

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische

Pharmakologie und Toxikologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

Vektorbasierte Genexpression in Gehirnendothelzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

vorgelegt von

Hanna Graßhoff

aus Lübeck

Lübeck, 2020

1. Berichtstatter / Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger
 2. Berichtstatter / Berichtstatterin: Priv.-Doz. Dr. Sc. (Universität Belgrad) Ana Westenberger
- Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2021
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 24.09.2021
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Aufbau der neurovaskulären Einheit der Blut-Hirn-Schranke	3
2.2 AAV mit modifiziertem Kapsid: AAV-BR1	8
2.3 Gentherapie unter Verwendung des Vektors AAV-BR1 am Beispiel des Morbus Sandhoff...17	
2.4 Erhöhung der gehirndothelzellspezifischen Genexpression unter Verwendung eines gehirndothelzellspezifischen Promoters	28
2.5 Informationen zu den verwendeten Promotoren.....	30
2.6 Fragestellung der Arbeit	43
3 Material	44
3.1 Geräte	44
3.2 Verbrauchsmaterialien	47
3.3 Allgemeine Chemikalien	48
3.4 Medien, Puffer, Lösungen.....	50
3.5 Kits, Enzyme	53
3.6 Nukleinsäuren	54
3.6.1 Primer	54
3.6.2 Plasmide.....	58
3.7 DNA-Leitern	76
3.8 Zelllinien.....	76
3.9 Versuchstiere	77
3.10 Antikörper.....	77
3.10.1 Primärantikörper	77
3.10.2 Sekundärantikörper	77
3.11 Software.....	78
4 Methoden	79
4.1 Molekularbiologische Methoden	79
4.1.1 Generierung von Plasmiden.....	79
4.1.2 Isolation von genomischer DNA aus Schwanz- oder Ohrlochbiopsien von Mäusen	87
4.1.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion.....	88
4.2 Zellkultur.....	89
4.2.1 Isolation und Kultur von primären Gehirndothelzellen von Mäusen	89
4.2.2 Isolation und Kultur von primären Gehirndothelzellen aus Schweinegehirnen	90

4.2.3 Kultur von immortalisierten humanen Gehirndothelzellen der Zelllinie hCMEC/D3 ..	90
4.2.4 Isolation und Kultur von primären corticalen Astrozyten aus Mausgehirnen	91
4.2.5 Lipofektion	92
4.2.6 rAAV _{HEK} -Isolation von HEK293-Zellen	93
4.2.7 Aufreinigung von rAAV _{HEK} mittels Affinitätschromatographie	94
4.3 Histologische Methoden.....	94
4.3.1 Anfertigung von histologischen Schnitten	94
4.3.2 Immunhistochemische Färbungen	95
4.3.2 PAS-Färbung.....	96
4.3.3 Nachweis der vektorexprimierten mRNA für die β -Hexosaminidase A und B mittels RNAscope®	97
4.4 Tierexperimentelle Methoden.....	98
4.4.1 Das Sandhoff-Mausmodell.....	98
4.4.2 Das Incontinentia pigmenti-Mausmodell	99
4.4.3 Haltung und Zucht von Mäusen	100
4.4.4 Intravenöse Vektoradministration	100
4.4.5 Euthanasie und Organentnahme	101
4.5 Statistische Auswertung	102
5 Ergebnisse.....	105
5.1 Entwicklung einer Gentherapie in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff	105
5.1.1 Generierung von Plasmiden zur Untersuchung der vektorbasierten Gentherapie im Mausmodell des Morbus Sandhoff	105
5.1.2 Untersuchung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Expression der β -Hexosaminidase	106
5.1.3 Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B verbessert das Überleben sowie die Symptome nach Injektion zum Zeitpunkt P0/1 und P25-30	109
5.1.4 Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B reduziert die Glycosphingolipid- Akkumulation im Gehirn.....	117
5.2 Erhöhung der gehirndothelzellspezifischen, vektorbasierten Genexpression durch Anwendung der Methode des „Transcriptional Targetings“	120
5.2.1 Generierung von Plasmiden zur Identifizierung einer gehirndothelzell-spezifischen Promotersequenz.....	121
5.2.2 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der kurzen genregulatorischen Sequenzelemente <i>in vitro</i> in primären Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen sowie in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3.....	1233
5.2.3 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der verwendeten synthetischen Promotersequenzen <i>in vitro</i> in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3	1322

5.2.4 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität synthetischer Promotersequenzen <i>in vitro</i> in aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten.....	139
5.2.5 Untersuchung der cerebralen Genexpression <i>in vivo</i> nach Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation verschiedener synthetischer Promoterkonstrukte exprimieren.....	143
5.2.6 Untersuchung der extracerebralen Genexpression <i>in vivo</i> nach Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation verschiedener synthetischer Promoterkonstrukte exprimieren.....	149
5.3 Sicherheitsprofil des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO	153
6 Diskussion und Ausblick	155
6.1 Entwicklung einer Gentherapie in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff	155
6.2 Erhöhung der gehirndothelzellspezifischen, vektorbasierten Genexpression durch Anwendung der Methode des „Transcriptional Targetings“	160
6.3 Sicherheitsprofil des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO	166
6.4 Zusammenfassende Beurteilung.....	168
7 Literaturverzeichnis.....	169
8 Anhänge	183
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	183
8.2 Tabellenverzeichnis	185
8.3 Weitere Anhänge	187
8.3.1 Abbruchkriterien und Scoring zur Einschätzung der momentanen Belastung aus dem Tierversuchsantrag V 242-7224.122-22 (35-4/18).....	187
8.3.2 Sequenzen der untersuchten Promotoren	188
9 Abkürzungsverzeichnis.....	193
10 Lebenslauf.....	195
11 Danksagung	196

1.1 Zusammenfassung

Das Gehirn ist als Steuerzentrale des menschlichen Organismus vor schädigenden externen Einflüssen durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine selektive physiologische Barriere zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Blutkreislauf, die von Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, Neuronen und extrazellulärer Matrix gebildet wird. Das Vorliegen der Blut-Hirn-Schranke stellt jedoch ein zentrales Hindernis bei der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob eine spezifische vektorbasierte Genexpression in Gehirndothelzellen mittels rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren mit modifiziertem Kapsid (AAV-BR1) einen möglichen Behandlungsansatz zur Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems darstellt (1). Exemplarisch wurde als Modellerkrankung die autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung Morbus Sandhoff untersucht, bei der es bei Erkrankten durch eine Defizienz des Enzyms β -Hexosaminidase zur Akkumulation von Gangliosiden in Lysosomen von Mikroglia sowie Neuronen und im weiteren Verlauf zur Neurodegeneration kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff zeigen, dass die spezifische vektorbasierte Genexpression in Gehirndothelzellen einen effektiven therapeutischen Ansatz darstellt und durch vektorbasierte Gentherapie die Gangliosidakkumulation im Gehirn vermindert werden kann. Ein zentrales Risiko bei der vektorbasierten Gentherapie besteht in dem onkogenen Potential der Vektoren. Um das onkogene Risiko sowie die benötigte Vektordosis zu reduzieren, beschäftigt sich diese Arbeit zudem mit der Entwicklung einer synthetischen Gensequenz, die zu einer spezifischen Genexpression in Gehirndothelzellen im Sinne des „Transcriptional Targetings“ führt. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit die Langzeit-Sicherheit des Kapsid-modifizierten Vektors AAV-BR1 in Mäusen bis zu einem Alter von elf Monaten untersucht. Nach einem Zeitraum von elf Monaten ergaben sich keine Hinweise auf die Entwicklung von Tumoren oder die Entwicklung von Organinsuffizienzen. Zusammenfassend stellt die vektorbasierte Genexpression in Gehirndothelzellen einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen dar.

1.2 Abstract

The brain forms the control center of the human organism and because of this the brain is protected from damaging external influences through the blood-brain barrier. The blood-brain barrier is a selective physiological barrier between the central nervous system and the bloodstream formed by endothelial cells, pericytes, astrocytes, microglia, neurons and extracellular matrix. However, the presence of the blood-brain barrier is a major obstacle in the treatment of central nervous system disorders. In this work, we investigated whether a blood-brain barrier endothelial specific vector which was generated by modifying the capsid of an adeno-associated viruses (AAV-BR1) represents a possible treatment approach for the treatment of diseases of the central nervous system. As a model disease, the autosomal recessive inherited Sandhoff's disease was investigated. In Sandhoff's disease a deficiency of the enzyme hexosaminidase leads to an accumulation of gangliosides in lysosomes of microglia and neurons which finally results in neurodegeneration. In a mouse model of Sandhoff's disease, we demonstrated that a specific vector-based gene expression in cerebral endothelial cells is a therapeutic approach to improve the outcome. Moreover, vector-based gene therapy reduces ganglioside accumulation in the brain. A key risk in vector-based gene therapy is the oncogenic potential of the vectors. To reduce the oncogenic risk as well as the required vector dose, this work additionally deals with the development of a synthetic gene sequence, which leads to a specific gene expression in brain endothelial cells following the concept of transcriptional targeting. Moreover, the long-term safety of the capsid-modified vector AAV-BR1 used in mice up to an age of eleven months was investigated in this work. Eleven months post vector injection there was no evidence of tumor development or organ failure detectable. In summary, vector-based gene expression in brain endothelial cells represents a promising approach for the treatment of neurodegenerative diseases.

2 Einleitung

2.1 Aufbau der neurovaskulären Einheit der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn gilt als Steuerzentrale des menschlichen Körpers: Es ermöglicht durch eine hochdifferenzierte Sinnesverarbeitung eine rasche Wahrnehmung von Veränderungen der Umwelt und anschließend koordinierte Reaktionen auf diese Veränderungen. Darüber hinaus ermöglicht das Gehirn die Entwicklung eines Gedächtnisses, die Fähigkeit zum Lernen und zur Kommunikation mit anderen Organismen und das Vorhandensein eines Bewusstseins, folglich ist das Gehirn essenziell für zentrale Elemente des Menschseins.

In Anbetracht der herausragenden Bedeutung des Gehirns für das Überleben eines Organismus sowie seines im Vergleich zu seiner Größe überproportionalen Energieverbrauchs (20% der dem Körper zur Verfügung stehenden Energieressourcen) scheint es verwunderlich, dass das Gehirn über keine eigenen Energiereserven verfügt und so auf eine externe Versorgung mit Nährstoffen angewiesen ist. Diese externe Versorgung mit Nährstoffen erfolgt über die cerebralen Blutgefäße, die aus der linken und rechten Arteria carotis interna sowie aus der linken und rechten Arteria vertebralis entspringen. Damit das Gehirn als zentrale Steuerzentrale des menschlichen Körpers vor schädigenden Einflüssen geschützt ist, wurden im Rahmen der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt. Zum Schutz vor mechanischen Schäden ist das Gehirn von Knochen umgeben und in Liquor gebettet. Essenziell für den Schutz vor chemischen Einflüssen ist die Blut-Hirn-Schranke.

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine hochselektive Barriere zwischen den Blutgefäßen, die das zentrale Nervensystem versorgen, und dem zentralen Nervensystem selbst: So ist die Blut-Hirn-Schranke einerseits essenziell für die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen, andererseits aber auch für den Abtransport von Metaboliten. Darüber hinaus verhindert die Blut-Hirn-Schranke den unkontrollierten Übertritt von Pathogenen, Immunzellen und polaren sowie apolaren Substanzen ins Gehirn. Um sowohl eine Schutz-, als auch eine Versorgungsfunktion für das Gehirn zu übernehmen, müssen die Strukturen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, sowohl über Barrieremechanismen als auch über Transportmechanismen verfügen.

Erste Beobachtungen, die auf die Existenz eines Barrieremechanismus zwischen den Blutgefäßen und dem Gehirn hinwiesen, wurden 1885 von Paul Ehrlich, einem deutschen Arzt und Naturforscher, gemacht, der beobachtete, dass nach Infusion eines Farbstoffes alle Gewebe bis auf das Gehirngewebe gefärbt wurden. Diese Beobachtung führte er zunächst auf eine niedrige Affinität des Gehirngewebes zum Farbstoff zurück (2).

Fünfzehn Jahre später, im Jahr 1900, beobachtete Lewandowsky, dass es nach Injektion von Neurotoxinen ins Gehirn zu neuronalem Zelltod kam. Das Vorkommen von neuronalem Zelltod konnte aber nicht nach intravenöser Injektion der Neurotoxine beobachtet werden. Ausgehend von dieser Beobachtung postulierte Lewandowsky erstmalig das Konzept eines Barrieremechanismus, der das Gehirn schützt (3). Das Konzept des Vorhandenseins eines Barrieremechanismus wurde 1913 durch ein Experiment von Goldmann bekräftigt. Goldmann injizierte Trypanblau ins Gehirn und beobachtete, dass es zu einer ausgeprägten Färbung des Gehirns, aber zu keiner Färbung anderer Gewebe kam. Mithilfe dieses Experiments konnte ausgeschlossen werden, dass eine geringe Affinität des Farbstoffs zum Hirngewebe für die initialen Beobachtungen von Paul Ehrlich verantwortlich war (4).

Aufgrund einer fehlenden histologischen Struktur, die mit einem Barrieremechanismus korreliert werden konnte, blieb die Funktionsweise und die Zusammensetzung der Blut-Hirn-Schranke bis 1967 unklar. In diesem Jahr konnten Reese und Karnovsky die Existenz der Blut-Hirn-Schranke mittels Rasterelektronenmikroskopuntersuchungen nachweisen (5). 2001 wurde im Rahmen des Treffens der „Stroke Progress Review Group“ des „National Institute of Neurological Disorders and Stroke“ das Konzept der neurovaskulären Einheit formuliert, um das enge Zusammenspiel zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss zu betonen. Seit 2001 wurde das Konzept der neurovaskulären Einheit weiterentwickelt, sodass in diesem Modell nun neben Endothelzellen und Neuronen auch die multiplen Interaktionen und Einflüsse von Perizyten, Astrozyten, Myozyten, Mikroglia und der extrazellulären Matrix auf die Transport- und Barrieremechanismen der Blut-Hirn-Schranke berücksichtigt werden (Abb. 1) (6).

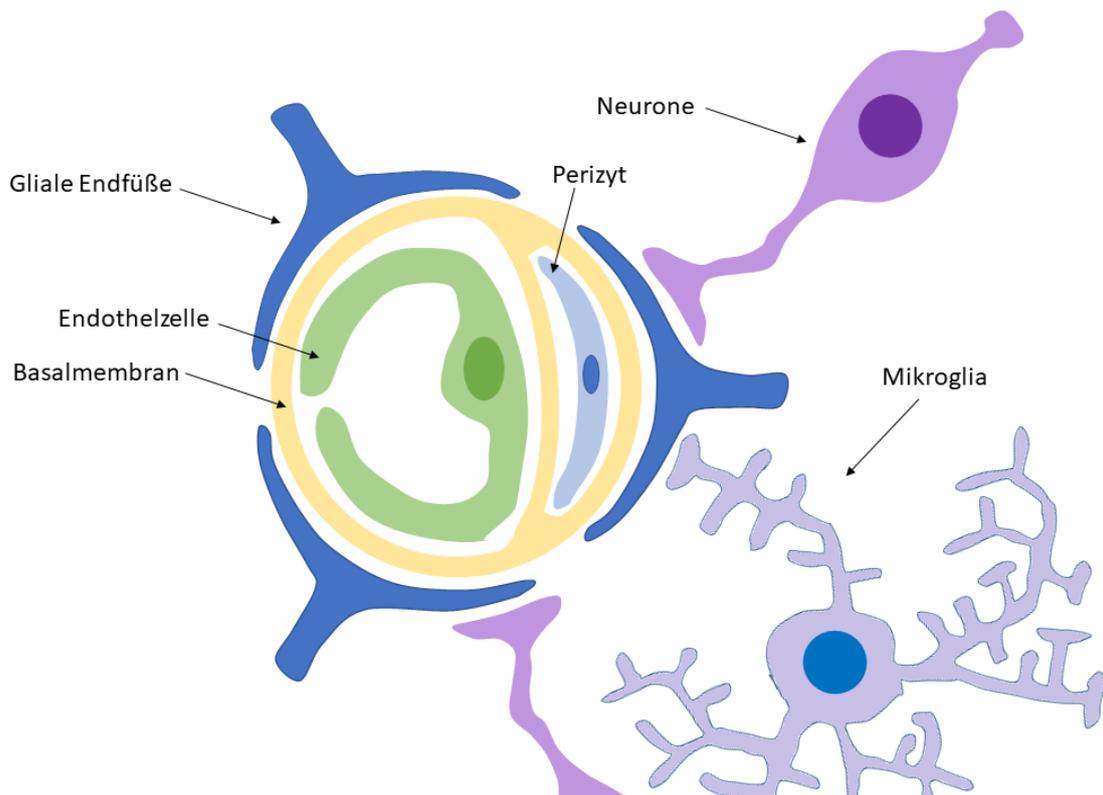


Abb. 1: Übersicht über den Aufbau der neurovaskulären Einheit bestehend aus Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Mikrogliia, extrazellulären Matrixproteinen und Neuronen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere die Rolle der Endothelzellen im Konzept der neurovaskulären Einheit untersucht. Dabei wird ein spezieller Fokus darauf gelegt, die Endothelzellen als Tor zum Gehirn zu nutzen, um therapeutische Ansätze für neurologische und neurodegenerative Erkrankungen zu entwickeln.

So wie alle Endothelzellen des Körpers haben die zerebralen Kapillarendothelzellen ihren Ursprung im Mesoderm (7). Die Differenzierung zu zerebralen Kapillarendothelzellen erfolgt im Rahmen der Migration der Zellen durch Einflüsse von umgebenden Zellen.

Die Bedeutung der Einflüsse umgebender Zellen konnte 1981 von Stewart und Wiley gezeigt werden: Nach Transplantation von embryonalem Darmgewebe von Hühnern in embryonales Hirngewebe von Wachteln entwickelten Endothelzellen im transplantierten embryonalen Darmgewebe Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke. Endothelzellen aus embryonalem Hirngewebe, das in embryonales Darmgewebe transplantiert wurde, entwickelten nicht die für die Blut-Hirn-Schranke typischen Eigenschaften (8).

Dieses Experiment von Stewart und Wiley betont, dass sich Endothelzellen in ihren Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Position im Gefäßbaum sowie in Abhängigkeit des von ihnen vaskularisierten Organs unterscheiden. Für die Entwicklung sowie für eine physiologische Funktionsweise des Gehirns ist es essenziell, dass sich die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in wesentlichen Eigenschaften von Endothelzellen in anderen Gefäßbetten des Körpers unterscheiden. Dies trifft insbesondere auf die kleinen Gefäßsegmente zu, zu denen die Kapillaren und die postkapillären Venolen zählen, die unter dem Begriff der Mikrovaskulatur zusammengefasst werden. Die essenzielle Bedeutung der physiologischen Funktionsweise der Mikrovaskulatur für den Ablauf neurologischer Prozesse lässt sich unter anderem daran erkennen, dass pathologische Veränderungen der Mikrovaskulatur zu schweren Erkrankungen führen können. Ein Beispiel für eine cerebrale Kleingefäßerkrankung ist z.B. die CADASIL-Erkrankung. Darüber hinaus spielt die Mikrovaskulatur eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie zahlreicher neurologischer Erkrankungen wie z.B. der akuten und chronischen zerebralen Ischämie, Multipler Sklerose oder Schädel-Hirn-Traumata, bei denen es zu einer Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke durch Degradation der „Tight Junctions“ zwischen den Gehirnendothelzellen durch im Rahmen des Erkrankungsprozesses freigesetzte Radikale und Proteasen kommen kann. Durch die sich im Verlauf der Erkrankungen entwickelnden Störungen der Pathophysiologie der Blut-Hirn-Schranke kann es zu einem deutlichen Progress der Erkrankungen kommen (9). Demgegenüber sind Gehirnendothelzellen aber auch essentiell im Heilungsprozess neuronaler Erkrankungen, indem sie Angiogenese betreiben können (10).

Ursächlich für die zentrale Bedeutung der Gehirnendothelzellen im Rahmen der Pathophysiologie verschiedenster neurovaskulärer, neurologischer sowie neurodegenerativer Erkrankungen ist, dass diese Zellen im Konzept der neurovaskulären Einheit die zentrale physiologische Barriere zwischen Blut und zentralem Nervensystem darstellen. Für diese Barrierefunktion verfügen die Gehirnendothelzellen über zahlreiche physikalische, chemische und metabolische Mechanismen, die über Interaktionen mit anderen Zellen der neurovaskulären Einheit sowie über Interaktionen mit Immunzellen reguliert werden.

Ein Aspekt, in dem sich Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke wesentlich von Endothelzellen anderer Gewebe unterscheiden, ist der Aufbau der Gefäßarchitektur. Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, umgeben die komplette Zirkumferenz der Gehirnkapillaren. Die dabei aneinander liegenden Membranen der einzelnen Endothelzelle sowie die einzelnen Endothelzellen untereinander sind über „Tight Junctions“ miteinander verbunden (5, 11, 12). Als „Tight Junctions“ bezeichnet man bandförmige enge Adhäsionen benachbarter Zellmembranen. Die „Tight Junctions“ behindern den parazellulären Molekültransport, sodass hydrophile Moleküle mit einer Größe über 0,2 nm die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren können. Die „Tight Junctions“ unterteilen die Zellmembran in einen luminalen und abluminalen Teil. Ein weiteres Merkmal von mikrovaskulären Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, ist, dass diese Zellen im Vergleich zu Endothelzellen anderer Gewebe sehr dünn sind (13). Coomber und Stewart zeigten 1985, dass Gehirnendothelzellen fast 40% dünner als muskuläre Endothelzellen sind, sodass zwischen dem Gefäßlumen der Mikrovaskulatur und dem Gehirnparenchym nur eine Distanz von ca. 0,25 µm besteht (14).

Neben der Ausbildung von „Tight Junctions“ sowie der geringen Zelldicke zeigen Gehirnendothelzellen weitere Charakteristika, die Endothelzellen in anderen Geweben nicht zeigen. Dazu gehören die Ausbildung einer kontinuierlichen Basalmembran, das Fehlen von Fenestrations- und Interzellularspalten sowie eine niedrige Expression der Leukozyten-Adhäsions-Moleküle (LAM), was zu einem geringen Übertritt von Immunzellen in das Gehirn führt (15). Darüber hinaus zeigen Gehirnendothelzellen eine geringe Ausprägung der Pino- und Endozytoseaktivität sowie eine geringe Transzytoserate, wodurch der transzelluläre Transport von Substanzen vom Gefäßlumen zum Gehirnparenchym nur in sehr eingeschränktem Umfang stattfinden kann (16).

Zusammenfassend ist folglich sowohl der parazelluläre Substanztransport durch die Ausbildung von „Tight Junctions“ als auch der transzelluläre Substanztransport in Gehirnendothelzellen stark beschränkt. Eine weitere Möglichkeit für insbesondere lipophile Substanzen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, ist die Diffusion über die Zellmembran. Um diesen zunächst unreguliert stattfindenden Transportmechanismus zu kontrollieren, exprimieren Gehirnendothelzellen Effluxtransporter, die die über die Zellmembran diffundierten, lipophilen Substanzen wieder aus der Zelle

hinaustransportieren (17). Ein vierter bekannter Transportmechanismus neben dem parazellulären, dem transzellulären sowie dem passiven Transport von Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke ist die Expression von hochspezifischen Nährstofftransportern, die den Transport von spezifischen Substraten über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn sowie von spezifischen Abfallstoffen über die Blut-Hirn-Schranke ins Blut ermöglichen (18). Um ausreichend ATP zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten bereitzustellen, die für die Funktion der hochspezifischen Substrattransporter essenziell sind, ist der Mitochondriengehalt in Gehirnendothelzellen im Vergleich zu Endothelzellen anderer Gewebe erhöht (19). Ein von den oben beschriebenen Eigenschaften und Aufbau des Gehirnendothels abweichendes Endothel liegt in den circumventrikulären Organen wie z.B. der medianen Eminenz oder der Area postrema vor, in denen das Endothel fenestriert ist und so eine hohe passive Permeabilität für Substanzen ermöglicht (20).

2.2 AAV mit modifiziertem Kapsid: AAV-BR1

Das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke sowie die sehr strikt regulierten Barriere Mechanismen zwischen den cerebralen Blutgefäßen und dem Gehirn selbst stellen eminente Hindernisse in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar, da zahlreiche potentielle Therapeutika die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nur in geringem Umfang überwinden können (21). Um therapeutische Effekte im Gehirn erzielen zu können, wäre es in vielen Fällen notwendig, die periphere Konzentration von Pharmaka drastisch zu erhöhen. Diese Konzentrationssteigerung könnte aber vielfach zu einer kaum abschätzbaren, durch das Pharmakon vermittelten Toxizität und so zu einem vermehrten Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Somit ist eine systemisch applizierte medikamentöse Behandlung neurologischer Erkrankungen, wie z.B. von Gehirntumoren, lysosomalen Speicherkrankheiten oder Encephalitiden, nur in sehr begrenztem Umfang mit den im klinischen Setting etablierten Pharmaka und Methoden möglich. Um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und so dringend benötigte Therapieoptionen für neurologische Erkrankungen zu entwickeln, wurden im Laufe der vergangenen Jahre verschiedene Techniken angewandt. Die entwickelten Techniken können, wie in Abbildung 2 dargestellt, eingeteilt werden.

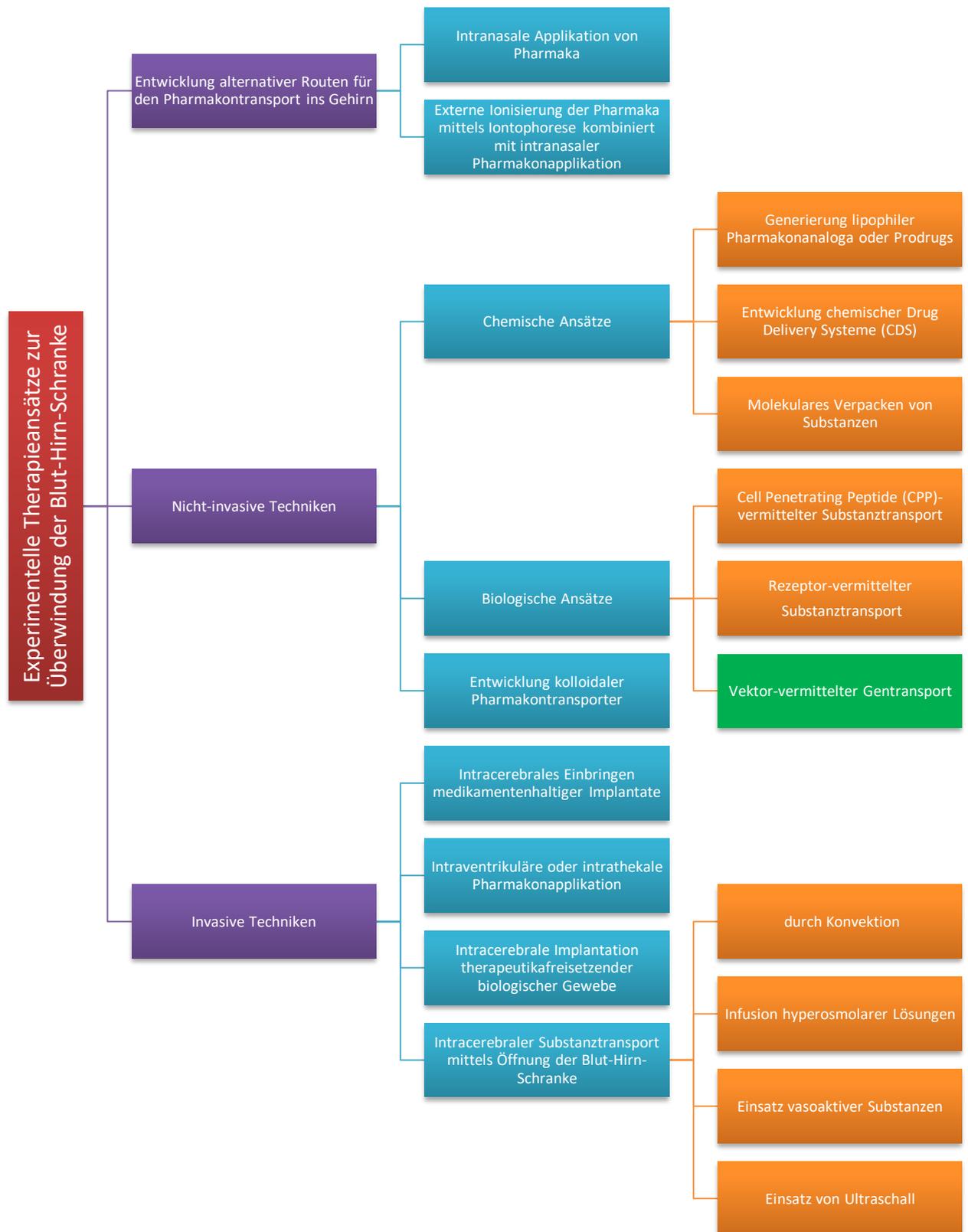


Abb. 2: Experimentelle Therapieansätze zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke als zentrales Hindernis in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (modifiziert nach Lu et al. (22)). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Methode des Vektor-vermittelten Gentransports mit einem Vektortropismus für Gehirndothelzellen untersucht (grün markiert).

Alle in der Abbildung 2 dargestellten Therapieansätze, die zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zur Ermöglichung einer effektiven Behandlung von zerebralen Erkrankungen entwickelt wurden, zeichnen sich durch gewisse Vor- und Nachteile aus. Daraus folgt, dass gemäß der obigen Abbildung ein geeigneter Therapieansatz in Abhängigkeit von der Indikation, der zu applizierenden Substanz und dem gewünschten Wirkort im Gehirn ausgewählt werden muss.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Variante der biologischen Therapieansätze für die Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems der Ansatz der vektorbasierten Gentherapie angewendet. Erfordernisse, die Vektoren, die im Rahmen von Gentherapien verwendet werden, erfüllen müssen, sind, dass sie zu einer langfristig persistierenden Genexpression führen und dass die Vektoren eine möglichst geringe Reaktion des Immunsystems provozieren. Darüber hinaus soll die Verpackungskapazität der Vektoren möglichst groß sein. Weiterhin ist beim Einsatz von Gentherapien zur Behandlung von Erkrankungen häufig ein sehr spezifischer Zelltropismus erforderlich. Als mögliche Vektorsysteme wurden in vorherigen Gentherapiestudien der SV40-Vektor, Retroviren (z.B. Lentiviren), Herpesviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren verwendet (23). Jedes dieser Vektorsysteme hat entscheidende Vor- und Nachteile, sodass bei der Entwicklung einer vektorbasierten Gentherapie ein die Erfordernisse erfüllendes Vektorsystem ausgewählt werden muss (24). Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Vektorsystem ein Adeno-assoziiertes Virus mit modifiziertem Kapsid verwendet (1).

Wichtige Vorteile bei der Verwendung von Adeno-assoziierten Viren für gentherapeutische Ansätze ist, dass das Vektorgenom sehr stabil ist und dass sich auch nicht-proliferierende Zellen wie z.B. Neurone infizieren lassen (25). Darüber hinaus kommt es im Rahmen einer Infektion mit Adeno-assoziierten Viren nur zu einer milden Immunantwort und nicht zur Entwicklung eines pathologischen Phänotyps. In Mausmodellen sind Adeno-assoziierte Viren wenig immunogen; dieser Effekt wird erst in Tiermodellen größerer Säugetiere beobachtet (26).

Wichtige Nachteile bei der Verwendung Adeno-assoziiertes Viren für gentherapeutische Ansätze ist, das Vorhandensein von „inverted terminal repeats“ (ITRs), die das Genom des Virus flankieren. Die flankierte Gensequenz ist auf eine maximale Länge von 4,5-4,7 kb begrenzt. Die limitierte DNA-Packungskapazität des Adeno-assoziiertes Virus ist Folge der

Geometrie und der geringen Größe der Viren (27). Daraus folgt, dass im Rahmen gentherapeutischer Ansätze nicht alle Transgene exprimiert werden können. Ein weiterer wichtiger Nachteil bei der Verwendung Adeno-assoziiierter Viren im Rahmen gentherapeutischer Ansätze ist, dass das Genom des Adeno-assoziierten Virus in das Genom des zu behandelnden Organismus integrieren kann, wodurch das onkogene Potential des Vektors begründet ist (28, 29).

Die Existenz Adeno-assoziiierter Viren wurde 1965 als Kontamination einer Adenoviruspräparation entdeckt (30). Adeno-assoziierte Viren sind ca. 25 nm große Viren mit einem sehr stabilen, ikosahedralen Kapsid ohne Lipidhülle, die ein einsträngiges, lineares DNA-Genom mit einer Länge von 5 kb enthalten. Adeno-assoziierte Viren wurden bisher mit keiner bekannten Erkrankung assoziiert, obwohl ca. 70% der Menschen seropositiv für mindestens einen Serotyp der Adeno-assoziierten Viren sind. Adeno-assoziierte Viren gehören zur Gruppe der Dependoviren. Dependoviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie zur Replikation in einer Zelle einen Helfervirus benötigen, der adenovirale Proteine bereitstellt. Beispiele für Helferviren sind z.B. das Herpes-simplex-Virus 1, das humane Cytomegalievirus oder Baculoviren. Als häufigste, natürliche Helferviren gelten Adenoviren (31).

Wie bereits zuvor beschrieben, werden die kodierenden Regionen des AAV-Genoms von ca. 145 bp langen cis-aktiven Sequenzen umgeben, die „inverted terminal repeats“ genannt werden und eine komplexe T-förmige Struktur bilden. Die „inverted terminal repeats“ bilden den Startpunkt der Replikation, indem sie die Primerfunktion für die Synthese des zweiten DNA-Strangs übernehmen. Darüber hinaus sind die „inverted terminal repeats“ essenziell für die Verpackung der viralen DNA in das Kapsid (32). Das virale Genom beinhaltet drei offene Leserahmen mit drei Promotoren, unter deren Kontrolle acht funktionelle Proteine exprimiert werden. Der offene Leserahmen „rep“ kodiert für vier Rep-Proteine (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) unter der Kontrolle von zwei Promotoren (p5 und p19). Rep 78 und Rep 68 fungieren als Endonukleasen, DNA-Helikasen und ATPasen und sind somit essenziell für die Replikation des Virusgenoms. Rep52 und Rep40 sind notwendig für die Verpackung des viralen Genoms in das Viruskapsid (33). Während der offene Leserahmen „rep“ essenziell für die Replikation des

Virusgenoms ist, werden über den offenen Leserahmen „cap“ die Kapsidproteine kodiert. Der Promoter des offenen Leserahmens „cap“ ist der p40-Promoter. Über alternatives Splicing der mRNA entstehen drei Kapsidproteine, die VP1, VP2 und VP3 genannt werden. Das Kapsid ist aus 60 dieser Proteine in einem Verhältnis 1:1:10 zusammengesetzt. VP1 und VP2 enthalten als Kernsequenz die Sequenz von VP3 und zusätzlich eine N-terminale Sequenz, die eine Signalsequenz für eine nukleäre Lokalisation und eine Phospholipase A2-Aktivität bewirken. Die Phospholipase A2-Aktivität ist essenziell für die Infektiosität des Virus, da diese den Austritt des Virus aus dem Endosom ermöglicht. Da das Kapsid nur die Sequenz des offenen Leserahmens „cap“ und die der verpackten DNA enthält, stellen Adeno-assoziierte Viren nur wenige Epitope dar, die durch das Immunsystem erkannt werden. VP2 und VP3 werden zusätzlich in einem weiteren offenen Leserahmen kodiert. Die mRNA von VP2/VP3 kodiert für das „assembly-activating protein“ (AAP). Dieses erleichtert den nukleären Import des Kapsidproteins VP3 und fördert die Zusammensetzung des Kapsids. AAP ist kein Bestandteil des endgültigen Kapsids. Des Weiteren determiniert VP3 den Gewebetropismus der verschiedenen Serotypen der Adeno-assoziierten Viren (34).

Aktuell sind 12 Serotypen Adeno-assoziiierter Viren bekannt, die sich insbesondere hinsichtlich ihres Zelltropismus unterscheiden (Tab. 1). Der Zelltropismus der verschiedenen Serotypen Adeno-assoziiierter Viren ist abhängig von der Interaktion des Viruskapsids mit der Zelloberfläche (35). Natürlich vorkommende Adeno-assoziierte Viren verwenden Glykaneinheiten für die initiale Anheftung des Virus an die Zelloberfläche. Bisher wurden als interagierende Glykaneinheiten Heparansulfat-Proteoglykan für die Serotypen 2, 3 und 6, N-terminale Galactose für den Serotyp 9 und N-/O-gebundene Sialinsäure für die Serotypen 1, 4, 5 und 6 identifiziert (35). Nach der initialen Anheftung des Adeno-assoziierten Virus an die Zelloberfläche tritt der Virus in die Zellen ein, sodass diese infiziert werden. In *in vitro* Untersuchungen an zahlreichen humanen Zellen verschiedener Gewebe sowie in einem *in vivo* Mausmodell konnte 2016 gezeigt werden, dass für die Transduktion der humanen und murinen Zellen durch AAV der Serotypen 1, 2, 3B, 5, 6, 8 und 9 ein spezielles glycosyliertes Membranprotein essentiell ist, das AAV-Rezeptor (AAVR, KIAA0319L) genannt wird (36–38). In weiteren experimentellen Versuchen wurden z.B. der Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1), integrin $\alpha\beta 5$ und der hepatocyte growth factor receptor (c-Met) als potenziell relevante Co-

Rezeptoren für den Zelleintritt von AAV identifiziert (35). Von den verschiedenen Serotypen werden im Rahmen von gentherapeutischen Studien zur Behandlung zerebraler Erkrankungen insbesondere Vektoren, die von den Serotypen 2 oder 9 abgeleitet werden, verwendet. Am besten untersucht sind hierbei Vektoren, die auf dem Serotyp 2 beruhen. Ein wichtiger Aspekt, der bei der Anwendung Adeno-assoziiierter Viren berücksichtigt werden muss, ist, dass sich der Gewebetropismus sowie die Dauer der Transgenexpression je nach Administrationsroute der Vektoren und nach untersuchter Spezies ändert (39).

Gewebe (Maus)	Mögliche zu verwendende Serotypen
Zentrales Nervensystem	AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9
Herz	AAV1, AAV8, AAV9
Niere	AAV2
Leber	AAV7, AAV8, AAV9
Lunge	AAV4, AAV5, AAV6, AAV9

Tab. 1: Übersicht über die möglichen für die Transduktion eines Organs zu verwendenden AAV-Serotypen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Adeno-assoziiertes Virus vom Serotyp 2 mit modifiziertem Kapsid (AAV-BR1) verwendet (1).

Nach intravenöser Applikation der Adeno-assoziierten Viren erfolgt wie oben beschrieben die Internalisierung der Viren in die Zellen des Organismus. Der weitere intrazelluläre Transport der Adeno-assoziierten Viren erfolgt anschließend in Endosomen entlang von Zytoskelettelementen. Innerhalb von zwei Stunden nach der Virusinfektion einer Zelle akkumulieren die virushaltigen Endosomen perinukleär. Anschließend kommt es im Endosom zu einer Änderung des pH-Wertes in den sauren Bereich. Der Abfall des pH-Wertes im Endosom führt zu einer Konformationsänderung der Kapsidproteine, wodurch das N-terminale Ende des Kapsidproteins VP1, das VP1u genannt wird, an die Kapsidoberfläche verlagert wird (40). Mithilfe der bereits oben beschriebenen Phospholipase A2-Aktivität der VP1u-Untereinheit kommt es zu einer Ruptur des Endosoms und einer anschließenden Freisetzung der Viren in das Zellzytoplasma. Die Untereinheit VP1u führt außerdem zu einer Akkumulation der Viruspartikel an der Kernmembran. Anschließend treten die Viren in den Zellkern ein durch Interaktion mit

dem Importin- α -Rezeptor. Im Zellkern wird anschließend die virale DNA aus dem Kapsid freigesetzt. Dieser Vorgang wird als „Uncoating“ bezeichnet (33, 34).

Auf Grundlage der aus dem Kapsid freigesetzten Virus-DNA erfolgt im Zellkern die Replikation der DNA mittels eines Mechanismus, der als „rolling hairpin“ Mechanismus bezeichnet wird (41). Nach der DNA-Replikation folgt die Verpackung der DNA in die bereits vorher zusammengesetzten Viruspartikel. Der entscheidende Stimulus für die Verpackung der DNA in die Viruspartikel wird durch das Rep-Protein vermittelt, das an das 5'-Ende der neu synthetisierten Virus-DNA gebunden ist. Das Rep-Protein bindet die neu synthetisierte Virus-DNA und die noch leeren Viruspartikel aneinander. Für die DNA-Verpackung verfügen diese leeren Viruspartikel als Eintrittspforte für die DNA über eine Pore mit einem Durchmesser von ca. 8,5 Å. Mutationen der DNA-Sequenz, deren Aminosäuren diese Pore bilden, führen zu einer deutlichen Verminderung an DNA-haltigen Viruspartikeln (33). Nach der Annäherung und Bindung der Virus-DNA an die leeren Viruspartikel sowie nach Übertritt der Virus-DNA in die leeren Viruspartikel erfolgt die Verpackung der DNA durch die Helikaseaktivität der Rep-Proteine Rep 52 und Rep 40.

Ist die Zelle, die von einem Adeno-assoziierten Virus infiziert wurde, nicht zusätzlich von einem Helfervirus infiziert, kann sich die virale DNA in das Genom der infizierten Zelle integrieren oder als Episom neben dem humanen Genom vorliegen (42). Dabei ist ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Möglichkeiten, dass die virale DNA nur nach Integration in das Genom der vom Virus infizierten Zelle bei einer Zellteilung vervielfältigt wird. Episomen werden bei der Zellteilung nicht vervielfältigt. So zeigte sich bei Mäusen, denen ein rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus verabreicht wurde, nach einer Hepatektomie, nach der es zu einer ausgeprägten Zellteilung kam, ein ca. 90%iger Abfall an Transgenexpression durch das Genom des rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (43). In zahlreichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es bei der Verwendung von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren insbesondere in Geweben wie Muskeln, Herz, Gehirn und Lunge zur Bildung von Episomen kommt, die aus multiplen Wiederholungen der Transgenkassette bestehen. In der Leber kommt es in ca. 1% der Zellen und somit in einem ausgeprägteren Ausmaß als in den anderen Geweben, zu einer Integration des Vektorgenoms (43–45). Zu einem verhältnismäßig hohen Ausmaß an Vektorgenom-Integration kommt es auch in nicht proliferierenden Zellen, wie z.B. in

Neuronen, in Kardiomyozyten und in Osteoblasten (46). Auf Grundlage der bisher ausgeführten Erkenntnisse kann also gefolgert werden, dass Adeno-assoziierte Viren insbesondere bei der Behandlung von monogenetischen Erkrankungen wenig teilungsaktiver Gewebe sinnhaft eingesetzt werden können und in diesen Fällen zu einer langfristigen Transgenexpression führen.

Kommt es zu einer Integration des viralen Genoms, integriert die virale DNA beim Menschen am häufigsten in das humane Chromosom 19 (q13.4) (47). Der Nachteil der Integration des viralen Genoms in das humane Genom ist das onkogene Potential, das hierdurch entsteht. So konnten Nault et al. 2015 in 11 von 193 untersuchten hepatozellulären Karzinomen eine klonale Integration der DNA von Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp 2 in Krebstreibergenen wie z.B. in den Genen Cyclin A2 (CCNA2), Telomerase Reverse Transkriptase (TERT), Cyclin E1 (CCNE1), Tumornekrosefaktor-Superfamilie 10 (TNFSF10) und Lysin(K)-spezifische Methyltransferase 2B (LMT2B), nachweisen. Die Integration der DNA der Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp 2 führt anschließend zu einer vermehrten Genexpression der Krebstreibergene (29). Trotz einer Seropositivität von bis zu 70% der Bevölkerung für mindestens einen der verschiedenen Serotypen Adeno-assoziiierter Viren scheint die Entwicklung virusinduzierter hepatozellulärer Karzinome weiterhin selten zu sein. Neben der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen konnte in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff nach Applikation von Adeno-assoziierten Vektoren vom Serotyp 9 bei neonatalen Mäusen die Entwicklung von Lungentumoren unklarer Dignität nachgewiesen werden (48).

Adeno-assoziierte Vektoren wurden bisher in zahlreichen tierexperimentellen Studien für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze untersucht. Dabei wurden die Vektoren in den verschiedenen Studien auf verschiedene Weisen verabreicht. Für die Behandlung neuronaler Erkrankungen wurden bisher zum einen die stereotaktische Injektion der Adeno-assoziierten Vektoren in definierte Bereiche des Gehirns oder der Ventrikel, zum anderen die intravenöse Vektoradministration untersucht. Beherrschende Probleme der stereotaktischen Vektoradministration bestehen darin, dass bei Anwendung beim Menschen multiple Injektionen für die Erzielung einer ausreichenden Vektorkonzentration zur Erzielung einer Wirksamkeit notwendig wären. Durch das

Erfordernis multipler Injektionen für eine ausreichende Wirksamkeit steigt bei stereotaktischer Vektoradministration das Infektionsrisiko sowie das Risiko cerebraler Schädigungen durch die Injektionen.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Transduktion von Neuronen durch Adeno-assoziierte Vektoren Neurodegeneration auslösen kann. Golebiowski et al. untersuchten 2017 die Effekte nach stereotaktischer Injektion dreier Vektordosierungen von Adeno-assoziierten Vektoren vom Serotyp rh8, deren DNA für die N-Acetylhexosaminidase kodiert, in den Thalamus sowie den lateralen Ventrikel von Makaken. Zudem wurden Kontrollinjektionen mit Transgen-freien Vektoren durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Makaken, die stereotaktische Injektionen mit Transgen-haltigen Vektoren erhielten, nach der Vektoradministration Dyskinesien und Ataxien entwickelten. Histopathologisch ergab sich im Vergleich zu den Makaken, die mit den Kontrollvektoren behandelt wurden, der Nachweis einer ausgedehnten Nekrose der weißen und grauen Hirnsubstanz sowie eine reaktive Vermehrung der Gefäße und Akkumulation eosinophiler Granula in den Neuronen (49).

Um die bisher aufgeführten entscheidenden Nachteile bei der Verwendung Adeno-assoziiierter Viren für gentherapeutische Ansätze zu minimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Adeno-assoziiertes Virus verwendet, das von Herrn Dr. Körbelin und Herrn Prof. Trepel (UKE Hamburg) sowie der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schwaninger, Institut für Pharmakologie und Toxikologie (UKSH Campus Lübeck), entwickelt wurde. Der rekombinante Vektor AAV-BR1 wurde generiert, indem im AAV-Wildtyp des Serotyps 2 an Position R588 des Kapsidproteins eine Sequenz aus den sieben Aminosäuren NRGTEWD eingefügt wurde. Die Selektion dieser Aminosäuresequenz erfolgte mittels fünf Wiederholungen einer intravenösen Injektion einer „zufälligen AAV-Peptidbibliothek“ in FVB/N-Mäusen, Extraktion der DNA-Partikel im Zielorgan, PCR-Amplifikation der DNA-Sequenz des Heptapeptids mittels PCR und anschließender erneuter Injektion der nun selektierten Peptidsequenzen aus der initialen Peptidbibliothek. Durch die Veränderung der Aminosäuresequenz des Kapsids ändert sich der Gewebetropismus des Vektors. Während der Wildtyp-AAV2 hauptsächlich zu einer Genexpression in der Leber und Niere führt, kommt es nach intravenöser Injektion des AAV-BR1 vornehmlich zu einer

Genexpression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Dabei werden nach intravenöser Injektion bis zu 60% der gesamten zerebralen Gefäßlänge transduziert. Neben Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke werden aber auch bis zu 5% der Neurone sowie in geringem Umfang kardiale Zellen sowie Zellen der Lunge und Leber transduziert. Der Peak der Transgenexpression liegt nach intravenöser Injektion des AAV-BR1 zwischen dem 10.-14. Tag. Bis zu 665 Tagen post injectionem bleibt die Transgenexpression im Gehirn stabil (1). Basierend auf diesen Ergebnissen zeigt der Vektor AAV-BR1 nahezu ideale Eigenschaften zur Anwendung in der Behandlung neurologischer, neurodegenerativer und neurovaskulärer Erkrankungen.

