem Fettstoffwechsel kommt.

Eine kausale Therapie ist derzeit für SLS-Patienten nicht vorhanden. Ein therapeutischer Ansatz besteht darin, das funktionelle Gen für FALDH durch Gentransfer in SLS-Zellen einzubringen.

Ziel dieser Arbeit war es, erste Grundlagen für dieses gentherapeutische Konzept mittels rekombinanten-Adeno-assoziierten-Virusvektoren in SLS-Keratinocyten zu erarbeiten. Die zur Transfektion verwendeten AAV-2 Vektoren erscheinen als geeignet, da diese nicht human-pathogen sind, geringe Immunogenität besitzen, neben der spezifischen Integration in das Wirtsgenom teilende und nicht teilungsfähige Zellen transduzieren können und eine dauerhafte Genexpressionen sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* herbeiführen können.

Im ersten Versuchsteil wurde eine FALDH-defekte FAA.K-Zelllinie mit rAAV-2/C-FALDH transduziert und die FALDH-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transduktion bestimmt. Die transduzierten Zellen erreichten bis zu 100 % der Aktivität intakter CHO-Zellen. Nach Octadecanalinkubation überlebten bis zu 9-mal mehr FALDH-Transfektanten als GFP-Transfektanten.

Im zweiten Versuchsteil wurden defekte SLS-Keratinocyten mit rAAV-2/C-FALDH-Vektoren transduziert. FALDH-Transfektanten erreichten 34 Tage nach Transduktion zwischen 92 %, SLS-Keratinocyten 10 % FALDH-Aktivität bezogen auf eine 100 % Aktivität gesunder Keratinocyten. Dies entsprach dem Aktivitätsniveau heterozygoter Merkmalsträger, die phänotypisch gesund sind bei einer verminderten FALDH-Aktivität zwischen 50 % und 60 % im Vergleich zu gesunden Keratinocyten.

FALDH-transfizierte SLS-Zellen hatten nach Octadecanalinkubation einen viermal größeren prozentualen Anteil überlebender Zellen als die Kontrolle (GFP).

In kultivierten dreidimensionalen Hautkulturen aus FALDH-transfizierten Keratinocyten konnten durch *in-situ* Darstellung epithelialer FALDH eine gesteigerte FALDH-Expression in den FALDH-rekombinanten Hautkulturen nachgewiesen werden.

Damit sind erste Schritte einer Rekonstitution des FALDH-Defektes in humanen SLS-Keratinocyten mittels Gentransfer von rAAV-2 Vektoren gelungen und die Grundlagen einer gentherapeutischen Korrektur des Sjögren-Larsson Syndroms geschaffen worden.

5. Literatur

Aberdam D, Galliano MF, Vailly J (1994) Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is genetically linked to the mutations in the nicein/kalinin (laminin-5) LAMC2 gene. *Nat Genet* 6: 299-304.

Agrawal N, You H, Liu Y, Chiriva-Internati M, Bremner J, Garg T, Grizzi F, Krishna Prasad C, Mehta JL, Hermonat PL (2004) Generation of recombinant skin in vitro by adeno-associated virus type 2 vector transduction. *Tissue Eng* 10: 1707-1715.

Aitken ML, Moss RB, Waltz DA, Dovey ME, Tonelli MR, McNamara SC, Gibson RL, Ramsey BW, Carter BJ, Reynolds TC (2001) A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 12: 1907-1916.

Alexander IE, Russell DW, Miller AD (1994) DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 68: 8282-8287.

Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, Cotsarelis G, Yoon K (2000) Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 18: 43-47.

Allen JM, Debelak DJ, Reynolds TC, Miller AD (1997) Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol* 71: 6816-6822.

Andoh T, Kuraishi Y (1998) Intradermal leukotriene B₄, but not prostaglandin E₂, induces itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol* 353: 93-96.

Aoki N, Suzuki H, Ito K, Ito M (2000) A novel point mutation of the FALDH gene in a Japanese family with Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 114: 1065-1066.

Arin MJ, Longley MA, Wang XJ, Roop DR (2001) Focal activation of a mutant allele defines the role of stem cells in mosaic skin disorders. *J Cell Biol* 152: 645-649.

Archetti I, Bereczky E, Bocciarelli DS (1966) A small virus associated with the simian adenovirus SV11. *Virology* 29: 671-675.

Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149:754-756.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1987) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, USA.

Baek SC, Lin Q, Robbins PB, Fan H, Khavari PA (2001) Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue. *Hum Gene Ther* 12: 1551-1558.

Bale S, Compton J, Russel L, DiGiovanna J (1996) Genetic heterogeneity in lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* 107: 140-141.