2.3 Gentherapie unter Verwendung des Vektors AAV-BR1 am Beispiel des Morbus Sandhoff

Um mögliche Einsatzfelder der gehirndothelzellspezifischen Transduktion in der Gentherapie neurologischer Erkrankungen zu identifizieren, untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit den Vektor AAV-BR1 in einem gentherapeutischen Ansatz im Rahmen der Modellerkrankung des Morbus Sandhoff. Der Morbus Sandhoff ist eine Erkrankung aus dem Formenkreis der lysosomalen Speicherkrankheiten. Zu der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten zählen ca. 50 genetische Erkrankungen, die über Mutationen in entsprechenden Genen zu einer Defizienz lysosomaler Enzyme führen. Durch die Defizienz lysosomaler Enzyme kommt es zu einer Akkumulation der Enzymsubstrate. Lysosomale Speicherkrankheiten werden bis auf wenige Ausnahmen – wie z.B. der Morbus Fabry – autosomal-rezessiv vererbt. Obwohl die Prävalenz der Einzelerkrankungen gering ist, liegt die Prävalenz lysosomaler Speicherkrankheiten zusammengenommen bei ca. 1:7.000 Lebendgeburten (50). Auf Grundlage dieser Prävalenzdaten wird deutlich, dass lysosomale Speicherkrankheiten neben ihren dramatischen Auswirkungen auf die Betroffenen und ihre Angehörigen auch gravierende sozioökonomische Folgen haben.

Lysosomale Speicherkrankheiten werden in Subgruppen nach den im Rahmen der Erkrankungen akkumulierenden Substraten eingeteilt. So gehört der Morbus Sandhoff zu der Subgruppe der Sphingolipidosen. Sphingolipide sind polare Lipide, die aufgebaut sind aus Sphingosin, einem ungesättigten Aminoalkohol, an das eine Fettsäure gebunden ist.

Daneben ist an das Sphingosin eine Restgruppe gebunden, über die die Sphingolipide weiter klassifiziert werden in Ceramide, die als Restgruppe ein Wasserstoffatom tragen, in Sphingomyeline, die als Restgruppe Phosphocholin oder Phosphoethanolamin tragen, und Glycosphingolipide, an die als Restgruppe ein Saccharid gebunden ist. Glycosphingolipide wiederum werden weiter unterschieden in Cerebroside, Globoside und Ganglioside. Ganglioside zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Restgruppe aus drei Zuckerresten besteht, von denen mindestens einer eine Sialinsäure ist.

Sphingolipide sind zentrale Bestandteile der Zellmembranen. In Zellmembranen bilden Sphingolipide Mikrodomänen (51). Sie sind wichtig für Signaltransduktion (52), Zell-Zell-Interaktionen (53) und Internalisierung von Substanzen (54). Sie kommen insbesondere in Nervengewebe vor und sind dort wichtige Moleküle für die neuronale Entwicklung, indem sie an der Entwicklung von Neuriten, Axonen und Synapsen beteiligt sind (55). Aufgrund des gehäufteten Vorkommens in Nervengewebe erklärt sich, dass es bei der Erkrankungsgruppe der Sphingolipidosen regelhaft zu neuronalen Symptomen kommt. Intrazellulär erfolgt die initiale Synthese von Sphingolipiden im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat aus Serin und Acyl-CoA, aus denen über weitere biochemische Zwischenschritte Ceramid synthetisiert wird. Aus Ceramid können dann in weiteren Syntheseschritten durch Glucosyl- und Sialyltransferasen Glycosphingolipide synthetisiert werden. Der Transport der Sphingolipide erfolgt in Vesikeln und als monomerischer, zytosolischer Transport. In der Zelle kommen Sphingolipide gehäuft in der Zellmembran und in Endosomen vor, so stellen sie z.B. bis zu 35% der Moleküle, die die Zellmembran bilden. In Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum können Sphingolipide nicht nachgewiesen werden (56).

Demgegenüber erfolgt der Abbau der Sphingolipide in den Lysosomen der Zelle. Zu der Erkrankungsgruppe der Sphingolipidosen gehören neben dem Morbus Sandhoff z.B. auch die Niemann-Pick-Krankheit (Defizienz des Enzyms Sphingomyelinase mit Akkumulation von Sphingomyelin), der Morbus Gaucher (Defizienz des Enzyms β -Glucosidase mit Akkumulation von Glucocerebroside), die metachromatische Leukodystrophie (Defizienz des Enzyms Sulfatidase mit Akkumulation von Sulfatiden), der Morbus Fabry (Defizienz des Enzyms α -Galactosidase mit Akkumulation von Globotriaosylceramid) (Abb. 3).

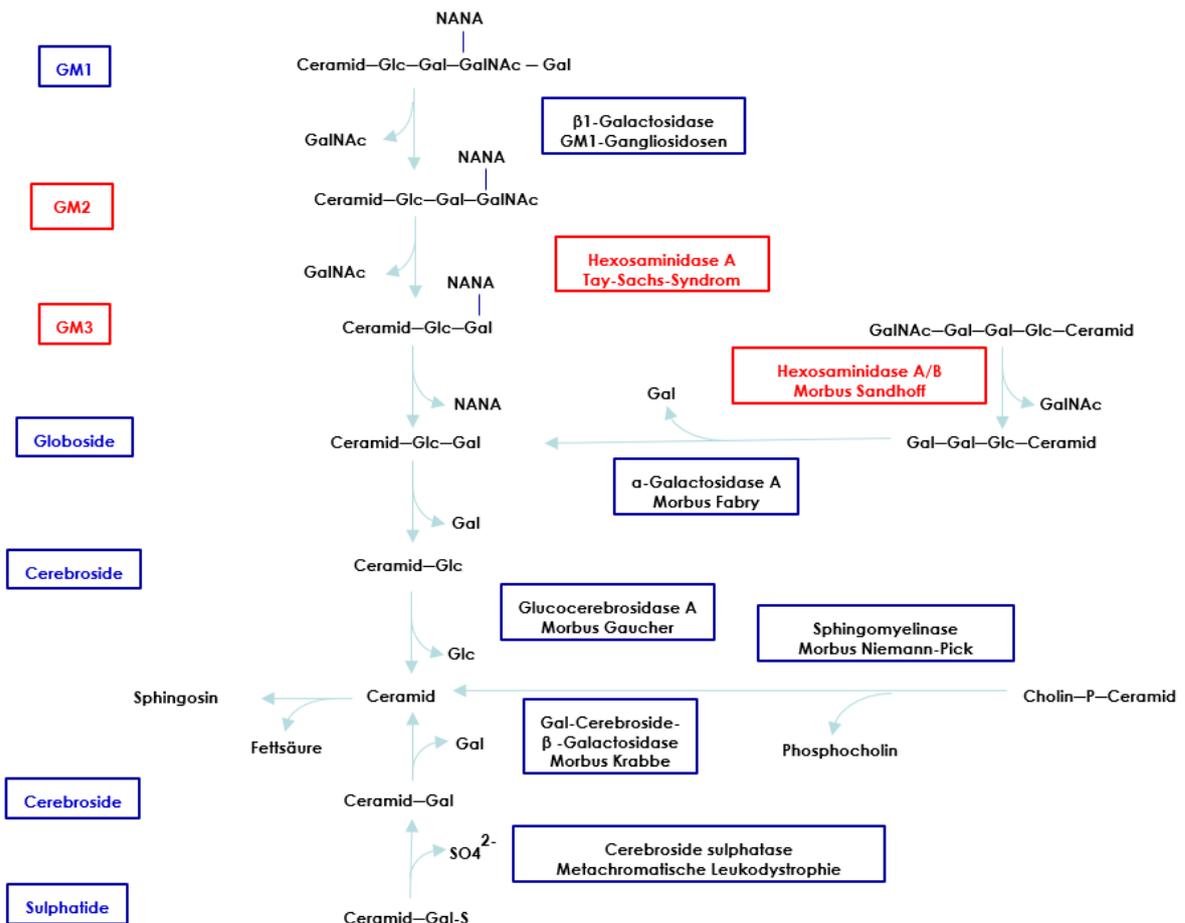


Abb. 3: Übersicht über die Erkrankungsgruppe der Sphingolipidosen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Effekte untersucht, die mittels vektorbasierter Transduktion von Gehirndothelzellen in einem Mausmodell der Erkrankung des Morbus Sandhoff erzielt werden können (rot markiert) (modifiziert nach von Dahl et al. (57)). Glc – Glucose, Gal – Galactose, GalNAc – N-Acetylgalactosamin, NANA – N-Acetylneuraminsäure, P – Phosphat.

Eine weitere Erkrankung, die zu der Erkrankungsgruppe der Sphingolipidosen zählt und eng mit der Erkrankung des Morbus Sandhoff verknüpft ist, ist die Tay-Sachs-Krankheit. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch eine Defizienz der Enzymgruppe der β -N-Acetylhexosaminidasen (kurz: β -Hexosaminidasen) aus. β -Hexosaminidasen sind Enzyme, die terminale N-Acetyl-D-Hexosamin-Reste von N-Acetylglucosiden abspalten. Beim Menschen unterscheidet man fünf Isoenzyme mit β -Hexosaminidaseaktivität: Sie werden β -Hexosaminidase A, B, S, C und D genannt. Dabei sind die drei Isoenzyme mit physiologischer Bedeutung die β -Hexosaminidase A, B und S – sie sind Oligomere der drei Untereinheiten α und β A und β B, die von den Genen *Hexosaminidase A (HEXA)* und *Hexosaminidase B (HEXB)* kodiert werden. Das Isoenzym der β -Hexosaminidase A ist ein

Trimer aus einer α - und jeweils einer β A- und β B-Untereinheit, das Isoenzym der β -Hexosaminidase B ein Tetramer aus jeweils zwei β A- und β B-Untereinheiten, das Isoenzym der β -Hexosaminidase S ein Homodimer aus je zwei α -Subgruppen (Abb. 4). Während bei der Tay-Sachs-Krankheit eine Mutation im Gen *Hexosaminidase A* vorliegt, sodass die Isoenzyme β -Hexosaminidase A und S nicht gebildet werden können, liegt beim Morbus Sandhoff eine Mutation im Gen *Hexosaminidase B* vor. Bei einer Mutation im Gen *Hexosaminidase B* kommt es zu einer Defizienz der β -Untereinheit, die für die Bildung der Isoenzyme β -Hexosaminidase A und B essenziell ist. Die Mutationen im Gen *Hexosaminidase B*, die zu der Entwicklung eines Morbus Sandhoff führen können, sind vielfältig und können über das gesamte Gen verteilt sein (58).

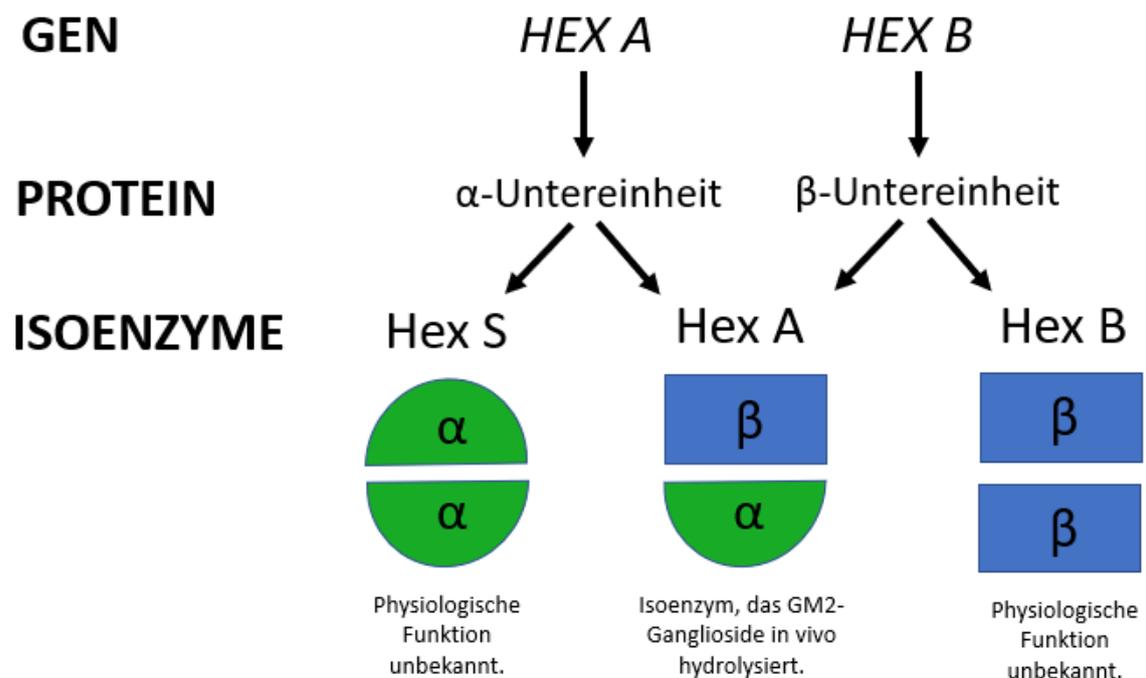


Abb. 4: Übersicht über die Nomenklatur der β -N-Acetylhexosaminidasen A, B und S auf Gen- sowie Proteinebene. Während bei der Tay-Sachs-Krankheit eine Mutation im Gen *Hexosaminidase A* vorliegt, sodass die Isoenzyme β -Hexosaminidase A und S nicht gebildet werden können, liegt beim Morbus Sandhoff eine Mutation im Gen *Hexosaminidase B* vor. Bei einer Mutation im Gen *Hexosaminidase B* kommt es zu einer Defizienz der β -Untereinheit, die für die Bildung der Isoenzyme β -Hexosaminidase A und B essenziell ist.

Im Rahmen von Einzelzell-Genexpressionsprofil-Analysen, die mittels FACS an Gehirnen adulter Mäuse sowie mittels qPCR aus Maus-RNA angefertigt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Gene *Hexosaminidase A* und *B* hauptsächlich in Mikroglia exprimiert

werden. Für das Gen *Hexosaminidase B* ist die Genexpression nahezu exklusiv in Mikroglia nachgewiesen, sodass von der Arbeitsgruppe von Hickman et al. die β -Hexosaminidase B als Marker für Mikroglia genutzt wird (59–61).

Es wird angenommen, dass die β -Hexosaminidasen A und B nach der Synthese auf dem Weg zu den Lysosomen und in den Lysosomen selbst modifiziert werden. Die synthetisierten Untereinheiten der β -Hexosaminidasen werden, um die Enzyme zu den Lysosomen zu dirigieren, an Mannose-6-Phosphat-Motive gebunden, die zwischen Golgi-Apparat und Lysosom weiter umgewandelt werden (62, 63). Ca. 20% der in den Mikroglia synthetisierten und mit Mannose-6-Phosphat-Motiven markierten β -Hexosaminidasen werden in den Extrazellulärraum sezerniert und können anschließend von anderen Zellen aufgenommen werden. Als mögliche Rezeptoren für die zelluläre Aufnahme der Enzyme β -Hexosaminidase A und B wurden in *in vitro* Versuchen an Mikrogliaulturen zwei mögliche Glycorezeptoren identifiziert: der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor sowie der CIM6P/IGF1R-Rezeptor (64). Nach Aufnahme der β -Hexosaminidasen über einen der Transporter gelangen die Enzyme über Endosomen in die Lysosomen der Zellen.

Durch die Defizienz der β -Hexosaminidasen beim Vorliegen des Morbus Sandhoff kommt es zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von Gangliosidmolekülen, die sowohl in Neuronen als auch in Mikroglia nachgewiesen werden konnte (64). Dabei ist bisher unklar, ob die Gangliosidakkumulation in den Mikroglia primär durch die Enzymdefizienz oder sekundär durch Aufnahme der neuronalen Gangliosidakkumulationen bedingt ist. Durch die Gangliosidakkumulationen kommt es zur Aktivierung der Mikroglia, die inflammatorische Cytokine und Chemokine freisetzen (65). Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt vor der symptomatischen Krankheitsphase und vor dem Nachweis eines Neuronenverlustes. Durch die vermehrte Freisetzung inflammatorischer Substanzen kommt es zur Astroglie. Darüber hinaus kann insbesondere in späten Krankheitsphasen das Auftreten von anti-Gangliosid-Auto-Antikörpern beobachtet werden (66).

Bedingt durch die Neuroinflammation sowie die neuronale Akkumulation von Gangliosiden, die in Neuronen vermutlich toxische Effekte haben, werden in den Neuronen Apoptosemechanismen aktiviert, sodass es zu einem Untergang und somit Verlust von Neuronen kommt (65, 67). Dabei wird die neuronale Apoptose insbesondere im Rückenmark, im Hirnstamm und im Thalamus beobachtet. Im Cerebellum sowie im

cerebralen Cortex ist neuronale Apoptose nur in einem geringen Umfang nachweisbar. Ab dem Zeitpunkt des ersten histologischen Nachweises der neuronalen Apoptose setzt der finale Krankheitsabschnitt ein, der durch einen rapiden Rückgang bereits erworbener Fähigkeiten gekennzeichnet ist. Dass die Neuroinflammation ein sehr zentraler Induktionsmechanismus für die neuronale Apoptose ist, lässt sich daran erkennen, dass die Apoptoserate und die Rate aktivierter Mikroglia in einem Mausmodell der Erkrankung durch eine Knochenmarktransplantation deutlich reduziert werden konnte, ohne einen Einfluss auf die Gangliosidakkumulationen zu haben (65). Trotz zahlreicher Studien, in denen versucht wurde, den exakten Pathomechanismus des Morbus Sandhoff zu charakterisieren, bleiben viele Fragen bisher unbeantwortet. Für weitere Forschungsprojekte ist es essenziell, die molekularen Mechanismen, die während der Erkrankung ablaufen, zu identifizieren, um gezielte und spezifischere Therapien entwickeln zu können.

Bei Auftreten einer Defizienz der β -Hexosaminidasen beim Menschen werden je nach Alter beim Auftreten der ersten Symptome und nach Krankheitsverlauf der infantile, der juvenile und der adulte Erkrankungstyp unterschieden. Der Zeitpunkt des Einsetzens der Entwicklung eines pathologischen Phänotyps ist abhängig von der Restaktivität der β -Hexosaminidasen. Bei der β -Hexosaminidase sind ca. 10% enzymatische Restaktivität ausreichend, um die Entwicklung eines Morbus Sandhoff zu verhindern. Anzumerken ist darüber hinaus, dass in geringem Umfang neben den β -Hexosaminidasen die Neuraminidase 3 und 4 Ganglioside katabolisieren können (68). Beim Morbus Sandhoff ist der infantile Erkrankungstyp am häufigsten. Ein häufig zu beobachtender Erkrankungsverlauf bei Vorliegen des Morbus Sandhoff ist in Abbildung 5 dargestellt. Betroffene Kinder zeigen eine unauffällige Entwicklung bis zu einem Alter von ca. 6-12 Monaten. Ab diesem Alter kommt es zu ersten Symptomen, zu denen eine Verlangsamung bzw.- ein Stopp der physiologischen Entwicklung, eine erhöhte Schreckhaftigkeit sowie ein reduzierter Muskeltonus gehören. Die Diagnose wird durchschnittlich in einem Alter von ca. einem Jahr gestellt. Dabei ist neben der genetischen Testung sowie der Testung der enzymatischen β -Hexosaminidaseaktivität aus Blutplasma oder Leukozyten ein charakteristisches diagnostisches Merkmal das

Vorhandensein eines kirschroten Fleckes der Macula lutea. Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickeln die Betroffenen eine Spastik der Gliedmaßen, sie erblinden und zeigen einen progredienten Verlust bereits entwickelter kognitiver und motorischer Fähigkeiten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es häufig zur Entwicklung einer Epilepsie sowie zu einer gestörten Funktion des autonomen Nervensystems. Ca. 50% der von der infantilen Form betroffenen Kinder sterben in einem Alter von ca. 3-4 Jahren. Die häufigste Todesursache ist respiratorische Insuffizienz (69).

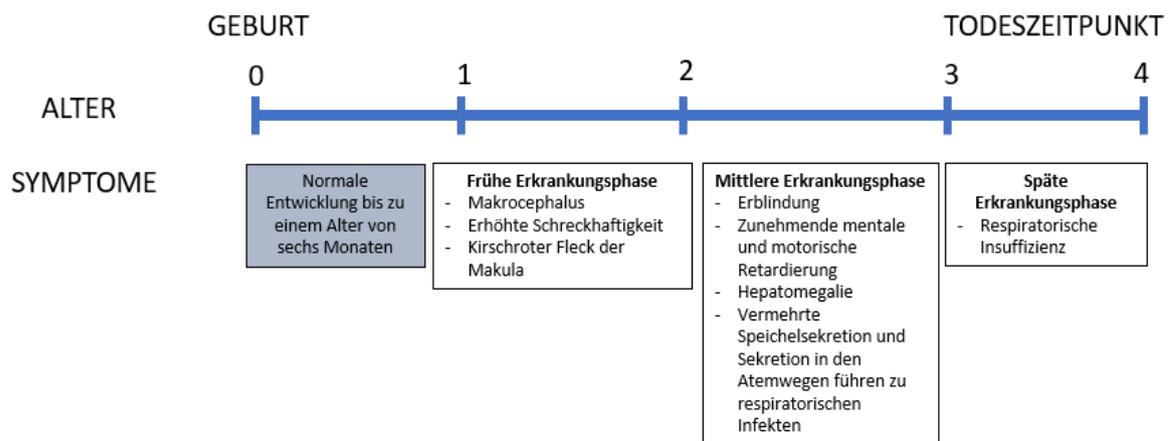


Abb. 5: Typischer Krankheitsverlauf bei Vorliegen eines infantilen Typs des Morbus Sandhoff. Ab einem Alter von sechs Monaten kommt es zu der Entwicklung erster neurodegenerativer Symptome, die im weiteren Verlauf fortschreiten in Form eines Verlustes bereits erworbener kognitiver und motorischer Fähigkeiten. In einem Alter von ca. 3-4 Jahren versterben die Kinder häufig an respiratorischer Insuffizienz.

Im klinischen Setting werden bisher keine kurativen Therapieansätze zur Behandlung des Morbus Sandhoff eingesetzt. Therapien, die eingesetzt werden, sind z.B. die Anwendung von Vibrationsgeräten zur Unterstützung der Atemwegsreinigung („High Frequency Chest Wall Oscillation“) und die Anwendung von Hustenassistenten. Ergänzend kommen Verfahren zur künstlichen Ernährung in späten Erkrankungsphasen zur Anwendung.

Kurative Therapieansätze zur Behandlung des Morbus Sandhoff werden im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen entwickelt. Untersucht werden hierbei Substratreduktionstherapien (70, 71), Enzymersatztherapien (72), Methoden der Chaperontherapie (73) und gentherapeutische Ansätze.

Um die Pathogenese des Morbus Sandhoff zu verstehen und darauf basierend Therapieoptionen für die Erkrankung zu entwickeln, wurden verschiedene Tiermodelle mit einer Defizienz der β -Hexosaminidase B untersucht. In aktuell laufenden Forschungsprojekten werden insbesondere Katzen- und Mausmodelle der Erkrankung genutzt (74). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse der Linie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J von Charles River verwendet, die in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet wurden. (Stamm: B6, 002914). Das Gen der *Hexosaminidase B* wurde bei den Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} durch Insertion einer Neomycinresistenzkassette zerstört (75). Der pathologische Phänotyp, den Mäuse dieser Mauslinie entwickeln, wird im Abschnitt „Material und Methoden“ weitergehend beschrieben.

Die erste Arbeitsgruppe, die einen gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung einer GM2-Gangliosidose in *in vitro* Versuchen anwendete, war die Arbeitsgruppe um Akli et al. Akli et al. exprimierten in Fibroblasten eines Patienten, der an der Tay-Sachs-Erkrankung litt, die β -Hexosaminidase A mithilfe eines adenoviralen Vektors. Hierdurch konnte eine Degradation von GM2-Gangliosiden in den Fibroblasten bewirkt werden (76).

2003 publizierte die Arbeitsgruppe von Yamaguchi et al. erstmals eine *in vivo*-Studie, in der mittels kationischer Liposom-vermittelter, Plasmid-basierter Gensatztherapie die β -Hexosaminidaseaktivität in zahlreichen viszerale Organen, aber nicht im Gehirn, erhöht werden konnte. In der Leber konnte mit dieser Methode die GM2-Akkumulation reduziert werden (66).

Im gleichen Jahr veröffentlichten Bourgoin et al. eine Studie, in der sie nach intrazerebraler Injektion von β -Hexosaminidase-exprimierenden Adenoviren und Mannitol eine weite Expression der Hexosaminidaseaktivität im Gehirn erzielen konnten. Dabei konnte bei Anwendung hoher Dosierungen ein durch das Adenovirus vermittelter zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (77).

In den folgenden Jahren folgten Studien mit bicistronischen lentiviralen Vektoren an humanen Fibroblasten von Patienten, die an der Erkrankung Morbus Sandhoff litten, sowie an murinen, embryonalen Sandhoffneuronen (78).

2006 folgte, publiziert von Cachón-González et al., die erste Studie, die untersuchte, welche Effekte auf das Überleben und die Symptomatik von Knockout-Mäusen mit dem

Genotyp *Hexb*^{-/-} mittels stereotaktischer intrakranieller Injektion Adeno-assoziiierter Viren des Serotyps 2, die die α - und β -Untereinheiten der β -Hexosaminidasen exprimieren, erzielt werden können. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei behandelten Mäusen das Auftreten erster Symptome bis zu einem Alter von 300 Tagen verzögert werden konnte (79). Damit wurde das bisher beste erzielte Überlebensergebnis von 280 Tagen der Knockout-Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, das zuvor mittels Knochenmarktransplantation erzielt wurde, weiter verbessert (80).

Ergänzend publizierte die Arbeitsgruppe um Sargeant 2011 eine Arbeit, in der sie zeigen konnten, dass durch Injektion eines rAAV2/1-Vektors, der *HEXA*-cDNA exprimiert, in das rechte Striatum β -Hexosaminidase-defizienter Mäuse neuronale Apoptose insb. im ventroposterioren medialen und ventroposterioren lateralen Kern des Thalamus verhindert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die neuronale Dichte in diesen Thalamuskernen mit der Überlebensspanne der behandelten Mäuse korreliert (81).

2017 erfolgte die Publikation einer weiteren richtungsweisenden Studie in der Entwicklung gentherapeutischer Ansätze zur Behandlung des Morbus Sandhoff. Die Arbeitsgruppe um Sena-Esteves wiederholte die in Mäusen und Katzen erfolgreich angewendete Methode der intrakraniellen Vektorapplikation eines AAVrh8 Vektors, der die α - und β -Untereinheit der β -Hexosaminidasen exprimiert, in Makaken. Wie bereits im Vorfeld beschrieben, konnte im Rahmen dieser Versuche eine vektorbedingte cerebrale Schädigung nachgewiesen werden, sodass nachfolgende wissenschaftliche Bemühungen zur Entwicklung therapeutischer Strategien des Morbus Sandhoff eine systemische Vektorapplikation favorisierten (49).

2015 publizierte die Arbeitsgruppe um Triggs-Raine eine Studie, in der die Vektorapplikation erstmals systemisch erfolgte. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mittels hochdosierter, intravenöser P0-Injektion eines rAAV9-Vektors, der *HEXB*-cDNA exprimiert, in β -Hexosaminidase-defizienten Mäusen Neuroinflammation und Neurodegeneration verhindert werden konnte und ein symptomfreies Überleben der Mäuse bis zu einem Alter von 43 Wochen erzielt werden konnte. Es zeigte sich jedoch, dass 8 von 10 der zum Zeitpunkt P0 behandelten Mäuse im Verlauf Leber- oder Lungentumoren entwickelten (48). Diese Nebenwirkung trat nicht auf in einer 2018 veröffentlichten Studie, in der neonatale β -Hexosaminidase-defiziente Mäuse mit einem

scAAV9 intravenös behandelt wurden. Bei Anwendung dieses Vektorsystems konnte ein symptomfreies Überleben der Mäuse erzielt werden (82).

Um die sekundäre Entwicklung von Leber- und Lungentumoren nach Vektorapplikation sicher zu verhindern, ist eine Optimierung des Vektortropismus erforderlich. Eine Optimierung des Vektortropismus mit spezifischer Genexpression in der Zielzelle kann zu einer Reduktion der Nebenwirkungen und zu einer Erhöhung der Effizienz der vektorbasierten Gentherapie führen.

Diesbezüglich publizierten Batista et al. 2010 eine Studie, in der sie nachwiesen, dass in einem Zellkultursystem mit zwei Kammern, in dem in der einen Kammer hCMEC/D3-Zellen wachsen, die mit einem bicistronischen Vektor transfiziert wurden, der die β -Hexosaminidasen exprimiert, β -Hexosaminidase-defiziente Fibroblasten, die im zweiten Kammersystem wachsen, eine β -Hexosaminidase-Aktivität nach Kokultivierung aufweisen (83). Diese Daten bildeten die Grundlage für weiterführende *in vivo* Versuche, da die Ergebnisse nahelegten, dass in Hexosaminidase-defizienten Mäusen eine Transduktion von Gehirndothelzellen mit Vektoren, die die β -Hexosaminidase exprimieren, zu einer ausreichenden β -Hexosaminidaseaktivität in Mikroglia und Neuronen führen kann, um eine Symptomatik des Morbus Sandhoff zu lindern oder zu verhindern. Basierend auf diesen Daten war das Ziel dieser Arbeit, einen gehirndothelzellspezifischen Vektor zu entwickeln, der zu einer Expression der β -Hexosaminidase in Gehirndothelzellen β -Hexosaminidase-defizienter Mäuse führt. Die in den Gehirndothelzellen synthetisierten β -Hexosaminidasen werden sezerniert und können im Verlauf von Neuronen und Mikroglia aufgenommen werden. Auf diese Weise könnte die Entwicklung einer Astrogliose, neuroinflammatorischer Prozesse sowie eine neuronale Apoptose mit daraus resultierender mentaler und motorischer Retardierung verhindert werden (Abb. 6).

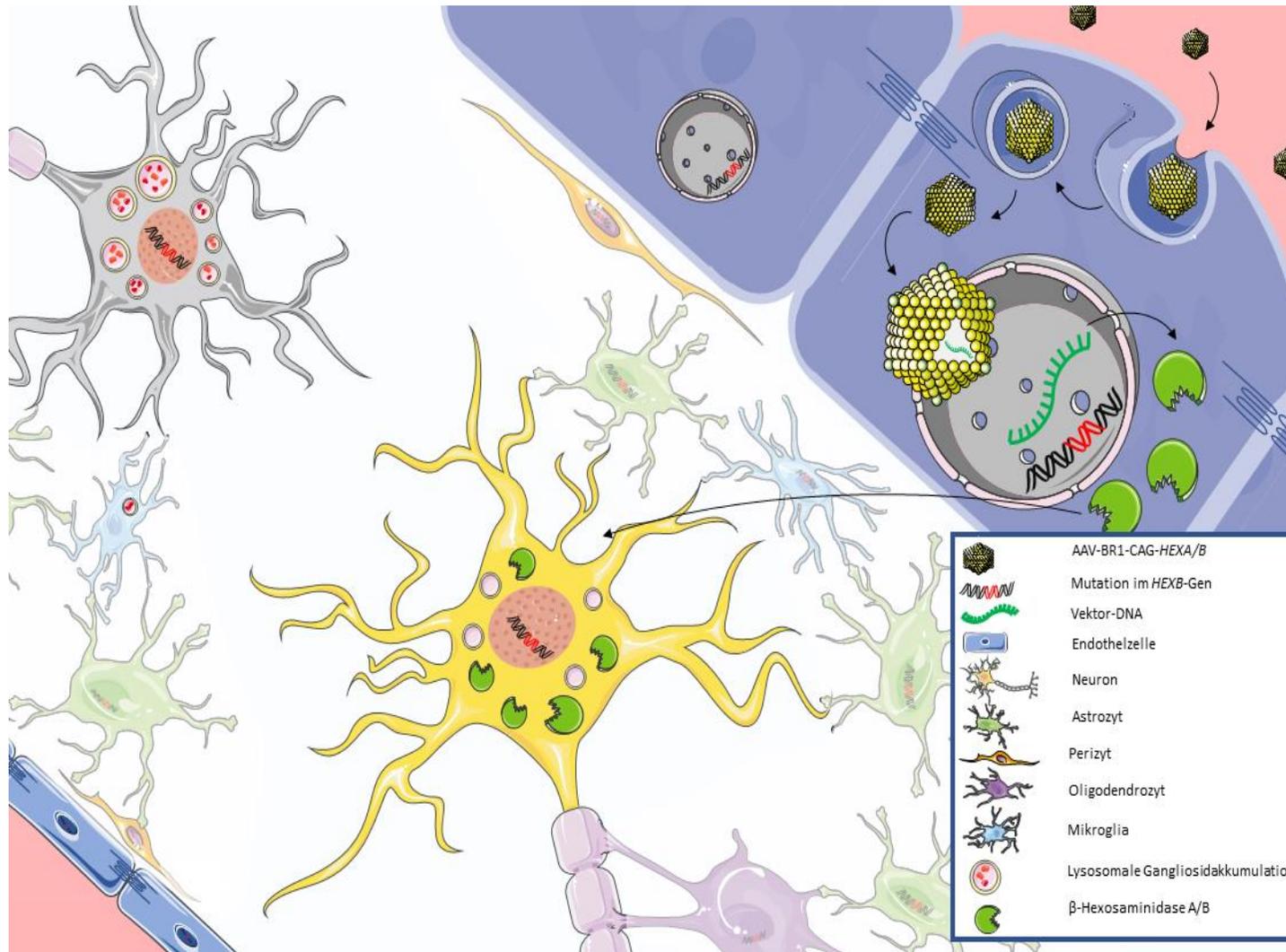


Abb. 6: Übersicht über das Konzept der in dieser Arbeit angewendeten vektorbasierten Gentherapie der Erkrankung Morbus Sandhoff. Bei Defizienz der β -Hexosaminidase B kommt es zu einer lysosomalen Akkumulation von Gangliosiden in Neuronen und Mikroglia sowie nachfolgend zu Neuroinflammation und Apoptose der Neurone (links). Bei AAV-BR1-basierter Expression der β -Hexosaminidase B in Gehirnendothelzellen Hexosaminidase-B-defizienter Mäuse kommt es zur Synthese der β -Hexosaminidase B in Gehirnendothelzellen. Die in den Gehirnendothelzellen synthetisierte β -Hexosaminidase B kann von Neuronen und Mikroglia im Sinne des Mechanismus der „Cross Correction“ aufgenommen werden. Hierdurch könnten die lysosomale Gangliosidakkumulation sowie Neuroinflammation und neuronale Apoptose reduziert werden (rechts).

2.4 Erhöhung der gehirnendothelzellspezifischen Genexpression unter Verwendung eines gehirnendothelzellspezifischen Promoters

Um die in den vorherigen Textabschnitten erläuterten potentiellen systemischen Nebenwirkungen einer vektorbasierten Gentherapie mit Adeno-assoziierten Viren zu reduzieren und die Effizienz des verwendeten Vektorsystems AAV-BR1 zu erhöhen, bestand die Zielsetzung des zweiten Versuchsteils dieser Arbeit in der Optimierung des angewendeten Vektorsystems.

Eine Möglichkeit zur Optimierung des angewendeten Vektorsystems besteht in der Identifizierung einer gehirnendothelzellspezifischen Promotersequenz zur Erhöhung der Spezifität der Genexpression in Gehirnendothelzellen.

Die Verwendung zellspezifischer Promotoren war aus oben aufgeführten Gründen bereits in frühen Zeiten der Gentherapie und ist auch heute noch ein wichtiger Bestandteil zur Etablierung effizienter und nebenwirkungsarmer Vektorsysteme (84, 85). Neben zellspezifischen Promotersequenzen wurden darüber hinaus in einzelnen Studien auch Genelemente verwendet, die in Abhängigkeit des Vorliegens von krankheitsabhängigen Pathologien (z.B. HIF-1 bei Vorliegen von Hypoxie) oder durch Strahlentherapie induziert (z.B. durch Verwendung des Promoters *egr-1*) zu einer vermehrten oder spezifischen Genexpression führen (86, 87).

Promotoren stellen Nukleotidsequenzen der DNA dar, die die regulierte Expression eines Gens ermöglichen. Diese präzise Regulation der Genexpression in verschiedenen Zellen über die Promotersequenzen ermöglicht die Entwicklung von vielzelligen Organismen, die aus unterschiedlichen Zelltypen mit unterschiedlichen Eigenschaften bestehen. Zelltypen in vielzelligen Organismen unterscheiden sich, indem von der in allen Zellen identischen Nukleotidsequenz Gene in unterschiedlichem Umfang exprimiert werden. So ist z.B. das in Zellen des Pankreas am häufigsten exprimierte Protein die Procarboxypeptidase A1, in Hepatozyten Albumin und in Blutstammzellen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase bei identischer Geninformation in allen Zellen eines Organismus.

Die Promotersequenz liegt am 5'-Ende des Nichtmatrizenstrangs eines Gens und enthält dabei eine Nukleotidsequenz, die als initiale Bindungsstelle der RNA-Polymerasen dient. Die zusätzliche Nukleotidsequenz des Promoters reguliert die Expression des zugehörigen Gens in den verschiedenen Zellen des Körpers. Entscheidend für die komplexe Regulation

der Genexpression bei Eukaryoten ist die räumliche und zeitliche Trennung der Transkription und Translation, die umfangreiche RNA-Prozessierung nach der Transkription sowie spezifische, konservierte Nukleotidsequenzen in der Promoterstelle. Diese konservierten Nukleotidsequenzen in der Promoterstelle werden als Consensussequenzen bezeichnet. Die Consensussequenzen werden bei Eukaryoten von Proteinen erkannt, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Transkriptionsfaktoren bestehen in der Regel aus einer DNA-bindenden Domäne sowie einer Aktivierungsdomäne. Nachdem Transkriptionsfaktoren mit ihrer DNA-bindenden Domäne an die DNA gebunden haben, verändern sie mittels der Aktivierungsdomäne die Chromatinstruktur des Genoms oder treten mit der RNA-Polymerase II oder dem Mediator, einem Proteinkomplex, der als Brücke zur RNA-Polymerase II dient, in Wechselwirkung. Über diese Mechanismen kann die Transkription initiiert und auch verstärkt werden.

Darüber hinaus gibt es Transkriptionsrepressoren, die über eine Veränderung der Chromatinstruktur zu einem Stillstand der Transkription eines Genes führen können. Bei Eukaryoten sind zahlreiche Consensussequenzen bekannt, an die Transkriptionsfaktoren binden können. Diese Sequenzen können sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegen. Wichtige Consensussequenzen sind z.B. die TATA-Box, das „Downstream Promoter Element“ (DPE), die CAAT-Box, die GC-Box oder das Initiatorelement.

Durch den basalen Transkriptionsapparat wird die Transkription jedoch nur in geringem Umfang aktiviert. Daher enthalten eukaryotische Promotoren neben den Consensussequenzen Nukleotidsequenzen, die als „Enhancerelemente“ die Genexpression verstärken oder als „Silencerelemente“ die Genexpression inhibieren. Diese „Enhancer“- und „Silencerelemente“ können über 1.000 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen und besitzen keine eigene Promoteraktivität. Sie sind wie die Consensussequenzen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Es kommt aufgrund der Entfernung zum Transkriptionsstartpunkt nach Anlagerung von DNA-bindenden Proteinen aber in der Regel nicht zu einer direkten Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase II. Häufiger wird durch die Anlagerung der DNA-bindenden Proteine die Chromatinstruktur verändert.

„Enhancerelemente“ wirken dabei nur in spezifischen Zelltypen. So ließ sich durch Einfügen eines „Enhancerelements“ des Promoters der muskelspezifischen Kreatinkinase in Promotoren von normalerweise in Muskelzellen nicht exprimierten Genen eine starke Genexpression dieser Gene ausschließlich in Muskelzellen induzieren (88).

Zusammenfassend kommt es zu einer starken Expression eines Gens in einer spezifischen Zelle, wenn Transkriptionsfaktoren mit der RNA-Polymerase II den basalen Transkriptionskomplex bilden und Transkriptionsfaktoren an „Enhancerelemente“ der Promotersequenz binden und so die Transkriptionsaktivität erhöhen.

In der Vergangenheit konnten einige Promotersequenzen, die sich aufgrund einer hohen Spezifität für ihre Zielzellen sowie einer starken Genexpression hervorragend für die Anwendung in gentherapeutischen Untersuchungen eignen, identifiziert werden. Hierzu zählt z.B. der Melanozyten-spezifische Tyrosinase-Promoter (89). In den allermeisten Fällen führen zellspezifische Promotoren jedoch nur zu einer geringen Aktivierung der Transkription. Dies konnte z.B. für den Promoter des Gens des von-Willebrand-Faktors gezeigt werden, der zwar zu einer hohen Endothelzellspezifität führt, aber nur in geringem Umfang zu einer Aktivierung der Transkription. Weitere Promotoren, wie der PECAM-1 oder der FLK1/KDR-Promoter führen zu einer stärkeren Aktivierung der Transkription, sind jedoch weniger spezifisch als der Promoter des Gens des von-Willebrand-Faktors (90).

Basierend auf diesen Grundlagen war das Ziel dieser Arbeit, durch Kombination des nahezu gehirndothelzellspezifischen Kapsids mit einem gehirndothelzellspezifischen Promoter eine spezifische Genexpression in Gehirndothelzellen zu erzielen. Dabei wird die Verwendung eines zellspezifischen Kapsids als „transductional targeting“, die Verwendung eines zellspezifischen Promoters als „transcriptional targeting“ bezeichnet.

2.5 Informationen zu den verwendeten Promotoren

Die theoretische Grundlage für die Identifizierung einer regulatorischen Gensequenz, die zu einer spezifischen Genexpression in Gehirndothelzellen führt, beruht auf einer von der Arbeitsgruppe um Daneman 2010 publizierten Transkriptomanalyse der Gehirndothelzellen. Die Arbeitsgruppe um Daneman konnte zeigen, dass

Endothelzellen im Gehirn durch ein spezifisches Genexpressionsmuster gekennzeichnet sind, was darauf hindeutet, dass die Etablierung einer Transkriptionskontrolle in vektorbasierten Systemen das „Targeting“ spezifischer Endothelzellen des Gehirns ermöglichen könnte (91).

Bereits deutlich vor Veröffentlichung der Ergebnisse von Daneman et al. arbeiteten verschiedene Arbeitsgruppen an der Identifizierung von für Endothelzellen spezifischen genregulatorischen Sequenzen. Eine der ersten Methoden, für die die Identifizierung und Untersuchung panendothelzellenspezifischer regulatorischer Elemente erforderlich war, war die Entwicklung von transgenen Mauslinien (92). Doch bereits seit 1996 wurden verschiedene genregulatorische Sequenzen identifiziert, die in vektorbasierten Systemen zu einer panendothelialen Genexpression von Reportergenen führen (Tabelle 2).

Promoter		Vektor	Literatur
β-Actin	ACTB	rAAV	(93)
Endotheliale Stickoxidsynthase 3	eNOS	Adenovirus	(94)
E-Selectin	Esel	Adenovirus, Retrovirus	(95, 96)
Fms-like Tyrosine Kinase-1	Flk1	Adenovirus, Lentivirus	(94, 97,98)
Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 2	ICAM-2	Adenovirus, Lentivirus, Retrovirus	(94, 97–99)
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1	PAI-1	rAAV	(100)
Präproendothelin-1	PPET-1	Adenovirus, Retrovirus	(101, 102)
Roundabout-4-Rezeptor	Robo4	Adenovirus	(103)
Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und epidermalen Wachstumsfaktor-Homologiedomänen 1	Tie1	Lentivirus	(97)
Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und epidermalen Wachstumsfaktor-Homologiedomänen 2	Tie2	Adenovirus, Lentivirus	(94, 97, 98, 104)
Vascular Cell Adhesion Molecule-1	VCAM-1	Adenovirus	(94)
Murines vaskuläres endotheliales Cadherin	mVEcad	rAAV, Lentivirus	(97, 105, 106)
Gefäßendothelwachstumsfaktor	VEGF	Adenovirus	(107)
Gefäßendothelwachstumsfaktor-Rezeptor 1	VEGFR-1	Adenovirus, Retrovirus, Baculovirus	(103, 108–111)
Gefäßendothelwachstumsfaktor-Rezeptor 2	VEGFR-2	Adenovirus, Retrovirus, Lentivirus	(95, 97, 112)
Gefäßendothelwachstumsfaktor-Rezeptor 2	VEGFR-2-ENG	Adenovirus	(113)
Kinase-ähnlicher Domänenrezeptor	VEGFR-KDR	Adenovirus, Retrovirus	(94, 95, 114)
Von-Willebrand-Faktor	vWF	Adenovirus, Retrovirus	(94, 115)

Tab. 2: Übersicht über die in verschiedenen Vektorsystemen untersuchten genregulatorischen Sequenzen, die zu einer panendothelialen Expression der Reportergene führen.

Bei der Suche nach genregulatorischen Sequenzen, die für ein rAAV-basiertes Vektorsystem verwendet werden können, ist die Sequenzlänge aufgrund der auf ca. 4.500 bp begrenzten Verpackungskapazität Adeno-assoziiierter Vektoren einer der wichtigsten zu berücksichtigenden Aspekte.

2016 wurden erstmals von der Arbeitsgruppe um Simpson (CMMT, Vancouver, Canada) genregulatorische Sequenzen publiziert, die zu einer gehirndothelzellspezifischen Expression von Reporter Genen führen. Problematisch an den publizierten Promotersequenzen, die auf dem humanen Claudinpromoter beruhen, ist, dass es sich hierbei mit 2.963 bp für Ple34 und mit 3.854 bp für Ple261 um sehr lange genregulatorische Sequenzen handelt, sodass bei Anwendung in einem AAV-basierten Vektorsystem aufgrund der limitierten Packungskapazität der Adeno-assoziierten Viren nur sehr kurze Zielgene exprimiert werden können (116).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse zur Identifizierung eines gehirndothelzellspezifischen Promoters basiert auf der bereits zuvor aufgeführten Publikation von Daneman et al. aus dem Jahr 2010. Daneman et al. analysierten das Transkriptom von Endothelzellen des Gehirns, das Transkriptom von Zellen des Gehirnparenchyms und von Zellen der Lunge und der Leber. Dabei konnte die Arbeitsgruppe in ihren Analysen 129 Gene von „Tight Junction“-Proteinen, Transportern, metabolisch wirksamen Enzymen oder Komponenten aus Signalwegen identifizieren, deren Expression in Gehirndothelzellen im Vergleich zu Zellen von Lunge, Leber und übrigen Zellen des Gehirnparenchyms deutlich erhöht ist (9). Ähnliche Analysen erfolgten in zwei weiteren Publikationen (117, 118).

Zur weiterführenden Analyse wählten wir aus den 129 in den Tabellen 1A, 2A und 2B der 2010 von Daneman et al. veröffentlichten Publikation Gene mit einer Gehirndothelzell/Leber-Ratio > 150 und einer Gehirndothelzell/Lungen-Ratio > 1 aus. Von den 129 publizierten Genen erfüllten 38 diese Voraussetzungen.

Zur weiteren Analyse dieser 38 Gene, die sich entsprechend der Publikation von Daneman et al. durch eine erhöhte Transkription in Gehirndothelzellen verglichen mit Zellen der Leber, der Lunge und des Gehirnparenchyms auszeichnen, überprüften wir, ob für eines der veröffentlichten Gene von Daneman et al. eine vermehrte Expression in Perizyten

nachgewiesen wurde (Tabelle 1B, (91)). Ergänzend prüften wir, ob für eines der Gene in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnte, dass es bei Regulation der Expression von Reporter genen unter der entsprechenden Promotersequenz zu einer panendothelialen Genexpression kommt (Tab. 2, (92)). Für keines der 38 Gene konnte eine dieser beiden Eigenschaften nachgewiesen werden.

Nachfolgend erfolgte eine weiterführende Analyse der Gene unter Anwendung der Datenbank DropViz. DropViz ist eine Datenbank, die Ergebnisse von Einzelzell-Genexpressionsprofil-Analysen in verschiedenen Zellgruppen adulter Mausgehirne zusammenfasst. Die in der Datenbank DropViz enthaltenen Ergebnisse wurden auf Ebene des RNA-Transkriptoms mithilfe der Technik Drop-seq erhoben. Die Datenbank ermöglicht den Vergleich von Genexpressionsprofilen von Endothelzellen, Astrozyten, Zellen des Choroidplexus, Ependymzellen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen des Gehirns, Mikroglia und Makrophagen, Neuronen, Interneuronen, Oligodendrozyten und Polydendrozyten in verschiedenen Gehirnregionen (119). Auf Grundlage der in der Datenbank enthaltenen Daten schlossen wir Gene für die weiterführenden Untersuchungen aus, für die keine überwiegende Expression in Gehirnendothelzellen mit > 10 Transkripten/100.000 Transkripten in einem Cluster verglichen mit anderen Zellen adulter Mausgehirne nachgewiesen werden konnte.