- Barrandon Y, Morgan JR, Mulligan RC, Green H (1989) Restoration of growth potential in paraclones of human keratinocytes by a viral oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4102-4106.
- Benhamida S, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A, Zhao-Emonet JC, Cavazzana-Calvo M, Rocchiccioli F, Fichelson S, Aubourg P, Charneau P, Cartier N (2003) Transduced CD34+ cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Mol Ther* 7: 317-324.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Blaese RM, Mullen CA, Ramsey WJ (1993) Strategies for gene therapy. *Pathol Biol (Paris)* 41: 672-676.
- Botquin V, Cid-Arregui A, Schlehofer JR (1994) Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *J Gen Virol* 75: 2655-2662.
- Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complex. *J Invest Dermatol* 112: 411-418.
- Boyce ST, Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81(Suppl): 33s-40s.
- Braun-Falco M, Hallek M (1998) Hautgentherapie- Perspektiven des Gentransfers in Keratinozyten. *Hautarzt* 49: 536-544.
- Braun-Falco M, Doenecke A, Smola H, Hallek M (1999) Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 6: 432-441.
- Braun-Falco M, Eisenried A, Buning H, Ring J (2005) Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer into human keratinocytes is influenced by both the ubiquitin/proteasome pathway and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Arch Dermatol Res* 296: 528-535.
- Bravermann N, Steel G, Obie C, Moser H, Gould SJ, Valle D (1997) Huma PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nature Genet* 15: 369-376.
- Büning H, Braun-Falco M, Hallek M (2004) Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Cells Tissue Organs* 177: 139-150.
- Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981) Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *Virology* 40: 241-247.
- Cao T, Wang XJ, Roop DR (2000) Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor. *Hum Gene Ther* 11: 2297-2300.
- Cao T, Longley MA, Wang XJ, Roop DR (2001) An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex: implications for gene therapy. *J Cell Biol* 152: 651-656.
- Carney G, Wei S, Rizzo WB (2004) Sjogren-Larsson syndrome: seven novel mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene ALDH3A2. *Hum Mutat* 24: 186.

- Cartier N, Lopez J, Moullier P, Rocchiccioli F, Rolland MO, Jorge P, Mosser J, Mandel JL, Bougneres PF, Danos O (1995) Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1674-1678.
- Chang C, Yoshida A (1997) Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression. *Genomics* 40: 80-85.
- Check E (2003) Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy. *Nature* 423: 573-574.
- Chen M, O'Toole EA, Mühlenhoff M, Medina E, Kasahara N, Woodley D (2000) Development and Characterization of A Recombinant Truncated Type VII Collagen "Minigene". *J Biol Chem* 275: 24429-24435.
- Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, Barcova M, Cannon PM, Mazurek C, Woodley DT (2002) Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 32: 670-675.
- Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI (1980) Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33: 739-748.
- Choate KA, Kinsella TM, Williams ML, Nolan GP, Khavari PA (1996) Transglutaminase 1 delivery to lamellar ichtyosis keratinocytes. *Hum Gene Ther* 7: 2247-2253.
- Choate KA, Khavari PA (1997) Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Hum Gene Ther* 8: 895-901.
- Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404-410.
- Crystal RG, Sondhi D, Hackett NR, Kaminsky SM, Worgall S, Stieg P, Souweidane M, Hosain S, Heier L, Ballon D, Dinner M, Wisniewski K, Kaplitt M, Greenwald BM, Howell JD, Strybing K, Dyke J, Voss H (2004) Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Gene Ther* 15: 1131-1154.
- De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG, Markova N, Rizzo WB (1996) Sjogren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet* 12: 52-57.
- De Laurenzi V, Rogers GR, Tarcsa E, Carney G, Marekov L, Bale SJ, Compton JG, Markova N, Steinert PM, Rizzo WB (1997) Sjogren-Larsson syndrome is caused by a common mutation in northern European and Swedish patients. *J Invest Dermatol* 109: 79-83.
- Dellambra E, Pellegrini G, Guerra L, Ferrari G, Zambruno G, Mavilio F, De Luca M (2000) Toward epidermal stem cell-mediated ex vivo gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 11: 2283-2287.

- Demozay D, Rocchi S, Mas JC, Grillo S, Pirola L, Chavey C, Van Obberghen E (2004) Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J Biol Chem* 279: 6261-6270.
- Deodato B, Arsic N, Zentilin L, Galeano M, Santoro D, Torre V, Altavilla D, Valdembri D, Bussolino F, Squadrito F, Giacca M (2002) Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing. *Gene Ther* 9:777-785.
- Van Domburg PH, Willemsen MA, Rotteveel JJ, de Jong JG, Thijssen HO, Heerschap A, Cruysberg JR, Wanders RJ, Gabreels FJ, Steijlen PM (1999) Sjogren-Larsson syndrome: clinical and MRI/MRS findings in FALDH-deficient patients. *Neurology* 52: 1345-1352.
- Donahue BA, McArthur JG, Spratt SK, Bohl D, Lagarde C, Sanchez L, Kaspar BA, Sloan BA, Lee YL, Danos O, Snyder RO (1999) Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *Gene Med* 1: 31-42.
- Dong JY, Fan PD, Frizzell RA (1996) Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 7: 2101-2112.
- Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75: 1824-1833.
- Dranoff G, Mulligan RC (1995) Gene transfer as cancer therapy. *Adv Immunol* 58: 417-454.
- Driskell RA, Engelhardt JF (2003) Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annu Rev Physiol* 65: 585-612.
- Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, Fisher KJ, Engelhardt JF (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 72: 8568-8577.
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF (2000) Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 105:1573-87.
- During MJ, Kaplitt MG, Stern MB, Eidelberg D (2001) Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 12: 1589-1591.
- Fenjves ES, Gordon DA, Pershing LK, Williams DL, Taichman LB (1989) Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8803-8807.
- Fenjves ES (1994) Approaches to gene transfer in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103: 70S-75S.
- Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, Carter BJ (1993) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268: 3781-3790.

Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, Heald AE, Pedersen P, Beck S, Conrad CK, Brass-Ernst L, Humphries M, Sullivan K, Wetzel R, Taylor G, Carter BJ, Guggino WB (2003) Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 14:1079-1088.

Fox JL (2003) FDA panel recommends easing gene therapy trial limits. *Nat Biotechnol* 21: 344-345.

Freiberg RA, Choate KA, Deng H, Alperin ES, Shapiro LJ, Khavari PA (1997) A model of corrective gene transfer in x-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 6: 927-933.

Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, Gagnoux-Palacios L, Larcher F, Lacour JP, Meneguzzi G (2004) Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 15: 921-933.

Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Squadrito G, Seminara P, Marini H, Stagno d'Alcontres F, Colonna M, Calo M, Lo Cascio P, Torre V, Giacca M, Venuti FS, Squadrito F (2003) Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Crit Care Med* 31: 1017-1025.

Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Cucinotta D, Arsic N, Marini H, Torre V, Giacca M, Squadrito F (2003) Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetologia* 46: 546-555.

Gerrard AJ, Hudson DL, Brownlee GG, Watt FM (1993) Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat Genet* 3:180-183.

Ghazizadeh S, Kalish RS, Taichman LB (2003) Immune-mediated loss of transgene expression in skin: Implications for cutaneous gene therapy. *Mol Ther* 7: 294-295.

Ghazizadeh S, Katz AB, Harrington R, Taichman LB (2004) Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 9: 269-275.

Gerry HW, Kelly TJ Jr, Berns KI (1973) Arrangement of nucleotide sequences in adeno-associated virus DNA. *J Mol Biol* 79: 207-225.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.

Greenhalgh DA, Rothnagel JA, Roop DR (1994) Epidermis: an attractive target tissue for gene therapy. *J Invest Dermatol* 103: 63S-69S.

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335-341.

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348: 255-256.

Hallek M, Wendtner CM (1996) Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors for somatic gene therapy: recent advances and potential clinical applications. *Cytokines Mol Ther* 2: 69-79.

Haug S, Braun-Falco M (2005) Adeno-associated virus vectors are able to restore fatty aldehyde dehydrogenase-deficiency. Implications for gene therapy in Sjogren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 296: 568-72.

Hengge UR, Mirmohammadsadegh A (2000) Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis. *Mol Ther* 2: 188-194.

Hengge U (2001) The skin as protein factory. Healthy and beautiful with gene cream? *MMW Fortschr Med*. 143: 13.

Hengge UR (2005) Progress and prospects of skin gene therapy: a ten year history. *Clin Dermatol* 23: 107-114.

Herrmann T, van der Hoeven F, Grone HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, Liebisch G, Gosch I, Buchkremer F, Drobnik W, Schmitz G, Stremmel W (2003) Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J Cell Biol* 161: 1105-1115.

Hewett DR, Simons AL, Mangan NE, Jolin HE, Green SM, Fallon PG, McKenzie AN (2005) Lethal, neonatal ichthyosis with increased proteolytic processing of filaggrin in a mouse model of Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 14: 335-346.

Heymans HAS, Oorthuys JWE, Nelck G, Wanders RJA, Dingemans KP, Schutgens RBH (1986) Peroxisomal abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Inher Metab Dis* 9: 329-331.

High KA (2003) Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 29: 107-120.

High KA (2004) Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 30: 257-267.

Hoefler G, Hoefler S, Watkins PA, Chen WW, Moser A, Baldwin V, McGillivray B, Charrow J, Friedman JM, Rutledge L, Hashimoto T, Moser HW (1988) Biochemical abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Pediatr* 112: 726-733.

Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55: 1467-1474.

Holzmann H, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J, Bernd A (1994) Cell and tissue culture models in dermatology. The Frankfurt Center of Dermatology establishes models *Hautarzt* 45: 304-312.

Ichihara K, Kusunose E, Noda Y, Kusunose M (1986) Some properties of the fatty alcohol oxidation system and reconstitution of microsomal oxidation activity in intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 878: 412-418.