Anschließend analysierten wir die Promotersequenz (1.000 bp stromaufwärts, 100 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes) der übrigen 26 Gene bezüglich des Vorliegens von Transkriptionsfaktorbindungsstellen, von denen bekannt ist, dass diese zu einer vermehrten Genexpression in Gehirnendothelzellen führen (118). Für diese Analyse wurde die Transkriptionsfaktor-Datenbank „JASPAR CORE 2018 vertebrates“ sowie die „Eucaryotic Promoter Database“ verwendet ($p=0,001$). Von den auf Grundlage der beschriebenen Analyse 24 identifizierten Gene wählten wir acht Gene für die weiterführende Analyse in den *in vitro* Versuchen aus. Die Zusammenfassung der Auswertung ist in Tabelle 3 dargestellt. Die für die *in vitro* Versuche ausgewählten Gene sind in roter Schriftfarbe in Tabelle 3 markiert.

Probe Set ID	Gensymbol	Gehirn/ Leber	Gehirn/ Lunge	Gehirndothel/ Gehirnparenchym	In Perizyten vermehrt exprimiertes Transkript	Bekannt als gehirndothel- zell- spezifischer Promoter	Überwiegend endotheliale Expression mit > 10 Transkripten / 100.000 Transkripten pro Cluster	Zahl zellspezifischer Transkriptionsfaktor- bindungsstellen
Nach Tabelle 1A, 2A, 2B (Daneman et al.)					Nach Tabelle 1B (Daneman et al.)			
1419758_at	Abcb1a_1	1848.7	12.9	34.7	∅	∅	✓	13
1419758_at	Abcb1a_2	1848.7	12.9	34.7	∅	∅	✓	19
1447272_s_at	Atp10a	527.2	42.8	40.6	∅	∅	✓	13
1418094_s_at	Car4	772.1	2.9	ND	∅	∅	✓	14
1424549_at	Degs2	156.4	50	ND	∅	∅	✓	15
1438558_x_at	Foxq1_1	317	404.8	71.9	∅	∅	✓	20
1438558_x_at	Foxq1_2	317	404.8	71.9	∅	∅	✓	20
1441946_at	Itih5	3124.8	213.3	ND	∅	∅	✓	17
1429159_at	4631408O11Rik; Itih5	561.4	32.5	ND	∅	∅	✓	17
1451047_at	Itm2a	266.5	69.5	ND	∅	∅	✓	27
1448117_at	Kitl	261.9	1.2	52.3	∅	∅	✓	22
1438452_at	Nabl_1	253.1	4.7	ND	∅	∅	✓	13
1438452_at	Nabl_2	253.1	4.7	ND	no	no	✓	16
1448873_at	Ocln_2	255.5	9.8	ND	∅	∅	✓	14
1449184_at	Pglyrp1	371.8	116	47.6	∅	∅	✓	28
1419700_a_at	Prom1_1	589.5	69.8	ND	∅	∅	✓	19
1419700_a_at	Prom1_2	589.5	69.8	ND	∅	∅	✓	15
1419700_a_at	Prom1_3	589.5	69.8	ND	∅	∅	✓	23
1429348_at	Sema3c	511	1.3	ND	∅	∅	✓	14
1459903_at	Sema7a	194.3	4.2	ND	∅	∅	✓	15
1457867_at	Sgpp2	429.8	9.3	36.9	∅	∅	✓	16
1436417_at	Slc19a3	249.7	105.8	ND	∅	∅	✓	16
1435418_at	Slc22a8	774.6	764.3	33	∅	∅	✓	19
1426599_a_at	Slc2a1	234.7	48.5	ND	∅	∅	✓	23
1454622_at	Slc38a5_1	237.6	13.5	ND	∅	∅	✓	20

1454622_at	Slc38a5_2	237.6	13.5	ND	∅	∅	✓	20
1420405_at	Slco1a4	847.4	450.2	ND	∅	∅	✓	18
1423343_at	Slco1c1	1745.2	310.2	ND	∅	∅	✓	20
1425779_a_at	Tbx1	469.4	25.2	ND	∅	∅	✓	19
1437479_x_at	Tbx3_1	163.6	1.8	ND	∅	∅	✓	15
1426399_at	Vwa1	202.8	103.8	ND	∅	∅	✓	21
1423424_at	Zic3_1	438.5	441.2	ND	∅	∅	✓	19
1423424_at	Zic3_2	438.5	441.2	ND	∅	∅	✓	17
1448873_at	Ocln_1	255.5	9.8	ND	∅	∅	✓	12
1435026_at	Spock2_1	180.3	37.7	ND	∅	∅	✓	11
1435026_at	Spock2_2	180.3	37.7	ND	∅	∅	✓	12
1437479_x_at	Tbx3_2	163.6	1.8	ND	∅	∅	✓	12
1418979_at	9030611N15Rik; Akr1c14	182.3	9.9	36.5	∅	∅	∅	
1416301_a_at	Ebf1	380.1	11.8	ND	∅	∅	∅	
1447787_x_at	Gja7	825.5	3.8	ND	∅	∅	∅	
1426431_at	Jag2	325.6	4.4	ND	∅	∅	∅	
1442347_at	Lrp8	387.2	145.4	ND	∅	∅	∅	
1451255_at	MGI:1927471; Lsr	412.6	41	ND	∅	∅	∅	
1428223_at	Mfsd2	777.8	224.9	ND	∅	∅	∅	
1460465_at	A930038C07Rik; Ndnf	419.3	9.8	ND	∅	∅	∅	
1434734_at	Rad54b	168.2	167.1	ND	∅	∅	∅	
1434734_at	E130016E03Rik; Rad54b	168.2	167.1	ND	∅	∅	∅	
1428663_at	5133401H06Rik; Sgms2	472	4.8	ND	∅	∅	∅	
1429154_at	Slc35f2	552.5	69.2	ND	∅	∅	∅	
1437967_at	Titin	948.1	63.9	ND	∅	∅	∅	

Tab. 3: Auswahl von 5'-flankierenden regulatorischen Sequenzen mit möglicher Spezifität für Gehirndothelzellen. Die Analyse umfasst 38 Gene, die in Gehirndothelzellen im Vergleich zu Lungen-, Leber- und Gehirnparenchym verstärkt transkribiert werden.

Da die optimale Länge eines Promoters in Abhängigkeit der verwendeten Datenbank und in Abhängigkeit des zu untersuchenden Zelltyps variiert, wurden die verwendeten Promotersequenzen mit der Datenbank „Eucaryotic Promoter Database“ und der Datenbank ELDorado 12-2017 (Genomatix, München, DE) analysiert. Ein spezielles Augenmerk bei der Auswahl der Sequenzlänge wurde auf die Lokalisation der Transkriptionsfaktorbindungsstellen gelegt, die bei Bindung von Transkriptionsfaktoren zu einer verstärkten Reporterexpression in Gehirndothelzellen führen (118, 120). Ebenso wurde die Lokalisation von Transkriptionsfaktorbindungsstellen berücksichtigt, für die bekannt ist, dass die an diese Sequenzen bindenden Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Expression des Reportergens in Astrozyten, Neuronen, Oligodendrozyten, Mikroglia und Perizyten führen (118). Darüber hinaus wurde bei der Auswahl der Promotersequenz die Promoterlänge aufgrund der limitierten Packungskapazität Adeno-assoziiierter Viren berücksichtigt. Ergänzend wurden in Einzelfällen verkürzte Promoterelemente nach frustrierten Versuchen der Generierung von Plasmiden aufgrund von repetitiven Sequenzelementen sowie Haarnadelstrukturen der DNA verwendet, um weitere molekularbiologische Anwendungen zu erleichtern.

Unter Berücksichtigung oben aufgeführter Aspekte wählten wir die Promotoren der folgenden Gene für die Analyse auf ihre Eignung als gehirndothelzellspezifischer Promoter aus: *Tie2*, *Cdh*, *Foxq1*, *Ocln*, *Itih5*, *Slc2a1*, *Slco1c1*, *Pglyrp1*, *Sgpp2*, *Tbx3*, *Plvap* und *Poglut1*. Als Kontrollen wurden der ubiquitär zu einer starken Genexpression führende Promoter CAG und der T81-Promoter, der zu einer geringen Genexpression führt, verwendet (121). Die untersuchten Promotersequenzen sind in Tabelle 4 zusammengefasst und ihre Eigenschaften weiter ausgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Promotersequenzen umfassen die Sequenz 100 bp stromabwärts sowie zwischen 600 und 1.000 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt. Eine Ausnahme hiervon bildet die verwendete Sequenz des *Tie2*-Promoters. Im Vorfeld dieser Arbeit erfolgte durch Frau Jacqueline Bannach und Herrn Dr. Godwin Dogbevia eine Untersuchung der AAV-BR1-basierten Expression des Reportergens eGFP unter einer langen und kurzen Sequenz des *Tie2*-Promoters *in vivo*. Unter Regulation der kurzen Sequenz des *Tie2*-Promoters kam es zu einer signifikant geringeren Expression von eGFP im Vergleich zur langen Sequenz des eGFP-Promoters.

Daher wurde für die weiterführenden Analysen die lange Sequenz des Tie2-Promoters verwendet.

Da spezifische Promotoren - wie bereits im vorherigen Textabschnitt dargelegt - häufig zu einer geringeren transkriptionellen Aktivierung auch in den Targetzellen führen, ergänzten wir die eigentlichen Promotersequenzen um kurze genregulatorische Nukleotidsequenzen, um die Genexpression in den Zielzellen zu erhöhen. Diese sind in Tabelle 5 zusammengefasst. In dieser Arbeit untersuchte kurze regulatorische Gensequenzen stellen hierbei eine kurze (ca. 300 bp) sowie eine lange Nukleotidsequenz (ca. 1.700 bp) aus dem 3'-Ende des Exons 1 und dem 5'-Ende des Introns 1 des *Tie2*-Gens dar, von denen bekannt ist, dass sie in transgenen Embryonen in Kombination mit einem basalen Tie2-Promoter eine gehirnendothelzellspezifische Genexpression erhöhen können (122). Diese kurze Sequenz wird im Folgenden als „Kurzes Intron“ (S) bezeichnet; die lange Sequenz wird im Folgenden als „Langes Intron“ (L) bezeichnet. 1990 konnte erstmals gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines Introns einen Effekt auf die Prozessierung der mRNA haben kann und zu einer Erhöhung der Expression des Transgens führen kann (123). In den nachfolgenden Jahren konnte für zahlreiche Intronsequenzen eine Erhöhung der vektorkodierten Expression des Transgens nachgewiesen werden. Anders als für die „Enhancersequenzen“ konnten die stärkste Erhöhung der Transgenexpression erzielt werden, wenn die Intronsequenzen zwischen Promoter und Transgen lokalisiert waren (124).

Zudem verwendeten wir als kurze genregulatorische Sequenz die Sequenz des CMV-Enhancers (C) (125). Die Sequenz des CMV-Enhancers wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller zur Verfügung gestellt. Der CMV-Enhancer stellt ein häufig verwendetes Verstärkerelement dar und konnte in Kombination mit verschiedenen Promotersequenzen sowie in verschiedenen Zelltypen eine deutliche Verstärkung der Genexpression des vektorkodierten Transgens bewirken. So führte eine Kombination des CMV-Enhancers mit dem Kardiomyozyten-spezifischen Promoter MLC zu einer 50-fachen Verstärkung der Genexpression des vektorkodierten Transgens (88).

Ergänzend wurde das Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulation Element (WPRE, W) verwendet. Die Verwendung post-transkriptionaler Regulationselemente ist wichtig zur Optimierung der viralen Genexpression. Diese Regulationselemente

stabilisieren die virale RNA (126, 127). In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulation Elements in Kombination mit dem CMV-Promoter zu einer ca. 8-fachen Verstärkung der Expression des Transgens führt (128). Weiterführende *in vivo* Untersuchungen konnten die Verstärkung der Expression des Transgens auch in Kombination mit anderen Promotoren als dem CMV-Promoter zeigen (129, 130). Keine Verstärkung der Transgenexpression konnte bei Kombination des Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulation Elements mit dem CAG-Promoter gezeigt werden (131).

Zudem verwendeten wir im Rahmen dieser Arbeit Polyadenylierungssignale. Auch die Verwendung von Polyadenylierungssignalen erhöht die vektorbasierte Genexpression des Transgens durch Stabilisierung der viralen mRNA sowie Erleichterung des nukleären Exports. In Kombination mit den untersuchten Promotersequenzen verwendeten wir sowohl das SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 poly(A)) als auch das Bovine Growth Hormone Polyadenylierungssignal (bGHpA). *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass beide Polyadenylierungssignale zu einer ca. 2,5-fachen Verstärkung der Transgenexpression führen (124, 132, 133). Zudem ergaben weiterführende Untersuchungen, dass die Verstärkung der Genexpression durch das SV40-Polyadenylierungssignal und das Bovine Growth Hormone Polyadenylierungssignal auch *in vivo* äquivalent ist (134).

Um eine synthetische gehirndothelzellspezifische Promotersequenz zu identifizieren, untersuchten wir in einem ersten Schritt die Effekte, die durch die Verwendung der kurzen genregulatorischen Sequenzen erzielt werden können. In einem zweiten Schritt untersuchten wir *in vitro* und *in vivo*, ob eine Kombination der kurzen genregulatorischen Sequenzen mit den verschiedenen oben aufgeführten Promotoren zu einer starken, gehirndothelzellspezifischen Genexpression des vektorkodierten Reportergens führt.

Promoter	Synonyme	Gen ID	Spezies	Verwendeter Promoter entsprechend EIDorado 2017-12	Verwendete Sequenz nach EIDorado 2017-12
CAG			Cytomegalievirus, Huhn, Kaninchen		1.620 bp (135, 136)
T81	Thymidine Kinase, Tk, HSVtk	24271467	Herpes simplex I		147 bp (Sequenz von -81 bis +52 bp aufwärts und abwärts vom Transkriptionsstartpunkt, die distale GC- und CCAAT-Sequenz wurden entfernt) (121)
<i>Tie2</i>	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase, TEK	21687	Maus	GXP_111189 (1.330 bp): 94738289-94739618	(+), 94737494-94739592 (2.099 bp)
<i>Cdh</i>	Cadherin 5, Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin)	12562	Maus	Beim <i>Cdh</i> -Promoter handelt es sich nur um die ersten 312 bp des murinen vaskulär-endothelialen Cadherin-5-Promotors, die den Core-Promotor und das erste regulatorische Element (Endothelzell-Spezifität) enthalten. Zudem enthält die verwendete Sequenz das β -Globin-Intron (137). Gesamtlänge des Promoters 475 bp. Der Promoter wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Oliver Müller.	
<i>Foxq1</i>	Forkhead Box Q1, Forkhead Homolog, Winged Helix / Forkhead Transcription Factor	15220	Maus	GXP_112431 (1.260 bp): 31557165-31558424	(+), 31557156-3155845, (811 bp)

<i>Ocln</i>	Occludin	18260	Maus	GXP_5029668 (1.101 bp): 100552218-100553318 GXP_168838 (1.175 bp): 100552360-100553534 GXP_6663208 (2.185 bp): 100552507-100554691	(-), 100552283-100553532, (1.250 bp)
<i>Itih5</i>	Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain Family Member 5, Inter-Alpha (Globulin) Inhibitor H5	634882	Maus	GXP_251493 (1.185 bp): 10152536-10153720	(+), 10153036-10153767 (732 bp)
<i>Slc2a1</i>	Solute Carrier Family 2 Member 1 (facilitated glucose transporter); GLUT1	20525	Maus	GXP_68940 (1.304 bp): 119107711-119109014	(+), 119107687-119109040 (1.354 bp)
<i>Slco1c1</i>	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family, Member 1c1	58807	Maus	GXP_244577 (1.891 bp): 141522897-141524787	(+), 141523390-141524726 (1.337 bp)
<i>Pglyrp1</i>	Peptidoglycan Recognition Protein 1	21946	Maus	GXP_304858 (1.270 bp): 18883549-18884818	(+), 18883653-18884854 (1.202 bp)

<i>Sgpp2</i>	Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase 2, Sphingosine 1-Phosphate Phosphohydrolyse 2	433323	Maus	GXP_6656189 (1.131 bp): 78309316-78310446 GXP_6656188 (1.101 bp): 78309044-78310144	(+), 78309302-78310452 (1.151 bp)
<i>Tbx3</i>	T-Box Transcription Factor TBX3	21386	Maus	GXP_6677015 (2.254 bp): 119669319-119671572 GXP_5045820 (1.102 bp): 119671227-119672328 GXP_3088919 (1.101 bp): 119674445-119675545	(+), 119670154-119671129 (976 bp)
<i>Plvap</i>	Plasmalemma Vesicle Associated Protein, Fenestrated-Endothelial Linked Structure Protein	84094	Maus	GXP_157958 (1.349 bp): 71511604-71512952	(-), 71511596-71512976 (1.379 bp)
<i>Poglut1</i>	Protein O-Glucosyltransferase	224143	Maus	GXP_7462778 (1.122 bp): 38549311-38542722	(-), 38550049-38550842 (794 bp)

Tab. 4: Informationen zu den im Rahmen der Arbeit verwendeten Promotersequenzen, die hinsichtlich ihrer Endothelzellspezifität untersucht wurden. Dargestellt sind alternative Bezeichnungen des Gens, die Gen-ID, die Spezies, von deren DNA die Promotersequenz amplifiziert wurde, sowie die Lokalisation und Länge der verwendeten Promotersequenz. Die Lokalisation und Länge der verwendeten Promotersequenz sowie identifizierte Promotersequenzen, die in der verwendeten Sequenz beinhaltet sind, sind auf Grundlage der Annotationen der Datenbank EIDorado 2017-12 (Genomatix, München, DE) angegeben.

Kurzes genregulatorisches Element	Abkürzung	Beschreibung	Spezies	Sequenz	Länge [bp]	Literatur
Langes Intron	L	1.7 kB langes DNA-Fragment, das das 3'-Ende des Exon 1 und das 5'-Ende des Intron 1 des murinen Tie2-Gens umfasst	Maus	(+), 94745331-94746987	1657	(122)
Kurzes Intron	S	NcoI/XbaI-Fragment des langen Introns (s.o.)	Maus	(+), 94746370-94746670 (301 bp)	301	(122)
CMV-Enhancer	C	Human CMV immediate-early enhancer	Humanes Cytomegalievirus (HCMV)	Basenpaare -598 bis -68 des IE-Gens des humanen Cytomegalievirus	530	(138)
Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element	WPRE, W	Woodchuck hepatitis B virus Genom (WHV8)	Hepatitis B Virus	Basenpaare 1093 bis 1684 des Woodchuck-Gens des Hepatitis B Virus (WHV8)	591	(139)
SV40 Polyadenylation Signal	SV40 poly(A)	Polyadenylierungssignal des SV40-Virus	Simian Virus 40	s. Literatur	240	(140)
Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal	bGHpA	Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons	Rind	s. Literatur	223	(141)

Tab. 5: Informationen zu den verwendeten kurzen genregulatorischen Elementen, die zur Verstärkung der Genexpression der oben aufgeführten Promotersequenzen eingesetzt wurden. Angegeben sind die Spezies, auf deren Grundlage die Sequenz amplifiziert wurde. Zudem sind die Länge sowie die Lokalisation der verwendeten Sequenz angegeben.

2.6 Fragestellung der Arbeit

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit den Effekten und Möglichkeiten eines gehirnendothelzellspezifischen Vektors zur Gentherapie neurogenetischer Erkrankungen und der Optimierung der Gehirnendothelzellspezifität des verwendeten Vektors.

Diesbezüglich ist ein Ziel dieser Arbeit die Identifizierung eines gehirnendothelzellspezifischen Promoters, der zu einer starken Genexpression eines Zielgens in den Gehirnendothelzellen führt. Die Identifizierung eines gehirnendothelzellspezifischen Promoters würde zum einen im Rahmen vektorbasierter Gentherapien monogenetischer neurologischer Erkrankungen das Risiko onkologischer Nebenwirkungen reduzieren und zum anderen die für therapeutische Fragestellungen benötigte Vektordosis reduzieren.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit untersucht, ob Gehirnendothelzellen im Rahmen genterapeutischer Ansätze als „Pforte“ zu gehirneigenen Zellen dienen können. Das heißt, dass Endothelzellen nach vektorbasierter Transduktion von Gehirnendothelzellen das mittels Nukleotidsequenz des Vektors kodierte Gen exprimieren und sezernieren, sodass das Enzym von anderen Zellen (z.B. Neuronen) aufgenommen werden kann. Diese Fragestellung wird am Beispiel der Modellerkrankung des Morbus Sandhoff untersucht, die zu der Gruppe der Sphingolipidosen, einer Untergruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten, gehört.

Des Weiteren wird untersucht, ob der gehirnendothelzellspezifische Vektor AAV-BR1 ein sicheres genterapeutisches Werkzeug darstellt. Zu prüfen war, ob es Hinweise auf eine vektorbedingte Entwicklung von Organinsuffizienzen und eine erhöhte Frequenz vektorbedingter Krebserkrankungen gibt.

3 Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades (pro analysi) verwendet. Glasware und Kulturmedien wurden bei mind. 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Lösungen und Materialien, die bei hohen Temperaturen instabil sind, wurden sterilisiert mittels Filtration durch einen 0,2 µm Filter.

3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegeldokumentationssystem	Power PAC 300; 2,5 A Type T	Phase GmbH, Lübeck, DE
Agarosegelelektrophoresesystem	Sub [®] Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Analysenwaage	MC1	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav	Systec V-65	Systec, Linden, DE
Gewebehomogenisator	Dounce Gewebehomogenisator	KimbleChase, Vineland, USA
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Fluoreszenz- und Lumineszenzmesser	CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg, DE
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fuchs-Rosenthal Zählkammer 0,0625 mm ²	Assistant, Sondheim/Rhön, DE
Gefrierschrank: -80°C	KM-DU73Y1	Panasonic Corp., Osaka, JP
Gefrierschrank, -20°C	MediLine	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Homogenisator	Bullet Blender 5E	Next Advance, Troy, USA
Horizontalschüttler	MTS4	IKA [®] -Werke, Staufen, DE

Horizontalinkubator	Infors HAT Multitron Standard shaker	Infors GmbH, Einsbach
Inkubator	CB210 (5% CO ₂)	Binder, Tuttlingen, DE
Inkubator	INB 400	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Konfokales Mikroskop	TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Kühlschrank	LKPv	Liebherr, Bulle FR, CHE
Kryotom	CM3050	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Magnetrührer	IKAMAG® RH	Janke & Kunkel, Staufen, DE
Lichtmikroskop	Lichtmikroskop CK2	Olympus, Shunjuku, JPN
Mikrowelle	FG87SU	Samsung, Seoul, KOR
Perfusorpumpe	TSE540100	Technical Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, DE
pH-Meter	pH 531	WTW, Weilheim i. OB, DE
Pipetten	Pipetman Classic™ (P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Middleton, USA
Pipetten	Eppendorf ReferenceR (10/100/200/1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetus® Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt, DE
qPCR-Gerät	LightCycler® 96	Roche, Basel, CHE
Rollenmischer	RM5	CAT, Staufen- Etzenbach, DE
Schüttelinkubator	HAT Multitron Standard	Infors, Bottmingen, DE

Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilwerkbank	Universal Hood 75S/01530	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermocycler	TGradient	Biometra, Göttingen, DE
Thermomixer	1420	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Thermomixer	Comfort, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge	Universal 320R Hettich Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG Tuttlingen
Vibratom	VT1200S	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel, Staufen, DE
Vortexer	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH co. KG, Schwabach, DE
Vortexer	REAX top	Heidolph Instruments GmbH co. KG, Schwabach, DE
Waage	ABT 100-5 M	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Waage	MC1 LC 220 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Waage	MC1 LC 4200 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad	Thermomix 1420	B. Braun, Melsungen, DE

3.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters Ultracel®-10K, 10; 000NMWL	Merck KGaA, Darmstadt, DE
BD Perfusion 50 ml Spritze	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 mL / 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Cellstar® Plastikpipetten 2,5/ 5/ 10/ 25/ 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
CellstarR Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Cellstar® Zellkulturplatten 6-Well, 12- Well, 24-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Deckgläschen (1870)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einwegskalpell (Sorten 10, 21)	Feather, Osaka, JPN
Fettstift (DAKO Pen)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Millex®-GV Filter Unit, Low Protein binding Durapore® PVDF 0; 22 µm 33 mm	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Millex®-HV Filter Unit, Low Protein binding Durapore® PVDF 0; 45 µm 33 mm	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nitrilhandschuhe	Hartmann, Heidenheim, DE
Parafilm	Pechiney, Paris, FR
Pasteurpipetten 150 mm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Pasteurpipetten 230 mm	Assistant, Sondheim v. d. Rhon, DE
PCR-Platte für Roche® LightCycler®	Roche, Basel, CHE
Pipettenspitzen 10 µL / 100 µl / 1.000 µL	Sarstedt, Nürnberg, DE
Plattierungsspatel	Sarstedt, Nürnberg, DE
PCR Multiply®-Pro Farbmix	Sarstedt, Nürnberg, DE
Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Hamburg DE

Star FrostR Objekttrager	Laborchemie, Wien, AUT
Vinylhandschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersgelden, DE
Whatman Filterpapier	Whatman-GE Healthcare, Freiburg, DE
Zellschaber 30 cm	TPP, Trasadingen, CHE
Zirkoniumoxidperlen, ZrOB05	Next Advance, New York, USA

3.3 Allgemeine Chemikalien

Reagenzien	Hersteller
Agarose NEEO Ultraqualität	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose Ultra Pure™	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Ampicillin-Natrium, Bioextra, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Antibiotic-Antimycotic [1%]	Gibco®-Life Technologies Darmstadt, DE
Avertin (2,2,2-Tribromoethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bacto Tryptone – pankreatischer Casein-Verdau	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
CutSmart Puffer	New England BioLabs, Ipswich, USA
Collagen Typ 1, Rattenschwanz	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octan)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Di-Kaliumhydrogenphosphat + 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt, DE
Dextran [MW 60.000-90.000]	Affymetrix/ Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) [10 mM]	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Glucose	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
DMEM-F12 ohne Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
dNTP-Mix [10 mM]	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Dulbeco's PBS (phosphate buffered saline)	Biowest, Nuaille, FR
EndoGRO-MV-Zellkulturmedium	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Endothelzellwachstumszusatz (ECGS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure-dihydrat)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	J.T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, USA
Ethidiumbromid-Lösung [1% Lösung in Wasser (10 mg/ml)]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, DE
Glycerin	GERBU, Heidelberg, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Heparin-Natrium [5.000 IE/ml]	B.Braun, Melsungen, DE
HCl (Salzsäure) [2M]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, DE
Isopropanol	J.T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
LB Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen, Carlsbad, USA
LB Broth Base	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin [200 mM]	Gibco®-Life Technologies Darmstadt, DE
Magnesium-Chlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Methanol	J.T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, USA
Maus-Kollagen IV	BD, Franklin Lakes, USA
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, USA
Natriumchloridlösung, isoton [0,9%]	B. Braun, Melsungen, DE
Natrium-Dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, DE
Orange G (Ladepuffer)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Paraformaldehyd [37%]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PDS (Plasma derived serum from platelet free bovine plasma dialysed) (derived = abgeleitet)	First Link, Wolverhampton, UK
Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml]	PAA- GE Healthcare, Freiburg, DE
Puromycin-Dihydrochlorid von Streptomycin alboniger	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Salzsäure (HCl) [1 M]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Serumalbumin (bovin, Fraktion V)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, GB
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TRIS-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TRIS Base	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton®X-100	Promega, Mannheim, DE
Tosyl-lysin chloromethyl keton hydrochlorid (TLCK)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Yeast Extract	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

3.4 Medien, Puffer, Lösungen

Medien, Puffer, Lösungen	Hersteller
Agarose-Probenpuffer (10x)	4,43 mM Orange G 30% (v/v) Glycerin
Arbeitsmedium	DMEM/F12 L-Glutamin 2 mM Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 0,1 mg/ml)
CaCl ₂ -Lösung (2x)	100 mM (w/v) CaCl ₂

Colony PCR Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1,0 % Triton®X-100
DEPC-Wasser [0,1%]	0,1% (w / v) DEPC
Dextranlösung [18%]	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) Dextran 60.000-90.000 MW 18% (w/v) Penicillin / Streptomycin 100 U/ml / 0,1 mg/ml L-Glutamin 2 mM
DMEM-F12	Gibco®-Life Technologies Darmstadt, DE
Dulbecco's MEM Medium	Biochrom, Berlin, DE
Eindeckmedium (Mowiol/DABCO)	3,6 M Glycerin 0,43 mM Mowiol 4-88 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 22,3 mM DABCO
Glycin-HCl	25 mM (w/v) Glycin 2 M HCl hinzufügen bis pH 2,7
LB Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lysispuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS 200 mM NaCl Direkt vor der Verwendung hinzufügen von: Proteinase K (finale Konzentration 100 µg/ml)
MEM	Gibco®-Life Technologies Darmstadt, DE
OptiMEM®	Gibco®-Life Technologies Darmstadt, DE
PBS-Azid	PBS 0,02% (w/v) Natriumazid

Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Paraformaldehyd, PFA (4%), pH 7,4	PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (30x)	TRIS 1,2 M EDTA 30 mM pH 8,3 mit konzentrierter Essigsäure einstellen
TBS-Puffer, pH 7,6	38,5 mM TRIS-HCl 11,5 mM TRIS-Base 150 mM NaCl
TNT-Extraktionspuffer	20 ml Tris-HCl (1 M, pH 7,5) 10 ml MgCl ₂ (1 M) 150 ml NaCl (1 M) 100 ml Triton®X-100 (10%) 720 ml Ultrapure Wasser
Tris-HCl	1 M (w/v) Tris 2 M HCl hinzufügen bis pH 8
SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Verdaumedium	10 ml DMEM 100 µl Penicillin/Streptomycin (100x) Direkt vor dem Verdau: 100 µl Collagenase/Dispase CD 100 µl Tosyl-L-lysin chloromethyl keton (TLCK) 40 µl DNase I
Vollmedium, ggf. + Puromycin [8 µg/mL]	40 ml DMEM/F12 10 ml Plasma-abgeleitetes bovines Serum 500 µl Antibiotic / Antimycotic (100x) 500 µl L-Glutamin (100x) 150 µl Heparin (5000 U/ml) 500 µl ECGS

Zellkulturmedium HEK293-MEM (1x)	500 ml MEM Medium 50 ml FCS 5,5 ml L-Glutamin (200 mM) 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)
----------------------------------	---

3.5 Kits, Enzyme

Kit	Hersteller
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Fitchburg, USA
FastStart Essential DNA Green Master	Roche, Basel, CHE
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey & Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey & Nagel, Düren, DE
NucleoBond® Xtra Maxi Plus	Macherey & Nagel, Düren, DE
Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
PAS-Färbekit	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Enzym	Hersteller
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England BioLabs, Schwalbach, DE
Antarktische Phosphatase	New England BioLabs, Schwalbach, DE
Benzonase® Nuclease	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Collagenase/Dispase	Roche, Basel, CH
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England BioLabs, Schwalbach, DE
DNase I	Roche, Basel, CH
Firefly-Luciferase	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Godwin Dogbevia
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Schwalbach, DE
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Renilla-Luciferase	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Godwin Dogbevia

Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Schwalbach, DE
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England BioLabs, Schwalbach, DE
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs, Schwalbach, DE
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin, DE

3.6 Nukleinsäuren

3.6.1 Primer

Primer	Sequenz	Sequenz (5' → 3')
CAG_internal_F	CAG-Promoter	AACGCCAATAGGGACTTTC
CAG_internal_R	CAG-Promoter	GTAGGAAAGTCCCATAAGGTCA
EGFP_qPCR_F	eGFP	TGACCCTGAAGTTCATCTGC
EGFP_qPCR_R	eGFP	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
WPRE_F2	Woodchuck-Element	ACTGTGTTTGCTGACGCAAC
WPRE_R2	Woodchuck-Element	CAACACCACGGAATTGTCAG
mHexA_BstB_S	Murine Hexosaminidase A	CGATTCTGAATTCACCATGGCCGGCTGCAGGC
mHexA_Not_AS		GCGCGGCCGCTTTATCAAGTCTGCTCAAAC
mHexB_BstB_S	Murine Hexosaminidase B	CGATTCTGAATTCACCATGCCGCAGTCCC
mHexB_Not_AS		ACTTGCGGCCGCTTTACTATATTTTATTC
sl-T81-S-Nco1	S-T81	CTTCCCATGGGGACATGGCTGTCATGGTGTG
sl-T81-AS-Nco1	S-T81	GATCTCCATGGGCGGCACGCTGTTGACGCTG
CMV-T81-S-Kpn1	C-T81	GCGTGGTACCCGGTGGCGCCGCTTCGAGC

CMV-T81-AS-BamH1	C-T81	AGATCGGATCCTGCGGCACGTGTTGACG C
sl-S-Hind3	Kurzes Intron	GAATAAAGCTTCCCATGGGGACATGGCT GTCA
sl-AS-XhoI	Kurzes Intron	GCCTACTCGAGTTGTATCTAGAGGAAAG TGG
C-S-Hind3	CMV-Enhancer	GGATCAAGCTTACGCGTCGGTGGCGGC CGCT
C-AS-XhoI	CMV-Enhancer	GGCCCTCGAGGTCATCGGCGGAGTTGTT A
Tie2L_XhoI_fw	<i>Tie2</i> -Promoter	ATGACTCGAGAAAGAAGCTTACTAAGAT
Tie2L_AgeI_rev	<i>Tie2</i> -Promoter	TCCCACCGGTGGGAAGCTTCAACAAC
Tie2_intron_Mlu_S	Langes Intron	CCGCTACGCGTCGAGGTCCAGTATGGCT TCT
Tie2_intron_Xho_AS	Langes Intron	GCGGCTCGAGGGTACCATTATTGTTTTA CTTG
Xho_AS_short_Intron	Kurzes Intron	GCCTACTCGAGTTGTATCTAGAGGAAAG TGG
Mlu_S_short_Intron	Kurzes Intron	GGAGTACGCGTGAATACCCATGGGGAC ATGG
GD-C-Mlu-S	CMV-Enhancer	ACCGACGCGTCGGTGGCGGCCGCTTCG AG
GD-C-Xba-S	CMV-Enhancer	ACCGTCTAGACGGTGGCGGCCGCTTCGA GC
GD-C-XhoI-AS	CMV-Enhancer	GGCCCTCGAGGCATGGGGCGGAGTTGT TA
HG_Tie2L_S_Xho1_2	<i>Tie2</i> -Promoter	CAGCCACTCTCGAGATTCCTCTAGA
HG_Tie2L_AS_Mlu1_2	<i>Tie2</i> -Promoter	TGCTCACCATACGCGTGGTGGCGACCG
HG_WPRE_FseI_S	Woodchuck- Element	GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCA A

HG_WPRE_Fsel_AS	Woodchuck- Element	CGAGGCTGGCCGCGCTCAGCGAGCTC T
HG_Cdh5_S_Xho1_24_07_18	<i>Cdh</i> -Promoter	GCGGCCGCTCTCGAGCTAGGACCCAGC
HG_Cdh5_S_BamH1_24_07_18	<i>Cdh</i> -Promoter	GTAATTGGGATCCAACCTGGGAGTGGACA
HG_Master_S_BamH1	Master-Promoter	GCCAACCTGGATCCCCATCATAGGGGTTCC TAG
HG_Master_AS_AgeI	Master -Promoter	AATCAATACCGGTGTCTGGGCGAGCTCGA AGCGG
HG_Foxq1_häufig_long_S	<i>Foxq1</i> -Promoter	GGAAGACTCGAGAGGAGGAAGCTGGC
HG_Foxq1_häufig_long_AS	<i>Foxq1</i> -Promoter	AGGACACGCGTGTCTTCAGCCTCGAG
HG_Ocln_S_XhoI	<i>Ocln</i> -Promoter	CAGGGCGACTCGAGAAGTCCACCGAAA CTG
HG_Ocln_S_BamH1	<i>Ocln</i> -Promoter	GCTTGCGAGGATCCAATTTAACTATCTTC GGT
HG_ITIH5_long_S_XhoI_optimiert	<i>Itih5</i> -Promoter	CCTACACCTCGAGCCACCATCACACTG
HG_ITIH5_long_BamH1_optimiert	<i>Itih5</i> -Promoter	GTCGTCGGATCCCCAACTCCTTGCCCTC
HG_Slc2A1_genomatix_S_Xho1	<i>Slc2a1</i> -Promoter	GAGCAGAGCTCGAGGAGGCAGGTCTTG
HG_Slc2A1_genomatix_AS_Mlu1	<i>Slc2a1</i> -Promoter	AGCGGGGACACGCGTTCGGACAGGCGC
mSlco1c1_prom_XhoI_F1	<i>Slco1c1</i> -Promoter	GGAATCCAGTTCTCGAGTCTGGGGATCC AACA
mSlco1c1_prom_MluI_R2	<i>Slco1c1</i> -Promoter	GGAGGTAGAAGTCAACGCGTAAGCTGTC CAGT
mPglyrp1_prom_XhoI_F1	<i>Pglyrp1</i> -Promoter	CCCATGTGTGCTCGAGGTGAGAGGCATG GGAATG

mPglyrp1_prom_BamH1_R1	<i>Pglyrp1</i> -Promoter	CACTCACTGCGGGGCGGATCCACGATGAA
HG_Sgpp2_genomatix_S_Xho1	<i>Sgpp2</i> -Promoter	TGGTGGCAGCTCGAGGTGTTTCATGCAC
HG_Sgpp2_genomatix_AS_BamH1	<i>Sgpp2</i> -Promoter	CACGAGCTGGATCCGTGAATCCCAGCAG
HG_Tbx3_prom2_Xho1_S	<i>Tbx3</i> -Promoter	TTTTGCACTCGAGCCCGTCTTCTTGA
HG_Tbx3_prom2_MluI_AS	<i>Tbx3</i> -Promoter	GTCCCAACGCGTAAGTTCCTTGGCCT
HG_Plvap_genomatix_tm_S_Xho1	<i>Plvap</i> -Promoter	TTGGGGGCTCTCGAGGGTGTACCCG
HG_Plvap_genomatix_tm_AS_BamH1	<i>Plvap</i> -Promoter	GGACCAGGGATCCGCCAGGATGATG
GLUT1_S_Xho1_06_18	<i>Poglut1</i> -Promoter	TTAATGATACTCGAGATGATACATAGC
GLUT1_AS_BamH1_06_18	<i>Poglut1</i> -Promoter	ACCCCGAGCGGATCCCGCGGCGGTAAGCTC

3.6.2 Plasmide

Plasmid	Generierung des Plasmids
p-CAG- <i>hHEXA</i>	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Godwin Dogbevia (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Lübeck)
p-CAG- <i>hHEXB</i>	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Godwin Dogbevia (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Lübeck)
p-CAG- <i>mHexA</i>	Zur Herstellung des Plasmids p-CAG- <i>mHexA</i> wurde die Sequenz der murinen <i>Hexosaminidase A</i> von muriner cDNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert mittels der Primer mHexA_BSTB_S und mHexA_NotI_AS. Anschließend wurden die Fragmente mit den Restriktionsenzymen BstBI und NotI geschnitten. Aus dem Plasmid p-CAG- <i>NEMO-2A-eGFP</i> wurden <i>NEMO-2A-eGFP</i> mit BstBI und NotI entfernt und die Fragmente anschließend ligiert.
p-CAG- <i>mHexB</i>	Zur Herstellung des Plasmids p-CAG- <i>mHexB</i> wurde die Sequenz der murinen <i>Hexosaminidase B</i> von muriner cDNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert mittels der Primer mHexB_BSTB_S und mHexB_NotI_AS. Anschließend wurden die Fragmente mit den Restriktionsenzymen BstBI und NotI geschnitten. Aus dem Plasmid p-CAG- <i>NEMO-2A-eGFP</i> wurden <i>NEMO-2A-eGFP</i> mit BstBI und NotI entfernt und die Fragmente anschließend ligiert.
p-CAG-∅	Das Plasmid p-CAG-∅ wurde hergestellt mittels Restriktion des Plasmids p-CAG-eGFP mit den Restriktionsenzymen NcoI und FseI, sodass das Reporter-gen eGFP entfernt wurde. Anschließend wurde eine Klenowbehandlung zur Glättung der Enden durchgeführt und das Plasmid anschließend ligiert.
p-C-MLC800-eGFP	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Oliver Müller (Universitätsklinikum Heidelberg)
p-C-MLC1500-eGFP	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Oliver Müller (Universitätsklinikum Heidelberg)

p-CAG-eGFP	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Rolf Sprengel (MPI, Heidelberg)
p-CAG-Luc-W	Der CAG-Promoter wurde isoliert mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen MluI und BamHI aus dem Plasmid p-CAG-iCre-2A-eGFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Jakob Körbelin und Prof. Dr. Martin Trepel, UKE Hamburg). Anschließend wurde das Plasmid p- <i>ITIH5</i> -Luc, das die Firefly-Luciferase enthält, mit MluI und BamHI geschnitten und hierdurch der <i>ITIH5</i> -Promoter entfernt. Anschließend wurden die aufgereinigten Plasmidfragmente miteinander ligiert.
p-CAG-RLuc	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Jakob Körbelin (UKE Hamburg).
p-T81-eGFP	Um das Plasmid p-T81-eGFP zu generieren, wurde der CMV-Enhancer aus dem Plasmid p-C-T81-eGFP mittels Restriktion mit KpnI and XhoI isoliert. Anschließend wurden die Enden nach der Restriktion geglättet und das Plasmid wurde ligiert.
p-S-T81-eGFP	Das Insert S-T81 wurde auf Grundlage des Plasmids p-S-T81-Luc mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden die folgenden Primer 5'-CTCCCATGGGGACATGGCTGTCATGGTGTG-3' und 5'-GATCTCCATGGGCGGCACGCTGTTGACGCTG-3' verwendet. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-S- <i>Tie2</i> -eGFP eingefügt, aus dem zuvor S- <i>Tie2</i> mittels Restriktion mit NcoI entfernt wurde. Vor der Ligation wurde das Fragment dephosphoryliert.
p-C-T81-eGFP	Das Insert C-T81 wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-T81-Luc mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurde der Primer mit der Sequenz 5'-GCGTGGTACCCGGTGGCGCCGCTTCGAGC-3' und der Primer mit der Sequenz 5'-AGATCGGATCCTGCGGCACGTGTTGACGC-3' verwendet. Anschließend wurde das isolierte PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen KpnI und BamHI geschnitten. Nachfolgend wurde das geschnittene PCR-Produkt in das Plasmid p-CAG- <i>NEMO</i> -2A-eGFP eingefügt, das mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde.

p-T81-Luc	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Markus Schwaninger (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Lübeck) (121).
p-S-T81-Luc	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde auf Grundlage des Plasmids p-S- <i>Tie2</i> -Luc mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'-GAATAAAGCTTCCCATGGGGACATGGCTGTCA-3' und des Primers mit der Sequenz 5'-GCCTACTCGAGTTGTATCTAGAGGAAAGTGG-3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-T81-Luc eingefügt, nachdem sowohl das kurze Intron als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI behandelt wurden.
p-C-T81-Luc	Das Insert in Form des CMV-Enhancers wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Itih5</i> -Luc mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'-GGATCAAGCTTACGCGTCGGTGGCGGCCGCT-3' und unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'-GGCCCTCGAGGTCATCGGCGGAGTTGTTA-3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-T81-Luc eingefügt, nachdem sowohl der CMV-Enhancer als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI behandelt wurden.
p-Tie2-eGFP-W	Das Insert in Form des <i>Tie2</i> -Promoters wurde auf Grundlage genomischer Maus-DNA mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'-ATGACTCGAGAAAGAAGCTTACTAAGAT-3' und des Primers mit der Sequenz 5'- TCCCACCGGTGGGAAGCTTTCAACAAC -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p- <i>Itih5</i> -eGFP eingefügt, nachdem sowohl der <i>Tie2</i> -Promoter als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XhoI und AgeI behandelt wurden.

p-L- <i>Tie2</i> -eGFP	Das Plasmid p-L- <i>Tie2</i> -eGFP wurde generiert, indem das Woodchuck-Element aus dem Plasmid p-L- <i>Tie2</i> -eGFP-W mittels Restriktion mit NotI und Sall entfernt wurden. Anschließend wurden mittels Klenow-Behandlung glatte Enden generiert und das Plasmid religiert.
p-L- <i>Tie2</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des langen Introns wurde auf Grundlage genomischer Maus-DNA mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- CCGCTACGCGTCGAGGTCCAGTATGGCTTCT -3' und des Primers mit der Sequenz 5'- GCGGCTCGAGGGTACCATTATTGTTTTACTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, nachdem sowohl das lange Intron als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI behandelt wurden.
p-S- <i>Tie2</i> -eGFP	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde auf Grundlage des Plasmids p-L- <i>Tie2</i> -eGFP mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GCCTACTCGAGTTGTATCTAGAGGAAAGTGG -3' und des Primers mit der Sequenz 5'- GGAGTACGCGTGAATACCCATGGGGACATGG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-L- <i>Tie2</i> -eGFP eingefügt, nachdem sowohl das kurze Intron als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI behandelt wurden.
p-S- <i>Tie2</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde auf Grundlage des Plasmids p-L- <i>Tie2</i> -eGFP mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GCCTACTCGAGTTGTATCTAGAGGAAAGTGG -3' und des Primers mit der Sequenz 5'- GGAGTACGCGTGAATACCCATGGGGACATGG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-L- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, nachdem sowohl das kurze Intron als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI behandelt wurden.

p-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des CMV-Enhancers wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-MLC1500-eGFP, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE) zur Verfügung gestellt wurde, mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- ACCGACGCGTCCGGTGGCGGCCGTTTCGAG -3' und unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GGCCCTCGAGGTCATCGGCCGGAGTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, nachdem sowohl der CMV-Enhancer als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI behandelt wurden.
p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP	Das Insert in Form des CMV-Enhancers wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-MLC1500-eGFP, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE) zur Verfügung gestellt wurde, mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- ACCGTCTAGACGGTGGCGGGCGCTTCCAGC -3' und unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GGCCCTCGAGGTCATCGGCCGGAGTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-S- <i>Tie2</i> -eGFP eingefügt, nachdem sowohl der CMV-Enhancer als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI behandelt wurden.
p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des CMV-Enhancers wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-MLC1500-eGFP, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE) zur Verfügung gestellt wurde, mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- ACCGTCTAGACGGTGGCGGGCGCTTCCAGC -3' und unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GGCCCTCGAGGTCATCGGCCGGAGTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p-S- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, nachdem sowohl der CMV-Enhancer als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI behandelt wurden.

p- <i>Tie2</i> -Luc-W	Das Insert in Form der Firefly-Luciferase wurde aus dem Plasmid p- <i>Itih5</i> -Luc mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen AgeI und Sall isoliert. Anschließend wurde die Firefly-Luciferase in das Plasmid p- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, aus dem die Sequenz für eGFP mittels Restriktion mit AgeI und Sall entfernt wurde.
p-L- <i>Tie2</i> -Luc-W	Das Insert in Form des langen Introns wurde auf Grundlage genomischer Maus-DNA mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- CCGCTACGCGTCGAGGTCCAGTATGGCTTCT -3' und des Primers mit der Sequenz 5'- GCGGCTCGAGGGTACCATTATTGTTTTACTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p- <i>Tie2</i> -Luc-W eingefügt, nachdem sowohl das lange Intron als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI behandelt wurden.
p-S- <i>Tie2</i> -Luc-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde aus dem Plasmid p-S- <i>Tie2</i> -eGFP-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI isoliert. Anschließend wurde das kurze Intron in das Plasmid p-L- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, aus dem die Sequenz für das lange Intron mittels Restriktion mit MluI und XhoI entfernt wurde.
p-C- <i>Tie2</i> -Luc-W	Das Insert in Form des CMV-Enhancers wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-MLC1500-eGFP, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE) zur Verfügung gestellt wurde, mittels PCR amplifiziert unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- ACCGACGCGTCGGTGGCGGCCGTTTCGAG -3' und unter Verwendung des Primers mit der Sequenz 5'- GGCCCTCGAGGTCATCGGCGGAGTTG -3'. Das isolierte PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid p- <i>Tie2</i> -Luc-W eingefügt, nachdem sowohl der CMV-Enhancer als auch das Plasmid mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI behandelt wurden.