Irvine AD, McLean WH (2003) The molecular genetics of the genodermatoses: progress to date and future directions. *Br J Dermatol* 148: 1-13.

Iselius L, Jagell S (1989) Sjogren-Larsson syndrome in Sweden: distribution of the gene. *Clin Genet* 35: 272-275.

Ito M, Oguro K, Sato Y (1991) Ultrastructural study of the skin in Sjogren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* 283: 141-148.

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4: 549-553.

James PF, Rizzo WB, Lee J, Zoeller RA (1990) Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell line deficient in fatty alcohol:NAD⁺ oxidoreductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6102-6106.

James PF, Zoeller RA (1997) Isolation of animal cell mutants defective in long-chain fatty aldehyde dehydrogenase. Sensitivity to fatty aldehydes and Schiff's base modification of phospholipids: implications for Sjogren-Larsson syndrome. *J Biol Chem* 272: 23532-23539.

Janson C, McPhee S, Bilaniuk L, Haselgrove J, Testaiuti M, Freese A, Wang DJ, Shera D, Hurh P, Rupin J, Saslow E, Goldfarb O, Goldberg M, Larijani G, Sharrar W, Liouterman L, Camp A, Kolodny E, Samulski J, Leone P (2002) Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum Gene Ther* 13: 1391-1412.

Jensen TG (2004) Strategies for long-term gene expression in the skin to treat metabolic disorders. *Expert Opin Biol Ther* 4: 677-682.

Jones PH, Watt FM (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73: 713-724.

Judge MR, Lake BD, Smith VV, Besley GT, Harper JI (1990) Depletion of alcohol (hexanol) dehydrogenase activity in the epidermis and jejunal mucosa in Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 95: 632-4.

Kaiser J (2003) Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 299: 495.

Kawakami T (1999) Incomplete Sjogren-Larsson syndrome in two Japanese siblings. *Dermatology* 198: 93-96.

Khavari PA (1998) Gene therapy for genetic skin disease. *J Invest Dermatol* 110: 462-467.

Khavari PA (2000) Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Hum Gene Ther* 11: 2277-2282.

- Khavari PA, Rollman O, Vahlquist A (2002) Cutaneous gene transfer for skin and systemic diseases. *J Intern Med* 252: 1-10.
- Kelson TL, Craft DA, Rizzo WB (1992) Carrier detection for Sjogren-Larsson syndrome. *J Inherit Metab Dis* 15: 105-111.
- Kelson TL, Secor McVoy JR, Rizzo WB. Kelson TL, Secor McVoy JR, Rizzo WB (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1335: 99-110.
- Koczot FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA (1973) Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 215-219.
- Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC (2003) Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 3: 477-488.
- Koivula T (1975) Subcellular distribution and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase fractions. *Life Sci* 16: 1563-1569.
- Kolodka TM, Garlick JA, Taichman LB (1998) Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4356-4361.
- Koone MD, Rizzo WB, Elias PM, Williams ML, Lightner V, Pinnell SR (1990) Ichthyosis, mental retardation, and asymptomatic spasticity. A new neurocutaneous syndrome with normal fatty alcohol: NAD⁺ oxidoreductase activity. *Arch Dermatol* 126: 1485-1490.
- Kotin RM, Berns KI (1989) Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170: 460-470.
- Kousseff BG, Matsuoka LY, Stenn KS, Hobbins JC, Mahoney MJ, Hashimoto K (1982) Prenatal diagnosis of Sjogren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 101: 998-1001.
- Kraus C, Braun-Quentin C, Ballhausen WG, Pfeiffer RA (2000) RNA-based mutation screening in German families with Sjogren-Larsson syndrome. *Eur J Hum Genet* 8: 299-306.
- Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ (1998) In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 4: 285-290.
- Kuhn U, Terunuma A, Pflutzner W, Foster RA, Vogel JC (2002) In vivo assessment of gene delivery to keratinocytes by lentiviral vectors. *Virology* 76: 1496-1504.
- Kuramoto N, Takizawa T, Takizawa T, Matsuki M, Morioka H, Robinson JM, Yamanishi K (2002) Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *J Clin Invest* 109: 243-250.
- Lacour M, Middleton-Price HR, Harper JI (1996) Confirmation of linkage of Sjogren-Larsson syndrome to chromosome 17 in families of different ethnic origins. *J Med Genet* 33: 258-259.

Lake BD, Smith VV, Judge MR, Harper JI, Besley GT (1991) Hexanol dehydrogenase activity shown by enzyme histochemistry on skin biopsies allows differentiation of Sjogren-Larsson syndrome from other ichthyoses. *J Inher Metab Dis* 14: 338-340.

Labow MA, Berns KI (1988) The adeno-associated virus rep gene inhibits replication of an adeno-associated virus/simian virus 40 hybrid genome in cos-7 cells. *J Virol* 62: 1705-1712.

Laughlin CA, Cardellicchio CB, Coon HC (1986) Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 60: 515-524.

Lee T (1979) Characterization of fatty alcohol:NAD⁺ oxidoreductase from rat liver. *J Biol Chem* 254: 2892-2896.

Leiden JM (1995) Gene therapy--promise, pitfalls and prognosis. *N Engl J Med* 333: 871-3.

Leigh IM, Watt FM (1994) *Keratinocyte Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.

Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ (1984) Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 225: 743-750.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K, Noser F (1989) Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol* 92: 758-762.

Lin MT, Wang F, Uitto J, Yoon K (2001) Differential expression of tissue-specific promoters by gene gun. *Br J Dermatol* 144: 34-39.

Lin Z, Carney G, Rizzo WB (2000) Genomic organization, expression, and alternate splicing of the mouse fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab* 71: 496-505.

Lindahl R, Petersen DR (1991) Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases. *Biochem Pharmacol* 41:1583-1587.

Lindahl R (1992) Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Biochem Mol Biol* 27: 283-335.

Lo WD, Qu G, Sferra TJ, Clark R, Chen R, Johnson PR (1999) Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum Gene Ther* 10: 201-213.

Lowry O, Rosebrough, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Lundqvist K, Schmidtchen A (2001) Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *Br J Dermatol* 144: 254-259.

Maaswinkel-Mooij PD, Brouwer OF, Rizzo WB (1994) Unsuccessful dietary treatment of Sjögren-Larsson syndrome. *J Pediatr* 124: 748-750.

Magnaldo T, Sarasin A (2004) Xeroderma pigmentosum: from symptoms and genetics to gene-based skin therapy *Cells Tissues Organs* 177: 189-98.

- Mah C, Qing K, Khuntirat B, Ponnazhagan S, Wang XS, Kube DM, Yoder MC, Srivastava A (1998) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J Virol* 72: 9835-9843.
- Mandel RJ, Burger C (2004) Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: promises and challenges. *Curr Opin Mol Ther* 6: 482-490.
- Manning WC, Zhou S, Bland MP, Escobedo A, Dwarki V (1998) Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 9: 477-485.
- Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B (2003) AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963-2972.
- Marshall E (1995) Gene therapy's growing pains. *Science* 269: 1050-1055.
- Marshall E (2002) Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 298: 34-35.
- Marshall E (2003) Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 299: 320.
- Martinez M (2001) Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J Mol Neurosci* 16: 309-316.
- Masaki R, Yamamoto A, Tashiro Y (1994) Microsomal aldehyde dehydrogenase is localized to the endoplasmic reticulum via its carboxyl-terminal 35 amino acids. *J Cell Biol* 126: 1407-1420.
- Mathor MB, Ferrari G, Dellambra E, Cilli M, Mavilio F, Cancedda R, De Luca M (1996) Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10371-10376.
- Matsuoka LY, Kousseff BG, Hashimoto K (1982) Studies of the skin in Sjogren-Larsson syndrome by electron microscopy. *Am J Dermatopathol* 4: 295-301.
- McLaughlin SK, Collis P, Hermonat PL, Muzyczka N (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62:1963-1973.
- McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA (1985) Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *J Virol* 47: 217-222.
- Miller HI (2000) Gene therapy on trial. *Science* 287: 591-592.
- Mitchell DY, Petersen DR (1989) Metabolism of the glutathione-acrolein adduct, S-(2-aldehyde-ethyl)glutathione, by rat liver alcohol and aldehyde dehydrogenase. *J Pharmacol Exp Ther* 251:193-198.
- Miyauchi K, Masaki R, Taketani S, Yamamoto A, Akayama M, Tashiro Y (1991) Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA for rat liver microsomal aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 266: 19536-19542.

- Möhrenschlager M, Rizzo WB, Kraus CS, Limbrock J, Cohen M, Anton-Lamprecht I, Abeck D, Ring J (2000) Sjogren-Larsson syndrome. *Hautarzt* 51: 250-255.
- Moll I (1996) Differential epithelial outgrowth of plucked and microdissected human hair follicles in explant culture. *Arch Dermatol Res* 288: 604-610.
- Morgan RA, Anderson WF (1993) Human Gene Therapy. *Annu Rev Biochem* 62:191-217.
- Moser AB, Jones DS, Raymond GV, Moser HW (1999) Plasma and red blood cell fatty acids in peroxisomal disorders. *Neurochem Res* 24: 187-197.
- Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE (2004) Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125: 509-521.
- Muzyczka N (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129.
- Nahreini P, Srivastava A (1989) Rescue and replication of the adeno-associated virus 2 genome in mortal and immortal human cells. *Intervirology* 30:74-85.
- Nakayasu H, Mihara K, Sato R (1978) Purification and properties of a membrane-bound aldehyde dehydrogenase from rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 697-703.
- Navsaria H, Myers S, Leigh I, McKay I (1995) Culturing skin in vitro for wound therapy *Trends Biotechnol* 13: 91-100.
- Nicklin S, Buening H, Dishart K, de Alwis M, Girod A, Hacker U, Thrasher AJ, Ali R, Hallek M, Baker AH (2001) Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* 4: 174-181.
- Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y (1998) Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91: 30-36.
- Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* 8: 137-146.
- Peus D, Hamacher L, Pittelkow MR (1997) EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 109: 751-756.
- Pfützner W, Hengge UR, Joari MA, Foster RA, Vogel JC (1999) Selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene in an in vitro skin model presents a strategy for enhancing gene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 10: 2811-2821.
- Pfützner W, Terunuma A, Tock CL, Snead EK, Kolodka TM, Gottesman MM, Taichman L, Vogel JC (2002) Topical colchicine selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene (MDR1) can sustain and enhance transgene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13096-13101.