p-S-C- <i>Tie2</i> -Luc-W	Das Insert in Form der Firefly-Luciferase wurde aus dem Plasmid p- <i>Itih5</i> -Luc mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen AgeI und Sall isoliert. Anschließend wurde die Firefly-Luciferase in das Plasmid p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W eingefügt, aus dem die Sequenz für eGFP mittels Restriktion mit AgeI und Sall entfernt wurde.
p- <i>Cdh</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des Promoters Cadherin wurde auf Grundlage des Plasmids pDS-C- <i>Cdh</i> -eGFP, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE) zur Verfügung gestellt wurde, mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI isoliert. Anschließend wurden mittels Klenowbehandlung des Fragments glatte Enden generiert. Als Plasmid, in das der Promoter eingefügt werden sollte, wurde das Plasmid p- <i>Ocln</i> -eGFP-W verwendet. Aus diesem wurde die Sequenz des Promoters <i>Ocln</i> mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI entfernt. Anschließend erfolgte auch hier eine Generierung glatter Enden sowie eine Dephosphorylierung und anschließend eine Ligation des Fragmentes sowie des Backbones.
p-S- <i>Cdh</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde aus dem Plasmid p-S- <i>Tie2</i> -eGFP-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen MluI und XhoI isoliert. Anschließend wurden glatte Enden mittels Klenowbehandlung generiert. Anschließend wurde das Plasmid p- <i>Cdh</i> -eGFP-W mit dem Restriktionsenzym MluI geschnitten, glatte Enden generiert und die Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde das Insert in das offene Plasmid mittels Ligation eingefügt.
p-C- <i>Cdh</i> -eGFP-W	Das Insert in Form des Cadherin-Promoters wurde aus dem Plasmid pDS-C- <i>Cdh</i> -eGFP, zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Oliver Müller (UniversitätsKlinikum Heidelberg, DE), mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI isoliert. Anschließend wurden glatte Enden mittels Klenowbehandlung generiert. Anschließend wurde das Plasmid p-C- <i>Ocln</i> -eGFP-W mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI geschnitten, glatte Enden generiert und die Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde das Insert in das offene Plasmid mittels Ligation eingefügt.

p-S-C-Cdh-eGFP-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde aus dem Plasmid p-S-Tie2-eGFP-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen Mlul und XhoI isoliert. Anschließend wurden glatte Enden mittels Klenowbehandlung generiert. Anschließend wurde das Plasmid p-C-Cdh-eGFP-W mit dem Restriktionsenzym Mlul geschnitten, glatte Enden generiert und die Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde das Insert in das offene Plasmid mittels Ligation eingefügt.
p-Cdh-Luc-W	Das Insert in Form der Firefly-Luciferase wurde aus dem Plasmid p-S-Tie2-Luc-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen AgeI und Sall isoliert. Anschließend wurde die Firefly-Luciferase in das Plasmid p-Cdh-eGFP-W eingefügt, aus dem die Sequenz für eGFP mittels Restriktion mit AgeI und Sall entfernt wurde.
p-S-Cdh-Luc-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde aus dem Plasmid p-S-Tie2-eGFP-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen Mlul und XhoI isoliert. Anschließend wurden glatte Enden mittels Klenowbehandlung generiert. Anschließend wurde das Plasmid p-Cdh-Luc-W mit dem Restriktionsenzym Mlul geschnitten, glatte Enden generiert und die Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde das Insert in das offene Plasmid mittels Ligation eingefügt.
p-C-Cdh-Luc-W	Das Insert in Form der Firefly-Luciferase wurde aus dem Plasmid p-S-Tie2-Luc-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen AgeI und Sall isoliert. Anschließend wurde die Firefly-Luciferase in das Plasmid p-C-Cdh-eGFP-W eingefügt, aus dem die Sequenz für eGFP mittels Restriktion mit AgeI und Sall entfernt wurde.
p-S-C-Cdh-Luc-W	Das Insert in Form des kurzen Introns wurde aus dem Plasmid p-S-Tie2-eGFP-W mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen Mlul und XhoI isoliert. Anschließend wurden glatte Enden mittels Klenowbehandlung generiert. Anschließend wurde das Plasmid p-C-Cdh-Luc-W mit dem Restriktionsenzym Mlul geschnitten, glatte Enden generiert und die Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde das Insert in das offene Plasmid mittels Ligation eingefügt.

p-C- <i>Cdh</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W mit den Primern HG_WPRE_FseI_S 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und HG_WPRE_FseI_AS 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3'. Das isolierte PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde in das Plasmid p-C- <i>Cdh</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.
p-C- <i>Cdh</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Cdh</i> -Promoters wurde mittels PCR auf Grundlage des Plasmids p-C-S- <i>Cdh</i> -eGFP-W amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Cdh5_S_Xho1_24_07_18 mit der Sequenz 5'-GCGGCCGCTCTCGAGCTAGGACCCAGC-3' und der Primer HG_Cdh5_S_BamH1_24_07_18 mit der Sequenz 5'-GTAATTGGGATCCAAGTGGGAGTGGACA-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Foxq1</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRV geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Foxq1</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W mit den Primern HG_WPRE_FseI_S 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und HG_WPRE_FseI_AS 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3'. Das isolierte PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde in das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.

p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Foxq1</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Foxq1_häufig_long_S mit der Sequenz 5'-GGAAGACTCGAGAGGAGGAAGCTGGC -3' und der Primer HG_Foxq1_häufig_long_AS 5'-AGGACACGCGTGTCTTCAGCCTCGAG-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W mit den Primern HG_WPRE_FseI_S 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und HG_WPRE_FseI_AS 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3'. Das isolierte PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde in das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.
p-C- <i>Ocln</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Ocln</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Ocln</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Ocln</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Ocln</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W mit den Primern HG_WPRE_FseI_S 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und HG_WPRE_FseI_AS 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3'. Das isolierte PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde in das Plasmid p-C- <i>Ocln</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.

p-C- <i>Ocln</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Ocln</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_ <i>Ocln</i> _S_XhoI mit der Sequenz 5'-CAGGGCGACTCGAGAACTGCCACCGAAACTG-3' und der Primer HG_ <i>Ocln</i> _S_BamHI 5'-GCTTGCGAGGATCCAATTTAACTATCTTCGGT-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Ocln</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_FseI_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGCGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Ocln</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.
p-C- <i>Itih5</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Itih5</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Itih5</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Itih5</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRV geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Itih5</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_FseI_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGCGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine

	Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Itih5</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten wurde.
p-C- <i>Itih5</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Itih5</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_ITIH5_long_S_XhoI_optimiert mit der Sequenz 5'-CCTACACCTCGAGCCACCATCACA CTG-3' und der Primer HG_ITIH5_long_BamHI_optimiert 5'-GTCGTCGGATCCCCAACTCCTTGCCCTC-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Itih5</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_Fsel_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT -3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Itih5</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten wurde.
p-C- <i>Slc2a1</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Slc2a1</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Slc2a1</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Slc2a1</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen MluI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Slc2a1</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer

	<p>HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C-<i>Slc2a1</i>-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.</p>
p-C- <i>Slc2a1</i> -S-eGFP	<p>Die Sequenz des <i>Slc2a1</i>-Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Slc2a1_genomatix_S_Xho1 mit der Sequenz 5'-GAGCAGAGCTCGAGGAGGCAGGTCTTG - 3' und der Primer HG_Slc2a1_genomatix_AS_Mlu1 5'-AGCGGGGACACGCGTTCGGACAGGCGC-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C-<i>Foxq1</i>-S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.</p>
p-C- <i>Slc2a1</i> -S-eGFP-W	<p>Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C-<i>Tie2</i>-eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_FseI_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C-<i>Slc2a1</i>-S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.</p>
p-C- <i>Slco1c1</i> -eGFP	<p>Das Plasmid p-C-<i>Slco1c1</i>-eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-<i>Slco1c1</i>-S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C-<i>Slco1c1</i>-S-eGFP mit den Restriktionsenzymen MluI und EcoRV geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.</p>

p-C- <i>Slco1c1</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_Fsel_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Slco1c1</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten wurde.
p-C- <i>Slco1c1</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Slco1c1</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer mSlco1c1_prom_XhoI_F1 mit der Sequenz 5'-GGA CTCCAGTTCTCGAGTCTGGGGATCCAACA-3' und der Primer mSlco1c1_prom_XhoI_R2 5'-GGAGGTAGAAGTCAACGCGTAAGCTGTCCAGT-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Slco1c1</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_Fsel_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Slco1c1</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten wurde.
p-C- <i>Pglyrp1</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Pglyrp1</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Pglyrp1</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Pglyrp1</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das

	Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Pglyrp1</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_Fsel_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Pglyrp1</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten wurde.
p-C- <i>Pglyrp1</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Pglyrp1</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer mPglyrp1_prom_XhoI_F1 mit der Sequenz 5'-CCCATGTGTGCTCGAGGTGAGAGGCATGGGAATG-3' und der Primer mPglyrp1_prom_BamHI_R1 5'-CACTCACTGCGGGGCGGATCCACGATGAAA -3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Pglyrp1</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_Fsel_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGGCCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_Fsel_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Fsel geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C-

	<i>Pglyrp1</i> -S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.
p-C- <i>Sgpp2</i> -eGFP	Das Plasmid p-C- <i>Sgpp2</i> -eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C- <i>Sgpp2</i> -S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C- <i>Sgpp2</i> -S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C- <i>Sgpp2</i> -eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_FseI_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGCGCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C- <i>Sgpp2</i> -eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.
p-C- <i>Sgpp2</i> -S-eGFP	Die Sequenz des <i>Sgpp2</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Sgpp2_genomatix_tm_S_XhoI mit der Sequenz 5'-TGGTGGCAGCTCGAGGTGTTTCATGCAC-3' und der Primer HG_Sgpp2_genomatix_tm_AS_BamHI 5'-CACGAGCTGGATCCGTGAATCCCGCAG-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C- <i>Foxq1</i> -S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C- <i>Sgpp2</i> -S-eGFP-W	Das Woodchuck-Element (W) wurde mittels PCR amplifiziert auf Grundlage des Plasmids p-S-C- <i>Tie2</i> -eGFP-W. Hierfür wurde der Primer HG_WPRE_FseI_S mit der Sequenz 5'-GTACAAGTAGGCCGCGCAAGCGGCCGCAA-3' und der Primer

	<p>HG_WPRE_FseI_AS mit der Sequenz 5'-CGAGGCTGGCCGCGCCGCTCAGCGAGCTCT-3' verwendet. Das isolierte PCR-Fragment wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten und dann erfolgte eine Dephosphorylierung mit dem Enzym Antarktische Phosphatase. Dieses Insert wurde anschließend in das Plasmid p-C-Sgpp2-S-eGFP inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym FseI geschnitten wurde.</p>
p-C-Tbx3-eGFP	<p>Das Plasmid p-C-Tbx3-eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-Tbx3-S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C-Tbx3-S-eGFP mit den Restriktionsenzymen MluI und EcoRV geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.</p>
p-C-Tbx3-S-eGFP	<p>Die Sequenz des <i>Tbx3</i>-Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Tbx3_prom2_XhoI_S mit der Sequenz 5'-TTTTGCACTCGAGCCCGTCTTCTTGA -3' und der Primer HG_Tbx3_prom2_MluI_AS 5'-GTCCAacgcgtAAGTTCCTTGGCCT -3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C-Foxq1-S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.</p>
p-C-Plvap-eGFP	<p>Das Plasmid p-C-Plvap-eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-Plvap-S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C-Plvap-S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.</p>
p-C-Plvap-S-eGFP	<p>Die Sequenz des <i>Plvap</i>-Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer HG_Plvap_genomatix_tm_S_XhoI mit der Sequenz 5'-TTGGGGGCTCTCGAGGGTGTACCCG-3' und der</p>

	Primer HG_Plvap_genomatix_tm_AS_BamH1 5'-GGACCAGGGATCCGCCAGGATGATG-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C-Foxq1-S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-C-Poglut1-eGFP	Das Plasmid p-C-Poglut1-eGFP wurde auf Grundlage des Plasmids p-C-Poglut-S-eGFP generiert. Hierfür wurde das Plasmid p-C-Poglut1-S-eGFP mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und auf diese Weise das Element „S“ aus dem Plasmid entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Plasmids mit dem Klenowfragment zur Generierung glatter Plasmidenden und nachfolgend die Ligation.
p-C-Poglut1-S-eGFP	Die Sequenz des <i>Poglut1</i> -Promoters wurde mittels PCR von genomischer DNA von C57BL/6-Mäusen amplifiziert. Hierfür wurde der Primer GLUT1_S_Xho1_06_18 mit der Sequenz 5'-TTAATGATACTCGAGATGATACATAGC -3' und der Primer GLUT1_AS_BamH1_06_18 5'-ACCCCAGCGGATCCCGCGGCGGTAAGCTC-3' verwendet. Als Backbone diente das Plasmid p-C-Foxq1-S-eGFP, aus dem die Promotersequenz mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI entfernt wurde. Anschließend wurden die Plasmidfragmente ligiert.
p-CAG-NEMO	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Godwin Dogbevia (Universität zu Lübeck)
PXX2-187-NRGTEWD	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Jakob Körbelin (UKE Hamburg).
p179	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Jakob Körbelin (UKE Hamburg).

3.7 DNA-Leitern

DNA-Leiter	Hersteller
Lambda-Styl	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Sprengel, MPI Heidelberg, DE
pRK7-Hinfl	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Sprengel, MPI Heidelberg, DE
1 kb DNA-Leiter	New England BioLabs, Schwalbach, DE
100 bp DNA-Leiter	New England BioLabs, Schwalbach, DE

3.8 Zelllinien

Top Ten chemisch kompetente E. coli	Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG λ -	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mach1 chemisch kompetente E. coli	Genotyp: F- ϕ 80(lacZ) Δ M15 Δ lacX74 hsdR(rK-mK+) Δ recA1398 endA1 tonA	Invitrogen, Carlsbad, USA
NEB Stable chemisch kompetente Zellen (C3040H)	Genotyp: F' proA+B+ lacI ^q Δ (lacZ)M15 zzzf::Tn10 (Tet ^R) Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- Φ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str ^R) rph spoT1 Δ (mrr- hsdRMS-mcrBC)	New England BioLabs, Schwalbach, DE
HEK293-Zellen (DSMZ ACC 305)	DSMZ ACC 305	Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig

Immortalisierte Humane Gehirndothelzellen hCMEC/D3	SCC066 (142)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
--	--------------	-----------------------------------

3.9 Versuchstiere

Mauslinie	Lieferant
Wildtyp C57BL/6N	Charles River, Sulzfeld, DE
129S4-Hexb ^{tm1Rlp} /J	Charles River, Wilmington, USA; Zucht in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck

3.10 Antikörper

3.10.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller (Katalognummer)	Verdünnung	Wirt
Huhn anti-GFP	Abcam (ab13920)	1:2.000	Huhn
Rat anti-CD31	BD Biosciences (557355)	1:400	Ratte
Huhn anti-GFAP	Millipore (AB5541)	1:500	Huhn
Kaninchen anti-Iba1	Wako Chemicals (019-19741)	1:400	Kaninchen
Maus anti-NeuN, clone A 60	Millipore (MAB377)	1:2.000	Maus

3.10.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller (Katalognummer)	Verdünnung
Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam (ab150169)	1:400
Goat Anti-Mouse IgY H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam (A-31619)	1:400
Donkey Anti-Rabbit IgY H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam (A-21206)	1:400
Cy TM 3 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (712-165-150)	1:400
Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti- Chicken IgY (H+L)	Abcam (ab97147)	1:400

3.11 Software

Software	Hersteller
ABI Prism 7000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geneious 7.0.6	Biomatters, Auckland, NZL
GraphPad Prism®7.00	GraphPad, La Jolla, USA
SPSS	IBM, Armonk, New York, USA
Fiji (Image J)	Open Source Projekt (https://fiji.sc/)
LAS AF Imaging Software	Leica Microsystems, Wetzlar, USA
Serial Cloner 2.6	Serial Basics (serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)
Illustrator CS5	Adobe, San José (USA)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Generierung von Plasmiden

DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wurde 1986 von Kary B. Mullis entwickelt, um definierte Nukleotidsequenzen ausgehend von einer geringen initialen DNA-Menge zu vervielfältigen. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf der repetitiven Wiederholung der folgenden drei Mechanismen: Denaturierung der doppelsträngig vorliegenden DNA in zwei Einzelstränge, Anbinden der für das gewünschte PCR-Produkt spezifischen „Sense- und Antisense-Primer“ an die einzelsträngige DNA und anschließend die Verlängerung der Nukleotidsequenz ausgehend von den an die DNA gebundenen Primern (143). Mittels der im Rahmen dieser Arbeit zur Generierung von Plasmiden verwendeten Primer wurden spezifische Restriktionsschnittstellen eingebracht.

Zur Durchführung von PCR-Reaktionen für die Generierung von Plasmiden wurde das Phusion High Fidelity PCR System (New England BioLabs, Schwalbach, DE) verwendet. Im Rahmen von Colony-PCRs wurde die GoTaq-Polymerase verwendet (Tab. 6). Die Phusion-Polymerase wurde künstlich hergestellt und besteht aus einer Pyrococcus-ähnlichen Polymerase und einer DNA-bindenden ssO7d-Domäne, wodurch eine rasche sowie präzise DNA-Amplifizierung ermöglicht wird. Die Phusion-Polymerase hat eine Exonuklease-Aktivität, sodass die Amplifikationsprodukte glatte Enden aufweisen. Um die Generierung von Plasmiden zu erleichtern, werden überhängende Enden generiert, indem das PCR-Produkt anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten wird. Die GoTaq-Polymerase wurde 1969 aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert, das erstmals in Geysiren im Yellowstone Nationalpark nachgewiesen wurde (144). Um in einem solchen Lebensraum zu überleben, ist eine Hitzebeständigkeit des Bakteriums sowie seiner DNA-Polymerase erforderlich. Aus der Hitzebeständigkeit resultiert die Eignung dieser DNA-Polymerase für die Polymerasekettenreaktion.

Die PCR-Reaktionen erfolgten entsprechend der vom Hersteller herausgegebenen Empfehlungen. Parameter wie die Temperatur zur Primerhybridisierung und die

Elongationszeit wurden entsprechend der Schmelztemperatur des Primerpaares sowie der zu amplifizierenden DNA-Länge angepasst.

PCR-Protokoll für einen Reaktionsansatz von 20 µl	
5x Phusion® GC-Puffer	4 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Jeweils 10 µM Primer 1 und 2	Jeweils 1 µl
Phusion-DNA-Polymerase	1 µl
Matrizen-DNA	1-100 ng
Nuclease-freies Wasser	ad 20 µl

Tab. 6: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung der Phusion-DNA-Polymerase (NEB, Schwalbach, DE).

PCR-Programm zur Durchführung einer Gradienten-PCR

(1) Initiale Denaturierung	98°C	30 sec
(2) 30 Zyklen		
a) DNA-Denaturierung	98°C	15 sec
b) Primerhybridisierung	Gradient	30 sec
c) Elongation	72°C	30 sec/kb
(3) Finale Elongation	72°C	10 min
(4) Reaktionsende	4°C	∞

Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen (auch Restriktionsenzyme genannt) sind Enzyme, die physiologisch in Bakterien und Archaeen vorkommen und diesen zur Phagenabwehr dienen, indem sie anhand eines fehlenden Methylierungsmusters oder einer spezifischen Basenabfolge der DNA Fremd-DNA erkennen und hydrolysieren. Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine bestimmte Basensequenz von 4-8 Basenpaaren und spalten die DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen. Beim Spalten der DNA können in Abhängigkeit der

verwendeten Restriktionsendonuklease überhängende Enden („sticky ends“) und glatte Enden („blunt ends“) entstehen.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach, DE) bezogen. Da die Spezifität und Aktivität der Restriktionsenzyme – und somit das Gelingen der Restriktion - von eingesetzten Puffern, Cofaktoren, Umgebungstemperatur und Hitzeinaktivierung abhängig sind, wurde den Angaben des Herstellers präzise gefolgt. Die Restriktionsreaktion wurde auf Eis angesetzt. Für den Umsatz von 5 µg DNA wurden ca. 25 U des Restriktionsenzymes in einem maximalen Volumen von 60 µl eingesetzt.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel

Bei der Gelelektrophorese wird mittels einer Gel-Matrix ein engmaschiges, dreidimensionales Netzwerk gebildet, mit dessen Hilfe DNA- und RNA-Fragmente sowie hochmolekulare Proteine der Größe nach aufgetrennt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Gel-Matrix Agarose verwendet, die zu 150-500 nm großen Poren im Gel führt. DNA-Fragmente weisen nach Anlage eines elektrischen Feldes (6-8 Volt / cm²) über dem Agarosegel aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten in Richtung der Anode auf. Daraus folgt, dass sich nach Ablauf der Laufzeit des Gels die langen DNA-Fragmente dicht bei der Kathode befinden, die kurzen DNA-Fragmente finden sich dicht bei der Anode. Neben der Länge des DNA-Fragments ist die Distanz zwischen den DNA-Banden abhängig von dem Anteil an Agarose im Gel. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gelelektrophoresen wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet.

Für die Herstellung der Gele zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde die jeweils benötigte Agarosemenge in 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und so gelöst. Nach Abkühlen der aufgeköchten Agarose in 1x TAE-Puffer auf 70°C wurden 0,02 µl Ethidiumbromid pro ml Agarosegellösung zugegeben. Das Ethidiumbromid interkaliert in die aufzutrennende DNA und ermöglicht so die Darstellung der DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm. Zur Dokumentation diente das Fotosystem Gel Doc Launcher.

Um eine Fragmentlängenanalyse der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurde das Gel neben den mit Ladebuffer-versetzten Proben mit DNA-Markern beladen. Als DNA-Marker wurde zum Nachweis von DNA-Fragmenten mit einer Länge unter 1.400 bp pRK7-Hinf1 verwendet. Für DNA-Fragmente, die über 1.000 bp lang sind, wurde der Neb 1 kb Marker verwendet.

Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Restriktion oder Vervielfältigung von Vektor und Fragment mittels Polymerasekettenreaktion sowie Auftrennung und Darstellung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese sollte für die Generierung von neuen Plasmiden nur ein spezifisches DNA-Fragment verwendet werden. Zur Isolierung des spezifischen DNA-Fragments wurde der gesamte Restriktionsansatz oder der gesamte PCR-Ansatz auf ein präparatives Gel geladen und nach Durchführung der Gelelektrophorese unter langwelligem UV-Licht die DNA-Bande ausgeschnitten, die auf Höhe der gewünschten DNA-Länge liegt. Um die DNA aus dem Gel herauszulösen, wurde das „Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up“-Kit von Macherey-Nagel unter Benutzung der mitgelieferten Puffer verwendet. Zur Erhöhung der DNA-Konzentration im Eluat wurde das Protokoll von Macherey-Nagel, wie im Folgenden aufgeführt, modifiziert.

Zum Auflösen des ausgeschnittenen Gels wurden zu 100 mg Agarosegel 200 µl NTI-Puffer hinzugegeben und das Gel anschließend bei 50°C inkubiert und alle 2 Minuten mit einem Vortexer durchmischt. Das aufgelöste Gel wurde nachfolgend auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben und zentrifugiert (13.000 rpm; 1 Minute). Dabei wurde die im Gel enthaltene DNA an eine Silica-Membran in der Säule gebunden. Um Gelreste und Rückstände vom NTI-Puffer zu entfernen, wurden die Säulen zweimal mit 700 µl Waschpuffer und unter Zentrifugation (13.000 rpm; 1 Minute) gewaschen. Da das im Waschpuffer enthaltene Ethanol nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren kann, wurde die Membran vor der Elution trocken zentrifugiert und 5 Minuten bei 70°C getrocknet.

Um die DNA aus der Membran zu lösen, wurden zweimal hintereinander 15 µl Elutionspuffer (Tris/HCl, pH 8,5) auf die Membran gegeben und die Säule für 5 Minuten

bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde das Eluat aus der Membran durch Zentrifugation (13.000 rpm; 1 Minute) gelöst.

Klenow-Behandlung

Die Klenow-Behandlung dient der Generierung glatter Enden nach erfolgter Restriktion. Für die Klenow-Behandlung wird das Klenow-Enzym genutzt. Das Klenow-Enzym entspricht dem größeren der beiden Proteinfragmente der DNA-Polymerase I von *Escherichia coli* nach Spaltung mit Subtilisin. Das Klenow-Enzym besitzt eine 5'→3'-Polymerase-Aktivität und eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und kann somit zum Auffüllen von 5'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen nach Restriktion oder zum Abbau von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen nach Restriktion verwendet werden (145).

Das in dieser Arbeit eingesetzte Klenow-Fragment wurde von der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach, DE) bezogen. Den Anweisungen des Herstellers für die Anwendung des Klenow-Fragments wurde präzise gefolgt.

Dephosphorylierung von DNA-Fragment-Enden

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragment-Enden wurde bei der Generierung von Plasmiden durchgeführt, bei denen nach der Restriktion mit nur einem Restriktionsenzym oder nach der Durchführung einer Klenow-Behandlung eine Religation der linearisierten DNA zu einem zirkulären Plasmid verhindert werden sollte. Für die Dephosphorylierung von 5'- und 3'-Enden von DNA können verschiedene Enzyme verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür die Shrimp Alkaline Phosphatase oder die Antarktische Phosphatase von New England BioLabs (NEB, Schwalbach, DE) verwendet (Tab. 7). Die Dephosphorylierung wurde entsprechend des im Folgenden aufgeführten Reaktionsansatzes durchgeführt. Der im Folgenden beschriebene Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine negative Beeinflussung der nachfolgenden Ligation durch die Phosphatasen zu verhindern, erfolgte anschließend eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 5 Minuten.

Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von DNA-Fragment-Enden	
DNA-Fragment-Enden	1 pmol
CutSmart®Puffer (10x)	2 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase / Antarktische Phosphatase	1 I.U.
DEPC-H ₂ O	Auffüllen ad 20 µl

Tab. 7: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Dephosphorylierung von DNA-Fragment-Enden unter Verwendung der Shrimp Alkaline Phosphatase oder der Antarktischen Phosphatase (NEB, Schwalbach, DE).

Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase von New England BioLabs (NEB Schwalbach, DE) verwendet (Tab. 7). Die T4-DNA-Ligase ist ein Enzym, das die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem Phosphatrest und dem Zucker Desoxyribose in Nukleotidsequenzen katalysiert. Die T4-DNA-Ligase kann sowohl glatte als auch überhängende Enden miteinander verknüpfen. Zur Durchführung der Ligation wurde der im Folgenden aufgeführte Reaktionsansatz für 12 Stunden bei 16°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 Minuten.

Reaktionsansatz zur Ligation von DNA-Fragmenten	
T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
Zu inserierendes DNA-Fragment	200-300 ng
DNA-Backbone	50-100 ng
T4-DNA-Ligase	1 µl
DEPC-H ₂ O	Auffüllen ad 20 µl

Tab. 8: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Ligation von DNA-Fragmenten unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach, DE).

Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien

Mit dem Begriff der Transformation wird in der Molekularbiologie eine nicht-virale Übertragung von DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Für die im Rahmen

dieser Arbeit durchgeführten Transformationen wurden chemisch kompetente Zellen verwendet. Je nach zu transformierender Plasmid-DNA verwendeten wir E. coli Top Ten chemisch kompetente Zellen („Top 10“, Invitrogen, Carlsbad, USA), Mach1 chemisch kompetente Zellen („Mach 1“, Invitrogen, Carlsbad, USA) oder Neb Stable chemisch kompetente Zellen („NEB Stable“, NEB, Schwalbach, DE). Eine Übersicht über die erforderlichen Transformationsbedingungen der verschiedenen Zellen ist in Tabelle 10 dargestellt.

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die zu transformierende DNA vorsichtig auf die aufgetauten chemisch kompetenten Zellen gegeben und die Zellen sowie die DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend erfolgte der Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C für die unten angegebene Zeitspanne. Nach dem Hitzeschock erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Anschließend wurde zu den Zellen auf 37°C vorgewärmtes S.O.C.-Medium gegeben und diese Lösung für 60-120 Minuten bei unten aufgeführter Temperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf vorgewärmten LB-Agar-Platten, die mit Ampicillin versetzt worden waren, ausplattiert. Nachfolgend wurden die Platten je nach verwendetem Zelltyp bei 32°C oder 37°C über Nacht inkubiert.

Übersicht über die Transformationsbedingungen			
	„Top 10“	„Mach 1“	„NEB Stable“
DNA-Menge [ng]	50	20	50
Hitzeschock [s]	60	30	30
S.O.C.-Medium [μ L]	450	250	950
Inkubation [min]	120	60	120
Inkubationstemperatur [°C]	37	37	32
Ausplattiervolumen [μ L]	200	100	100

Tab. 9: Übersicht über die verschiedenen Protokolle der Transformation zum Einbringen von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen der Zelllinien E. coli Top Ten chemisch kompetente Zellen („Top 10“, Invitrogen, Carlsbad, USA), Mach1 chemisch kompetente Zellen („Mach 1“, Invitrogen, Carlsbad, USA) und Neb Stable chemisch kompetente Zellen („NEB Stable“, NEB, Schwalbach, DE).

Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli

Nach erfolgreicher Transformation und Wachstum von Kolonien auf den LB-Agar-Platten wurden die einzelnen Kolonien in Minikulturen (3 ml TBA/TBB-Puffer, versetzt mit Ampicillin) bei 32°C bei Verwendung von NEB Stable chemisch kompetenten Zellen oder bei 37°C bei Verwendung von E. coli Top 10 chemisch kompetenten Zellen für 8-12 Stunden inkubiert. Zur Analyse der transformierten Plasmid-DNA mittels Restriktion sowie Sequenzierung erfolgte anschließend eine DNA-Aufreinigung unter der Verwendung des NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits von Macherey-Nagel. Den Vorgaben des Herstellers wurde zur effizienten DNA-Aufreinigung präzise gefolgt. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte in 60 µl Elutionspuffer.

Zur Isolierung und Aufreinigung großer DNA-Mengen von Plasmiden, um diese für die Vektorproduktion oder für die Transfektion von Zellen zu verwenden, erfolgte eine Inkubation der transformierten chemisch kompetenten Zellen in Maxikulturen (200 ml TBA/TBB-Puffer, versetzt mit Ampicillin). Analog erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Kit NucleoBond® Xtra Maxi Plus von Macherey und Nagel. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte hier in 600 µl Elutionspuffer.

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen mit dem NanoDrop 2000

Bei dem Gerät NanoDrop 2000 handelt es sich um ein Spektralphotometer, das zur Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit von DNA, RNA und Proteinen eingesetzt werden kann. Für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung werden 0,5-2 µl Probe verwendet. Nach der Messung werden die Messergebnisse für den Spektralbereich von 190 bis 840 nm angegeben. Zentral für die Bestimmung der Reinheit der DNA oder RNA ist die 260/280-Ratio und die 260/230-Ratio. Eine 260/280-Ratio von 1,8 liegt bei reiner DNA, eine 260/280-Ratio von 2,0 liegt bei reiner RNA vor. Mithilfe der 260/230-Ratio kann eine Verunreinigung der Probe durch z.B. Phenol oder Proteine abgeschätzt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch eine spektrophotometrische Messung der Probe bei 280 nm.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der isolierten und aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma GATC Biotech mittels Lightrun-Technik. Die Analyse der sequenzierten DNA im Vergleich zur Literatursequenz erfolgte mithilfe des Programms Geneious 7.0.6 (Biomatters, Auckland, NZL). Sequenziert wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide. Sequenziert wurden die mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenzen und generierte DNA-Fragmente. Jede der DNA-Sequenzen, die sequenziert wurden, wurden sowohl mit einem Sense- als auch mit einem Antisense-Primer sequenziert, um Fehler bei der Sequenzierung auszuschließen.

4.1.2 Isolation von genomischer DNA aus Schwanz- oder Ohrlochbiopsien von Mäusen

Die Isolation von genomischer DNA erfolgte aus Schwanz- oder Ohrlochbiopsien von Mäusen. Für die Isolation der genomischen DNA wurden die Biopsien in Lysispuffer über Nacht bei 56°C lysiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (13.000 rpm; 3 Minuten; Raumtemperatur). Nach Inkubation des Überstands bei 4°C für 10 Minuten wurden 600 µl eiskalter Ethanol (100%) mit dem Überstand vermischt. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert (14.000 rpm; 8 Minuten; 4°C). Nach Entfernen des Überstands wurde das entstandene Pellet noch einmal in 500 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert (14.000 rpm; 8 Minuten; 4°C). Der Überstand wurde entfernt und das beim Zentrifugieren entstandene Pellet wurde für 10 Minuten bei 56°C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Millipore-Wasser resuspendiert.

Die isolierte genomische DNA diente zum einen zur Genotypisierung der in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchteten Mäuse der Linie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J. Zum anderen wurde die isolierte genomische DNA als Template zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen zur Generierung von Plasmiden mittels PCR verwendet.

4.1.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Die Bestimmung der Virustiter von Viruspräparationen wurde mithilfe des Life Cyclers (Roche, Basal, CHE) durchgeführt. Je nach dem zu untersuchenden Vektor wurde als Zielgen der CAG-Promoter, das Reporter-gen eGFP oder das Woodchuck-Element (WPRE, W) verwendet.

Als Kit für die qPCR wurde der Fast Start Essential DNA SYBR Green Master Mix von Roche verwendet. Mithilfe der im Kit enthaltenen FastStart Taq DNA Polymerase und der für das Zielgen spezifischen Primer wird das Zielgen vervielfältigt. Während jeder Phase der DNA-Synthese bindet SYBR Green I, ein fluoreszierender Farbstoff, spezifisch an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA des amplifizierten PCR-Produkts. Durch diese Bindung steigt die Fluoreszenz des Farbstoffs an, sodass am Ende der Elongation in jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenz durch den LifeCycler 96 detektiert werden kann. Bei Zunahme der gefärbten Ziel-DNA kommt es folglich zu einer Zunahme der Fluoreszenz, sodass die gemessene Fluoreszenz mit der Menge der Target-DNA korreliert. Zur Bestimmung der Menge der Ziel-DNA wird der Ct-Wert betrachtet. Der Ct-Wert (CT = „cycle threshold“) gibt den Zyklus an, an dem die gemessene Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Der gemessene Ct-Wert der Proben wird mit den Ct-Werten einer Standardkurve, bei der die initial eingesetzte Ausgangsmenge bekannt ist, verglichen und so die determinierte Vektor-DNA errechnet.

Eine wesentliche Fehlerquelle bei der Durchführung einer qPCR ist die geringe Spezifität des Verfahrens. Um auszuschließen, dass die gemessene Fluoreszenz durch alternative PCR-Produkte, die durch unspezifische Primerbindung entstanden sind, hervorgerufen wurde, wurde nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Unter einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 50-95°C kommt es zu einer Denaturierung des DNA-Doppelstrangs und somit zu einer Freisetzung von SYBR-Green. Dieses Ereignis zeichnet sich durch eine Änderung der Fluoreszenz aus. Da die Temperatur, bei der es zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs kommt, abhängig von der Basensequenz und der Fragmentlänge ist, ermöglicht die Schmelztemperatur eine Aussage über die Spezifität der durchgeführten qPCR.

4.2 Zellkultur

Die Isolation, Kultivierung und Behandlung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Medium, PBS und Trypsin/EDTA-Lösung wurden vor der Verwendung an Zellen in einem Wasserbad auf 37°C aufgewärmt.

4.2.1 Isolation und Kultur von primären Gehirnendothelzellen von Mäusen

Die Isolation und Kultur von Gehirnendothelzellen von Mäusen erfolgte, dem von Assmann et al. 2017 publizierten Protokoll folgend, aus Gehirnen von C57BL/6-Mäusen, die älter als sechs Wochen waren (146). Als Vorbereitung für die Kultur der aus Mausgehirnen isolierten Endothelzellen wurde eine 24-Well-Platte mit Mausekollagen Typ IV beschichtet, um die Anhaftung und somit das Wachstum der Gehirnendothelzellen zu verbessern. Das Mausekollagen wurde über einen Zeitraum von drei Stunden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 0,05 N HCl versetzt, um eine finale Konzentration von 50 µg/ml Kollagen zu erzielen. Die Kollagenlösung (200 µl pro Well einer 24-Well-Platte) wurde für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Pro sechs Wells wurde ein Mausgehirn zur Isolation der primären Gehirnendothelzellen eingesetzt. Nach Entnahme der Mausgehirne werden die Meningen der Gehirne durch Rollen auf Whatman-Papier entfernt sowie der Bulbus olfactorius und das Cerebellum entfernt. Im Anschluss wurden die Gehirne in Gewebehomogenisatoren homogenisiert. Die homogenisierten Gehirne wurden in Arbeitsmedium transferiert und anschließend zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Dextranlösung gelöst und erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstehen zwei Phasen: eine untere zellreiche Phase sowie eine Phase aus Dextran und Myelin. Die Dextran/Myelin-Phase wurde entfernt und das zellhaltige Pellet in Arbeitsmedium suspendiert und bei 37°C für 75 Minuten unter regelmäßigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Arbeitsmedium nach Zentrifugation entfernt, die Zellen in dPBS gewaschen und im weiteren Verlauf im Vollmedium, das mit Puromycin versetzt wurde, suspendiert. Puromycin diente zur Abtötung von Perizyten unter Erhalt der Endothelzellen. Pro Well wurden 500 µl der isolierten Zellen in Vollmedium eingesetzt. Die ersten drei

Medienwechsel erfolgten jeweils nach 24 Stunden inkl. Waschen der Zellen mit dPBS-Lösung. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in Puromycin-freiem Medium kultiviert.

4.2.2 Isolation und Kultur von primären Gehirnendothelzellen aus Schweinegehirnen

Die Isolation und Kultur von Gehirnendothelzellen aus Schweinegehirnen erfolgte entsprechend des von Patabedige et al. 2013 veröffentlichten Protokolls (147, 148). Für die Isolation der Gehirnendothelzellen wurden die Gehirne geschlachteter Schweine verwendet. Nach Isolation der Zellen wurden diese in 24-Well-Platten in glucosehaltigem DMEM-Medium kultiviert, das mit „Bovine Plasma Derived Serum“, Penicillin-Streptomycin, Heparin und Puromycin supplementiert wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit aus Schweinegehirnen isolierten und kultivierten Endothelzellen wurden zur Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit unterschiedlicher Promotersequenzen verwendet. Zur Untersuchung der Genexpression wurden die Zellen mittels Lipofektion mit Plasmiden, deren Genexpression von unterschiedlichen Promotersequenzen reguliert wurde, transfiziert. Die Lipofektion wurde vier Tage nach der initialen Zellisolation bei ca. 80%iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. 24 Stunden vor Durchführung der Lipofektion wurde das Zellkulturmedium gegen Medium ohne Penicillin-Streptomycin, Heparin und Puromycin gewechselt, um Störeffekte dieser Substanzen auf die Lipofektion zu verhindern. Die Analyse der in Abhängigkeit der Promotersequenz regulierten Genexpression erfolgte fünf Tage nach der Lipofektion.

4.2.3 Kultur von immortalisierten humanen Gehirnendothelzellen der Zelllinie hCMEC/D3

Bei den Zellen der käuflich erworbenen Zelllinie hCMEC/D3 handelt es sich um immortalisierte humane Gehirnendothelzellen (142). Die Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden initial aus der Mikrovaskulatur humaner Temporallappen isoliert, die im Rahmen von operativen neurochirurgischen Eingriffen zur Epilepsiekontrolle entfernt wurden. Die Immortalisierung der Zellen erfolgte mittels Transduktion mit einem Lentivirus und Expression einer katalytisch aktiven Untereinheit der humanen Telomerase und des SV40 T-Antigens.

Die Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 (Merck #SCC066) wurden in 24-Well-Platten kultiviert, die zuvor mit Kollagen I, das aus Rattenschwänzen isoliert wurde (1:20 in 1xPBS), beschichtet wurden. Als Medium zur Kultivierung der Zellen wurde EndoGRO-MV Medium verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten hCMEC/D3-Zellen wurden zur Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit unterschiedlicher Promotersequenzen verwendet. Zur Untersuchung der Genexpression wurden die Zellen mittels Lipofektion mit Plasmiden, deren Genexpression von unterschiedlichen Promotersequenzen reguliert wurde, transfiziert. Hierfür wurde 10 Stunden vor Durchführung der Lipofektion das Medium, in dem Zellen kultiviert wurden, gegen Zellmedium ausgetauscht, das nicht mit Heparin, Hydrocortison und Ascorbinsäure supplementiert wurde. Die Analyse der Genexpression unter Regulation verschiedener Promotersequenzen erfolgte am vierten Tag nach der Lipofektion.

4.2.4 Isolation und Kultur von primären corticalen Astrozyten aus Mausgehirnen

Primäre corticale Astrozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit aus Gehirnen von Mäusen des Genotyps *C57BL/6NCrl* im Alter P0/1 präpariert. Wir modifizierten hierfür das von Schildge et al. 2013 publizierte Protokoll. Schildge et al. erzielten unter Verwendung des von ihnen publizierten Protokolls eine Reinheit der Kultur, die mittels immunzytochemischer Färbung mit GFAP bestimmt wurde, von > 98% (149). Zur Isolation von primären corticalen Astrozyten wurden nach Tötung der Mäuse mittels Durchtrennung des Rückenmarks die Gehirne der Mäuse entnommen. Unter einem Binokular wurden die Cortices isoliert und die Meningen entfernt. Ein Cortex einer Maus wurde homogenisiert, indem dieser mit 4 ml DMEM (Thermo Fisher Scientific, #41960-029), das mit 10% FCS sowie Antibiotika und Antimykotika (100 µg/ml) versetzt wurde, durch Spritzenadeln der Größen 20 G, 21 G und 25 G gepresst wurde. Anschließend wurden dem homogenisierten Cortex weitere 46 ml des wie oben beschriebenen supplementierten Mediums hinzugefügt. Die auf diese Weise isolierte Zellsuspension wurde in 24-Well-Platten kultiviert; das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten primären corticalen Astrozyten wurden zur Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit unterschiedlicher Promotersequenzen verwendet. Zur Untersuchung der Genexpression wurden die primären corticalen Astrozyten mittels Lipofektion mit Plasmiden, deren Genexpression

von unterschiedlichen Promotersequenzen reguliert wird, transfiziert. Hierfür wurde an Tag 21 nach Isolation der primären corticalen Astrozyten das Medium der Zellen gegen Medium ohne Antibiotika und Antimykotika ausgetauscht, um Störeffekte durch diese Substanzen zu verhindern. Die Analyse der Genexpression unter der Regulation verschiedener Promotersequenzen erfolgte vier Tage nach der Lipofektion bzw. 25 Tage nach der initialen Isolation der Zellen.

4.2.5 Lipofektion

Um die Transfektion von Zellen verschiedener Zelllinien durchzuführen, wurde das Kit Lipofectamine® 3000 von Thermo Fisher Scientific verwendet. Um die Lipofektion der Zelllinie hCMEC/D3 durchzuführen, wurde zehn Stunden vor der Lipofektion das Medium mit allen Zusätzen mit Medium ohne Heparin ausgetauscht. Die Lipofektion der primären Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen erfolgte, indem Medium ohne Puromycin, Heparin, Antibiotika und Antimykotika verwendet wurde. Für die Lipofektion der primären corticalen Astrozyten wurde Medium ohne Antibiotika und Antimykotika verwendet. Die Lipofektion erfolgt an Zellen, die in 24-Well-Platten kultiviert werden, bei 70-90%iger Konfluenz der Zellen. Die Lipofektion wurde nach dem im Folgenden aufgeführten Protokoll durchgeführt.

1. Verdünnung des Reagens Lipofectamine® 3000 in Opti-MEM®-Medium
Opti-MEM®-Medium: 25 µl
Lipofectamine® 3000: 1 µl
2. Der Reaktionsansatz wurde für 2-3 Sekunden gevortext.
3. Verdünnung der DNA für die Transfektion in Opti-MEM®-Medium
Opti-MEM®-Medium: 25 µl
DNA: 800 ng *
P3000-Reagenz: 1 µl
4. Die verdünnte DNA wurde anschließend zum verdünnten Lipofectamine® 3000 gegeben und der Ansatz 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz auf die Zellen gegeben.

* Die Zellen, in denen eine Analyse der Stärke der transkriptionellen Aktivierung mittels Dual Luciferase Assay geplant war, wurden mit 800 ng DNA eines Plasmids transfiziert, das die Firefly-Luciferase (Luc) als Reporter exprimiert. Als Kontrolle wurde das Plasmid p-CAG-RLuc verwendet, das die Renilla-Luciferase unter Regulation des CAG-Promoters exprimiert. Für die Lipofektion wurden 40 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

4.2.6 rAAV_{HEK}-Isolation von HEK293-Zellen

Die Produktion von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren erfolgte mittels Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen mit drei Plasmiden. Die HEK293T-Zelllinie ist eine humane Zelllinie, die auf Grundlage von HEK293-Zellen entwickelt wurde, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das das SV40 large T-Antigen exprimiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden zusätzlich mit den viralen Proteinen E1a und E1b transduziert. Mittels Calcium-Phosphat-Transfektion wurden die Zellen mit zwei Helferplasmiden sowie dem zu exprimierenden Plasmid transfiziert. Als Helferplasmide wurden die Plasmide PXX2-187-NRGTEWD und p179 verwendet. Das Plasmid PXX2-187-NRGTEWD kodiert das rep- sowie das von Herrn Dr. Jakob Körbelin und Kollegen modifizierte cap-Gen des Adeno-assoziierten Virus Serotyp 2 (1). Das zweite Helferplasmid p179 kodiert die adenoviralen Proteine E2A, E4 und VA. Das dritte Plasmid kodiert das Transgen, das zusammen mit dem Promoter von zwei ITR-Sequenzen umgeben wird. Die Calcium-Phosphat-Transfektion erfolgte bei 50-60%iger Konfluenz der Zellen. Dafür wurden der unten beschriebene Transfektionsansatz bestehend aus den drei Plasmiden mit auf 37°C vorgewärmter BES-gepuffert Kochsalzlösung (BBS), pH 6,95-7,00, sowie Calciumchloridlösung (2M) für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben und diese für 22 Stunden bei 37°C in einem 3% CO₂-Inkubator inkubiert. Während dieser Inkubationszeit kommt es zur langsamen Bildung von Calcium-Phosphat-DNA-Komplexen, die dann aufgrund der hohen Permeabilität der Zellmembran für Calcium in die HEK293T-Zellen gelangen. Dabei wird die Bildung der Calcium-Phosphat-DNA-Komplexe begünstigt durch den niedrigen pH der BES-gepufferten Kochsalzlösung und durch den niedrigen CO₂-Gehalt. Am Tag nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen nach dem Mediumwechsel bei 5% CO₂ für weitere 48-72 Stunden bis zur Virusernte inkubiert. Für die Virusernte wurden die HEK293T-Zellen mechanisch von der Petrischale gelöst und anschließend bei 8.000 g zentrifugiert, sodass es zur Bildung eines Zellpellets kam. Die Zellen wurden anschließend in TNT-Extraktionspuffer lysiert. Der Überstand wurde mittels Salzfällung mit PEG8000 und NaCl 24-72 Stunden behandelt und anschließend zentrifugiert. Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde ebenso für 10 Minuten in TNT-Extraktionspuffer lysiert. Anschließend wurde das lysierte Zellpellet und der Überstand bis zur gemeinsamen Virusaufreinigung bei -80°C gelagert.

Transfektionsansatz pro 94 mm² Petrischale (d = 10 cm):

50 µl Plasmidlösung

- 7,5 µg p179
- 5 µg PXX2-187-NRGTEWD
- 2,5 µg Plasmid

62,5 µl 2 M CaCl₂

387,5 µl Aqua dest

500 µl 2 x BBS

4.2.7 Aufreinigung von rAAV_{HEK} mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der rekombinanten Adeno-assoziierten Viren erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Hierfür wurden das lysierte Zellpellet und der Zellüberstand der HEK293T-Zellen über eine Sepharosesäule gegeben (Hi Trap AVB™ sepharose™, GE Healthcare). Die rekombinanten Adeno-assoziierten Viren binden bei neutralem pH-Wert an die Sepharosesäule. Die Elution der rekombinanten Adeno-assoziierten Viren erfolgte mittels Absenkung des pH-Wertes in einen Bereich zwischen 2 und 5 mittels Glycinlösung. Aufgrund der Sensitivität der rekombinanten Adeno-assoziierten Viren gegenüber einem sauren pH-Wert und einer hierdurch bedingten möglichen Zerstörung der Viren erfolgte eine sofortige Neutralisation des pH-Wertes mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) (150, 151). Nach Elution der rekombinanten Adeno-assoziierten Viren erfolgte eine Konzentrierung des Eluats unter Verwendung von Amicon-15-Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten (Merck KGaA, Darmstadt) auf eine Konzentration von 1-2x10⁹ genomische Viruspartikel / µl Eluat. Vor Verwendung der auf diese Art aufgereinigten rekombinanten Adeno-assoziierten Viren wurde das vektorhaltige Eluat durch Ethylenoxid sterilisierte Filter (Millex GV 0,22 µm Filtereinheit, Merck KGaA, Darmstadt) sterilisiert. Bis zur Verwendung erfolgte eine Lagerung der vektorhaltigen Lösungen bei -80°C.