Plank C, Anton M, Rudolph C, Rosenecker J, Krotz F (2003) Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert Opin Biol Ther* 3: 745-758.

Ponnazhagan S, Wang XS, Woody MJ, Luo F, Kang LY, Nallari ML, Munshi NC, Zhou SZ, Srivastava A (1996) Differential expression in human cells from the p6 promoter of human parvovirus B19 following plasmid transfection and recombinant adeno-associated virus 2 (AAV) infection: human megakaryocytic leukaemia cells are non-permissive for AAV infection. *J Gen Virol* 77: 1111-1122.

Powers JM, Moser HW (1998) Peroxisomal Disorders: Genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol* 8: 101-120.

Pulkkinen L, Uitto J (1999) Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18:29-42.

Qing K, Wang XS, Kube DM, Ponnazhagan S, Bajpai A, Srivastava A (1997) Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10879-10884.

Qing K, Khuntirat B, Mah C, Kube DM, Wang XS, Ponnazhagan S, Zhou S, Dwarki VJ, Yoder MC, Srivastava A (1998) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* 72: 1593-1599.

Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould SJ (1997) Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* 17: 445-448.

Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-343.

Rikimaru K, Moles JP, Watt FM (1997) Correlation between hyperproliferation and suprabasal integrin expression in human epidermis reconstituted in culture. *Exp Dermatol* 6: 214-221.

Rizzo WB, Craft DA, Dammann AL, Phillips MW (1987) Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for a fatty alcohol cycle. *J Biol Chem* 262:17412-17419.

Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA (1988) Sjogren-Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol:nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest* 81: 738-744.

Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA, Black SH, Tilton AH, Africk D, Chaves-Carballo E, Holmgren G, Jagell S (1989) Sjogren-Larsson syndrome: inherited defect in the fatty alcohol cycle. *J Pediatr* 115: 228-234.

Rizzo WB and Craft DA (1991) Sjögren-Larsson syndrome. Deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase component of fatty alcohol:NAD⁺ oxidoreductase in cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 88: 1643-1648.

- Rizzo WB (1993) Sjogren-Larsson syndrome. *Semin Dermatol* 12: 210-218.
- Rizzo WB, Craft DA, Judd LL, Moser HW, Moser AB (1993) Fatty alcohol accumulation in the autosomal recessive form of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Biochem Med Metab Biol* 50: 93-102.
- Rizzo WB, Craft DA, Kelson TL, Bonnefont JP, Saudubray JM, Schulman JD, Black SH, Tabsh K, Dirocco M, Gardner RJ (1994) Prenatal diagnosis of Sjogren-Larsson syndrome using enzymatic methods. *Prenat Diagn* 14: 577-581.
- Rizzo WB, Carney G, de Laurenzi V (1997) A common deletion mutation in European patients with Sjogren-Larsson syndrome. *Biochem Mol Med* 62: 178-181.
- Rizzo WB (1998) Inherited disorders of fatty alcohol metabolism. *Mol Genet Metab* 65: 63-73.
- Rizzo WB, Carney G, Lin Z (1999) The molecular basis of Sjogren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Am J Hum Genet* 65: 1547-1560.
- Rizzo WB and Craft DA (2000) Sjögren-Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. *J Lipid Res* 41: 1077-1081.
- Rizzo WB, Lin Z, Carney G (2001) Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjogren-Larsson syndrome. *Chem Biol Interact* 130-132: 297-307.
- Robbins PB, Lin Q, Goodnough JB, Tian H, Chen X, Khavari PA (2001) In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5193-5198.
- Rogers GR, Markova NG, De Laurenzi V, Rizzo WB, Compton JG (1997) Genomic organization and expression of the human fatty aldehyde dehydrogenase gene (FALDH). *Genomics* 39: 127-135.
- Rolling F, Shen WY, Tabarias H, Constable I, Kanagasingham Y, Barry CJ, Rakoczy PE (1999) Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography. *Hum Gene Ther* 10: 641-648.
- Rose JA, Maizel JV Jr, Inman JK, Shatkin AJ (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 8: 766-670.
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Samulski RJ, Srivastava A, Berns KI, Muzyczka N (1983) Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* 33: 135-143.
- Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1987) A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61: 3096-3101.

- Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63: 3822-3828.
- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10: 3941-3950.
- Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, Engelhardt JF (2001) Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 1: 137-147.
- Sawamura D, Yasukawa K, Kodama K, Yokota K, Sato-Matsumura KC, Toshihiro T, Shimizu H (2002) The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product. *J Invest Dermatol* 118: 967-971.
- Scherer W, Syverton J, Gey (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710.
- Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P (1985) Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73.
- Sillen A, Holmgren G, Wadelius C (1997), First prenatal diagnosis by mutation analysis in a family with Sjogren-Larsson syndrome. *Prenat Diagn* 17: 1147-1149.
- Sillen A, Jagell S, Wadelius C (1997). A missense mutation in the FALDH gene identified in Sjogren-Larsson syndrome patients originating from the northern part of Sweden. *Hum Genet* 100: 201-203.
- Sillen A, Anton-Lamprecht I, Braun-Quentin C, Kraus CS, Sayli BS, Ayuso C, Jagell S, Kuster W, Wadelius C (1998) Spectrum of mutations and sequence variants in the FALDH gene in patients with Sjogren-Larsson syndrome. *Hum Mutat* 12: 377-384.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112.
- Snyder RO, Spratt SK, Lagarde C, Bohl D, Kaspar B, Sloan B, Cohen LK, Danos O (1997) Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* 8: 1891-1900.
- Spirito F, Meneguzzi G, Danos O, Mezzina M (2001) Cutaneous gene transfer and therapy: the present and the future. *J Gene Med* 3: 21-31.
- Stephenson J (2001) Studies illuminate cause of fatal reaction in gene-therapy trial. *JAMA* 285: 2570.
- Summerford C, Samulski RJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72: 1438-1445.

- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5: 78-82.
- Sutyak J, Austen KF, Sobermann RJ (1989) Identification of an aldehyde dehydrogenase in the microsomes of human polymorphonuclear leukocytes that metabolizes 20-aldehyde leukotriene B4. *J Biol Chem* 264:14818-14823.
- Tabsh K, Rizzo WB, Holbrook K, Theroux N (1993) Sjogren-Larsson syndrome: technique and timing of prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 82: 700-703.
- Takagi Y, Ito A, Omura T (1985) Biogenesis of microsomal aldehyde dehydrogenase in rat liver. *J Biochem* 98: 1647-1652.
- Tamayose K, Hirai Y, Shimada T (1996) A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum Gene Ther* 7: 507-513.
- Teumer J, Lindahl A, Green H (1990) Human growth hormone in the blood of athymic mice grafted with cultures of hormone-secreting human keratinocytes. *FASEB J* 4: 3245-3450.
- Tsukamoto N, Chang C, Yoshida A (1997) Mutations associated with Sjogren-Larsson syndrome. *Ann Hum Genet* 61: 235-242.
- Uitto J, Pulkkinen L (2000) The genodermatoses: candidate diseases for gene therapy. *Hum Gene Ther* 11: 2267-2275.
- van den Brink DM, van Miert JM, Wanders RJ (2005) Assay for Sjogren-Larsson syndrome based on a deficiency of phytol degradation. *Clin Chem* 51: 240-242.
- Vasiliou V, Kozak CA, Lindahl R, Nebert DW (1996) Mouse microsomal Class 3 aldehyde dehydrogenase: AHD3 cDNA sequence, inducibility by dioxin and clofibrate, and genetic mapping *DNA Cell Biol* 15: 235-245.
- Verhoeven NM, Jakobs C, Carney G, Somers MP, Wanders RJ, Rizzo WB (1998) Involvement of microsomal fatty aldehyde dehydrogenase in the alpha-oxidation of phytanic acid. *FEBS Lett* 429: 225-228.
- Vezzani A (2004) Gene therapy in epilepsy. *Epilepsy Curr* 4: 87-90.
- Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH, Moran ML, Batson EP, Dimiceli S, Brown BW, Desch JK, Norbash AM, Conrad CK, Guggino WB, Flotte TR, Wine JJ, Carter BJ, Reynolds TC, Moss RB, Gardner P.A (2002) phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther*. 13: 1349-1359.
- Willemsen MA, Steijlen PM, de Jong JG, Rotteveel JJ, IJ1st L, van Werkhoven MA, Wanders RJ (1999) A novel 4 bp deletion mutation in the FALDH gene segregating in a Turkish family with Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* 112: 827-828.
- Willemsen MA, Cruysberg JR, Rotteveel JJ, Aandekerck AL, Van Domburg PH, Deutman AF (2000) Juvenile macular dystrophy associated with deficient activity of fatty aldehyde dehydrogenase in Sjogren-Larsson syndrome. *Am J Ophthalmol* 130: 782-790.