4.3 Histologische Methoden

4.3.1 Anfertigung von histologischen Schnitten

Die histologischen Schnitte wurden am Kryotom CM 3050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) oder am Vibratom VT 1200S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) angefertigt. Für die Anfertigung von Kryoschnitten der Gehirne wurden die Organe in Gefriermedium eingebettet und bei -20°C gelagert. Am Kryotom CM 3050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) wurden Kryoschnitte einer Dicke von 20 µm

angefertigt und anschließend für ca. eine Stunde an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Als Objektträger wurden Superfrost-Objektträger verwendet. Die Kryoschnitte wurden bis zur Durchführung der Färbung bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung von Vibratomschnitten wurden die Gehirne in 4% Low-Melt-Agarose in PBS (1x) eingebettet. Die Schnitte, die am Vibratom angefertigt wurden, hatten eine Dicke von 50 µm. Die Schnitte wurden anschließend bei 4°C in PBS mit 0,02% Natrium-Azid bis zur Durchführung der Färbung gelagert.

4.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbungen dienten dem Nachweis der folgenden Proteine: eGFP, CD31, GFAP, NeuN sowie Iba1. Für die immunhistochemischen Analysen wurden am Kryotom- oder am Vibratom-angefertigte sagittale oder koronare Schnitte des Gehirns sowie der Lunge, des Herzens, der Leber, der Nieren und der Milz verwendet. Bei den verwendeten Organen handelte es sich um Organe von mit Ringer-Lösung perfundierten Mäusen, die anschließend je nach geplanter Färbung für 6-24 Stunden in Paraformaldehyd (4%) gelagert wurden. Zudem wurden mit Paraformaldehyd (4%) fixierte Zellen immunhistochemisch gefärbt.

Die am Kryotom angefertigten Schnitte wurden vor der Durchführung der Färbung eine Stunde an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die fixierten Zellen und die am Vibratom angefertigten Schnitte wurden in PBS gewaschen. Die am Vibratom angefertigten Gewebeschnitte wurden frei flottierend gefärbt und während der Inkubationsphasen auf einem Horizontalschüttler gelagert.

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Gewebeschnitte in PBS- Triton®X-100 (0,2%) für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sowie die Gewebeschnitte zwei Stunden in PBS-Triton®X-100 (0,2%), versetzt mit 5% Serumalbumin (bovin, Fraktion V), inkubiert. Nachfolgend erfolgte ein Transfer der zu färbenden Zellen oder Gewebe in die Antikörperlösung, in der die Primäantikörper (s.o.) in PBS- Triton®X-100 (0,2%) versetzt mit 5% Serumalbumin (bovin, Fraktion V) verdünnt wurden. Die entsprechenden Verdünnungen der Primäantikörper sind in der Tabelle

3.10.1 angegeben. Die Inkubation in der Primärantikörperlösung erfolgte für 16 Stunden bei 4°C.

Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte sowie die Zellen dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS (1x) gewaschen. Nachfolgend erfolgte die Inkubation in der Antikörperlösung, in der die sekundären Antikörper sowie DAPI mit oben angegebenen Verdünnungen in PBS-Triton®X-100 (0,2%), versetzt mit 5% Serumalbumin (bovin, Fraktion V), verdünnt wurden. Die Inkubation in der Antikörperlösung, die den sekundären Antikörper enthält, erfolgte für vier Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte sowie die gefärbten Zellen erneut dreimal für fünf Minuten in PBS (1x) gewaschen. Die am Vibratom-angefertigten Gewebeschnitten wurden auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die am Vibratom und am Kryostat angefertigten Gewebeschnitte mit Mowiol/DABCO eingedeckelt. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen mit PBS bedeckt und bei 4°C gelagert.

4.3.2 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung dient zum Nachweis von Polysacchariden. Sie wird eingesetzt zur Anfärbung von Glykolipiden, Glykoproteinen, Mukopolysacchariden oder Glykogen. Zusätzlich kann die PAS-Färbung im klinischen Setting ein wichtiges Diagnostikum zum Nachweis von Dermatophyten, aber auch zum Nachweis von Bakterien wie *Tropheryma whipplei* sein. Die umgangssprachlich so bezeichnete PAS-Färbung beruht auf der PAS-Reaktion. Bei der PAS-Reaktion kommt es durch Einsatz von Perjodsäure zur Umwandlung von zwei unsubstituierten Glycolgruppen in zwei Aldehydgruppen. Bei anschließender Zugabe von Schiff'schem Reagenz bindet die darin enthaltene Fuchsin-schweflige Säure an die entstandenen Aldehydgruppen, was zu einem molekularen Umbau führt. Durch den molekularen Umbau kommt es zu der, für die PAS-Färbung charakteristischen, rosaroten Färbung.

Für die Durchführung der PAS-Färbung im Rahmen dieser Arbeit verwendeten wir das Färbekit von Sigma-Aldrich unter Modifikation der Vorgaben des Herstellers. Hierfür wurden die Schnitte mit Perjodsäure fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 45 Sekunden in Schiff'schem-Reagenz inkubiert (Verdünnung 1:10 mit destilliertem Wasser).

Nachfolgend wurden die Schnitte in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gewaschen und dann erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung (Verdünnung 1:100 in destilliertem Wasser) für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte mit Toluol- und Xylen-haltigem Einbettmedium eingebettet. Für die nachfolgende Analyse wurden fünf Bilder pro Versuchstier und pro untersuchter Gehirnregion (Cortex, Hippocampus, Cerebellum) aufgenommen.

4.3.3 Nachweis der vektorexprimierten mRNA für die β -Hexosaminidase A und B mittels RNAscope®

Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis der mRNA der humanen β -Hexosaminidase A und B in Gehirnschnitten von Mäusen wurde unter Verwendung des RNAscope® von Advanced Cell Diagnostics (ACD) durchgeführt. Für den mRNA-Nachweis unter Verwendung des RNAscope® wurden Gehirne von *Hexb*^{-/-}-Mäusen, die intravenös die Vektoren AAV-BR1-CAG-hHEXA/B (Dosierung 1,8x10¹¹ gp/Maus) behandelt wurden, verwendet. Als Kontrollen dienten gleich alte C57BL/6-Mäuse, die keine Vektorbehandlung erhielten. Vierzehn Tage nach der Injektion wurden die Gehirne der Mäuse sofort nach der Entnahme bei -80°C eingefroren und im weiteren Verlauf aus dem Gehirngewebe am Kryostat 20 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt. Vor Verwendung der kommerziell erworbenen Proben zum Nachweis der humanen mRNA der Gene der Hexosaminidase A und B wurden Kreuztestungen gegenüber der mRNA der Gene der murinen Hexosaminidase A und B durchgeführt, sodass eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden konnte. Der Nachweis der mRNA der Gene der humanen Hexosaminidasen sowie der Nachweis von *Pecam* erfolgte in drei verschiedenen Kanälen: Die mRNA der Hexosaminidase B wurde mittels Fluorescein (Verdünnung 1:1.000), die mRNA der Hexosaminidase A mittels Cyanin 5 (Verdünnung 1:1.000) nachgewiesen. Zur Lokalisation der mRNA erfolgte ergänzend eine Markierung von *Pecam*, einem Marker für Endothelzellen. *Pecam* wurde unter Verwendung von Cyanin 3 (Verdünnung 1:1.000) nachgewiesen. Die mikroskopischen Aufnahmen zur Dokumentation der RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurden an einem konfokalen Mikroskop (TCS SP5, Leica) angefertigt.

4.4 Tierexperimentelle Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tierversuche durchgeführt, deren Anträge unter den folgenden Aktenzeichen geführt werden: „Virale Expression in Gehirndothelzellen“ (V 312-7224.122-22 (101-7/12), V 312-7224.122-22 (82-9/18)), „Gentherapie des Morbus Sandhoff“ (V 242-7224.122-22 (90-8/14), V 242-7224.122-22 (35-4/18)), „Zucht der Hexb-ko Mäuse“ (27_V242-7224.122-22 (91-8/14), 27_V242-7224.122-22 (36-4/18)), „Epilepsie bei Gentherapie der Incontinentia pigmenti“ (V 242-7224.122-22(31-2/15)). Die gelisteten Tierversuche wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

4.4.1 Das Sandhoff-Mausmodell

Als Modell für den Morbus Sandhoff wurden Mäuse der Linie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J (002914) von Jackson Laboratory verwendet (75). Die Mauslinie wurde generiert, indem eine Neomycinresistenzkassette in Exon 13 des Gens *Hexosaminidase B* auf Chromosom 13 inseriert wurde. Nach Einfügen dieser Mutation konnte keine funktionsfähige β -Hexosaminidase B mehr hergestellt werden, sodass eine Akkumulation von Gangliosiden resultierte. Bei der zugrundeliegenden Mauslinie handelt es sich um die Linie 129S4/SvJae.

Die Zucht der Mauslinie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J (002914) wurde aufrecht erhalten durch Verpaarung von entweder heterozygoten oder homozygoten Männchen mit heterozygoten Weibchen. Der Genotyp der einzelnen Mäuse wurde mittels PCR bestimmt, die auf Grundlage von genomischer DNA durchgeführt wurde, die aus Schwanz- oder Ohrlochbiopsien der Mäuse isoliert wurde. Die Schwanzbiopsien für die Genotypisierung wurden zwischen der dritten und vierten Lebenswoche der Mäuse gewonnen. Für die Durchführung der PCR wurden folgende Primer verwendet: 5'-ATT TTA AAA TTC AGG CCT CGA-3' diente als allgemeiner Primer, 5'-CAT AGC GTT GGC TAC CCG TGA-3' diente zum Nachweis des Vorliegens der mutierten Genversion, 5'-CAT TCT GCA GCG GTG CAC GGC-3' zum Nachweis des Wildtyps.

Während Mäuse der Genotypen *Hexb*^{+/+} und *Hexb*^{+/-} keinen veränderten Phänotyp zeigen, fällt bei Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} insbesondere eine verkürzte Lebensspanne von ca. 120-150 Tagen auf. Im Durchschnitt zeigten die Mäuse ein Überleben von 127 Tagen.

Ein erstes Frühzeichen, mit dem der Beginn der Erkrankung detektiert werden kann, ist die Unfähigkeit der Mäuse, auf einem Rotarod zu bleiben, ohne herunterzufallen. Eine defizitäre „Performance“ im Rotarod-Test lässt sich ab einem Alter von ca. 9 Wochen feststellen, ab einem Alter von ca. 11 Wochen kommt es zu einem rapiden und deutlichen Abfall der Leistungsfähigkeit im Rotarod-Test. Die verminderte Leistung im Rotarod-Test lässt sich insbesondere durch eine Abnahme der Koordinationsfähigkeit, die Entwicklung einer Bradykinese und eines Tremors begründen. Neben diesen pathologischen Veränderungen kommt es im weiteren Verlauf ab dem 4. Lebensmonat zu einer spastischen Lähmung insbesondere der Hinterglieder und in geringerem Umfang der Vorderglieder. In der Spätphase der Erkrankung kommt es zur Muskelatrophie und zu einem Gewichtsverlust.

Aufgrund der Ausbildung dieses schwerwiegenden Phänotyps wurden die Mäuse, die für die Versuche eingesetzt wurden, täglich überwacht und gewogen. Ab dem Auftreten der ersten Erkrankungssymptome erhielten die Mäuse Gelpads und Futter am Käfigboden. Bei Überschreiten von drei Punkten im entsprechend des Tierversuchsantrags „Gentherapie des Morbus Sandhoff“ (28_V242-7224.122-22 (90-8-14)) täglich durchgeführten Scorings zur Einschätzung der momentanen Belastung der Versuchstiere wurden die Mäuse innerhalb von 20 Minuten nach Entdecken der Symptomatik durch CO₂ getötet.

Aufgrund der schweren Belastung der Zucht wurden die Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die ausschließlich für die Zucht und nicht im Rahmen von Versuchsteilen eingesetzt wurden, vor dem Alter von neun Wochen getötet.

4.4.2 Das Incontinentia pigmenti-Mausmodell

Die Erkrankung Incontinentia pigmenti (IP, Bloch-Sulzberger-Syndrom) ist eine seltene, genetisch vererbte neurokutane Erkrankung. Der Erkrankung liegt eine pathogene Variante des X-chromosomal kodierten *Nemo*-Gens (IKBKG) zugrunde. Aufgrund des X-chromosomalen Vererbungsmodus erkranken Frauen. Männliche Feten sind nur mit dem Karyotyp XXY überlebensfähig. Darüber hinaus ist eine Erkrankung bei Vorliegen eines Mosaiks bei somatischer Mutation möglich. Patienten, die an der Erkrankung Incontinentia pigmenti leiden, zeigen akut auftretende kutane Blasen, die unter

Ausbildung von Pigmentstörungen abheilen. Neben einer möglichen Beteiligung der Zähne sowie der Augen entwickelt ca. ein Drittel der Patienten eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. Diese Patienten leiden insbesondere unter mentaler Retardierung und Epilepsien. Die Entwicklung der neurologischen Manifestation beruht darauf, dass das Protein NEMO essenziell ist für das Überleben von Gehirndothelzellen (152). Daher führt eine pathogene Variante des *Nemo*-Gens in Gehirndothelzellen zu einer Schrankenstörung der Blut-Hirn-Schranke. Darüber hinaus kommt es zu einem frühzeitigen Untergang von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und somit zu einer cerebralen Endothelrarefizierung mit cerebraler Hypoperfusion bis zu cerebralen Ischämien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse einer Mauslinie verwendet, bei denen ein Knockout des *Nemo*-Gens isoliert in Gehirndothelzellen induziert wurde (*Nemo*^{beKO}-Mauslinie). Zur Generierung dieser Mauslinie wurden Mäuse der Mauslinie *Slco1c1-CreER^{T2}* mit Mäusen der Mauslinie *Nemo^{Fl}* verpaart. Die Mäuse der Mauslinie *Slco1c1-CreER^{T2}* exprimieren die durch Tamoxifen-induzierbare CreER^{T2}-Rekombinase unter der Regulation von *Slco1c1*. Homozygote Mäuse für *Nemo^{Fl}* entwickeln Krampfanfälle durch einen Nemo-Defizienz in Gehirndothelzellen (153). Für die Langzeit-Untersuchungen bezüglich des Sicherheitsprofil der AAV-BR1-Vektoren wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, die keinen pathologischen Phänotyp entwickeln.

4.4.3 Haltung und Zucht von Mäusen

Neben der oben bereits beschriebenen Mauslinie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J wurden für alle weiteren Versuche C57BL/6NCrl-Mäuse verwendet, die über die Firma Charles River bezogen wurden oder in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet wurden. Die Mäuse der Mauslinien wurden in individuell ventilierten Käfigen (Größe: IVC 500 cm²) gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug jeweils zwölf Stunden. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libitum. Zum Nestbau wurden die Käfige mit Hanfpads oder Zelltüchern bereichert. Die Mäuse wurden täglich überwacht.

4.4.4 Intravenöse Vektoradministration

Die intravenöse Vektoradministration erfolgte zum einen bei Mäusen in einem Alter von P0/1, zum anderen bei Mäusen, die ca. einen Monat alt waren. Die intravenöse Vektoradministration zum Alter P0/1 erfolgte durch Herrn Dr. Godwin Dogbevia. Hierfür

wurde eine Dosierung von $6,0 \times 10^{10}$ genomische Partikel pro Versuchstier in einem maximalen Volumen von $5 \mu\text{l/g}$ Körpergewicht verwendet. Die Injektion der Vektoren erfolgte in die Temporalvene. Die Injektion der neonatalen Versuchstiere erfolgte ohne Isofluran-Narkose, weil bei neugeborenen Tieren mit einer erhöhten Letalität und neurotoxischen Wirkungen unter Isofluran zu rechnen ist (154). Für die Vektoradministration wurden die Mäuse manuell fixiert und die Vektoren wurden unter einem Stereomikroskop mit einer 31-G Kanüle injiziert.

Für die Vektoradministration in einem Alter der Mäuse von ca. einem Monat wurde eine Vektordosierung von $1,8 \times 10^{11}$ genomische Partikel pro Versuchstier in einem maximalen Volumen von $5 \mu\text{l/g}$ Körpergewicht verwendet. Die Vektoradministration erfolgte nach Fixierung der Mäuse unter Isoflurannarkose in eine der Schwanzvenen.

4.4.5 Euthanasie und Organentnahme

Die Tötung der Versuchsmäuse erfolgte je nach Versuchsplanung in unterschiedlichem Alter (zwischen 6 Wochen und 11 Monaten). Je nach anschließend geplanter Analyse der entnommenen Organe führten wir die Tötung der Mäuse durch Durchtrennung des Rückenmarks unter Isoflurannarkose oder durch transkardiale Perfusion mit PFA (4%) oder Sterofundinlösung unter Avertinnarkose durch. Je nach geplanter Analyse erfolgte die Entnahme von Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Milz und Nieren. Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Versuche ist in Tabelle 11 dargestellt.

Versuchsteil	Mauslinie	Anzahl	Vektor-injektion [Alter]	Vektor	Euthanasie [Alter]
RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	C57BL/6, <i>Hex</i> ^{+/+} , <i>Hexb</i> ^{+/-} , <i>Hexb</i> ^{-/-}	8	P31	AAV-BR1-CAG-hHEXA/B (kurz: BR1-hHEXA/B)	14 Tage post injectionem

Überlebensstudie Morbus Sandhoff I	<i>Hex</i> ^{+/+} , <i>Hexb</i> ^{+/-} , <i>Hexb</i> ^{-/-}	20	P25-P30	AAV-BR1- CAG- hHEXA/B	Erfüllen der Abbruch- kriterien
Überlebensstudie Morbus Sandhoff II	<i>Hexb</i> ^{-/-}	55	P0/1	(kurz: BR1- hHEXA/B),	
Gangliosid- akkumulation im Gehirn	C57BL/6, <i>Hex</i> ^{+/+} , <i>Hexb</i> ^{-/-}	12	P25-P30	AAV-BR1- CAG-∅ (kurz: BR1- ∅), AAV-BR1- mHexA/B (kurz: BR1- mHexA/B),	P85-95
Genexpression in Abhängigkeit verwendeter Promotoren	C57BL/6	27	P28-31	AAV-BR1- Promoter- eGFP	14 Tage post injectionem
Vektor- Sicherheitsprofil	C57BL/6	Kon- trolle n=19, Vektor n=15	P0/1	AAV-BR1- CAG-NEMO	11 Monate

Tab. 10: Übersicht über die durchgeführten tierexperimentellen Versuche. Dargestellt ist die Mauslinie der Mäuse, die für die Versuche verwendet wurden, die Zahl der für die Versuche verwendeten Mäuse, der Zeitpunkt der Vektoradministration, die verwendeten Vektoren sowie der Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere.

4.5 Statistische Auswertung

Sowohl die Durchführung der *in vivo* Versuche als auch die Durchführung der Promoteranalysen *in vitro* erfolgte verblindet. Die Verblindung wurde erst nach Abschluss der statistischen Auswertung aufgehoben.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mithilfe des Programms Graph Pad Prism Version 7.0 (San Diego, USA) durchgeführt. Die Darstellung der Daten in den

Abbildungen erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median \pm Standardabweichung. Zu Beginn der statistischen Analyse wurden die Daten mit dem Ausreißertest nach Grubbs untersucht. Bei Vorliegen von Ausreißerwerten, wurden diese aus der im Nachfolgenden dargestellten Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die erhobenen Daten bei einer Stichprobengröße zwischen drei und acht mittels Shapiro-Wilk-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Im Bereich dieser Stichprobengröße zeichnet sich der Shapiro-Wilk-Test durch eine höhere Teststärke aus als der Kolmogorv-Smirnov-Test sowie der D'Agostino & Pearson omnibus normality test (155). Bei Stichprobengrößen > 8 wurde der D'Agostino & Pearson omnibus normality test zur Prüfung des Vorliegens einer Normalverteilung eingesetzt (156, 157). Ergänzend erfolgte vor einer Analyse der Daten mittels ANOVA-Tests eine Analyse auf die Erfüllung der weiteren erforderlichen Voraussetzung wie die Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe Test (158). Vor Anwendung einer Analyse der Datensätze mittels Two-Way-ANOVA erfolgte ergänzend eine Analyse auf das Vorliegen von Sphärizität unter Verwendung des Mauchly Tests.

Da im Rahmen dieser Arbeit beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben parametrisch verteilte Datensätze vorlagen, erfolgte eine Analyse der Daten unter Anwendung des zweiseitigen Student's-T-Tests.

Die Analyse von Daten mit mehr als zwei unabhängigen Stichproben erfolgte in Abhängigkeit der Anzahl der zu vergleichenden Parameter mittels einfaktorieller oder zweifaktorieller Varianzanalyse (One-Way ANOVA oder Two-Way ANOVA) mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test oder Bonferroni Post-hoc-Test bei einem signifikanten Ergebnis.

Ergänzend erfolgten Analysen der Datensätze bezüglich des Vorliegens eines signifikanten Zusammenhangs zwischen den Daten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die statistische Korrelationsanalyse nach Pearson verwendet. Es erfolgte die Bestimmung des Korrelationskoeffizients nach Pearson. Hier wurde sich zur Interpretation der Zusammenhänge zwischen den Datensätzen nach den 1992 von der Arbeitsgruppe um Cohen veröffentlichten Einschätzungen der Effektstärke gerichtet. Ab einer Effektstärke von $r > 0,50$ wurde von einer starken Korrelation zwischen den Datensätzen ausgegangen (159).

Als weiteres statistisches Verfahren erfolgte die Analyse der Überlebensdaten in den Überlebensstudien 1 und 2 unter Verwendung des Log-rank (Mantel-Cox) Tests.

Ein signifikanter Unterschied zweier Daten wurde ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. In den Abbildungen 9, 10 und 21 wurden signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05 < 0,01 < 0,001$ wie folgt gekennzeichnet: * $< ** < ***$. In den Abbildungen 14-16, 18-19 und Tabelle 14 wurden signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,0332 < 0,0021 < 0,0002 < 0,0001$ wie folgt gekennzeichnet: * $< ** < *** < ****$.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung einer Gentherapie in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte untersucht, die mittels vektorbasierter Gentherapie der Gehirndothelzellen unter Verwendung des gehirndothelzellspezifischen Vektors AAV-BR1 im oben beschriebenen Mausmodell des Morbus Sandhoff erzielt werden können.

5.1.1 Generierung von Plasmiden zur Untersuchung der vektorbasierten Gentherapie im Mausmodell des Morbus Sandhoff

Im Rahmen der Entwicklung einer Gentherapie für den Morbus Sandhoff im Mausmodell wurden fünf verschiedene Plasmide für *in vitro* Zellkulturversuche sowie für die Produktion von Adeno-assoziierten Viren mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in HEK293T-Zellen verwendet. Die Plasmide p-CAG-*hHEXA* und p-CAG-*hHEXB* wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Godwin Dogbevia zur Verfügung gestellt. Sie enthalten jeweils die Gensequenz der humanen β -Hexosaminidase A (*hHEXA*) oder der humanen β -Hexosaminidase B (*hHEXB*), die unter der Kontrolle des CAG-Promoters exprimiert werden. Die Plasmide p-CAG-*mHexA* und p-CAG-*mHexB*, die in der Abbildung 7 dargestellt sind, enthalten die Gensequenz der murinen β -Hexosaminidase A (*mHexA*) oder die Gensequenz der murinen β -Hexosaminidase B (*mHexB*). Die Transgene wurden mittels PCR von cDNA amplifiziert und anschließend mittels Restriktion mit den Restriktionsenzymen BstBI und NotI in das Plasmid p-CAG-*NEMO-2A-eGFP* (freundlicherweise von Herrn Dr. Godwin Dogbevia zu Verfügung gestellt) eingefügt, das ebenfalls mit BstBI und NotI geschnitten wurde. Neben dem Promoter und dem Transgen enthalten die vier oben aufgeführten Plasmide zwischen den ITR-Sequenzen das „Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element“, das zu einer erhöhten Genexpression in viralen Vektorsystemen führt, sowie das „bovine growth hormone polyadenylation signal“ (bGHpA). Die beiden Plasmide sind in Abbildung 7 abgebildet. Das Plasmid p-CAG- \emptyset wurde als Kontrollplasmid verwendet. Es wurde mittels Restriktion des Plasmids p-CAG-eGFP mit den Restriktionsenzymen NcoI und FseI und anschließender Klenowbehandlung sowie Religation generiert. Somit enthält das Plasmid den CAG-Promoter, exprimiert aber kein Transgen. Die fünf Plasmide wurden nach der

Generierung mittels Restriktion mit dem Restriktionsenzym AhdI auf das Vorliegen intakter ITR-Sequenzen getestet. Die Sequenz des Transgens wurde nach der Generierung mittels Sequenzierung kontrolliert.

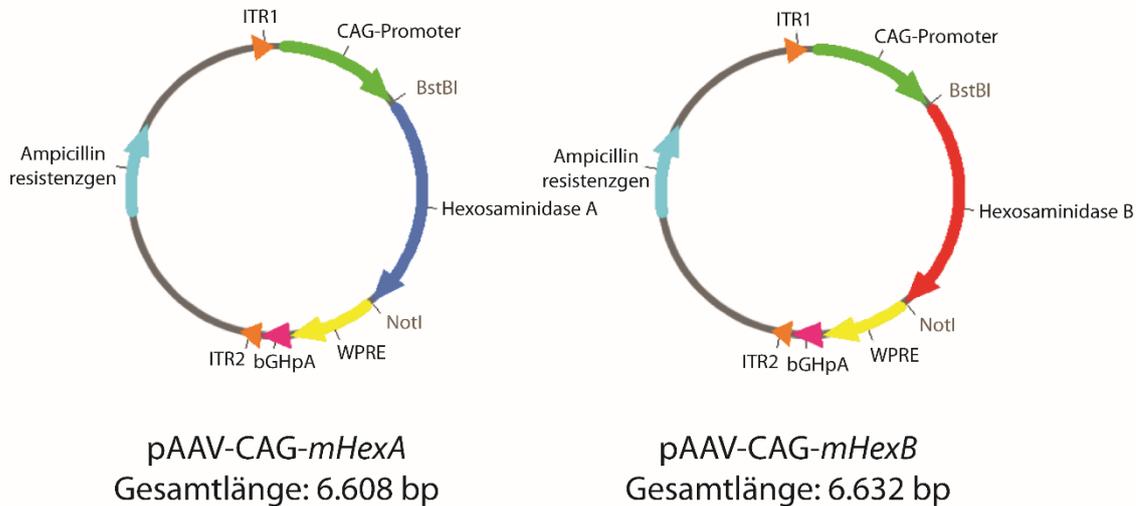


Abb. 7: Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide p-CAG-*mHexA* und p-CAG-*mHexB*. Die Plasmide p-CAG-*mHexA* (Gesamtlänge: 6.608 bp) sowie p-CAG-*mHexB* (Gesamtlänge: 6.632 bp) enthalten die Gensequenz des Gens der murinen Hexosaminidase A oder der murinen Hexosaminidase B unter der Kontrolle des CAG-Promoters. Die Plasmide wurden nach der Generierung mittels Restriktion mit dem Restriktionsenzym AhdI auf das Vorliegen intakter ITR-Sequenzen getestet. Die Sequenz des Transgens wurde nach der Generierung mittels Sequenzierung kontrolliert.

5.1.2 Untersuchung der *in vitro* und *in vivo* Expression der β -Hexosaminidase

Der Morbus Sandhoff wurde im Rahmen dieser Arbeit als Modellerkrankung für lysosomale Speicherkrankheiten ausgewählt. Frühe Therapiebestrebungen lysosomaler Speicherkrankheiten nutzten in der Regel die Methode der Enzyersatztherapie. Die Enzyersatztherapie führte bei verschiedenen lysosomalen Speicherkrankheiten, z.B. bei der Erkrankung des Morbus Fabry, zu einer deutlichen Symptombesserung bis zur Symptombefreiheit (160). Ein zentrales Problem beim Einsatz der Enzyersatztherapie blieb, dass mittels intravenöser Enzyersatztherapie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwunden werden konnte, sodass Symptome mit zentralnervöser Genese nicht behandelt werden konnten. Bereits früh entstand die Idee, die Methode der vektorbasierten Gentherapie zur Behandlung zentralnervöser Symptome lysosomaler Speicherkrankheiten zu nutzen. Ein entscheidendes Problem blieb dabei, einen Vektor zu entwickeln, der die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Erstmals entwickelten Chen et

al. 2009 einen rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, der statt Neuronen oder Astrozyten die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke infizierte und eine Behandlung von Mäusen ermöglichte, die an der Erkrankung MPS VII erkrankt sind, bei der es durch Mangel der β -D-Glukuronidase zu einer Akkumulation von Glykosaminoglykanen, z.B. Dermatan-Sulfat, Heparan-Sulfat und Chondroitin-Sulfat in Lysosomen der Zellen des zentralen Nervensystems kommt (161). Chen et al. postulierten, dass der Adeno-assoziierte Virus die Gehirnendothelzellen infiziert und das AAV-Genom anschließend im Nucleus freigesetzt wird. In den Endothelzellen wird das Transgen, für das die virale DNA kodiert, exprimiert und das Protein sezerniert und anschließend von anderen Zellen des zentralen Nervensystems aufgenommen (162).

Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus der „Cross-Correction“ auch für den von Herrn Dr. Jakob Körbelin entwickelten Adeno-assoziierten Virus AAV-BR1 zutrifft, infizierte Herr Dr. Godwin Dogbevia primäre Gehirnendothelzellen von *Hexb*^{-/-}-Mäusen mit Adeno-assoziierten Viren, die die humane β -Hexosaminidase B exprimieren. Anschließend ermittelte er mittels MUG-Assay die Aktivität der β -Hexosaminidase B sowohl im Zelllysate als auch im Kulturmedium. Dabei zeigte sich, dass sowohl im Zelllysate als auch im Kulturmedium eine Aktivität der β -Hexosaminidase B nachgewiesen werden konnte. Daraus konnte geschlossen werden, dass es in Zellkultur von primären Mausgehirnendothelzellen zu einer Sekretion der β -Hexosaminidase B durch die primären Gehirnendothelzellen kommt (163).

Um diesen Aspekt der Virusphysiologie *in vitro* weitergehend zu untersuchen, führten wir eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung mittels RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics, Newark, USA) durch. Dafür wurden zwei männlichen C57BL/6-Mäusen sowie zwei *Hexb*^{-/-}-Mäusen im Alter von 31 Tagen jeweils $0,9 \times 10^{11}$ genomische Partikel von AAV-BR1-CAG-*hHEXA* und AAV-BR1-CAG-*hHEXB* injiziert (Gesamtvektordosis: $1,8 \times 10^{11}$ genomische Partikel). Vierzehn Tage nach der Injektion wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und sofort bei -80°C gelagert. Für die Durchführung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurden 20 μm dicke Schnitte verwendet, die am Kryotom aus den isolierten Gehirnen angefertigt wurden. Als Kontrolle wurden Kryoschnitte der Gehirne von vier männlichen C57BL/6-Mäusen gleichen Alters eingesetzt, die keinen Virus erhielten. Für die RNA-*in-situ*-Hybridisierung mittels RNAscope® wurden drei Kanäle verwendet: der erste Kanal färbte

für die vektorkodierte mRNA der humanen β -Hexosaminidase B mittels Fluoreszein, der zweite Kanal für *Pecam* mittels Cyanin 3 und der dritte Kanal für die vektorkodierte mRNA der humanen β -Hexosaminidase A mittels Cyanin 5. In der mikroskopischen Auswertung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung ließ sich nachweisen, dass die mRNA der vektorexprimierten humanen β -Hexosaminidasen A und B in Endothelzellen, die mittels *Pecam* markiert wurden, nachgewiesen werden konnte (Abb. 8). In den Gehirnschnitten der C57BL/6-Mäuse, die keine Virusbehandlung erhalten hatten, wurde kein Signal detektiert, sodass eine Markierung der mRNA der murinen β -Hexosaminidase zusätzlich zu der mRNA der humanen β -Hexosaminidase durch oben beschriebenes Verfahren ausgeschlossen werden konnte (Daten aus Übersichtsgründen nicht dargestellt).

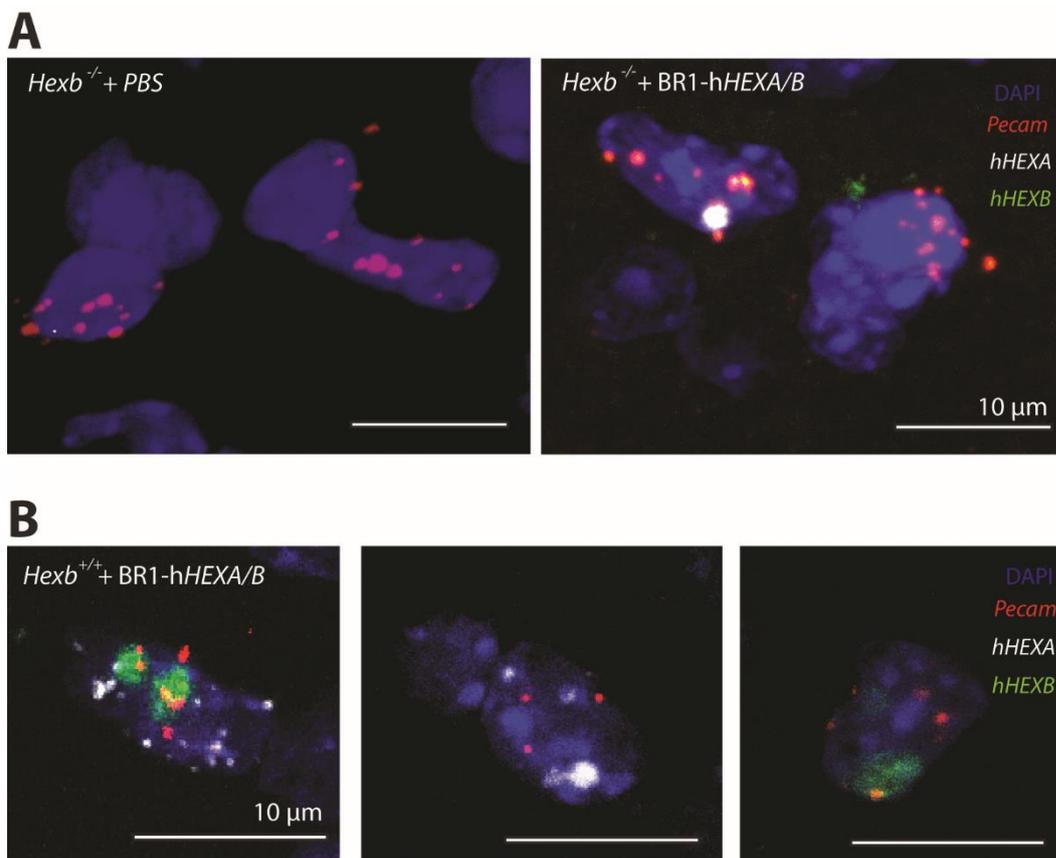


Abb.8: Nachweis der RNA-Synthese der vektorkodierten Gene der humanen β -Hexosaminidase A und B in Gehirndothelzellen. Mikroskopische Aufnahmen einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis der mRNA der vektorkodierten humanen β -Hexosaminidase A (weiß) und B (grün) in Gehirndothelzellen von Mäusen mit den Genotypen *Hexb^{+/+}* und *Hexb^{-/-}*, denen im Alter von 31 Tagen die Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* (Gesamtdosis $1,8 \times 10^{11}$ genomische Partikel/Maus) intravenös in die Schwanzvene injiziert wurden. Die Gehirndothelzellen wurden über den Nachweis von *Pecam* (rot) markiert.

5.1.3 Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B verbessert das Überleben sowie die Symptome nach Injektion zum Zeitpunkt P0/1 und P25-30

Um die Effekte auf das Überleben und die Symptomreduktion der AAV-BR1-basierten Gentherapie in Mäusen der Linie 129S4-Hexb^{tm1Rlp}/J (002914) zu untersuchen, wurden zwei Überlebensstudien zusammen mit Herrn Dr. Godwin Dogbevia und Frau Ines Stölting durchgeführt.

Für die Durchführung der Überlebensstudien wurden die in der folgenden Tabelle 12 aufgeführten Versuchsgruppen eingesetzt und die in den rechten Spalten der Tabelle 12 angegebenen Haupt- und Nebenzielgrößen untersucht. Dabei diente die Testung der Mäuse mit dem Rotarod-Test und Grip-Strength-Test der Untersuchung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse.

Überlebensstudie 1: durchgeführt von 21.04.2015 bis 15.02.2016					
Zeitpunkt der Vektoradministration: P25-P30					
Genotyp	Behandlung	Verabreichte Vektordosis [gp/Maus]	Anzahl der Mäuse	Hauptzielgröße	Nebenzielgrößen
<i>Hexb</i> ^{+/+} , <i>Hexb</i> ^{+/-}	PBS	150 μ l	10	Überleben	Rotarod-Test, Grip-Strength, Körpergewicht
<i>Hexb</i> ^{-/-}	AAV-BR1- CAG- \emptyset	1,8 x 10 ¹¹	18		
<i>Hexb</i> ^{-/-}	AAV-BR1- CAG- <i>hHEXA</i> , AAV-BR1- CAG- <i>hHEXB</i>	1,8 x 10 ¹¹	19		
Überlebensstudie 2: durchgeführt von 08.08.2016 bis 20.02.2017					
Zeitpunkt der Vektoradministration: P0/1					
Genotyp	Behandlung	Verabreichte Vektordosis [gp/Maus]	Anzahl der Mäuse	Hauptzielgröße	Nebenzielgröße
<i>Hexb</i> ^{-/-}	AAV-BR1- CAG- \emptyset	6,0 x 10 ¹⁰	16	Überleben	Körpergewicht

<i>Hexb^{-/-}</i>	AAV-BR1- CAG- <i>hHEXA</i> , AAV-BR1- CAG- <i>hHEXB</i>	Jeweils 3,0 x 10 ¹⁰	13		
<i>Hexb^{-/-}</i>	AAV-BR1- CAG- <i>mHexA</i> , AAV-BR1- CAG- <i>mHexB</i>	Jeweils 3,0 x 10 ¹⁰	14		
<i>Hexb^{-/-}</i>	AAV-BR1- CAG- <i>hHEXB</i>	6,0 x 10 ¹⁰	12		

Tab. 11: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Überlebensstudien zum Nachweis der Effekte, die nach Administration von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (AAV-BR1) durch die vektorkodierte Genexpression auf Symptome sowie Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb^{-/-}* erzielt werden können. Als Kontrollgruppen wurden in der Überlebensstudie 1 Mäuse mit dem Genotyp *Hexb^{+/+}* oder *Hexb^{+/-}* verwendet, denen PBS injiziert wurde. Zudem bestand eine Kontrollgruppe sowohl in der Überlebensstudie 1 als auch in der Überlebensstudie 2 aus Mäusen mit dem Genotyp *Hexb^{-/-}*, die eine intravenöse Injektion mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅ erhielten.

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Überlebensstudien ist der Zeitpunkt der Vektorbehandlung. Die Mäuse, die im Rahmen der Überlebensstudie 1 eingesetzt wurden, wurden in einem Alter von P25-30 mit den Vektoren behandelt. Die Mäuse der Überlebensstudie 2 wurden demgegenüber in einem Alter von P0/1 behandelt. Zwischen einem Alter von P0/1 und P25-30 kommt es zu vielfachen cerebrovaskulären Veränderungen bei Mäusen. Im ersten Lebensmonat der Mäuse kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Kapillardichte (164, 165). So konnten Zeller et al. bereits 1996 zeigen, dass sich zwischen P0 und P20 die Kapillardichte in der grauen Substanz verdoppelt (166). Die entwickelte Kapillardichte in verschiedenen Gehirnregionen ist dabei stark abhängig von der Bildung von VEGF durch benachbarte Neurone und Astrozyten. (167). Demgegenüber bildet sich das Venolennetzwerk in Abhängigkeit der Durchblutung zurück (168). Neben diesen vaskulären Veränderungen konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Geburt der Mäuse die Blut-Hirn-Schranke nicht vollständig ausgebildet und somit nicht geschlossen ist. So nimmt im

ersten Lebensmonat bei Mäusen und Ratten die Zahl und Struktur der „Tight junctions“ zu (169, 170). Ergänzend konnten Daneman et al. zeigen, dass auch die Zahl der Effluxtransporter Pg-P und ABC im ersten Lebensmonat abnimmt (169). Des Weiteren nimmt der Vesikel-vermittelte Transport in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ab (171). Darüber hinaus zeigt sich in den ersten drei Wochen der postnatalen Gehirnentwicklung eine ausgeprägte lokale Astrozytenproliferation, was zu einer Ausbildung der neurovaskulären Einheit führt (172). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass sich in den ersten drei Lebenswochen von Mäusen die Morphologie der Mikroglia ändert: Während der frühen postnatalen Phase bilden die Mikroglia, die den Gehirnkapillaren benachbart liegen, eine phagozytische, amöboide Morphologie, die sich im Verlauf in die klassische Morphologie der Mikroglia ändert, die die residente Zellmorphologie bei adulten Mäusen darstellt (173, 174). In Anbetracht dieser Veränderungen muss davon ausgegangen werden, dass es in Mäusen im Alter P0/1 (Überlebensstudie 2) im Vergleich zu Mäusen im Alter P25-30 (Überlebensstudie 1) zu Unterschieden in der vektorvermittelten Genexpression und somit in den vektorvermittelten Effekten auf Symptomatik und Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} kommt.

Die Ergebnisse der Überlebensstudie 1 sind in der Abbildung 9 dargestellt. Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden, entwickelten erste motorische Symptome, die mittels Grip-Strength- und Rotarod-Test detektiert werden konnten, im Alter von 80-90 Tagen. Im weiteren Verlauf kam es zu einer weiteren Abnahme der motorischen Fähigkeiten durch Entwicklung einer Spastik der Hinterbeine, Paresen, eines Tremors und einer Einschränkung der Bewegungskoordination. Durch diese Veränderungen kam es sekundär zu einer raschen Abnahme des Körpergewichts. Im Alter von durchschnittlich 130 Tagen (Zeitspanne des Überlebens zwischen 95 und 142 Tagen) erfüllten die Mäuse dieser Versuchsgruppe die im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien, sodass die Mäuse getötet wurden.

Demgegenüber waren die Abbruchkriterien in der Versuchsgruppe der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, denen die Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXA* und AAV-BR1-CAG-*hHEXB* injiziert wurden (zusammengefasst als AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B*), im Durchschnitt nach 189 Tagen erfüllt. Die Überlebensspanne dieser Mäuse reichte von 136 bis zu > 300 Tagen

(Tab. 12). Erste Anzeichen der Entwicklung motorischer Defizite zeigte die erste Maus dieser Versuchsgruppe in einem Alter von 102 Tagen in Form eines frühen Falls im Rotarod-Test. Im Grip-Strength-Test wird der Beginn der motorischen Defizite später detektiert als mit dem Rotarod-Test. In einem Alter von 154 Tagen wurde der letzte Rotarod-Test durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten vier der letzten acht überlebenden Mäuse keine Hinweise auf die Entwicklung motorischer Defizite im Rotarod-Test. Wie in der mit dem Kontrollvektor behandelten Versuchsgruppe konnte auch in dieser Versuchsgruppe neben der eingeschränkten motorischen Leistungsfähigkeit eine rasche Abnahme des Körpergewichts mit Voranschreiten der durch den Gendefekt bedingten Symptomatik beobachtet werden (Abb. 9C, 9D).

Die Mäuse mit dem Genotyp *Hexb^{+/+}* und *Hexb^{+/-}*, die mit PBS behandelt wurden, überlebten alle bis zu einem Alter von > 300 Tagen. In dieser Versuchsgruppe konnte keine Abnahme der Leistungsfähigkeit im Rotarod- oder Grip-Strength-Test sowie keine Gewichtsabnahme beobachtet werden. Die Daten dieser Versuchsgruppe sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 9 nicht dargestellt.

Eine Analyse der Überlebensspanne der Mäuse der Versuchsgruppen *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG- \emptyset (n=18) sowie *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* (n=19) erfolgte zunächst mit dem Ausreißertest nach Grubbs. Mithilfe des Tests konnte das Vorliegen von Ausreißerdaten ausgeschlossen werden. Eine anschließende Testung der Daten mit dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test ergab für die zwei Versuchsgruppen eine Normalverteilung der Daten, sodass für die statistische Analyse der Überlebensdaten der Mäuse der Student's T-Test durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Versuchsgruppe *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* gegenüber der Kontrollgruppe *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG- \emptyset ($p < 0,001$) (Abb. 9A, 9B).

Zur statistischen Analyse der motorischen Fähigkeiten der verschiedenen Versuchsgruppen, die mittels Rotarod-Test und Grip-Strength-Test untersucht wurden, wurde der Student's T-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen angewendet. Dabei ergab sich bei der Analyse der Daten des Rotarod-Tests ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Ergebnisse der Kontrollgruppe *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG- \emptyset sowie der Ergebnisse der Versuchsgruppe *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* ($p < 0,0001$). Die Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb^{-/-}* + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* (n=10) zeigten bessere motorische Fähigkeiten im Vergleich zu der Kontrollgruppe

Hexb^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ (n=10). Die Daten sind in der Abbildung 9C dargestellt. Zu jedem Zeitpunkt sind die Ergebnisse des Rotarod-Tests als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse der im Grip-Strength-Test gemessenen Griffstärke der Vorderpfoten der Mäuse erfolgte mittels Student's T-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen. Dabei ergab sich bei der Analyse der Daten des Grip-Strength-Tests ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Ergebnisse der Kontrollgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ sowie der Ergebnisse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* ($p < 0,0001$). Die Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* (n=10) zeigten ab einem Alter von 99 Tagen eine signifikant stärkere Griffstärke der Vorderpfoten im Vergleich zu der Kontrollgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ (n=10). Die Daten sind in der Abbildung 9D dargestellt. Zu jedem Zeitpunkt sind die Ergebnisse des Grip-Strength-Tests als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

2015 wurde von Walia et al. eine Studie veröffentlicht, in der die Arbeitsgruppe zeigte, dass sie mittels Gentherapie mit intravenös zum Zeitpunkt P0 applizierten rAAV9-Viren, die die murine β -Hexosaminidase B exprimieren, in einem Mausmodell der Erkrankung des Morbus Sandhoff ein Überleben aller behandelten Versuchstiere bis zu einem Alter von 43 Wochen erreichen konnten. Drei der fünf zum Zeitpunkt P0 mit einem β -Hexosaminidase B exprimierenden Vektor behandelten Mäuse zeigten in diesem Alter von 43 Wochen neurologische Defizite. In der histologischen Analyse der Organe der neonatal behandelten Mäuse fielen bei acht von zehn Mäusen Leber- und Lungentumore auf. Neben den zum Zeitpunkt P0 behandelten Mäusen wurde eine weitere Versuchsgruppe im Alter von 6 Wochen mit einem Vektor behandelt, der die β -Hexosaminidase B exprimiert. Die Mäuse dieser Versuchsgruppe überlebten zwischen 17 und 35 Wochen und entwickelten eine durch die Enzymdefizienz bedingte typische Symptomatik (48).

Auf Grundlage dieser Versuche initiierten wir eine zweite Überlebensstudie, in der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} zum Zeitpunkt P0/1 mit vier verschiedenen Vektoren behandelt wurden (Tab. 11). Als Kontrollgruppe dienten Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden. Darüber hinaus erhielten Mäuse in drei Versuchsgruppen Vektoren, die die humane β -Hexosaminidase A und B (*hHEXA/B*), die humane β -Hexosaminidase B (*hHEXB*) oder die murine β -Hexosaminidase A und B (*mHexA/B*) exprimieren (Tab. 11). Die Mäuse der vier Versuchsgruppen wurden täglich

gewogen und auf das Vorliegen von Abbruchkriterien untersucht. Testungen auf die Entwicklung motorischer Defizite wurden in dieser Überlebensstudie nicht durchgeführt.

Die Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ erfüllten im Median nach 127 Tagen die Abbruchkriterien (Zeitspanne: 119-137 Tage). Demgegenüber erfüllten Mäuse der Versuchsgruppen *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHEXB* und *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-*mHexA/B* im Median in einem Alter von 134 Tagen (Zeitspanne: 114-154 Tage) bzw. 135 Tagen (Zeitspanne: 117-150 Tage) die Abbruchkriterien. Am längsten überlebten die zum Zeitpunkt P0/1-behandelten Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* mit einem medianen Überleben von 155 Tagen (Zeitspanne: 144-195 Tage) (Tab. 13).

Bei der Analyse der Überlebensdaten dieser Versuchsgruppen wurde nach dem Ausreißertest nach Grubbs in der Versuchsgruppe der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit den Vektoren AAV-BR1-*mHexA* und AAV-BR1-*mHexB* behandelt wurden, ein signifikanter Ausreißerwert identifiziert, der ohne die vorherige Entwicklung motorischer Defizite im Alter von 52 Tagen tot im Käfig aufgefunden wurde. Für die weiterführende Analyse der Daten wurde diese Maus ausgeschlossen. Die anschließende Analyse der Daten mit dem D'Agostino & Pearson omnibus normality test ergab für alle vier Versuchsgruppen eine Normalverteilung der Daten, sodass für die statistische Analyse der Überlebensdaten der Mäuse der One-Way ANOVA-Test mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* gegenüber den Mäusen der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ (Abb. 9E, 9F). Beim Vergleich der Ergebnisse der Versuchsgruppen *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-*mHexA/B* sowie *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-*hHEXB* mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe *Hexb*^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅ wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens nachgewiesen (One-Way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test, $F(3/54)=21,24$, $p<0,0001$; ns: nicht signifikant, *** $p<0,0001$; Kontrollgruppe (n=16), *hHEXA/B* (n=13), *hHEXB* (n=12), *mHexA/B* (n=14)).

Versuchsgruppe	Zeitspanne des Überlebens [Tage]	Medianes Überleben [Tage]
<i>Hexb</i> ^{+/+} + PBS, <i>Hexb</i> ^{+/-} + PBS	>300 Tage	>300 Tage
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅	95-142	130
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG- <i>hHEXA/B</i>	136->300	189

Tab. 12: Überleben der Mäuse in der Überlebensstudie 1. Dargestellt ist die Zeitspanne des Überlebens sowie das mediane Überleben der Mäuse in Tagen.

Versuchsgruppe	Zeitspanne des Überlebens [Tage]	Medianes Überleben [Tage]
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG-∅	119-137	127
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG- <i>hHEXA/B</i>	144-195	155
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG- <i>mHexA/B</i>	117-150	135
<i>Hexb</i> ^{-/-} + AAV-BR1-CAG- <i>hHEXB</i>	114-154	134

Tab. 13: Überleben der Mäuse in der Überlebensstudie 2. Dargestellt ist die Zeitspanne des Überlebens sowie das mediane Überleben der Mäuse in Tagen.

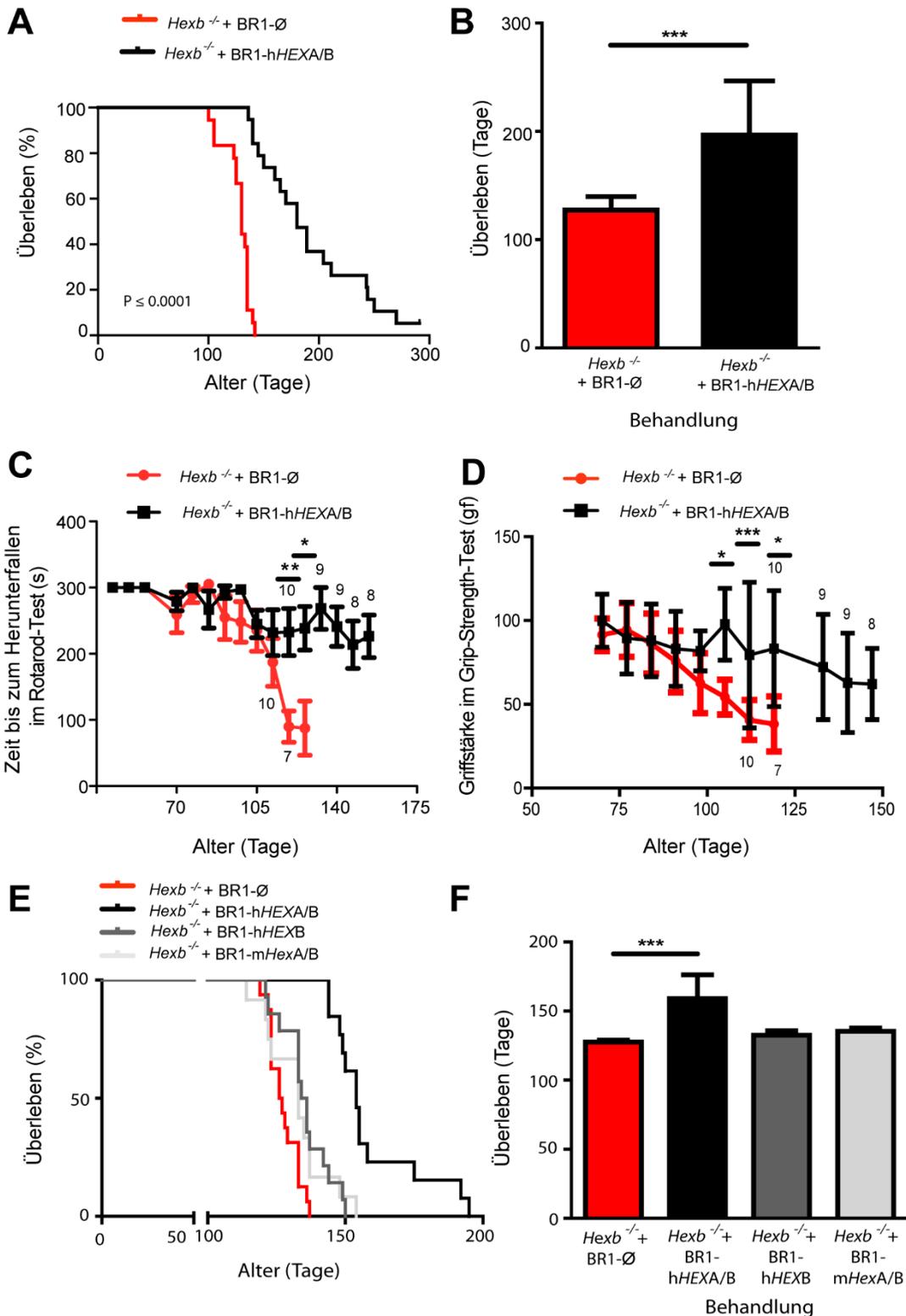


Abb. 9: Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B verbessert das Überleben sowie die Symptome nach Injektion zu den Zeitpunkten P0/1 sowie P25-30. Mäuse mit dem Genotyp $Hexb^{-/-}$ wurden in einem Alter von 25-30 Tagen mit den Vektoren AAV-BR1-CAG-hHEXA/B oder mit dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-Ø (Dosierung $1,8 \times 10^{11}$ gp/Maus) behandelt (A-D). (A) Mäuse mit dem Genotyp $Hexb^{-/-}$, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-hHEXA/B behandelt wurden, überlebten signifikant länger als Mäuse mit dem Genotyp $Hexb^{-/-}$, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-Ø behandelt wurde. Im Alter von 142 Tagen, an dem alle Mäuse der Gruppe $Hexb^{-/-}$ + AAV-BR1-CAG-

∅ die Abbruchkriterien erfüllten, lebten noch 15 der 18 Mäuse der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B*. Log-rank (Mantel-Cox) Test: p-Wert <0,0001. Kontrollgruppe (n=18), *HEXA/B* (n=19). (B) Das mediane Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* behandelt wurden, betrug 189 Tage im Vergleich zu 130 Tagen in der Versuchsgruppe *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-∅. Datendarstellung als Median ± Standardabweichung. Analyse mittels Student's-T-Tests (p<0,0001). Kontrollgruppe (n=18), *hHEXA/B* (n=19). (C) Zur Untersuchung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurde der Rotarod-Test mit konstanter Geschwindigkeit (5 Umdrehungen/min) durchgeführt (max. 300 s). Datendarstellung als Median ± Standardabweichung. Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden, fielen signifikant früher vom rotierenden Rad als *Hexb*^{-/-}-Mäuse, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* behandelt wurden. **p<0,01; *p<0,05 (T-Test, Bonferroni Korrektur). (D) Die Griffstärke wurde ab dem 63. Lebenstag der Mäuse erhoben. Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden, entwickelten eine frühere Abnahme der Griffstärke als *Hexb*^{-/-}-Mäuse, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* behandelt wurden. *p<0,05; ***p<0,0001 (T-Test, Bonferroni-Korrektur).

Überleben der Mäuse bis zu einem Alter von 195 Tagen, denen zum Zeitpunkt P0/1 Vektoren injiziert wurden (E-F). (E) Nach Administration von AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* kommt es zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens bei *Hexb*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Behandlung mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅. Mäuse, die mit den Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXB* und AAV-BR1-CAG-*mHexA/B* behandelt wurden, überlebten nicht signifikant länger als Mäuse der Kontrollgruppe. Log-rank (Mantel-Cox) Test: p-Wert <0,0001. Kontrollgruppe (n=16), *hHEXA/B* (n=13), *hHEXB* (n=12), *mHexA/B* (n=14). (F) Medianes Überleben: *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* 155 Tage, *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-*hHEXB* 134 Tage, *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-*mHexA/B* 135 Tage, *Hexb*^{-/-}+AAV-BR1-CAG-∅ 127 Tage. Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHEXB* behandelt wurden, überlebten somit signifikant länger als Mäuse der Kontrollgruppe. Zwischen den übrigen Versuchsgruppen ergab sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. Datendarstellung: Median ± Standardabweichung, ***p<0,0001 (One-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test). (F(3/54)=21,24, p<0,0001; ns: nicht signifikant, ***p<0,0001. Kontrollgruppe (n=16), *hHEXA/B* (n=13), *hHEXB* (n=12), *mHexA/B* (n=14)).

5.1.4 Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B reduziert die Glycosphingolipid-Akkumulation im Gehirn

Um zu ermitteln, ob die Effekte, die in den oben beschriebenen Überlebensstudien beobachtet wurden, durch die vektorbasierte Korrektur des bei den Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} vorliegenden Gendefekts erzielt wurden, wurde das Ausmaß der Glycosphingolipidakkumulation in verschiedenen Gehirnregionen untersucht. Dabei wurden als Kontrollen Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{+/+} verwendet, die keinen pathologischen Phänotyp entwickeln. Als weitere Kontrolle wurden Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} verwendet, denen der Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅ injiziert wurde. Als dritte Versuchsgruppe wurden Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} eingesetzt, die mit den Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* behandelt wurden. Die Vektoradministration erfolgte in

einem Alter von P25-30. Die Tötung der Versuchstiere und die Analyse der Glycosphingolipidakkumulation in verschiedenen Gehirnregionen erfolgte zum Zeitpunkt P85-95. Der Nachweis der Glycosphingolipide in verschiedenen Gehirnregionen erfolgte mittels PAS-Färbung. Exemplarisch dargestellt sind in der Abbildung 10 mikroskopische Aufnahmen von Cortex, Striatum und Cerebellum.

Auf den dargestellten mikroskopischen Aufnahmen heben sich die akkumulierten Glycosphingolipide lila vom rosa gefärbten Hintergrund ab. Es ist zu erkennen, dass Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{+/+}, die keine Vektorbehandlung erhielten, keine Glycosphingolipidakkumulationen ausbildeten. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass die Versuchstiere dieser Gruppe keinen pathologischen Phänotyp ausbilden und in den durchgeführten Überlebensstudien ein symptomfreies Überleben zeigen. Im Vergleich dazu entwickeln Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die den Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅ bekommen haben, ausgeprägte Glycosphingolipidakkumulationen in allen drei dargestellten Gehirnregionen. Demgegenüber zeigen die Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit den Vektoren AAV-BR1-CAG-hHEXA/B behandelt wurden, weniger Akkumulation von Glycosphingolipiden in den dargestellten Gehirnregionen (Abb. 10A). Eine Quantifizierung der Glycosphingolipidakkumulationen in Form PAS-positiver Zellen / Gesichtsfeld (2,25 mm²) ergab signifikant weniger PAS-positive Zellen in Cortex, Striatum und Cerebellum bei Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-hHEXA/B behandelt wurden, als bei Mäusen, die mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden (Abb. 10B). Die Analyse der Daten erfolgte nach Prüfung auf Ausreißer mithilfe des Ausreißertests nach Grubbs sowie nach Prüfung auf Vorliegen einer Normalverteilung mithilfe des D'Agostino & Pearson omnibus normality Tests mittels Two-Way ANOVA (Behandlung, F(1/27)=41.43, p<0,0001; Gehirnregion und Interaktion waren nicht signifikant). **p<0,01 (Bonferroni Test, n=4 Mäuse/Gruppe).

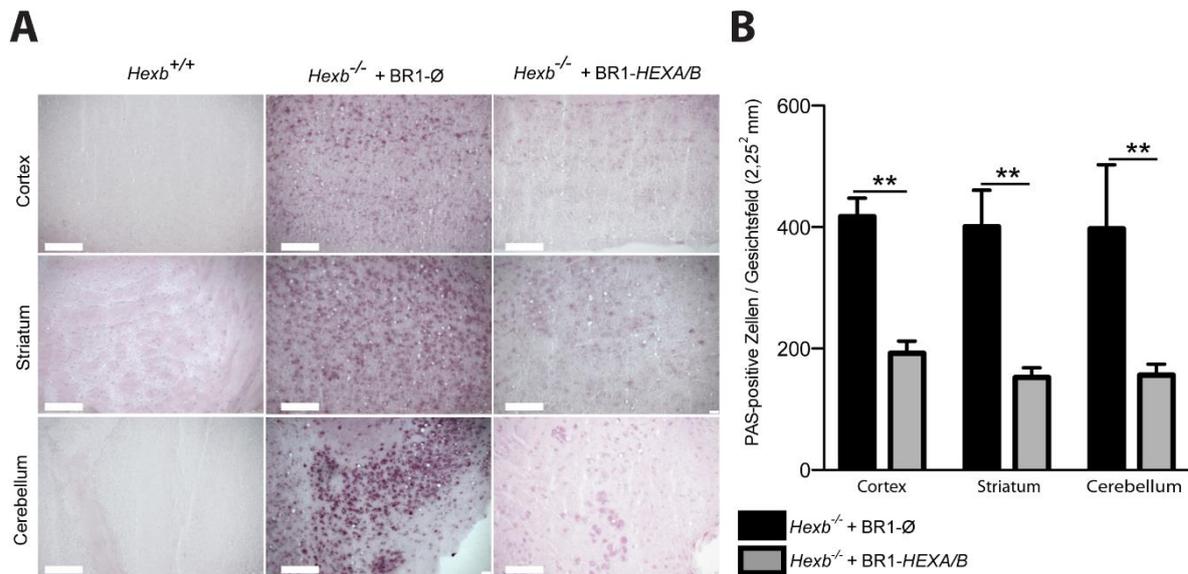


Abb. 10: Die vektorbasierte Genexpression der β -Hexosaminidasen A und B in Gehirndothelzellen reduziert die Akkumulation von Glycosphingolipiden in Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}. (A) Mikroskopische Aufnahmen von Gehirnschnitten (Mäuse im Alter von 85-95 Tagen), die mittels PAS-Färbung gefärbt wurden. Die PAS-Färbung diente zum Nachweis von Glycosphingolipidablagerungen. In Gehirnschnitten von Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{+/+} konnten keine Glycosphingolipidablagerungen nachgewiesen werden. Beim Vergleich der nachgewiesenen Glycosphingolipidablagerungen von Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} ergab sich, dass eine Behandlung mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* zu einer Reduktion der Ablagerungen führt im Vergleich zu einer Behandlung mit dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅. (B) Quantifizierung PAS-positiver Zellen in Cortex, Striatum und Cerebellum von Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}, die mit den Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* oder dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅ behandelt wurden. In den Gehirnschnitten waren signifikant weniger PAS-positive Zellen nach Behandlung mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* nachweisbar im Vergleich zu dem Vektor AAV-BR1-CAG-∅. Die Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels Two-Way ANOVA (Behandlung, $F(1/27)=41.43$, $p<0,0001$; Gehirnregion und Interaktion waren nicht signifikant). ** $p<0,01$ (Bonferroni Test, $n=4$ Mäuse/Gruppe). Maßstab 100 μ m.

Weiterführende Untersuchungen zur Quantifizierung der Glycosphingolipidakkumulationen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn. Dr. Alaa Othmann und Frau Dr. Anke Penno. Die Quantifizierung der Glycosphingolipidakkumulationen erfolgte neben der PAS-Färbung mittels Dünnschichtchromatographie und mittels Massenspektrometrie. In diesen beiden Verfahren konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es zu einer signifikanten Abnahme der Gangliosidakkumulationen (GM2 und GA2) durch die Behandlung von Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* kommt im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-∅ (163).

5.2 Erhöhung der gehirndothelzellspezifischen, vektorbasierten Genexpression durch Anwendung der Methode des „Transcriptional Targetings“

Parallel zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Untersuchung, die sich damit beschäftigte, welche therapeutischen Effekte mittels vektorbasierter Transduktion von Gehirndothelzellen in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff erzielt werden können, untersuchten wir die Möglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität für Gehirndothelzellen des Vektors AAV-BR1. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität für Gehirndothelzellen des Vektors AAV-BR1 bietet die Strategie des „Transcriptional Targeting“, bei der durch Verwendung eines gehirndothelzellspezifischen Promoters eine vektorbasierte Genexpression auf Gehirndothelzellen begrenzt wird. Das Konzept des „Transcriptional Targeting“ ist in Abbildung 11 dargestellt.

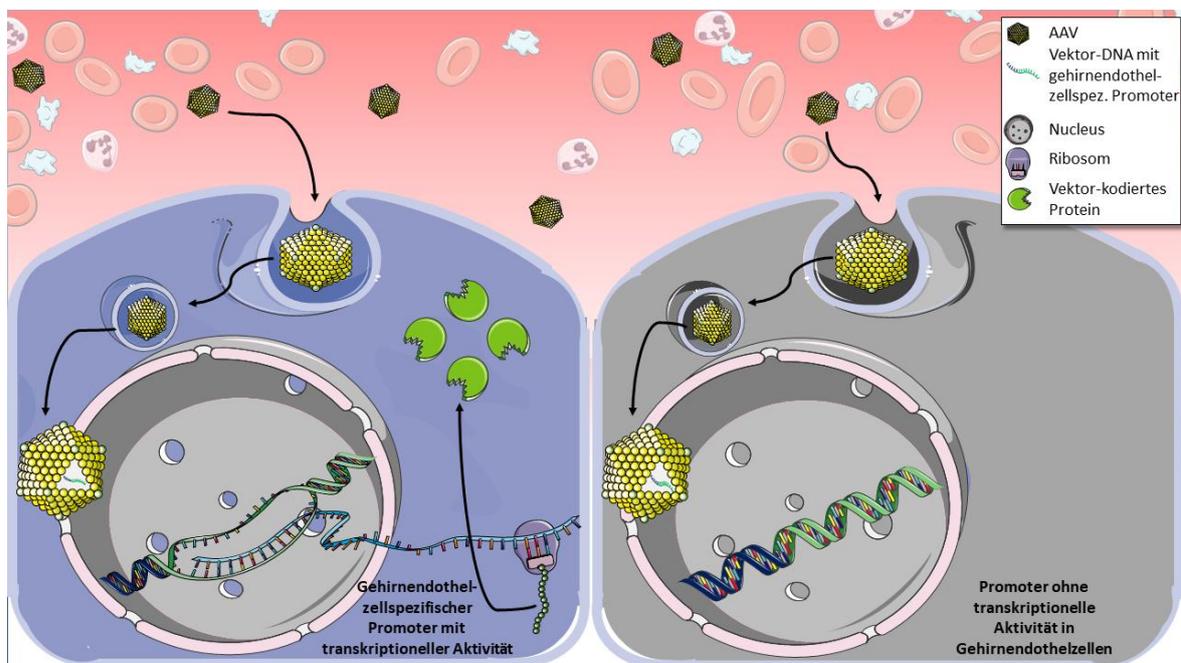


Abb. 11: Schematische Darstellung des Konzeptes des „Transcriptional Targeting“. Nach Internalisierung des Vektors AAV-BR1, der ein Protein unter Regulation verschiedener Promotersequenzen exprimiert, ist nach Freisetzung der Vektor-DNA im Nucleus das Ausmaß der vektorkodierten Genexpression von der transkriptionellen Aktivität der verwendeten Promotersequenz abhängig. Bei Verwendung einer Promotersequenz mit hoher transkriptioneller Aktivität in Gehirndothelzellen kommt es über Transkription der Vektor-DNA und anschließender Translation zu einer vektorkodierten Genexpression (blaue Zelle). Bei Verwendung einer Promotersequenz ohne transkriptionelle Aktivität in Gehirndothelzellen kommt es nicht zur Transkription und Translation. Es findet keine vektorkodierte Genexpression statt (graue Zelle). Somit ist durch Verwendung gehirndothelzellspezifischer Promotersequenzen das Erzielen einer zellspezifischen Genexpression möglich.

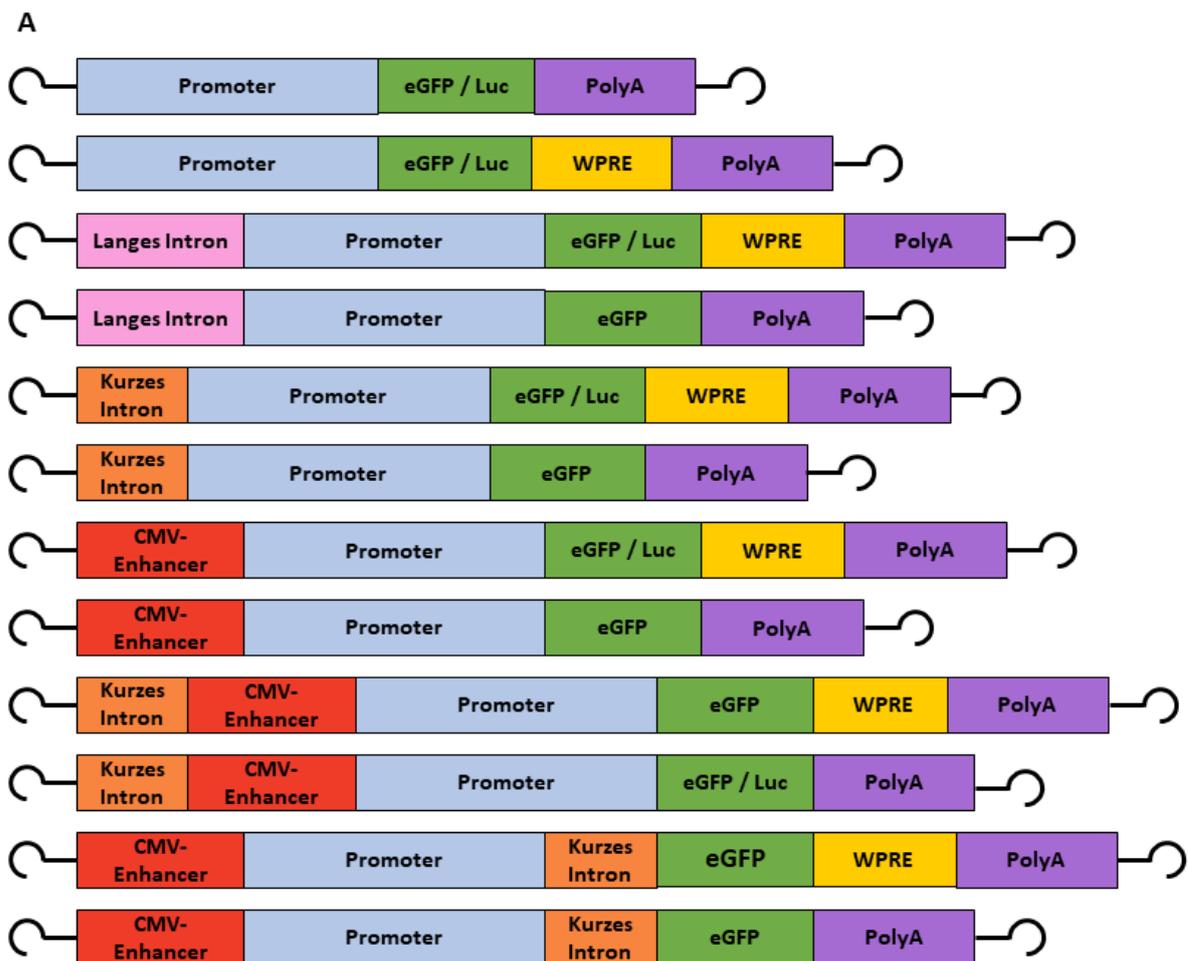
Im nachfolgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Identifizierung einer gehirndothelzellspezifischen synthetischen Promotersequenz aufgeführt. Eine gehirndothelzellspezifische synthetische Promotersequenz würde zum einen im Rahmen vektorbasierter Gentherapien monogenetischer neurologischer Erkrankungen das Risiko für die Entwicklung systemischer Nebenwirkungen reduzieren und zum anderen die für therapeutische Fragestellungen benötigte Vektordosis reduzieren. Darüber hinaus könnte ein gehirndothelzellspezifischer Promoter nach stereotaktischer Injektion von Vektoren in spezifischen Gehirnarealen eine Überexpression von bestimmten Genen spezifisch in Gehirndothelzellen ermöglichen. Hierüber wäre eine Untersuchung von unterschiedlichen Eigenschaften der Gehirndothelzellen in verschiedenen Gehirnarealen möglich.

5.2.1 Generierung von Plasmiden zur Identifizierung einer gehirndothelzell-spezifischen Promotersequenz

Zur Identifizierung einer gehirndothelzellspezifischen Promotersequenz, die zu einer starken Genexpression in Gehirndothelzellen führt, wählten wir entsprechend des in Abschnitt 2.5 (Informationen zu den verwendeten Promotoren) beschriebenen Vorgehens Promotersequenzen für die Untersuchung in Zellkulturversuchen aus (91). Daneben verwendeten wir zum Vergleich den CAG-Promotor, der zu einer ubiquitären und starken Genexpression führt, sowie den T81-Promoter, unter dessen Regulation es zu keiner nennenswerten Genexpression kommt (121). Auf Grundlage dieser 14 Promotersequenzen entwickelten wir durch Kombination mit E

nhancersequenzen 53 synthetische Promotersequenzen, die wir in Zellkulturexperimenten auf die Stärke der Genexpression untersuchten (Abb. 12). Als kurze genregulatorische Elemente wurde die Sequenz des langen Introns und des kurzen Introns des *Tie2*-Gens, des CMV-Enhancers, des Woodchuck-Elements sowie die Polyadenylierungssequenzen SV40 und bGHpA verwendet. Die „Enhancerelemente“, die als kurzes und langes Intron (S, L) des *Tie2*-Gens bezeichnet werden, wurden auf Grundlage genomischer DNA von Mäusen amplifiziert. Der CMV-Enhancer wurde aus dem Plasmid pDS-C-MLC1500-eGFP amplifiziert, das freundlicherweise von Herrn Prof. Oliver Müller (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Wie die Sequenz des kurzen und langen Introns des *Tie2*-Gens wurden auch die Promotersequenzen des

Tie2-, des *Foxq1*-, des *Ocln*-, des *Itih5*-, des *Slc2a1*-, des *Slco1c1*-, des *Pglyrp1*-, des *Sgpp2*-, des *Tbx3*-, des *Plvap*- und des *Poglut1*-Gens auf Grundlage genomischer DNA von Mäusen amplifiziert. Die Amplifikation des *Cadherin*-Promoters (*Cdh*) erfolgte mittels Gradienten-PCR auf Grundlage des Plasmids pDS-C-*Cdh*-eGFP, das ebenfalls von Herrn Prof. Oliver Müller (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Als Reportergene wurden eGFP oder die Firefly- und Renilla-Luciferase verwendet. Alle Plasmide enthalten zur Selektion eine Ampicillin-Resistenz codierende Sequenz. Das Vorgehen zur Generierung der oben beschriebenen Plasmide ist unter dem Abschnitt 3.6.2 aufgeführt. Die Plasmide wurden nach der Generierung durch die Firma GATC Biotech (Lightrun) sequenziert. Die Plasmide wurden nach der Generierung mittels Restriktion mit dem Restriktionsenzym AhdI auf das Vorliegen intakter ITR-Sequenzen getestet. Eine schematische Darstellung der untersuchten synthetischen Promotersequenzen ist in Abbildung 12A dargestellt. In Abbildung 12B ist die Länge der verwendeten Genelemente dargestellt.



B

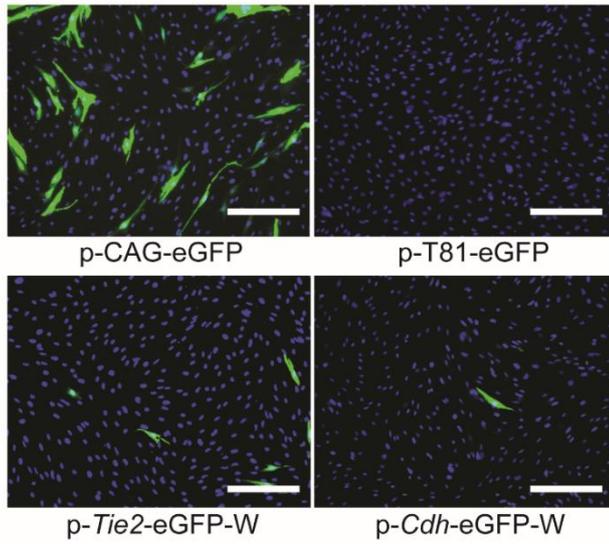
Element	Länge [bp]
Kurzes Intron	301
Langes Intron	1657
CMV-Enhancer	530
eGFP	717
Firefly-Luciferase	1653
WPRE	591
SV40 poly(A)	240
bGHpA	223

Abb. 12: Darstellung der Reihenfolge der Elemente, aus denen die Plasmide zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der synthetischen Promotersequenzen zusammengesetzt sind. Die in dieser Arbeit verwendete Benennung der Promoterkonstrukte folgt der Reihenfolge der verwendeten Elemente. (A) Die synthetischen Promoterkonstrukte bestehen aus der jeweiligen Promotersequenz, die mit kurzen genregulatorischen Elementen, wie z.B. dem langen oder kurzen Intron des *Tie2*-Gens (L, S), dem CMV-Enhancer (C) sowie dem Woodchuck-Element (WPRE, W) kombiniert wurden, um die Stärke der Genexpression zu erhöhen. Als Reportergene wurden eGFP, die Firefly-Luciferase sowie die Renilla-Luciferase verwendet. Zusätzlich enthalten die Plasmide zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der synthetischen Promotersequenzen als Polyadenylierungssignal bGHpA oder SV40 poly(A). (B) Länge, angegeben in bp, der verwendeten kurzen genregulatorischen Elemente und der verwendeten Reportergene.

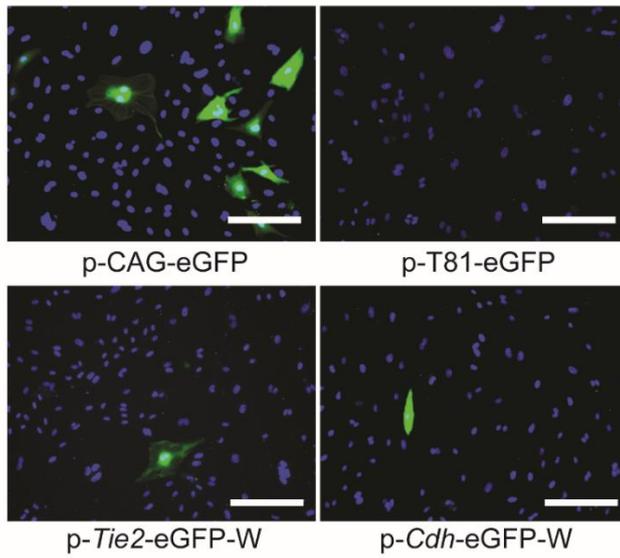
5.2.2 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der kurzen genregulatorischen Sequenzelemente *in vitro* in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 sowie in primären Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen

Erste Untersuchungen der transkriptionellen Aktivität der kurzen genregulatorischen Sequenzen erfolgten *in vitro* in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3, in primären Gehirndothelzellen von Mäusen (mPBEC) und in primären Gehirndothelzellen von Schweinen. Diese wurden mittels Lipofektion mit Plasmiden, die das Reportergen eGFP unter Regulation der Promotersequenzen exprimieren, transfiziert. Die initial untersuchten Promotersequenzen, die nur mit dem Woodchuck-Element, jedoch nicht mit dem CMV-Enhancer oder dem kurzen Intron des *Tie2*-Gens kombiniert wurden, führten zu keinem oder nur zu einem geringgradigen Nachweis von eGFP nach der Lipofektion. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

A Primäre Gehirnendothelzellen von Mäusen



B Primäre Gehirnendothelzellen von Schweinen



C Zellen der Zelllinie hCMEC/D3

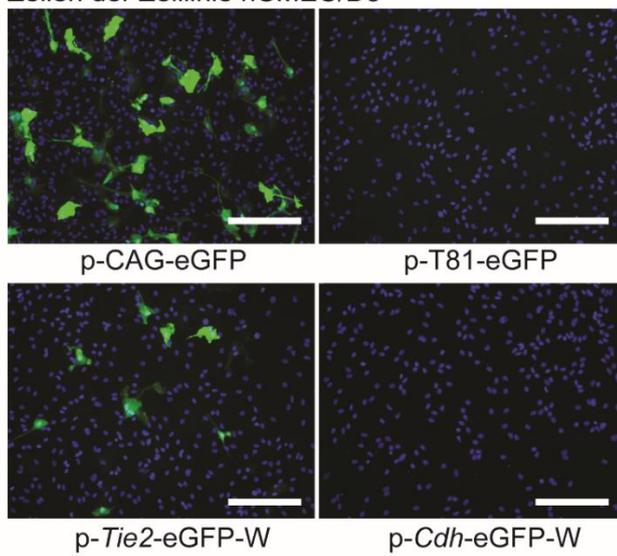


Abb. 13: Native Promotersequenzen, die nicht mit dem CMV-Enhancer oder dem kurzen Intron des *Tie2*-Gens kombiniert wurden, führen nur zu einer geringen transkriptionellen Aktivierung nach Lipofektion *in vitro*. Mikroskopische Aufnahmen primärer Gehirndothelzellen von Mäusen (A), von Schweinen (B) und Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 (C), die mit Plasmiden, die eGFP unter der Regulation verschiedener Promotersequenzen exprimieren, transfiziert wurden. Die primären Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen sowie Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden vier bis fünf Tage nach der Transfektion mittels Lipofektion mit den angegebenen Plasmiden fixiert und für DNA mittels DAPI (blau) sowie immunzytochemisch für eGFP (grün), das von den Plasmiden kodierte Reporter gen, gefärbt. Zu erkennen sind in der jeweils oberen Zeile der Abschnitte A, B und C exemplarische mikroskopische Aufnahmen der Zellen, die mit den Kontrollplasmiden transfiziert wurden. Nach der Transfektion der Zellen mit dem Plasmid p-CAG-eGFP, das als Reporter gen eGFP unter Kontrolle des CAG-Promoters exprimiert, kam es zu einem starken Nachweis von eGFP. Bei Verwendung von Plasmiden, die als Reporter gen eGFP unter Regulation der Promotoren *Tie2-W* und *Cdh-W* exprimieren, kam es verglichen mit dem Kontrollpromoter CAG zu einem geringeren Nachweis von eGFP. Somit war die transkriptionelle Aktivität der panendothelialen Promotersequenzen *Tie2-W* und *Cdh-W* in den erfolgten Untersuchungen *in vitro* als gering einzuschätzen. Maßstab 100 µm.

Basierend auf diesen Ergebnissen bestand die Notwendigkeit, zunächst zu untersuchen, ob die Verwendung verschiedener Kombinationen kurzer genregulatorischer Sequenzen mit den nativen Promotersequenzen zu einer verstärkten Genexpression führt. Diese Frage wurde exemplarisch anhand der panendothelialen Promotersequenzen des *Tie2*- und des *Cdh*-Promoters untersucht. Zum Vergleich wurden erneut der CAG-Promoter und der Promoter T81 verwendet. Als kurze genregulatorische Sequenzen, die mit den Promotersequenzen des *Tie2*- und des *Cdh*-Promoters kombiniert wurden, wurden das lange Intron und das kurze Intron des *Tie2*-Gens, die Sequenz des CMV-Enhancers sowie das Woodchuck-Element verwendet. Um die Effekte auf die Stärke der Aktivierung der Transkription in Gehirndothelzellen zu untersuchen, wurden Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 kultiviert und anschließend mit Plasmiden transfiziert, die unter Kontrolle der jeweiligen synthetischen Promotersequenzen eGFP als Reporter gen exprimieren. Die Analyse der Stärke der Aktivierung der Transkription erfolgte fünf Tage nach Durchführung der Lipofektion mittels DAPI zur Markierung der DNA aller Endothelzellen sowie mittels immunzytochemischer Färbung für eGFP, um die Endothelzellen zu detektieren, in denen es durch Transfektion mit den Plasmiden zu einer Genexpression von eGFP gekommen ist. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 14A dargestellt.

Zu erkennen ist in Abbildung 14A, dass eine Kombination der nativen Promotersequenzen mit den kurzen genregulatorischen Sequenzen zu einer stärkeren Expression von eGFP führte. Die diesbezüglich erhobenen Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

In Kombination mit dem *Tie2*-Promoter untersuchten wir exemplarisch, ob die Verwendung der kurzen oder der langen Sequenz des ersten Introns des *Tie2*-Gens zu einer stärkeren Aktivierung der transkriptionellen Aktivität in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 führt. Zudem untersuchten wir exemplarisch in Kombination mit dem Promoter des *Tie2*-Gens die Effekte des Woodchuck-Elements auf das Ausmaß der transkriptionellen Aktivierung und somit auf die Stärke der Genexpression des Reportergens eGFP. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen erfolgte ein statistischer Vergleich der Rate eGFP-positiver Zellen nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit den Plasmiden p-S-*Tie2*-eGFP, p-S-*Tie2*-eGFP-W, p-L-*Tie2*-eGFP und p-L-*Tie2*-eGFP-W. Hierfür erfolgte zunächst eine Überprüfung der Daten mittels Ausreißertest nach Grubbs, in der keine Ausreißer identifiziert werden konnten. Nach Ausschluss des Vorliegens mehrerer Verletzungen der Voraussetzungen für einen ANOVA-Test erfolgte eine statistische Analyse mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test ($F(15/80) = 156,2$, $p < 0,0001$; ns: nicht signifikant, $*p < 0,0332$, $**p < 0,0021$, $****p < 0,0001$, $n=6$ transfizierte Wells pro Plasmid). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausmaß der transkriptionellen Aktivierung der kurzen und der langen Sequenz des ersten Introns des *Tie2*-Gens festgestellt werden, sodass wir in nachfolgenden Untersuchungen aufgrund der begrenzten Verpackungskapazität Adeno-assoziiierter Vektoren die kurze Sequenz des ersten Introns des *Tie2*-Gens verwendeten.

Bei Vergleich der eGFP-Expression als Maß für die Stärke der transkriptionellen Aktivierung nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit Plasmiden mit den synthetischen Promotersequenzen S-*Tie2* und L-*Tie2* mit der eGFP-Expression nach Lipofektion mit Plasmiden mit den synthetischen Promotersequenzen S-*Tie2*-W und L-*Tie2*-W konnte eine signifikant stärkere eGFP-Expression bei Kombination der Promotersequenzen S-*Tie2* und L-*Tie2* mit dem Woodchuck-Element nachgewiesen werden. Ebenso ergab sich ein signifikanter Unterschied bei Vergleich der transkriptionellen Aktivierung durch die Promotersequenzen S-C-*Tie2* und S-C-*Tie2*-W. Die

statistische Analyse der Daten erfolgte wie oben beschrieben nach Ausschluss von Ausreißern in der zu testenden Probenmenge sowie nach Ausschluss von Verletzungen der Voraussetzungen für eine ANOVA-Testung mittels One-Way ANOVA. Anschließend erfolgte eine Post-hoc-Analyse mittels Tukey's Multiple Comparison Test ($F(15/80) = 156,2$, $p < 0,0001$; ns: nicht signifikant, $*p < 0,0332$, $**p < 0,0021$, $****p < 0,0001$, $n=6$ transfizierte Wells pro Plasmid). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 14A aufgeführt.

Nachfolgend wiederholten wir die Untersuchung der beschriebenen Fragestellungen an isolierten primären Schweinegehirnendothelzellen und an aus Mausgehirnen isolierten primären Endothelzellen (Abb. 14B), um zu untersuchen, ob es sich bei den durch die kurzen genregulatorischen Sequenzen vermittelten Effekte um spezieabhängige Effekte handelt. Dargestellt ist in Abbildung 14B die Korrelationsanalyse zwischen der Rate eGFP-positiver Zellen im Vergleich zu allen Zellen nach Lipofektion der verschiedenen Zellreihen mit Plasmiden, die eGFP unter Regulation der verschiedenen synthetischen Promotersequenzen exprimieren. Vor Analyse der Daten erfolgte zunächst eine Überprüfung der Daten mittels Ausreißertest nach Grubbs, in der keine Ausreißer identifiziert werden konnten. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Bei Nachweis parametrisch verteilter Daten erfolgte eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse nach Pearson. Die Rate eGFP-pos. Zellen korrelierte zwischen den drei Zelllinien (Maus vs Schwein, Pearson $r=0,9407$, $p=0,002$; Maus vs hCMEC/D3, Pearson $r=0,884$, $p=0,0016$; Schwein vs hCMEC/D3, Pearson $r=0,7291$, $p=0,0258$). Auf Grundlage dieser Ergebnisse erhielten wir erste Hinweise darauf, dass zunächst von einem spezieunabhängigen Effekt der kurzen genregulatorischen Sequenzelemente auf die Expression des Reportergens eGFP *in vitro* auszugehen ist.

Zur Verifizierung dieser beschriebenen Ergebnisse und zum Ausschluss von Störfaktoren wurde ergänzend eine Analyse mittels Dual Luciferase Assay (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, Fitchburg, USA) durchgeführt. Die Analyse mittels Dual Luciferase Assay ermöglicht im Vergleich zu der beschriebenen mittels Fluoreszenzfärbung durchgeführten Aussage über die Rate eGFP-pos. Zellen eine Aussage über die Stärke der Reporterexpression in den Zellen. Zur Durchführung des Dual Luciferase Assays

wurden Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das unter der Kontrolle des CAG-Promoters als Reporter die Renilla-Luciferase (RLuc) exprimiert. Zudem erfolgte eine Transfektion der Zellen mit Plasmiden, die unter Kontrolle der jeweiligen synthetischen Promotersequenzen als Reporter das Gen der Firefly-Luciferase (Luc) exprimieren. Fünf Tage nach der Transfektion wurde sowohl die Aktivität der Firefly- als auch der Renilla-Luciferase gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Ausreißertest nach Grubbs. Bei fehlender Verletzung mehrere Voraussetzungen konnte anschließend eine Analyse der Daten mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test erfolgen. Die oben aufgeführten Effekte, die in der mittels Fluoreszenzfärbung durchgeführten Analyse erhoben werden konnten, auf die Transkription der Reportergene durch Hinzufügen des kurzen bzw. des langen Introns zu der nativen Promotersequenz konnten mit dem Verfahren des Dual Luciferase Assay bestätigt werden: Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression der Firefly-Luciferase im Vergleich zur Renilla-Luciferase bei Verwendung der synthetischen Promotersequenzen *S-Tie2-W* und *L-Tie2-W* (One-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, $F(8/41) = 26,85$, $p < 0,0001$; ns: nicht signifikant; n=4-8 Wells/Plasmid).

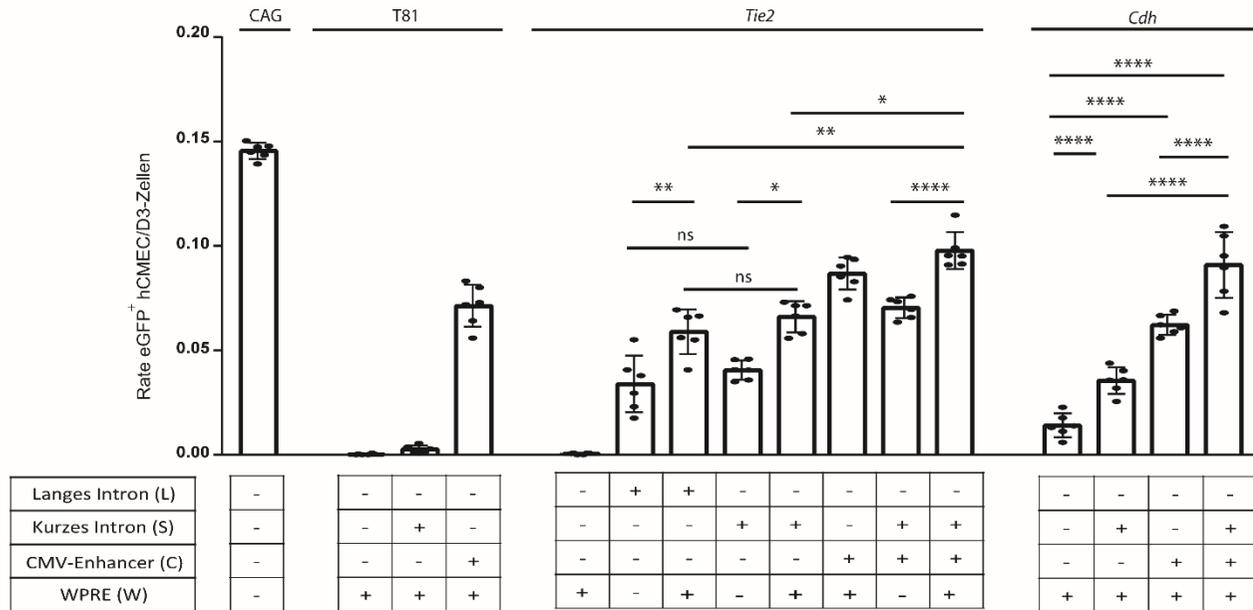
Ergänzend erfolgte exemplarisch anhand der Ergebnisse der Lipofektion mit Plasmiden, die den Promoter *Cdh* enthalten, eine differenzierte Analyse der Effekte, die mit den kurzen genregulatorischen Sequenzen (S, CMV-Enhancer) oder ihrer Kombination erzielt werden können. Unter Betrachtung der Ergebnisse für die transkriptionelle Aktivierung, die unter Verwendung des Reportergens eGFP erzielt werden konnten, ergab sich eine signifikante Steigerung der eGFP-exprimierenden Zellen durch Hinzufügen des kurzen Introns, des CMV-Enhancers bzw. des kurzen Introns und des CMV-Enhancers zu der Promotersequenz *Cdh-W*. Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch den CMV-Enhancer in Kombination mit dem *S-Cdh-W*-Promoter zu einer signifikanten Zunahme der Zahl eGFP-exprimierender Zellen kam. Ebenso kam es durch das Hinzufügen des kurzen Introns S zu der Promotersequenz *C-Cdh-W* zu einer signifikanten Zunahme eGFP-exprimierender Zellen.

Bei der Analyse der Stärke der transkriptionellen Aktivierung mittels Dual Luciferase Assay konnte gezeigt werden, dass ein Hinzufügen des CMV-Enhancers sowie des kurzen Introns und des CMV-Enhancers zu der Promotersequenz *Cdh-W* zu einer signifikanten Zunahme der relativen Luciferase-Expression führte. Bei Vergleich der relativen Luciferase-Aktivität nach Lipofektion der Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit den Plasmiden mit den Promotersequenzen *Cdh-W* und *S-Cdh-W* konnte kein signifikanter Unterschied in der Reporterexpression nachgewiesen werden.

Als Grundlage für weiterführende Analysen schlossen wir ergänzend eine Analyse an, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Reporterexpression bei immunzytochemischer Analyse der Daten sowie bei Auswertung der Ergebnisse mittels Dual Luciferase Assay korrelieren. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 15B dargestellt. Bei Berechnung der Korrelation unter Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen der mittels Fluoreszenzfärbung ermittelten Rate eGFP-positiver Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 und der mittels Dual Luciferase Assay ermittelten relativen Aktivität der Firefly- und der Renilla-Luciferase ergab sich ein signifikanter Zusammenhang (Pearson $r=0,8064$, $p=0,0087$, Pearson-Korrelation).

Zusammenfassend kann somit formuliert werden, dass eine Kombination der nativen Promotersequenzen mit den kurzen genregulatorischen Sequenzen zu einer signifikanten Zunahme der Zahl eGFP-exprimierender Zellen und der Aktivität der Firefly-Luciferase im Verhältnis zur Renilla-Luciferase nach Lipofektion primärer Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen sowie in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 führte. Für die weiteren Untersuchungen zur Identifikation einer gehirndothelzellspezifischen Promotersequenz untersuchten wir daher ausschließlich Plasmide, in denen wir die native Promotersequenz mit dem CMV-Enhancer oder dem CMV-Enhancer und dem kurzen Intron kombinierten.