- Willemsen MA, Lutt MA, Steijlen PM, Cruysberg JR, van der Graaf M, Nijhuis-van der Sanden MW, Pasma JW, Mayatepek E, Rotteveel JJ (2001) Clinical and biochemical effects of zileuton in patients with the Sjogren-Larsson syndrome. *Eur J Pediatr* 160: 711-717.
- Willemsen MA, Rotteveel JJ, de Jong JG, Wanders RJ, IJlst L, Hoffmann GF, Mayatepek E (2001) Defective metabolism of leukotriene B₄ in the Sjogren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci* 183: 61-67.
- Willemsen MA, IJlst L, Steijlen PM, Rotteveel JJ, de Jong JG, van Domburg PH, Mayatepek E, Gabreels FJ, Wanders RJ (2001) Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjogren-Larsson syndrome. *Brain* 124: 1426-1437.
- William M, Elias P (1987) Genetically transmitted, generalized disorders of cornification. *Dermatol Clin* 5:155-178.
- Woodley DT, Keene DR, Atha T, Huang Y, Ram R, Kasahara N, Chen M (2004) Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther* 10: 318-326.
- Wraight CJ, White PJ, McKean SC, Fogarty RD, Venables DJ, Liepe IJ, Edmondson SR, Werther GA (2000) Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18: 521-526.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10:816-820
- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1996) Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 70: 8098-8108.
- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232.
- Yan Z, Zak R, Luxton GW, Ritchie TC, Bantel-Schaal U, Engelhardt JF (2002) Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* 76: 2043-2053.
- Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, Rabussay DP (2002) Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim Biophys Acta* 1572:1-9.
- Zeng L, Quilliet X, Chevallier-Lagente O, Eveno E, Sarasin A, Mezzina M (1997) Retrovirus-mediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C. *Gene Ther* 4: 1077-84.
- Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth W, Guy J, Muzyczka N (1996) "Humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol* 70: 4646-4654.
- Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N (1999) Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6: 973-985.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Stefanie, Marianne Haug
Geboren	9 Mai 1974
Geburtsort	Pforzheim
Eltern	Barbara Haug, geb. Sigel, Dr. Thomas Haug

Schulische Ausbildung :

Grundschule	1981-1985 Südstadtschule Pforzheim
Gymnasium	1985-1994 Hebel-Gymnasium Pforzheim
Fremdsprachen:	Englisch, Latein, Französisch
Abschluß	Abitur 1994

Universität:

Universität	1995-2000 Pharmaziestudium Johann-Goethe Universität Mainz
Examina	1997 Erstes Staatsexamen 2000 Zweites Staatsexamen 2001 Drittes Staatsexamen
Approbation	1 Juni 2001

Berufliche Tätigkeit

Oktober 2001 Doktorandin der dermatologischen
Klinik der Technischen Universität München

Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU-München

Oktober 2001- März 2004

Experimentelle Arbeiten wurden im Zentrum für
Allergie und Umwelt der Dermatologie am Bieder-
stein ausgeführt.

Stipendium "Förderung des Forschens und
Gleichberechtigung für Frauen an der TUM"

Juni 2004 - November 2004.

Seit November 2004 Zusammenfassung der Thesen
der Doktorarbeit und Fertigstellung der
wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Seit Mai 2005 als Apothekerin in einer öffentlichen
Apotheke tätig.

7. Veröffentlichungen

Publikationen

S. Haug, M. Braun-Falco (2005)

Adeno-associated virus vectors are able to restore fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in vitro. Implications for gene therapy of Sjögren-Larsson syndrome
Arch Dermatol Res 296: 568-572.

S. Haug, Braun-Falco (2006)

Restoration of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in Sjögren-Larsson syndrome
Gene Ther 13:1021-1026.

Abstrakte

S. Haug, A. Eisenried, J. Ring, M. Braun-Falco (2003) Transduction with recombinant adeno-associated virus vectors containing the gene for functional fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) allows elevation of FALDH-activity in a FALDH-deficient cell line

Poster presentation at the 2nd International Symposium on Molecular Diagnostics and Skin Gene Therapy, Düsseldorf, 27-29.03.2003
J Gene Medicine 5: S22, P16

M. Braun-Falco, S. Haug, H. Büning (2004)

Adeno-associated virus vectors are able to restore FALDH-deficiency in cells of Sjögren-Larsson syndrome
Poster presentation at the American Society of Gene Therapy, 7. Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, 02.-06.2004

M. Braun-Falco, S. Haug, H. Büning (2004)

In vitro-restoration of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in keratinocytes of patients with Sjögren-Larsson syndrome
European Society of Dermatological Research, Annual Meeting, Vienna, 07.-11.09.2004