A



B

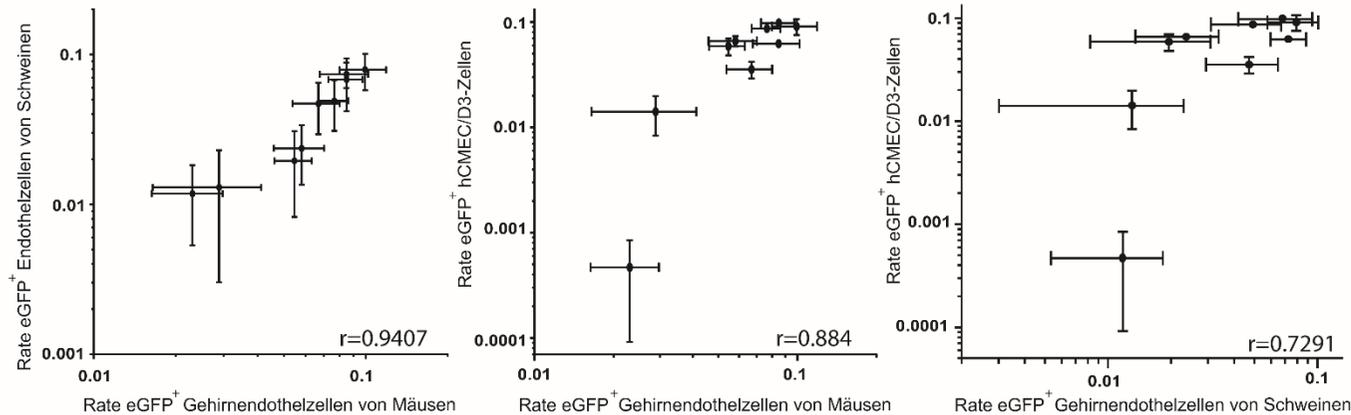


Abb. 14: Kurze genregulatorische Elemente verstärkten die Genexpression nach Transfektion von hCMEC/D3-Zellen mit Plasmiden, die eGFP unter Regulation synth. Promotorsequenzen exprimieren. (A) Analyse von Färbungen von hCMEC/D3-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden, die eGFP unter der Regulierung synth. Promotorsequenzen exprimieren. Die Daten zeigen die Rate eGFP-pos. hCMEC/D3-Zellen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, analysiert durch One-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test (Plasmid, $F(15/80) = 156,2$, $p < 0,0001$; ns: nicht signifikant, $*p < 0,0332$, $**p < 0,0021$, $****p < 0,0001$, $n=6$ transfizierte Wells pro Plasmid). (B) Die Rate eGFP-pos. Gehirndendothelzellen korreliert in Gehirndendothelzellen von Mäusen, Schweinen sowie Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 (Maus vs Schwein, Pearson $r=0,9407$, $p=0,002$; Maus vs hCMEC/D3, Pearson $r=0,884$, $p=0,0016$; Schwein vs hCMEC/D3, Pearson $r=0,7291$, $p=0,0258$).

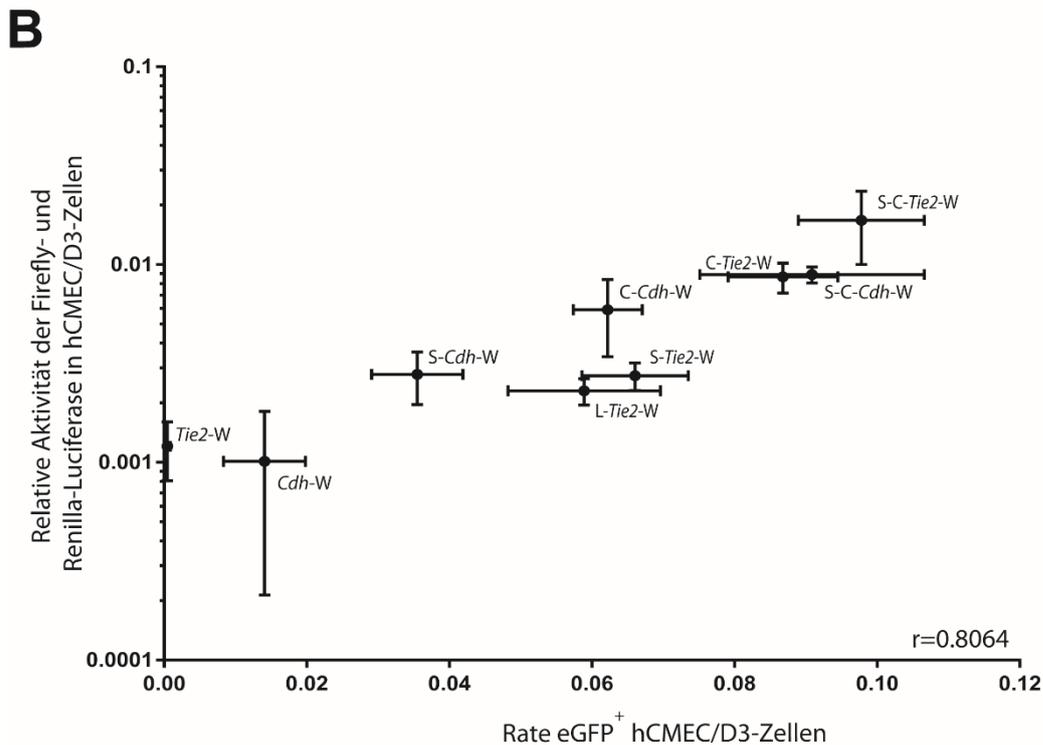
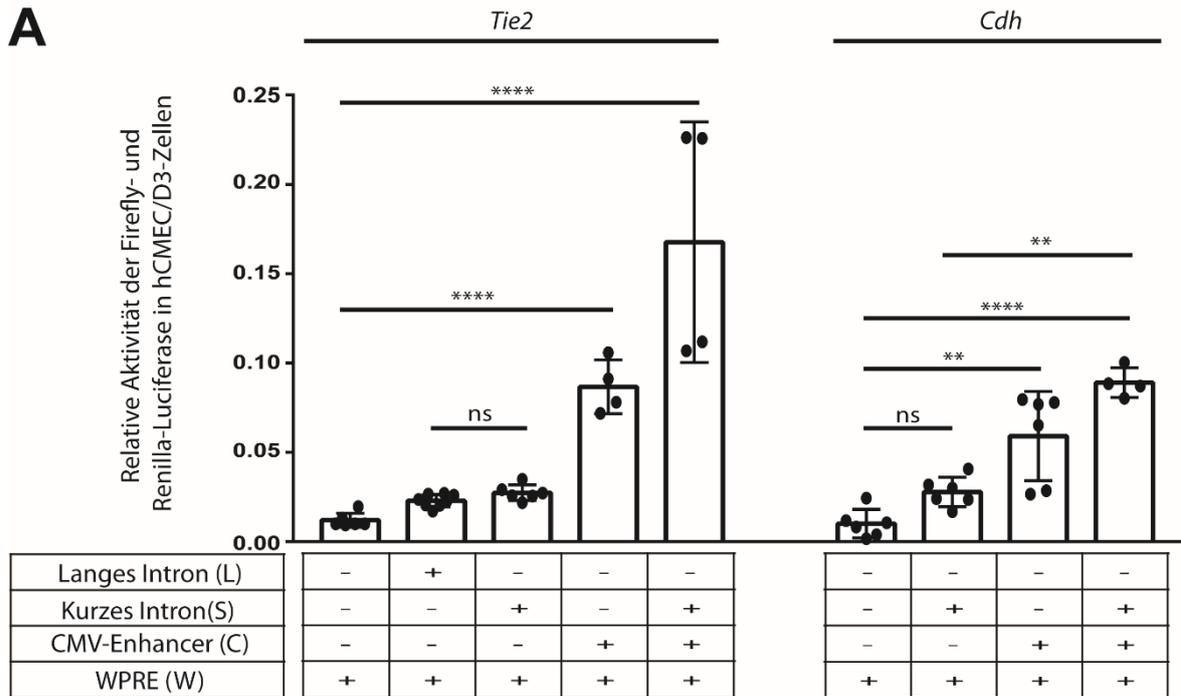


Abb.15: Kurze genregulatorische Elemente erhöhten die relative Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase als Maß für die transkriptionelle Aktivierung in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3. Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der genregulatorischen Sequenzen *in vitro* in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mittels Dual Luciferase Assay (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, Fitchburg, USA). Zur Durchführung dieser Analyse wurden Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das unter der Kontrolle des CAG-Promoters als Reportergen die Renilla-Luciferase (RLuc) exprimiert. Zudem erfolgte eine Transfektion mit Plasmiden, die unter Kontrolle der jeweiligen synthetischen Promotersequenzen als Reportergen die Firefly-Luciferase (Luc) exprimieren. Fünf Tage nach der Transfektion wurde sowohl die

Aktivität der Firefly- und der Renilla-Luciferase gemessen und ins Verhältnis gesetzt. (A) Die Daten in Abbildung 15A zeigen die relative Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, analysiert durch One-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test ($F(12/74)=81,06$; $p<0,0001$, ns: nicht signifikant, $**p<0,0021$, $****p<0,0001$, $n=4-8$ Wells/Plasmid). (B) Die Ergebnisse der immunzytochemischen Analyse der transkriptionellen Aktivität der genregulatorischen Sequenzen und die mittels Dual Luciferase Assay erhobenen Ergebnisse zeigen eine signifikante Korrelation (Pearson $r=0,8064$, $p=0,0087$, Pearson-Korrelation). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die immunzytochemische Analyse ein geeignetes Analyseverfahren zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der zu untersuchenden genregulatorischen Sequenzen darstellte.

5.2.3 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der verwendeten synthetischen Promotersequenzen *in vitro* in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, konnte die Untersuchung der Effekte, die durch Kombination der kurzen genregulatorischen Sequenzen mit den Promotersequenzen der panendothelialen Promotoren *Tie2* und *Cdh* *in vitro* in primären Gehirndothelzellen von Mäusen und Schweinen sowie in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 erzielt werden konnten, zeigen, dass eine Kombination der kurzen genregulatorischen Sequenzen mit dem *Tie2*- und dem *Cdh*-Promoter zu einer Erhöhung der Zahl der eGFP-exprimierenden Zellen und zu einer vermehrten Expression der Firefly-Luciferase führte.

In den *in vitro* Versuchen, die unter dem Abschnitt 5.2.2 aufgeführt sind, war die Sequenz des langen und kurzen Introns vor den beschriebenen Promotersequenzen des *Tie2*- und *Cdh*-Promoters lokalisiert. Studien konnten zeigen, dass eine Lokalisation der Intronsequenz zwischen Promotersequenz und Transgen zu einer verbesserten Prozessierung der mRNA und somit zu einer Erhöhung der Transgenexpression führen kann (123, 124). Daher wurden im nachfolgenden Abschnitt Promoterkonstrukte untersucht, bei denen das Intron nicht vor der eigentlichen Promotersequenz, sondern zwischen Promoter und Reportergen lokalisiert wurde.

Zur Untersuchung, welche der Promotersequenzen für gentherapeutische Ansätze geeignet sein könnten, generierten wir verschiedene Plasmide, die die Promotoren *Cdh*, *Foxq1*, *Ocln*, *Itih5*, *Slc2a1*, *Slco1c1*, *Pglyrp1*, *Sgpp2*, *Tbx3*, *Plvap* und *Poglut1* in Kombination mit dem CMV-Enhancer, dem kurzen Intron des *Tie2*-Gens oder dem Woodchuck-Element beinhalten. Zum Vergleich wurde erneut ein Plasmid, das eGFP

unter der Regulation des CAG-Promoters exprimiert, und ein Plasmid, das eGFP unter Regulation des T81-Promoters exprimiert, verwendet (in Abbildung 16A aus Übersichtsgründen nicht dargestellt). Es erfolgte eine Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit den 40 Plasmiden. Am fünften Tag nach der Lipofektion wurden die Zellen fixiert und das Ausmaß der transkriptionellen Aktivierung wurde analysiert. Hierfür wurden mittels DAPI die doppelsträngige DNA markiert (blau). Zudem erfolgte eine immunzytochemische Färbung zum Nachweis eGFP-exprimierender Zellen (grün). Die eGFP-exprimierenden Zellen wurden für die statistische Analyse ins Verhältnis zu den blau-angefärbten, doppelsträngige DNA-enthaltenden Nuclei gesetzt (Abb. 16A, 16B).

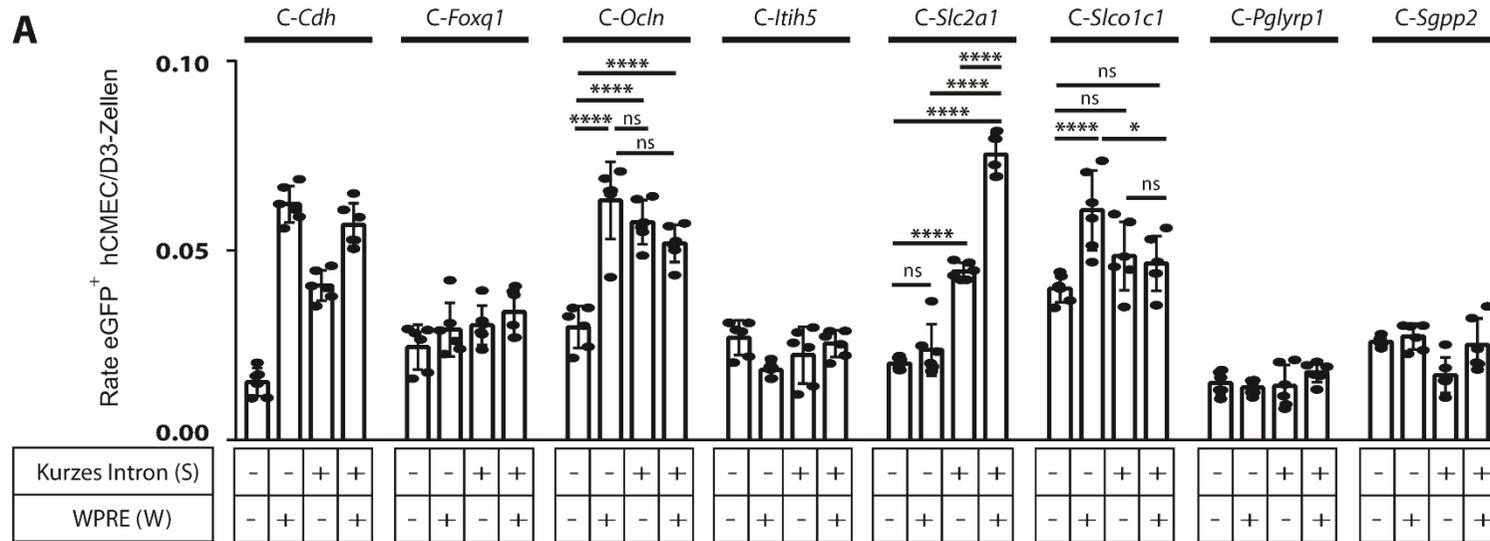
Zur statistischen Analyse der Daten erfolgte zunächst eine Untersuchung des Datensatzes auf das Vorliegen von Ausreißern mittels Grubbs-Ausreißertests. Es konnten keine Ausreißer festgestellt werden, sodass keine der erhobenen Daten von der weiterführenden Analyse ausgeschlossen wurden.

Auf Grundlage der im Vorherigen beschriebenen Voranalysen der Daten erfolgte nach Ausschluss von Verletzung der im Abschnitt 4.5 (Statistische Auswertung) beschriebenen Voraussetzungen eine statistische Auswertung der Ergebnisse mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test.

Zunächst erfolgte eine Analyse der Effekte auf das Ausmaß der Expression des Reportergens eGFP in Abhängigkeit der potentiell gehirnendothelzellspezifischen Promotersequenzen. In dieser Analyse ergab sich, entsprechend der in Abbildung 16B dargestellten Daten, dass die Promotoren *Ocln* und *Slco1c1* zu einer starken transkriptionellen Aktivierung mit einer starken immunzytochemisch nachweisbaren Expression der Reportergens eGFP in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 führten. Ein intermediärer Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung konnte für die Promotoren *Cdh* und *Slc2a1* nachgewiesen werden. Die Promotoren *Foxq1*, *Itih5*, *Pglyrp1* und *Sgpp2* zeigten hierbei den geringsten Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung gemessen an der Expression des Reportergens. Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; Promoter, $F(7/160)=135$, $p<0,0001$; Interaktion, $F(21/160)=27,85$, $p<0,0001$; ns: nicht signifikant, * $p<0,0332$, ** $p<0,0021$, *** $p<0,0002$, **** $p<0,0001$; n=6 untersuchte Wells/Plasmid.

Ergänzend erfolgte ebenfalls mittels Two-Way ANOVA eine Analyse der Effekte auf das Ausmaß der Expression des Reportergens eGFP in Abhängigkeit der Kombination der kurzen regulatorischen Sequenzen mit den im vorherigen Absatz aufgeführten Promotersequenzen. In dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die Kombination des Woodchuck-Elements sowie des Woodchuck-Elements und des kurzen Introns des *Tie2*-Gens mit einer Sequenz bestehend aus der Promotersequenz und dem CMV-Enhancer zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivität führte. Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; kurze regulatorische Genelemente, $F(3/160)=79,09$, $p<0,0001$; Interaktion, $F(21/160)=27,85$, $p<0,0001$; ns: nicht signifikant, **** $p<0,0001$; $n=6$ untersuchte Wells/Plasmid).

In der nachfolgend durchgeführten Post-hoc-Analyse mittels Tukey's Multiple Comparison Test konnte bezüglich der durch die genregulatorische Sequenz des kurzen Introns des *Tie2*-Gens vermittelten Steigerung der transkriptionellen Aktivität ein signifikanter Effekt nach Transfektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 im Kontext des *Slc2a1* und des *Ocln*-Promoters nachgewiesen werden durch Vergleich der Ergebnisse nach Transfektion der Zellen mit den Plasmiden p-C-*Slc2a1*-eGFP und p-C-*Slc2a1*-S-eGFP ($p<0,0001$), p-C-*Slc2a1*-eGFP-W und p-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W ($p<0,0001$) sowie p-C-*Ocln*-eGFP und p-C-*Ocln*-S-eGFP ($p<0,0001$). Ergänzend erfolgte eine Analyse im Kontext welcher Promotersequenzen die Kombination des Woodchuck-Elements mit der synthetischen Promotersequenz zu einer Zunahme der transkriptionellen Aktivität führt. Hier ließ sich ein signifikanter Effekt im Kontext des *Cdh*-Promoters, des *Ocln*-Promoters, des *Slc2a1*-Promoters und des *Slco1c1*-Promoters nachweisen durch Vergleich der Ergebnisse nach Transfektion der Zellen mit den Plasmiden p-C-*Cdh*-eGFP und p-C-*Cdh*-eGFP-W ($p<0,0001$), p-C-*Cdh*-S-eGFP und p-C-*Cdh*-S-eGFP-W ($p<0,0001$), p-C-*Ocln*-eGFP und p-C-*Ocln*-eGFP-W ($p<0,0001$), p-C-*Slc2a1*-S-eGFP und p-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W ($p<0,0001$) sowie p-C-*Slco1c1*-eGFP und p-C-*Slco1c1*-eGFP-W ($p<0,0001$). Jedoch zeigte sich auch trotz Kombination der kurzen genregulatorischen Sequenzen mit den beschriebenen nativen Promotersequenzen nach Lipofektion der hCMEC/D3-Zellen die stärkste Expression von eGFP weiterhin unter Regulation des CAG-Promoters mit einer Rate von fast 15% eGFP-exprimierender Zellen. Nach Lipofektion der hCMEC/D3-Zellen mit dem Plasmid p-T81-eGFP, ließ sich eine eGFP-Expression in $< 1\%$ der Zellen nachweisen (Daten nicht dargestellt).



B

	<i>Cdh</i>	<i>Foxq1</i>	<i>Ocln</i>	<i>Itih5</i>	<i>Slc2a1</i>	<i>Slco1c1</i>	<i>Pglyrp1</i>	<i>Sgpp2</i>
<i>Cdh</i>		****	***	****	ns	*	****	****
<i>Foxq1</i>	****		****	**	****	****	****	*
<i>Ocln</i>	***	****		****	****	ns	****	****
<i>Itih5</i>	****	**	****		****	****	****	ns
<i>Slc2a1</i>	ns	****	****	****		****	****	****
<i>Slco1c1</i>	*	****	ns	****	****		****	****
<i>Pglyrp1</i>	****	****	****	****	****	****		
<i>Sgpp2</i>	****	*	****	ns	****	****	****	

	C-P	C-P-W	C-P-S	C-P-S-W
C-P		****	****	****
C-P-W	****		ns	***
C-P-S	****	ns		****
C-P-S-W	****	***	****	

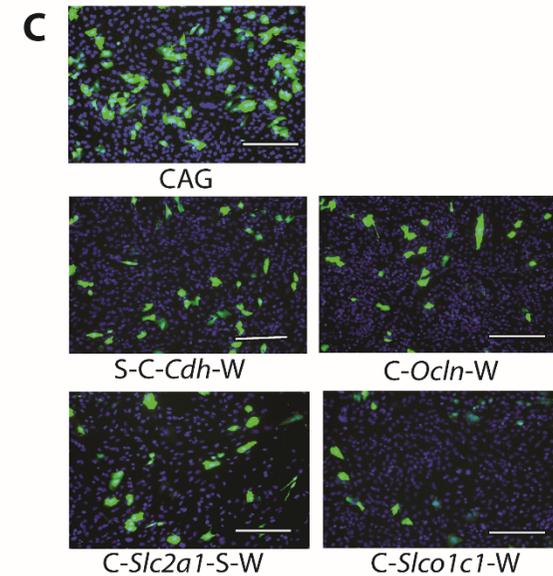


Abb. 16: Analyse der Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von eGFP nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3. Die Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden in 24-Well-Platten kultiviert. Es erfolgte eine Transfektion der Zellen mittels Lipofektion mit Plasmiden, die unter der Regulation verschiedener Promotersequenzen das Reportergen eGFP exprimieren. Am 5. Tag nach der Lipofektion erfolgte die Analyse der Expression von eGFP mittels Färbung der doppelsträngigen DNA mit DAPI und mittels immunzytochemischer Färbung für eGFP. Es wurde anschließend das Verhältnis der eGFP-exprimierenden Zellen zu den angefärbten Nuclei bestimmt. (A) Dargestellt ist die Rate eGFP-pos. Zellen im Verhältnis zur Zahl aller Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 pro Gesichtsfeld in Abhängigkeit der bei der Lipofektion verwendeten synthetischen Promotersequenzen. Unter Verwendung des CAG-Promoters werden im Vergleich zu allen anderen synthetischen Promotersequenzen signifikant mehr eGFP-exprimierende Zellen nachgewiesen (nicht dargestellt). Die abgebildeten Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (B) Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Abbildung 16A dargestellten Daten mittels Two-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test. Die Promotoren *Ocln* und *Slco1c1* führten zu einer starken transkriptionellen Aktivierung mit einer starken immunzytochemisch nachweisbaren Expression der Reportergens eGFP. Ein intermediärer Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung konnte für die Promotoren *Cdh* und *Slc2a1* nachgewiesen werden. Die Promotoren *Foxq1*, *Itih5*, *Pglyrp1* und *Sgpp2* zeigten den geringsten Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung gemessen an der Expression des Reportergens. Bezüglich des Effekts der kurzen genregulatorischen Sequenzelemente wurde gezeigt, dass die Kombination des Woodchuck-Elements sowie des Woodchuck-Elements und des kurzen Introns des *Tie2*-Gens mit der Sequenz bestehend aus der Promotersequenz und dem CMV-Enhancer zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivität führte. Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; Promoter, $F(7/160)=135$, $p<0,0001$; kurze regulatorische Genelemente, $F(3/160)=79,09$, $p<0,0001$; Interaktion, $F(21/160)=27,85$, $p<0,0001$; ns: nicht significant, * $p<0,0332$, ** $p<0,0021$, *** $p<0,0002$, **** $p<0,0001$; n=6 untersuchte Wells/Plasmid. (C) Darstellung exemplarischer mikroskopischer Aufnahmen von hCMEC/D3-Zellen, die mit den fünf Plasmiden, die nachfolgend für die *in vivo* Versuche verwendet wurden, transfiziert wurden. Die Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden nach der Lipofektion für DAPI (blau) und immunzytochemisch für eGFP (grün) gefärbt. Maßstab 100 μm .

Ergänzend zu den in Abbildung 16 aufgeführten, untersuchten Promotersequenzen erfolgte eine Analyse der Promotersequenzen *Tbx3*, *Plvap* und *Poglut1*. Untersucht wurde hierbei eine Kombination der Promotersequenzen mit der genregulatorischen Sequenz des CMV-Enhancers sowie in Kombination mit den genregulatorischen Sequenzen des CMV-Enhancers und des kurzen Introns des *Tie2*-Gens. Synthetische Promotersequenzen, die das Woodchuck-Element beinhalteten wurden nicht untersucht. Grundlage hierfür war, die eingeschränkte Eignung der Sequenzen für die Anwendung *in vivo*.

Diese Einschätzung basierte insb. auf den in Abschnitt 2.4 dargestellten Analysen: Während unter Regulation des *Plvap*-Promoters eine Genexpression insb. auch in

Neuronen und Interneuronen nachgewiesen wurde, wurde unter Regulation des *Poglut1*-Promoters ebenfalls eine Genexpression von Reportergenen in Oligodendrozyten und Neuronen nachgewiesen. Unter Regulation des Promoters *Tbx3* wurde neben einer Genexpression in Gehirndothelzellen auch eine Expression in muralen Zellen, also folglich den die Mikrovaskulatur begleitenden Perizyten und Zellen der glatten Muskulatur, gezeigt (119). Somit war auf Grundlage dieser Untersuchungen *in vivo* keine spezifische Expression in Gehirndothelzellen bei Verwendung der Promotoren *Tbx3*, *Plvap* und *Poglut1* zu erwarten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen *in vitro* für die oben beschriebenen synthetischen Promotersequenzen nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 sind in Abbildung 17 dargestellt.

Nach Lipofektion der Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 mit den Plasmiden p-C-*Tbx3*-eGFP, p-C-*Tbx3*-S-eGFP, p-C-*Plvap*-eGFP, p-C-*Plvap*-S-eGFP, p-C-*Poglut1*-eGFP und p-C-*Poglut1*-S-eGFP konnte in max. 2,8% der Zellen eine Expression von eGFP nachgewiesen werden. Somit führten die Plasmide, die eGFP im Kontext des *Tbx3*-, *Plvap*- und *Poglut1*-Promoters exprimierten, im Vergleich zu der transkriptionellen Aktivierung durch die für die in Abbildung 16 dargestellten Untersuchungen verwendeten Plasmide zu einer geringen transkriptionellen Aktivierung und einer geringen Rate eGFP-pos. Zellen.

Bei auf Grundlage der aufgeführten Daten zu erwartender unspezifischer Expression unter Regulation der Promotersequenzen *in vivo* sowie bei *in vitro* in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 geringer nachgewiesener transkriptioneller Aktivierung erfolgte keine weitere Analyse der Promotersequenzen unter Kombination der Promotoren C-*Tbx3*, C-*Tbx3*-S, C-*Plvap*, C-*Plvap*-S, C-*Poglut1* und C-*Poglut1*-S mit dem Woodchuck-Element.

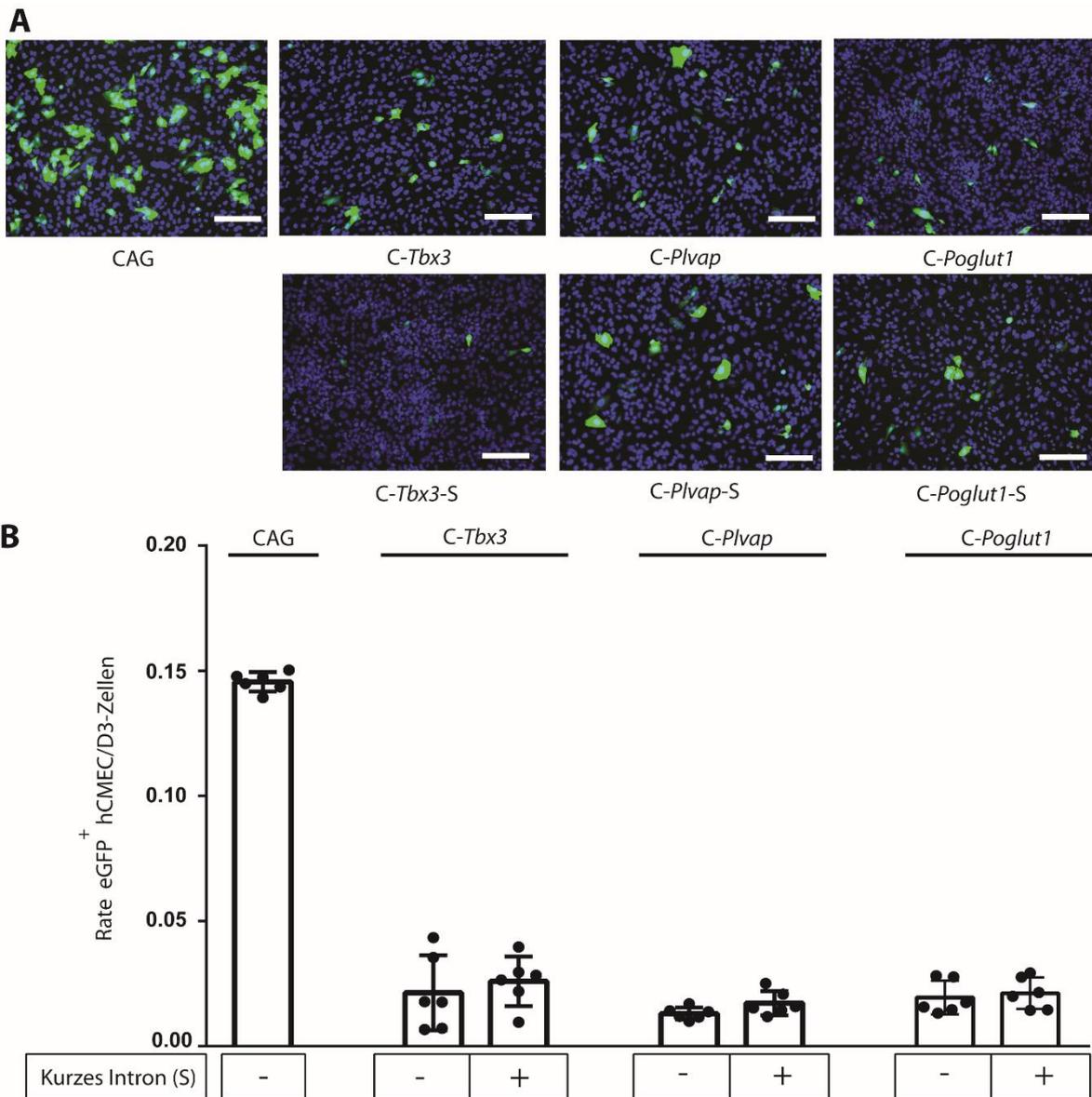


Abb. 17: Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der verwendeten synthetischen Promotersequenzen im Kontext des *Tbx3*-, *Plvap*- und des *Poglut1*-Promoters *in vitro* nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3. (A) Darstellung exemplarischer mikroskopischer Aufnahmen von hCMEC/D3-Zellen, die mit den sieben Plasmiden p-CAG-eGFP, p-C-*Tbx3*-eGFP, p-C-*Tbx3*-S-eGFP, p-C-*Plvap*-eGFP, p-C-*Plvap*-S-eGFP, p-C-*Poglut1*-eGFP, p-C-*Poglut1*-S-eGFP transfiziert wurden. Fünf Tage nach der Lipofektion erfolgte eine immunzytochemische Färbung der Zellen für eGFP (grün), das unter Regulation der synthetischen Promotersequenzen exprimierte Reportergen, sowie mittels DAPI für doppelsträngige DNA (blau) zur Markierung aller Nuclei. Maßstab 100 μ m. (B) Verhältnis der Expression von eGFP-pos. Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 zu den gefärbten Nuclei pro Gesichtsfeld in Abhängigkeit der bei der Lipofektion verwendeten synthetischen Promotersequenzen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.2.4 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität synthetischer Promotersequenzen *in vitro* in aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten

Zur weiterführenden Untersuchung der in den Abschnitten 5.2.2 sowie 5.2.3 identifizierten synthetischen Promotersequenzen, die in Versuchen an primären Maus- und Schweingehirnendothelzellen und Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität besaßen, erfolgte eine Untersuchung der Genexpression des Reportergens *in vitro* in aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten.

Die Astrozyten wurden, wie im Abschnitt 4.2.4 beschrieben, isoliert und 21 Tage unter regelmäßigem Wechseln des Kulturmediums in 24-Well-Platten kultiviert. 22 Tage nach der Isolation der Astrozyten erfolgte die Transfektion mittels Lipofektion mit Plasmiden, die unter der Kontrolle verschiedener synthetischer Promotersequenzen eGFP exprimieren. Am 4. Tag nach der Lipofektion erfolgte die Analyse der Expression von eGFP mittels Färbung aller Nuclei mit DAPI (blau) sowie mittels immunzytochemischer Färbung für eGFP (grün). Zum Vergleich wurden Plasmide verwendet, die eGFP unter Kontrolle der Promotoren CAG sowie T81 exprimieren. Für die Untersuchung in Astrozyten wurden neben den die Kontrollpromotoren beinhaltenden Plasmide Plasmide ausgewählt, die den *Cdh*-, *Ocln*, *Slca1c1*- und *Slco1c1*-Promoter in Kombination mit den kurzen genregulatorischen Sequenzelementen beinhalten. Diese Auswahl liegt darin begründet, dass durch die in den Abschnitten 5.2.2 und 5.2.3 mittels Two-Way ANOVA sowie Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführten Analysen der Stärke der transkriptionellen Aktivität im Kontext der verschiedenen Promotersequenzen die stärkste transkriptionelle Aktivität nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 für die Promotoren *Tie2*, *Cdh*, *Ocln*, *Slc2a1*, *Slco1c1* nachgewiesen wurde.

Synthetische Promotersequenzen, die den *Tie2*-Promoter beinhalten, wurden für diese sowie für die nachfolgende Untersuchung *in vivo* ausgeschlossen, da verschiedene Untersuchungen nachwiesen, dass es sich bei dem *Tie2*-Promoter um einen Promoter handelt, der zu einer panendothelialen Genexpression führt. Erste Untersuchungen bezüglich der zellspezifischen Genexpression unter Regulation des *Tie2*-Promoters wurden im Rahmen der Generierung transgener Mauslinien durchgeführt (175). Die Verwendung von Mäusen der transgenen Mauslinie *Tie2-Cre* ermöglicht eine panendotheliale Genexpression während der Embryogenese aber auch in adulten Tieren.

In den nachfolgenden Jahren nach Etablierung der Mauslinie *Tie2-Cre* untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Expression von Reportergenen im Rahmen vektorbasierter Systeme. Diese Untersuchungen erfolgten in Lentiviren sowie in Adenoviren (94, 97, 104). Auch im Rahmen dieser Untersuchungen war eine panendotheliale Expression der vektorkodierten Transgene zu beobachten. Ergänzend zu diesen Untersuchungen erfolgten insb. in den letzten Jahren Einzelzell-Genexpressionsprofil-Analysen des Transkriptom von Endothelzellen verschiedener Körperregionen. In diesen Untersuchungen ließ sich in zahlreichen Endothelzellsubpopulationen eine signifikante Expression des *Tie2*-Gens nachweisen (176, 177). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten jedoch auch einzelne Endothelzellsubpopulationen identifiziert werden, in denen es zu keiner signifikanten Expression des *Tie2*-Gens kommt. Hierzu zählen z.B. die Kapillaren der renalen Glomeruli. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe um Daneman im Rahmen ihrer Transkriptomanalyse von Endothelzellen der Lunge, der Leber und des Gehirns nachweisen, dass es in allen Zellgruppen zu einer ähnlichen Expression des *Tie2*-Gens kommt (91).

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch Frau Jacqueline Bannach und Herrn Dr. Godwin Dogbevia eine Untersuchung der Reportergenexpression *in vivo* in Mäusen nach Injektion eines Adeno-assoziierten Virus vom Serotyp AAV-BR1, der eGFP unter Regulation der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Promotersequenz *Tie2* exprimiert, durchgeführt. Im Rahmen dieser Vorarbeit zeigte sich nur eine geringe cerebrale Expression von eGFP, nachdem Mäusen der Mauslinie C57BL/6 im Alter von 30 Tagen $1,8 \times 10^{11}$ gp/Maus des Vektors AAV-BR1-*Tie2*-eGFP-W injiziert wurden. Eine Untersuchung der Expression des Reportergens eGFP unter Regulation des *Tie2*-Promoters in extracerebralen Geweben nach Injektion des Vektors AAV-BR1-*Tie2*-eGFP-W erfolgte nicht.

In den in der Abbildung 18B abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen der aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten ist zu erkennen, dass es nach Lipofektion mit dem Plasmid p-CAG-eGFP zu einer stärkeren transkriptionellen Aktivierung und somit zu einer vermehrten eGFP-Expression im Vergleich zur transkriptionellen Aktivierung und eGFP-Expression nach Lipofektion mit dem

Kontrollplasmid p-T81-eGFP kommt. Nach Lipofektion der Astrozyten mit Vergleichsplasmiden, die eGFP unter Regulation der verschiedenen Promotersequenzen exprimieren, kam es bei Kombination des T81-Promoters mit dem CMV-Enhancer zu einer deutlichen Zunahme der Rate eGFP-exprimierender Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen nach Lipofektion mit einem Plasmid, das ausschließlich den T81-Promoter ohne zusätzlich kurze genregulatorische Sequenzen als Promotersequenz enthält.

Die Analyse der immunzytochemischen Ergebnisse nach Lipofektion der primären Astrozyten erfolgte für die Konstrukte, die den *Ocln*-, *Slc2a1*- und *Slco1c1*-Promoter enthalten, mittels Grubbs-Ausreißertests. Anschließend erfolgte eine Testung der immunzytochemischen Ergebnisse auf eine parametrische Verteilung der Daten. Bei Nachweis einer parametrischen Verteilung der Daten erfolgte eine weiterführende Analyse mittels Two-Way ANOVA. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Hinzufügen des Woodchuck-Elements zu den synthetischen Promotersequenzen die eGFP-Expression in Astrozyten signifikant erhöhte. Darüber hinaus reduzierte das Hinzufügen der Sequenz des kurzen Introns zur synthetischen Promotersequenz die eGFP-Expression in primären Astrozyten signifikant. Die Daten in der Abbildung 18C sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse des Two-Way ANOVAs mit nachfolgender Post-hoc-Analyse mittels Tukey's Multiple Comparison Test dargestellt. Kurze regulatorische Genelemente, $F(3/84)=83,29$, $p<0,0001$; Promoter $F(2/84)=116,8$, $p<0,0001$; Interaktion $F(6/84)=39,06$, $p<0,0001$; (Tukey's Multiple Comparison Test, $n=8$ analysierte Bilder pro Plasmid).

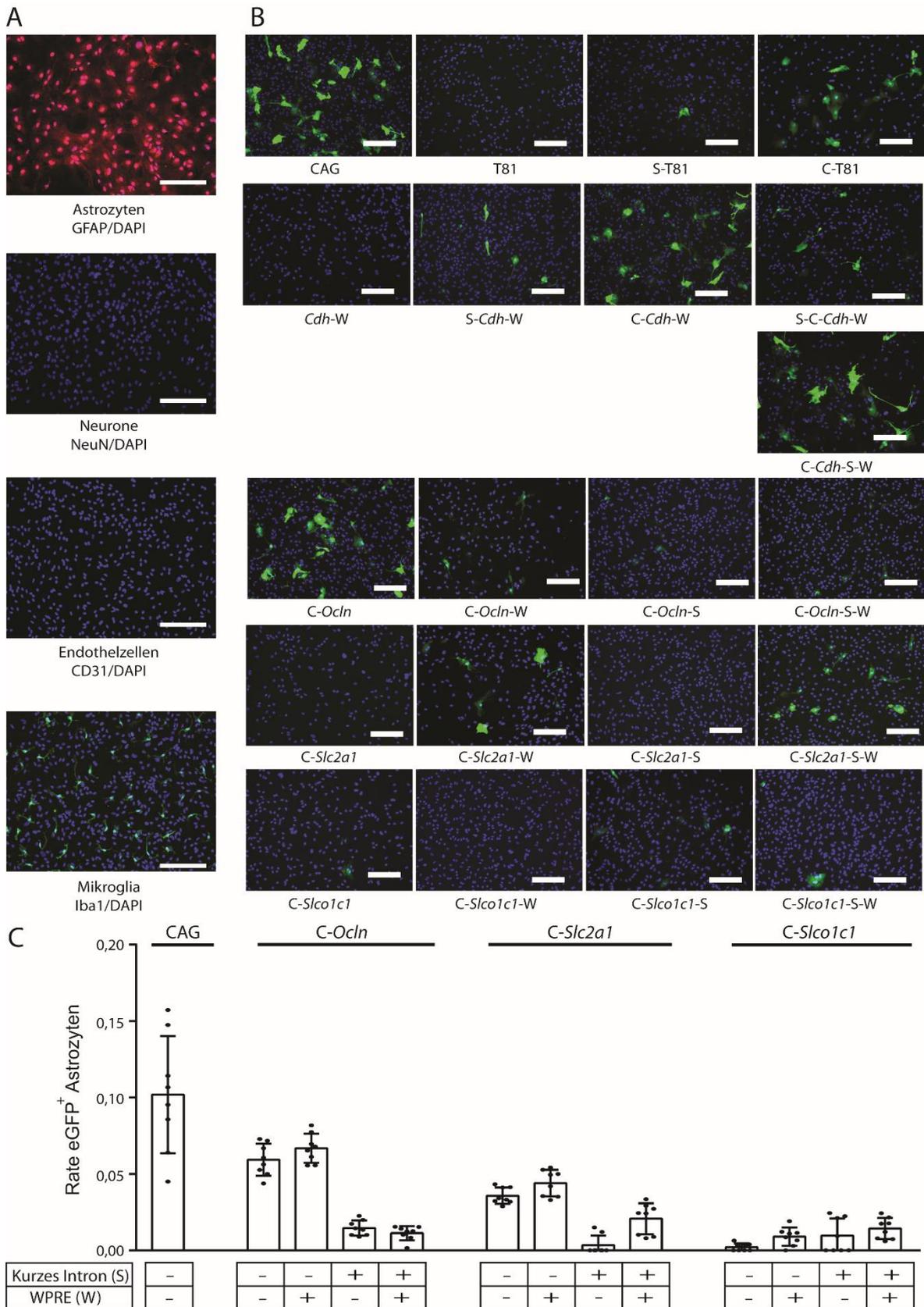


Abb. 18: Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von eGFP nach Lipofektion von aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten. Die primären corticalen Astrozyten wurden isoliert und 21 Tage in 24-Well-Platten kultiviert. (A) Färbung der isolierten corticalen Astrozyten für GFAP (rot) sowie Anfärbung der Nuclei mittels DAPI (blau) zur Bestimmung der

Reinheit der Kultur: 96% der kultivierten Zellen waren positiv für GFAP. Ergänzend erfolgte kein Nachweis von Endothelzellen bei immunzytochemischer Färbung für den Marker CD31 oder Neuronen bei immunzytochemischer Färbung für den Marker NeuN. Es erfolgte der immunzytochemische Nachweis von Iba1 als Marker für Mikroglia in ca. 4% der Zellen. (B) 22 Tage nach der Kultivierung erfolgte die Transfektion der Astrozyten mittels Lipofektion mit Plasmiden, die unter der Kontrolle verschiedener synthetischer Promotersequenzen eGFP exprimieren. Zum Vergleich wurde der Promotor CAG verwendet. Am 4. Tag nach der Lipofektion erfolgte die Analyse der Expression von eGFP mittels Färbung aller Nuclei mit DAPI (blau) sowie mittels Färbung für eGFP (grün). Maßstab 100 µm. (C) Die dargestellten Daten zeigen das Verhältnis von eGFP-positiven corticalen Astrozyten und der Gesamtzahl der Astrozyten. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

	Mittelwert 1	Mittelwert 2	Differenz	Signifikanz
C-P vs. C-P-W	0.03238	0.03993	-0.007546	**
C-P vs. C-P-S	0.03238	0.009228	0.02315	****
C-P vs. C-P-S-W	0.03238	0.01542	0.01696	****
C-P-W vs. C-P-S	0.03993	0.009228	0.307	****
C-P-W vs. C-P-S-W	0.03993	0.01542	0.02451	****
C-P-S vs. C-P-S-W	0.009228	0.01542	-0.006188	*

Tab. 14: Analyse der in Abbildung 18 dargestellten Daten mittels Two-Way ANOVA. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Hinzufügen des Woodchuck-Elements zu den synthetischen Promotersequenzen die eGFP-Expression in Astrozyten signifikant erhöhte (Daten grau hinterlegt). Darüber hinaus reduzierte das Hinzufügen der Sequenz des kurzen Introns zur synthetischen Promotersequenz die eGFP-Expression in primären Astrozyten signifikant (Daten blau hinterlegt). Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test; kurze regulatorische Genelemente, $F(3/84)=83,29$, $p<0,0001$; Promoter $F(2/84)=116,8$, $p<0,0001$; Interaktion $F(6/84)=39,06$, $p<0,0001$; ns: nicht signifikant, * $p<0,0332$, ** $p<0,0021$, **** $p<0,0001$; n=8 analysierte Bilder pro Plasmid.

5.2.5 Untersuchung der cerebralen Genexpression *in vivo* nach Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation verschiedener synthetischer Promoterkonstrukte exprimieren

Auf Grundlage der in den Abschnitten 5.2.2, 5.2.3 und 5.2.4 dargestellten Ergebnisse wurden vier der insgesamt 53 untersuchten synthetischen Promotersequenzen für die

Untersuchung der vektorbasierten gehirndothelzellspezifischen Genexpression in cerebralen und extracerebralen Geweben *in vivo* ausgewählt.

Im Abschnitt 5.2.2 konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der nativen Promotersequenzen *Tie2-W* und *Cdh-W* mit kurzen genregulatorischen Sequenzen des kurzen Introns und des CMV-Enhancers zu einer Erhöhung der Expression der Reportergene eGFP und Firefly-Luciferase führte. Eine weiterführende Untersuchung der verschiedenen nativen Promotersequenzen im Abschnitt 5.2.3, die mit dem kurzen Intron, dem CMV-Enhancer und dem Woodchuck-Element kombiniert wurden, ergab dass die Promotoren *Cdh*, *Ocln*, *Slc2a1* und *Slco1c1* zu der stärksten transkriptionellen Aktivierung nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 führten. Aufgrund der unter dem Punkt 5.2.4 aufgeführten Aspekte, die eine panendotheliale Genexpression unter Regulation des *Tie2*-Promoters nahelegen, wurde der *Tie2*-Promoter für die geplante *in vivo* Untersuchung ausgeschlossen. Neben der starken transkriptionellen Aktivierung im Kontext des *Cdh*-, *Ocln*-, *Slc2a1*- und *Slco1c1*-Promoters nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 ist im Abschnitt 5.2.3. dargelegt, dass bei gleichem Versuchsaufbau die Kombination des Woodchuck-Elements mit dem CMV-Enhancer und der Promotersequenz bzw. dem CMV-Enhancer, dem kurzen Intron und der Promotersequenz zu einer signifikanten Erhöhung der transkriptionellen Aktivierung führte. Darüber hinaus konnte durch Hinzufügen des kurzen Introns eine signifikante Steigerung der transkriptionellen Aktivierung in hCMEC/D3-Zellen für die Plasmide p-C-*Slc2a1*-S-eGFP, p-C-*Slc2a1*-eGFP-S-W und p-C-*Ocln*-S-eGFP im Vergleich zu den Plasmiden ohne kurzes Intron erzielt werden. Im Abschnitt 5.2.4 wurde in Untersuchungen der Promotoren *Ocln*, *Slc2a1* und *Slco1c1* nachgewiesen, dass ein Hinzufügen des kurzen Introns zur Promotersequenz die Reportergenexpression nach Lipofektion von Astrozyten reduziert, während das Hinzufügen des Woodchuck-Elements zur Promotersequenz die Reportergenexpression nach Lipofektion von Astrozyten erhöht.

Auf Grundlage dieser Voruntersuchungen wählten wir für die Untersuchungen *in vivo* vier synthetische Promotersequenzen aus, die jeweils aus dem *Cdh*-, *Ocln*-, *Slc2a1*- oder *Slco1c1*-Promoter in Kombination mit kurzen genregulatorischen Elementen zusammengesetzt waren.

Für die Auswahl der *in vivo* zu untersuchenden Promotersequenz, die auf der nativen Promotersequenz des *Cdh*-Promoters basierte, erfolgte ein Vergleich der transkriptionellen Aktivierung, die nach Lipofektion von hCMEC/D3-Zellen mit Plasmiden erzielt werden konnte, die eGFP unter Regulation des *Cdh*-Promoters in Kombination mit verschiedenen kurzen regulatorischen Genelementen exprimierten. Bei Vergleich der Rate eGFP-pos. Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 nach Lipofektion mit den Plasmiden p-*Cdh*-eGFP-W, p-S-*Cdh*-eGFP-W, p-C-*Cdh*-eGFP-W, p-S-C-*Cdh*-eGFP-W, p-C-*Cdh*-eGFP, p-C-*Cdh*-S-eGFP und p-C-*Cdh*-S-eGFP-W ergab sich die höchste Rate eGFP-pos. Zellen nach Lipofektion der Zellen mit den Plasmiden p-S-C-*Cdh*-eGFP-W und p-C-*Cdh*-S-eGFP-W. Eine Analyse der Daten mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test ergab eine signifikant höhere Rate eGFP-pos. Zellen nach Lipofektion mit dem Plasmid p-S-C-*Cdh*-eGFP-W verglichen mit dem Plasmid p-C-*Cdh*-S-eGFP-W ($F(6/35)=77,33$, $p<0,0001$; **** $p<0,0001$; $n=6$ Wells/Plasmid). Somit wurde die Promotersequenz S-C-*Cdh*-W für die Untersuchung der Gehirndothelzellspezifität *in vivo* ausgewählt.

Für die Auswahl der *in vivo* zu untersuchenden Promotersequenz, die auf der nativen Promotersequenz des *Ocln*-Promoters basierte, erfolgte ein Vergleich der transkriptionellen Aktivierung, die nach Lipofektion von hCMEC/D3-Zellen mit Plasmiden erzielt werden konnte, die eGFP unter Regulation des *Ocln*-Promoters in Kombination mit verschiedenen kurzen regulatorischen Genelementen exprimierten. In Abbildung 16A ist zu erkennen, dass sich nach Analyse der Rate eGFP-pos. hCMEC/D3-Zellen mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test keine signifikante Steigerung der transkriptionellen Aktivität im Kontext des *Ocln*-Promoters durch Hinzufügen der Sequenz des kurzen Introns zur Promotersequenz ergab. Wir wählten daher für die Untersuchung der Gehirndothelzellspezifität *in vivo* die Promotersequenz C-*Ocln*-W aus.

Ebenso erfolgte die Auswahl der *in vivo* zu untersuchenden Promotersequenz, die auf der nativen Promotersequenz des *Slc2a1*-Promoters basierte, auf Grundlage der in Abbildung 16 dargestellten Daten. Wie im Abschnitt 5.2.3 aufgeführt und in Abbildung 16 zu erkennen ist, ergab sich nach Analyse der Rate eGFP-positiver hCMEC/D3-Zellen mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test eine signifikant

stärkere Expression von eGFP in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3, die eGFP unter Regulation einer Promotersequenz exprimierten, die als Komponente das kurze Intron des *Tie2*-Gens beinhaltete. Auf Grundlage der aufgeführten Ergebnisse wählten wir für die Untersuchung der Gehirndothelzellspezifität *in vivo* die Promotersequenz C-*Slc2a1*-S-W aus.

Abschließend erfolgte die Auswahl der *in vivo* zu untersuchenden Promotersequenz, die auf der nativen Promotersequenz des *Slco1c1*-Promoters basierte. Auch hier berücksichtigten wir die im Abschnitt 5.2.3 aufgeführten sowie in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse. Im Kontext des *Slco1c1*-Promoters ließ sich eine signifikante Steigerung der Rate eGFP-pos. Zellen nach Analyse mittels One-Way ANOVAs und Tukey's Multiple Comparison Test durch Hinzufügen des Woodchuck-Elements zur Promotersequenz C-*Slco1c1* erzielen. Durch zusätzliches Hinzufügen des kurzen Introns des *Tie2*-Gens konnte keine signifikante Steigerung der transkriptionellen Aktivität nach Lipofektion der hCMEC/D3-Zellen erzielt werden. Daher wählten wir für die Untersuchung der Gehirndothelzellspezifität *in vivo* die Promotersequenz C-*Slco1c1*-W aus.

Zusammenfassend untersuchten wir somit *in vivo* die cerebrale und extracerebrale eGFP-Expression nach intravenöser Applikation der folgenden Vektoren: AAV-BR1-S-C-*Cdh*-eGFP-W, AAV-BR1-C-*Ocln*-eGFP-W, AAV-BR1-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W und AAV-BR1-C-*Slco1c1*-eGFP-W. Zum Vergleich wurde der Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-eGFP verwendet (Abb. 19A).

Die Generierung der rekombinanten Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp AAV-BR1 erfolgte wie in den Abschnitten 4.2.7 und 4.2.8 beschrieben mittels Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen und anschließender Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Die Bestimmung der Konzentrationen der aufgereinigten Vektoren erfolgte mittels qPCR. Zur Untersuchung der vektorkodierten cerebralen Expression des Reportergens eGFP unter Regulation der verschiedenen synthetischen Promotersequenzen wurden die Vektoren (Dosis: $1,8 \times 10^{11}$ genomische Partikel/Maus) C57BL/6-Mäusen in einem Alter von 28-31 Tagen in die Schwanzvene injiziert. Die Entnahme der Gehirne erfolgte 14 Tage post injectionem. Die Gehirne wurden für sechs Stunden in PFA und anschließend in PBS gelagert. Zur histologischen Analyse der eGFP-Expression unter Kontrolle der verschiedenen synthetischen Promotersequenzen wurden

am Vibratom Sagittalschnitte der Gehirne angefertigt. Diese Schnitte wurden anschließend für CD31 (rot), eGFP (grün) und Nuclei (blau) gefärbt. Die Ergebnisse der histologischen Analysen sind exemplarisch für die Gehirnregionen Cortex, Cerebellum und Hippocampus in Abbildung 19B dargestellt.

Zu erkennen ist, dass es, wie auch bereits in der Einleitung beschrieben, unter Regulation des CAG-Promoters zu einer vektorkodierten Expression von eGFP in Astrozyten und Neuronen kommt. Unter Verwendung der synthetischen Promoterkonstrukte kann eine Erhöhung der Endothelzellspezifität erreicht werden. Zu einer vektorkodierten Genexpression von eGFP in Astrozyten und Neuronen kommt es jedoch in geringerem Umfang weiterhin. Eine Erhöhung der Spezifität für die mit CD31-markierten Gehirndothelzellen konnte insbesondere für den Vektoren AAV-BR1-S-C-*Cdh*-eGFP-W und für den Vektor AAV-BR1-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W nachgewiesen werden. Bei Vergleich der beiden Vektoren zeigte sich bei Verwendung des Vektors AAV-BR1-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W jedoch eine ausgeprägtere eGFP-Expression der Gehirndothelzellen. Bei Mäusen, die den Vektor AAV-BR1-S-C-*Cdh*-eGFP-W erhielten, zeigte sich eine ausgeprägtere eGFP-Expression in den nicht-endothelialen Zellen.

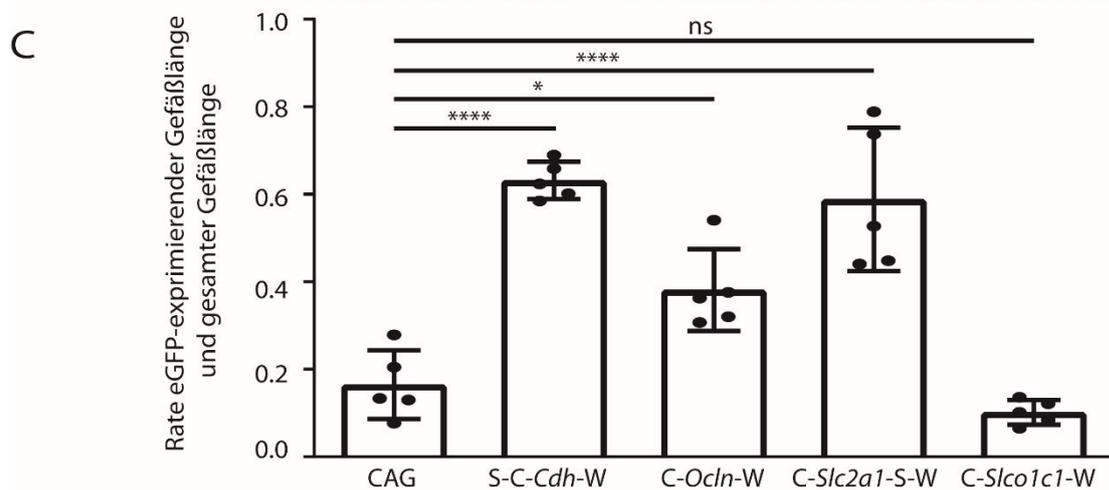
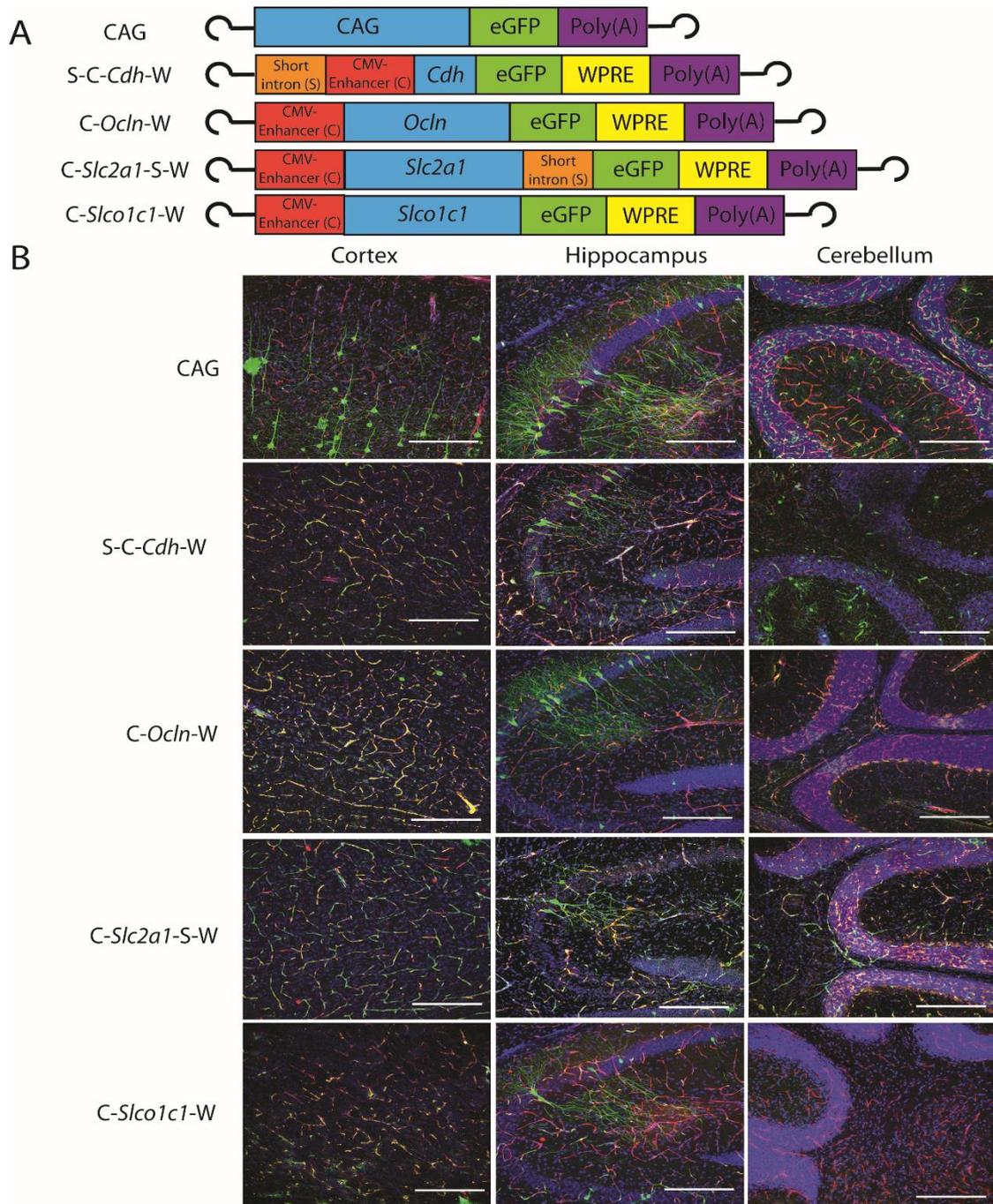


Abb. 19: Der Einsatz synthetischer Promotorsequenzen im Sinne des „Transcriptional Targeting“ erhöht die Spezifität des Vektors AAV-BR1 für die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke *in vivo*. (A) Schematische Darstellung der untersuchten Vektoren. Das Reportergen eGFP wird unter Kontrolle der synthetischen Promotersequenzen exprimiert. Untersuchte synthetische Promotorsequenzen sind *S-C-Cdh-W*, *C-Ocln-W*, *C-Slc2a1-S-W* und *C-Slco1c1-W*. Die Promotorsequenz CAG diente als Kontrollpromotor. (B) Diese Vektoren, die eGFP unter der Regulierung der aufgelisteten synthetischen Promotorsequenzen exprimieren, wurden im Alter von P28-31 in die Schwanzvene von Mäusen injiziert (Dosis: $1,8 \times 10^{11}$ genomische Partikel/Maus). Vierzehn Tage nach der Vektorinjektion wurden die Gehirne der Mäuse entnommen. Anschließend erfolgte eine Fluoreszenzfärbung für doppelsträngige DNA mittels DAPI sowie eine immunhistochemische Anfärbung des vektorexprimierten eGFPs (grün) sowie von CD31 (rot) als Marker für Endothelzellen. Repräsentative Bilder des Cortex, Hippocampus und Cerebellums der Mäuse werden präsentiert. Maßstab 100 μ m. (C) Diese mikroskopischen Bilder wurden analysiert: Das Verhältnis der Länge der Gefäße, die das vektorkodierte eGFP exprimieren, und der Gesamtgefäßlänge wurde bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Daten mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test (Vektor, $F(4/20)=29,86$, $p < 0,0001$; ns: nicht signifikant, $*p < 0,0332$, $****p < 0,0001$; $n=5$ Bilder pro Vektor). CAG ($n=4$), *S-C-Cdh-W* ($n=6$), *C-Ocln-W* ($n=2$), *C-Slc2a1-S-W* ($n=9$), *C-Slco1c1-W* ($n=6$). Maßstab 100 μ m.

5.2.6 Untersuchung der extracerebralen Genexpression *in vivo* nach Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation verschiedener synthetischer Promoterkonstrukte exprimieren

Ergänzend zu den unter dem Abschnitt 5.2.5 dargestellten Ergebnissen erfolgte eine Untersuchung der extracerebralen Genexpression *in vivo* nach Injektion von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp AAV-BR1, die eGFP unter der Regulation verschiedener synthetischer Promoterkonstrukte exprimieren (Abb. 20).

Nach Injektion des Vektors AAV-BR1-CAG-eGFP (kurz CAG), der eGFP unter der Regulation des Promoters CAG exprimiert, konnte neben der Genexpression in Gehirndothelzellen, Astrozyten und Neuronen mittels immunhistochemischer Färbungen eine eGFP-Expression in Zellen der Leber, Lunge und des Herzens nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich eGFP-positive Zellen in der Milz. In der Niere war kein eGFP-Signal nachweisbar.

Nach Injektion des Vektors AAV-BR1-*S-C-Cdh*-eGFP-W (kurz *S-C-Cdh-W*), der eGFP unter der Regulation der synthetischen Promotersequenz *S-C-Cdh-W* exprimiert, konnte cerebral eine Genexpression von eGFP in den Gehirndothelzellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach Injektion des Vektors AAV-BR1-CAG-eGFP

konnte durch Verwendung der synthetischen Promotersequenz *S-C-Cdh-W* eine Reduktion der Genexpression von eGFP in Astrozyten und Neuronen erzielt werden. In Zellen der Lunge konnte jedoch nach Injektion des Vektors AAV-BR1-S-C-Cdh-eGFP-W weiterhin eine vektorkodierte Expression von eGFP nachgewiesen werden. Eine geringe vektorkodierte Expression von eGFP konnte zudem in Zellen des Herzens sowie der Milz nachgewiesen werden. In Zellen der Leber und der Niere war in den durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen nur eine sehr geringe bzw. keine vektorkodierte Expression von eGFP nachweisbar.

Nach Injektion des Vektors AAV-BR1-C-Ocln-eGFP-W (kurz *C-Ocln-W*), der eGFP unter der Regulation der synthetischen Promotersequenz *C-Ocln-W* exprimiert, konnte cerebral eine mäßige Genexpression von eGFP in den Gehirndothelzellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach Injektion des Vektors AAV-BR1-CAG-eGFP konnte durch Verwendung der synthetischen Promotersequenz *C-Ocln-W* eine Reduktion der Genexpression von eGFP in Astrozyten und Neuronen erzielt werden. In Zellen der Lunge konnte nach Injektion des Vektors AAV-BR1-C-Ocln-eGFP-W eine ausgeprägte vektorkodierte Expression von eGFP nachgewiesen werden. Eine geringe vektorkodierte Expression von eGFP konnte zudem in Zellen der Leber und der Milz nachgewiesen werden. In Zellen des Herzens und der Niere war keine vektorkodierte Expression von eGFP nachweisbar.

Nach Injektion des Vektors AAV-BR1-C-Slc2a1-S-eGFP-W (kurz *C-Slc2a1-S-W*), der eGFP unter Kontrolle der synthetischen Promotersequenz *C-Slc2a1-S-W* exprimiert, konnte cerebral eine hohe Spezifität für die Expression von eGFP in Gehirndothelzellen erzielt werden. Die Expression von eGFP konnte nur in geringem Ausmaß auch in Astrozyten und in Neuronen des Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden. In extracerebralen Organen konnte eine im Vergleich zu der Expression nach Injektion des Vektors AAV-BR1-CAG-eGFP geringere Expression von eGFP nachgewiesen werden. Es war jedoch weiterhin eine Expression von eGFP in Zellen der Leber, der Lunge, des Herzens sowie der Milz nachweisbar. In Zellen der Nieren war keine Expression von eGFP mittels immunhistochemischer Methoden zu detektieren.

Nach Injektion des Vektors AAV-BR1-C-Slco1c1-eGFP-W (kurz *C-Slco1c1-W*), der eGFP unter Kontrolle der synthetischen Promotersequenz *C-Slco1c1-W* exprimiert, wurde in

den Gehirnendothelzellen nach Anfertigung immunhistochemischer Färbungen nur eine spärliche Expression von eGFP nachgewiesen. Zudem war im Gehirn eine geringgradige Expression von eGFP in Neuronen und Astrozyten nachweisbar. In Zellen der Leber, der Lunge, des Herzens und der Nieren war keine Expression von eGFP nachweisbar. In der Milz zeigte sich in geringem Ausmaß das Vorliegen eGFP-exprimierender Zellen.

In Zusammenschau der Befunde konnte nach Injektion verschiedener Vektoren, die eGFP unter Kontrolle verschiedener Promotersequenzen exprimieren, in Form der Vektoren AAV-BR1-S-C*Cdh*-eGFP-W und AAV-BR1-C-*Slc2a1*-S-eGFP Vektoren identifiziert werden, die zu einer Erhöhung der cerebralen Spezifität für die Gehirnendothelzellen verglichen mit dem Kontrollvektor AAV-BR1-CAG-eGFP führten. Dennoch war nach Injektion dieses Vektors weiterhin eine vektorkodierte eGFP-Expression in nicht-endothelialen cerebralen Zellen sowie in extracerebralen Organen und hierbei insb. in der Lunge und in der Milz nachweisbar.

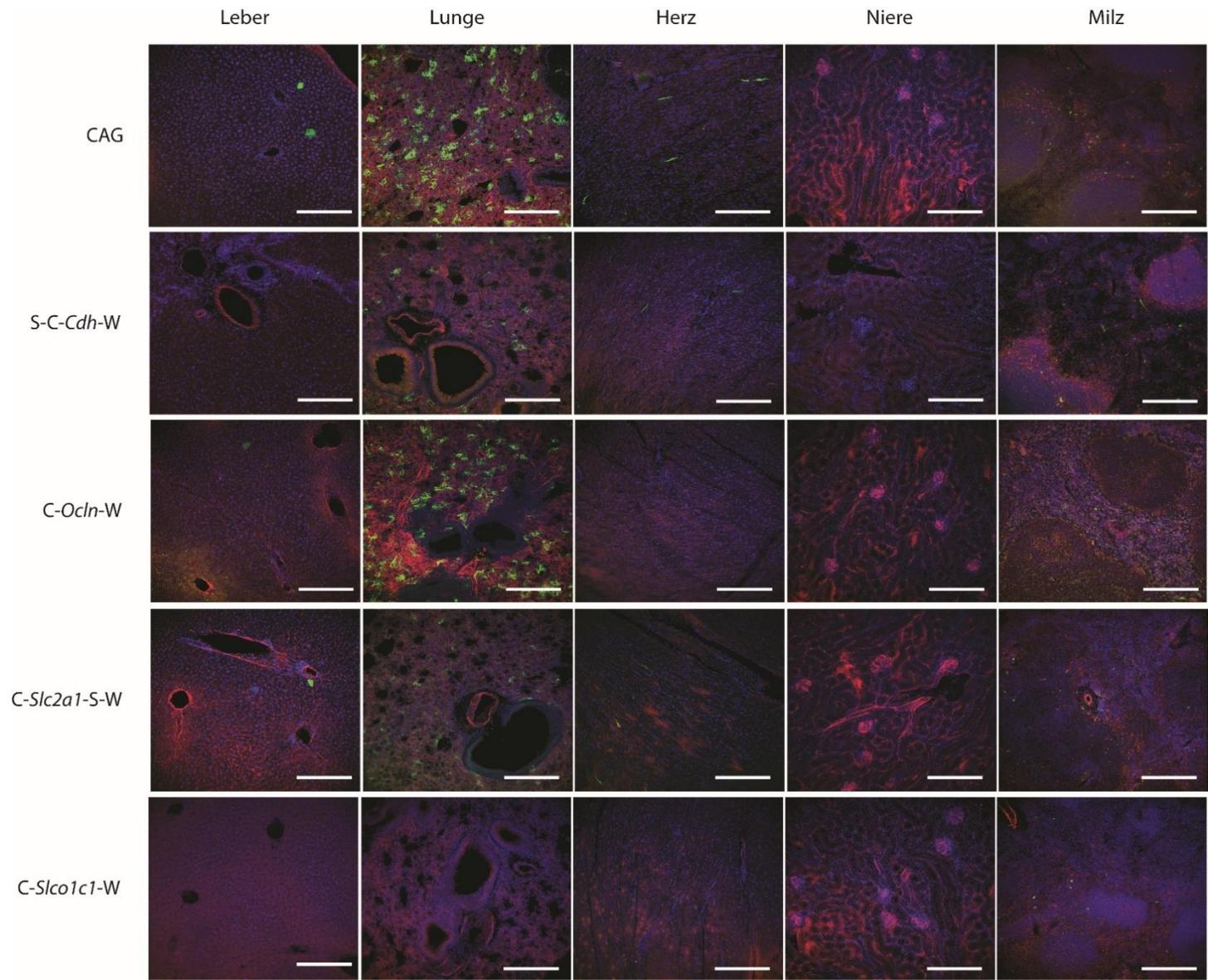


Abb. 20: Untersuchung der extracerebralen Genexpression *in vivo* nach intravenöser Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation der synthetischen Promoterkonstrukte *S-C-Cdh-W*, *C-Ocln-W*, *C-Slc2a1-S-W* und *C-Slco1c1-W* exprimieren. C57BL/6-Mäusen wurden Vektoren, die eGFP unter Kontrolle verschiedener Promotersequenzen exprimieren, in einem Alter von 28-31 Tagen intravenös injiziert (Dosis: $1,8 \times 10^{11}$ gp/Maus, Volumen: 150 μ m). Als Kontrollvektor wurde der Vektor AAV-BR1-CAG-eGFP injiziert. 14 Tage post injectionem erfolgte die Tötung und Organentnahme. Die Organe wurden gefärbt für Nuclei (blau) und immunzytochemisch für eGFP (grün) und CD31 (rot). Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Organe Leber, Lunge, Herz, Niere und Milz. CAG (n=4), *S-C-Cdh-W* (n=6), *C-Ocln-W* (n=2), *C-Slc2a1-S-W* (n=9), *C-Slco1c1-W* (n=6). Maßstab 100 μ m.

5.3 Sicherheitsprofil des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO

Zur Untersuchung des Langzeit-Sicherheitsprofils des Vektors AAV-BR1 wurde der Vektor AAV-BR1-CAG-NEMO verwendet. In vorherigen Versuchen wurde untersucht, ob der Vektor AAV-BR1-CAG-NEMO im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes eine Behandlungsoption zur Therapie der Modellerkrankung Incontinentia pigmenti bei *Nemo* knockout Mäusen (*Nemo*^{beKO}) eingesetzt werden kann. Bei der Erkrankung Incontinentia pigmenti handelt es sich um eine genetisch vererbte Erkrankung, die zu neurokutanen Symptomen insb. zu Entwicklung einer mentalen Retardierung sowie epileptischer Anfälle führt. Unter Behandlung mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-NEMO, der zur Expression des Gens *NEMO* in Gehirndothelzellen führt, konnte gezeigt werden, dass es nach Behandlung des Vektors zu einer Abnahme des Auftretens epileptischer Anfälle kommt (178).

Daher führten wir eine Untersuchung des Langzeit-Sicherheitsprofils des in den vorherigen Versuchen angewendeten Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO durch. Hierfür erhielten neonatale Wildtyp-Mäuse der Mauslinie C57BL/6 (n=15) eine Injektion mit dem Vektor AAV-BR1-CAG-NEMO (Dosis: $6,0 \times 10^{10}$ gp/Maus). Kontrollmäuse des gleichen Genotyps erhielten keine Vektoradministration (n=19). Die Vektorinjektionen bei den neonatalen Mäusen wurden von Dr. Godwin Dogbevia durchgeführt.

11 Monate nach der Vektorbehandlung wurden die Mäuse beider Versuchsgruppen getötet und die Organe der Mäuse, inkl. Leber, Nieren, Lunge, Herz und Milz, entnommen. Zunächst erfolgte eine makroskopische Untersuchung der Organe der Mäuse beider Versuchsgruppen. Hierbei ergaben sich keine Hinweise auf die Entwicklung von Tumoren in den Organen beider Versuchsgruppen. Ebenso fiel kein signifikanter Gewichtsunterschied der Organe der Versuchsgruppen auf. Die statistische Analyse der Gewichtsunterschiede der entnommenen und untersuchten Organe erfolgte zunächst mittels Grubbs-Ausreißertests. In diesem Test konnten keine Ausreißer identifiziert werden. Ein anschließender Vergleich der Gewichte der verschiedenen Organe erfolgte mittels Student's-T-Test. In dieser Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gewichts der verschiedenen Organe zwischen den zwei betrachteten Gruppen (ns: nicht signifikant, Student's-T-Test, Kontrollgruppe n=19, Vektor-behandelte Gruppe n=15). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Neben diesen makroskopischen Organuntersuchungen erfolgte zudem durch Herrn Dr. Dirk Ridder eine histologische Untersuchung der entnommenen Organe nach Anfertigung histopathologischer Schnitte sowie Färbung der Schnitte mittels H.E.-Färbung. Histologisch ergaben sich in Leber, Nieren, Lunge, Herz und Milz ebenfalls keine Hinweise auf die Entwicklung von Tumoren oder Fibrosen. Auffällig war jedoch, dass sich bei Vergleich der Gewebeschnitte der Leber in der Gruppe der Vektor-behandelten Mäuse vermehrt Lymphozyten- und Plasmazellaggregate zeigten. Darüber hinaus ergaben sich keine Hinweise auf die Entwicklung einer Hepatitis oder Leberzirrhose nach Vektorinjektion (178).

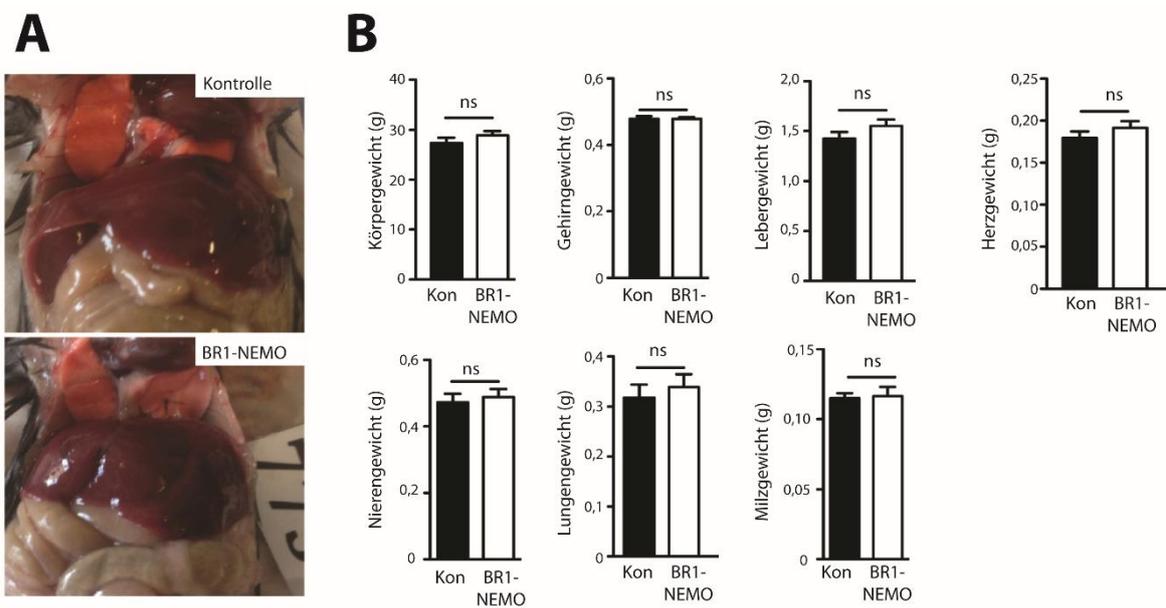


Abb. 21: Erhebung des Sicherheitsprofils des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO (kurz BR1-NEMO) elf Monate nach Vektoradministration in neonatalen C57BL/6-Mäusen. (A) Makroskopische Betrachtung der inneren Organe beider Versuchsgruppen. Makroskopisch ergibt sich kein Hinweis auf die Entwicklung von Tumoren oder Organfibrosen. (B) Körpergewicht und Gewicht verschiedener Organe der Mäuse beider Versuchsgruppen im Alter von elf Monaten: Es sind keine signifikanten Unterschiede im Gewicht der Mäuse und der Organe nachweisbar (ns: nicht signifikant, Student's-T-Test, (Kontrollgruppe n=19, Vektor-behandelte Gruppe n=15)).

6 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten sowie Komplikationen einer gentherapeutischen Anwendung eines gehirnendothelzellspezifischen Vektors zur Behandlung neurogenetischer Erkrankungen sowie Möglichkeiten der Optimierung der Gehirndothelezellspezifität des verwendeten Vektors AAV-BR1 untersucht.

Vorarbeiten von Herrn Dr. Jakob Körbelin sowie der Arbeitsgruppe um Prof. Markus Schwaninger konnten bereits zeigen, dass durch Modifikation des Kapsids des Adeno-assoziierten Virus vom Serotyp 2 eine Erhöhung der Vektorspezifität für Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke erzielt werden konnte. Begleitend kam es jedoch cerebral zusätzlich zu einer Expression des Vektorgenoms in Neuronen sowie in Astrozyten. Extracerebral konnte darüber hinaus eine Vektorexpression in der Lunge sowie eine deutlich reduzierte Vektorexpression in Zellen der Leber sowie des Herzens und der Milz nachgewiesen werden (1).

6.1 Entwicklung einer Gentherapie in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff

Die Untersuchung der möglichen Effekte, die unter Verwendung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren mit hoher Gehirndothelezellspezifität vom Serotyp AAV-BR1 erzielt werden können, erfolgte am Beispiel des Morbus Sandhoff. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Applikation des Vektors AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* eine Expression der humanen β -Hexosaminidase A und B in Gehirndothelezellen von Mäusen vom Genotyp *Hexb*^{-/-} erzielt werden kann (Abb. 8). Durch Expression der humanen β -Hexosaminidasen in Gehirndothelezellen der Mäuse vom Genotyp *Hexb*^{-/-} konnte die Akkumulation von Glycosphingolipiden verringert (Abb. 10) und das symptomfreie Überleben sowie die Lebensdauer der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} bis zu einem Alter von 300 Tagen signifikant verlängert werden (Abb. 9).

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Morbus Sandhoff gehört zu der Erkrankungsgruppe der Gangliosidosen, bei denen es durch Enzymdefizienzen zu der Akkumulation von Gangliosiden in Neuronen und Mikroglia kommt, was letztendlich über neuroinflammatorische Prozesse zu der Aktivierung neuronaler Apoptosemechanismen führt. Obwohl dieser pathophysiologische Ablauf der Erkrankung zunächst die

Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes nahelegt, bei der Neurone die Zielzellen des eingesetzten Vektorsystems darstellen, würde die Expression der β -Hexosaminidasen in Neuronen nicht die physiologische Situation reflektieren. Physiologisch werden die β -Hexosaminidasen nicht in den Neuronen, sondern hauptsächlich in extraneuronalen Zellen exprimiert. Die vektorkodierte Expression der β -Hexosaminidasen in Neuronen führte in Makaken zu der Entwicklung einer schweren Neurotoxizität mit histologischem Nachweis neuronalen Zelltods (49). Zudem konnte in einem Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose gezeigt werden, dass in Neuronen der Erkrankten - anders als in der physiologischen Situation - die β -Hexosaminidase B exprimiert wird (179). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Expression der β -Hexosaminidase B in Neuronen ein Zeichen einer pathologischen cerebralen Situation darstellt. Daher ahmt die Expression der β -Hexosaminidasen in Gehirndothelzellen die physiologische Situation nach. Hierdurch könnte folglich die Sicherheit des gentherapeutischen Ansatzes erhöht und die potenziellen Nebenwirkungen der Gentherapie mit Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp AAV-BR1 in Primaten und letztlich beim Menschen reduziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit verfolgten wir – anders als in zahlreichen anderen Arbeiten, bei denen die Vektoren stereotaktisch intracerebral injiziert wurden - die Methode der intravenösen Administration der Vektoren. Das Verfahren der intravenösen Administration der Vektoren reduziert das Risiko cerebraler Infektionen und cerebraler Schädigungen durch die stereotaktische Injektion. Darüber hinaus würde eine stereotaktische cerebrale Administration der Vektoren bei gentherapeutischer Behandlung von Menschen multiple Injektionsorte erfordern, um eine ausreichende Verteilung der Vektoren zu erzielen.

Durch Verwendung eines Vektorsystems, das zu einer hohen Spezifität der vektorkodierten Transgenexpression für Gehirndothelzellen führt, wird zudem das Risiko der Entwicklung systemischer Nebenwirkungen durch die Therapie reduziert. Für Adeno-assoziierte Viren wurde nachgewiesen, dass es nach Infektion von Zellen ohne begleitende Infektion mit einem Helfervirus, zu einer Insertion der DNA des Vektors in die DNA von Krebstreibergenen kommen kann. In diesem Zusammenhang konnte eine Assoziation zu der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome ohne Entwicklung einer Leberzirrhose nachgewiesen werden (28, 180, 181). Im Rahmen der durchgeführten und

in obigen Abschnitten dargestellten Überlebensstudien ergab sich in den histologischen Analysen der Organe kein offensichtlicher Hinweis auf die Entwicklung von Leber- und Lungentumoren.

Unter Verwendung des Vektors AAV-BR1, der die Gene der β -Hexosaminidasen nahezu spezifisch in Gehirndothelzellen exprimiert, konnte, wie oben dargestellt, eine signifikante Verlängerung des symptomfreien Überlebens sowie eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff nachgewiesen werden. Dabei ergab sich ein deutlicher Unterschied des Überlebens in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Vektoradministration. Eine Administration der Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHexA/B* zum Zeitpunkt P0/1 führte zu einem kürzeren Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} als eine Vektoradministration zum Zeitpunkt P31 (Abb. 9). Zwischen den Zeitpunkten P0/1 und P31 kommt es zu deutlichen Veränderungen des cerebralen Gefäßnetzes sowie zur Ausbildung und vermehrten Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke. Eine Untersuchung der Lebenszyklen der Vektoren zu den verschiedenen Zeitpunkten der Administration, die zu den aufgezeigten Unterschieden in der Überlebensspanne der Mäuse führt, könnte weitere Möglichkeiten zur Optimierung des Vektorsystems aufzeigen, wodurch das symptomfreie Überleben der Mäuse verbessert werden könnte. Ein Aspekt, der die Unterschiede bezüglich des symptomfreien Überlebens sowie der Überlebensspanne der vektorbehandelten Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} zwischen den beiden Injektionszeitpunkten erklären könnte, wäre, dass die DNA Adeno-assoziiierter Viren in Gehirndothelzellen hauptsächlich in Form von Episomen vorliegt und nur in geringstem Umfang in die DNA der Gehirndothelzellen inseriert wird. Episomen werden bei Zellteilungen nicht vervielfältigt. Da es zwischen P0/1 und P31 zu einer deutlichen Zunahme der cerebralen Mikrovaskulatur kommt, könnte es durch Zellteilung zu einer Abnahme der Vektorgenome pro cerebraler Gehirndothelzelle kommen. Da bei neonatalen Mäusen die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke noch nicht abgeschlossen ist, wäre es zudem denkbar, dass es bei Verwendung des Vektorsystems AAV-BR1 zu einer erhöhten neuronalen Transduktion kommt. Möglicherweise könnte dies zu einer erhöhten Neurotoxizität nach Applikation der Adeno-assoziierten Viren führen. Ab einem Alter von P14 kommt es zu einer deutlichen Reduktion der cerebralen Angiogenese, sodass eine Vektorapplikation zum Zeitpunkt P14 einen geeigneten Zeitpunkt zur frühen Vektorapplikation darstellen könnte.

Ergänzend ist zu erwähnen, dass in beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Überlebensstudien deutliche Unterschiede bezüglich des symptomfreien Überlebens und der Überlebensspanne zwischen den einzelnen Versuchstieren aufgezeigt werden konnten. Eine Korrelation der Dauer des symptomfreien Überlebens oder der Überlebensspanne zum Geschlecht der verwendeten Mäuse oder zu dem Körpergewicht der Mäuse zum Zeitpunkt der Vektoradministration konnte nicht festgestellt werden. Die Identifizierung der Mechanismen, die in einem Teil der Mäuse zu einer sehr eingeschränkten Wirksamkeit der vektorbasierten Gentherapie und in einem anderen Teil der Mäuse zu einer deutlichen Verlängerung des Überlebens geführt haben, könnte ebenfalls eine Optimierung des verwendeten Vektorsystems ermöglichen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit mit dem Vektor AAV-BR1, der zu einer hohen spezifischen Transduktion von Gehirndothelzellen führt, Effekte auf die cerebrale Gangliosidakkumulation, den Zeitpunkt der Symptomentwicklung und das Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} erzielt werden. Ein symptomfreies Überleben der Mäuse oder eine Verhinderung von Glycosphingolipidakkumulationen und Neuroinflammation konnte nicht erreicht werden. Demgegenüber berichteten bisher zwei Studien, dass mittels vektorbasierter Gentherapie ein symptomfreies Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} erreicht wurde. In der einen Studie von Walia et al. (2017) konnte ein symptomfreies Überleben der Mäuse nach intravenöser Administration rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren vom Serotyp 9 zum Zeitpunkt P0 erzielt werden. Diese Mäuse entwickelten jedoch, möglicherweise als Nebenwirkungen der Therapie mit den Adeno-assoziierten Viren, Leber- und Lungentumoren in einem Alter von 43 Wochen (48). In einer zweiten Studie von Niemir et al. (2018) erfolgte die Behandlung der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} mit selbstkomplementären Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp 9 (scAAV9) zum Zeitpunkt P1/2. Mittels dieses Vektorsystems konnte erstmals eine normale Überlebensdauer der Mäuse aufgezeigt werden. Die Mäuse erhielten eine Dosis von $3,5 \times 10^{13}$ gp/kg KG (Körpergewicht der Mäuse zum Zeitpunkt P1/2 ca. 1,5-2 g (182)). Somit war die im Rahmen der Studie von Niemir et al. applizierte Vektordosis vergleichbar mit der im Rahmen dieser Arbeit in der Überlebensstudie 2 angewendeten Vektordosis (82).

2016 publizierten Tropak et al. die Entwicklung einer Hybrid- β -Hexosaminidase μ (HexM), die das aktive Zentrum der α -Untereinheit der β -Hexosaminidasen, einen Proteininteraktionsabschnitt der β -Untereinheit der β -Hexosaminidasen und Areale beider Untereinheiten enthält, die für die Interaktion mit dem GM2-Aktivator-Protein entscheidend sind (183). Eine Verwendung dieser Hybrid- β -Hexosaminidase μ könnte eine weitere Möglichkeit der Optimierung der vektorbasierten Gentherapie der Gehirndothelzellen darstellen. Durch Verwendung der Sequenz der Hybrid- β -Hexosaminidase μ wäre eine Behandlung der Mäuse mit nur einem Vektor und nicht mit zwei verschiedenen Vektoren, wie in unseren Versuchen, erforderlich.

Zusammenfassend konnten nach Applikation der Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* vielversprechende Ergebnisse auf das Überleben von Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} erzielt werden. Für weiterführende Anwendungen ist jedoch eine Optimierung dieses gentherapeutischen Ansatzes erforderlich. Hierfür müssen Untersuchungen der Vektorphysiologie zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten der Mäuse angeschlossen werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang zum Beispiel, ob es bei Einsatz der Vektoren AAV-BR1-CAG-*hHEXA/B* zu Unterschieden in der Genexpression in Abhängigkeit von z.B. Geschlecht, Alter der Mäuse, Mauslinie, Zeitpunkt der Vektorapplikation im Tagesverlauf oder Herstellungsverfahren der Vektoren kommt. Zudem ist eine Untersuchung zur Identifizierung geeigneter Vektordosierungen zu verschiedenen Zeitpunkten erforderlich. Auf Grundlage der von Wada et al. publizierten Daten, die zeigen konnten, dass mittels Knochenmarktransplantation die neuronale Apoptoserate und die Rate aktivierter Mikroglia in einem Mausmodell des Morbus Sandhoff deutlich reduziert werden konnte, ohne einen Einfluss auf die Gangliosidakkumulationen zu nehmen, wäre es denkbar, dass durch Kombination einer vektorbasierter Gentherapie mit Inhibitoren der Neuroinflammation zudem eine Verlängerung des symptomfreien Überlebens der Mäuse erzielt werden könnte (65).

6.2 Erhöhung der gehirnendothelzellspezifischen, vektorbasierten Genexpression durch Anwendung der Methode des „Transcriptional Targetings“

Ergänzend erfolgte anhand von Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* die Bearbeitung der Fragestellung, ob mittels „Transcriptional Targeting“ durch Verwendung eines gehirnendothelzellspezifischen Promoters eine Erhöhung der vektorkodierten Genexpression in Gehirnendothelzellen sowie eine Erhöhung der Spezifität für Gehirnendothelzellen erzielt werden kann. Mittels Erhöhung der vektorkodierten Genexpression in den Zielzellen wäre eine Verbesserung des Mechanismus der endothelialen Transduktion und eine Linderung systemischer Nebenwirkungen nach Applikation von Vektoren möglich. Auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten konnten zwei synthetische Promotersequenz identifiziert werden, die in Kombination mit dem von Herrn Dr. Jakob Körbelin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Markus Schwaninger entwickelten modifizierten Kapsids des Adeno-assoziierten Virus vom Serotyp 2, zu einer stärkeren und spezifischeren Genexpression in Gehirnendothelzellen führten.

Während der untersuchte Vektor AAV-BR1-C-*Slco1c1*-eGFP-W zu einer sehr spezifischen Genexpression mit fehlendem Nachweis einer Genexpression in extracerebralen Organen führte, kam es nur zu einer schwachen neurovaskulären Genexpression. Demgegenüber stehen die übrigen untersuchten Promotoren, bei denen zwar cerebral eine hohe Genexpression in Gehirnendothelzellen nachgewiesen werden konnte, jedoch weiterhin eine extraendotheliale Reporterexpression nachweisbar war. Dabei zeigte sich für den Vektor AAV-BR1-C-*Slc2a1*-S-eGFP-W im Vergleich zu den übrigen Vektoren eine starke Genexpression in Gehirnendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke bei geringer Genexpression in Neuronen, Astrozyten, Zellen der Lunge, Leber und des Herzens.

Die vier für die Untersuchungen *in vivo* ausgewählten Promotersequenzen sind die Promotersequenzen S-C-*Cdh*-W, C-*Ocln*-W, C-*Slc2a1*-S-W und C-*Slco1c1*-W. In die initiale Analyse der möglichen Promotersequenzen, die potentiell in Gehirnendothelzellen zu einer spezifischen Genexpression führen könnten, schlossen wir die Promotersequenzen der 129 Gene ein, für die die Arbeitsgruppe um Daneman in ihren Transkriptomanalysen eine signifikant höhere Expression in Endothelzellen des Gehirns als in Zellen der Lunge und der Leber nachweisen konnte (91). Auf Grundlage von weiterführenden Einzelzell-

Genexpressionsprofil-Analysen sowie Analysen der Promotersequenzen der einzelnen Gene wurden, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, 24 Gene identifiziert, deren Promotersequenzen zu einer spezifischen Genexpression in Gehirndothelzellen führen könnten. Hiervon wurden im Rahmen dieser Arbeit acht Promotersequenzen untersucht. Eine Analyse der Promotersequenzen der 16 weiteren Gene hinsichtlich ihrer Spezifität für Gehirndothelzellen sowie ihres Ausmaßes der Transgenexpression sollte ergänzend durchgeführt werden.

Auf Grundlage der mittels Einzelzell-Genexpressionsprofil-Analysen in Gehirndothelzellen erhobenen und in der Datenbank DropViz aufgeführten Daten variiert das Ausmaß der Expression der verschiedenen in Tabelle 3 aufgeführten Gene zwischen den verschiedenen Subgruppen cerebraler Endothelzellen. Insbesondere für die Untersuchung von Eigenschaften verschiedener Subgruppen cerebraler Endothelzellen mittels stereotaktischer Vektorinjektion könnten somit je nach zu untersuchender Endothelzellsubgruppe unterschiedliche Promotersequenzen geeignet sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten könnten den Beginn einer Identifizierung von Promotersequenzen mit hoher Spezifität für die Gehirndothelzellen darstellen. Zahlreiche weitere Modifikationen der bereits untersuchten Promotersequenzen zur Erhöhung der zellspezifischen Genexpression wären jedoch für weiterführende Untersuchungen denkbar.

In weiterführenden Untersuchungen wäre es notwendig, zu untersuchen, zu welchen Effekten die Verwendung der jeweiligen kurzen genregulatorischen Sequenzen *in vivo* führt. In den *in vitro* Untersuchungen der Expression des Reportergens eGFP in Abhängigkeit verschiedener synthetischer Promotersequenzen an primären Astrozyten führte die Verwendung des Woodchuck-Elements zu einer signifikanten Erhöhung des Nachweises der eGFP-Expression in Astrozyten. Bei Verwendung des kurzen Introns des *Tie2*-Gens kam es zu einer signifikanten Abnahme der Reportergenexpression in aus Mausgehirnen isolierten Astrozyten. Diese Effekte sind in Abbildung 18 sowie Tabelle 14 gezeigt. Für die Untersuchung der Effekte der kurzen genregulatorischen Sequenzen auf die Expression in nicht-endothelialen cerebralen Zellen wäre zunächst eine Untersuchung unter Kombination der kurzen genregulatorischen Sequenzen in Kombination mit Sequenzen, die selbst keine transkriptionelle Aktivierung bewirken, sinnvoll (121). Neben

in vitro Untersuchungen in Astrozyten wären zudem *in vitro* Untersuchungen an isolierten primären Neuronen sinnvoll. Diesbezüglich wäre zu evaluieren, ob die in *in vitro* Untersuchungen in Zellkulturen primärer Zellen erhobenen Daten und beobachteten Effekte auch in *in vivo* Versuchen nachweisbar sind. Würde sich die Zellkultur primärer Zellen als adäquates Modell für die *in vivo* Versuche herausstellen, wäre hierdurch eine rasche Untersuchung der aufgeführten Fragestellungen möglich. Dieses Vorgehen würde ein einfaches und praktikables Vorgehen für eine effiziente Erhöhung der Stärke der Transgenexpression und eine Erhöhung der Gehirndothelzellspezifität der genregulatorischen Sequenzen darstellen.

Bezüglich der *in vitro* durchgeführten Untersuchungen wäre vor Durchführung weiterführenden Untersuchungen der genregulatorischen Sequenzelemente zu überprüfen, ob Unterschiede hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierung in Abhängigkeit der angewendeten Methode zur Transfektion der Zellen bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Transfektion der primären Mausgehirndothelzellen, der primären Schweinegehirndothelzellen, der Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 und der primären corticalen Astrozyten die chemische Methode der Lipofektion zum Einbringen der Plasmid-DNA in die Zellen verwendet. Alternative chemische Verfahren wären z.B. die Transfektion der Zellen unter Verwendung kationischer Polymere wie Diethylaminoethyl-Dextran oder Polyethylenimin sowie die Durchführung einer Calcium-Phosphat-Präzipitation (184). Jeder der aufgeführten Verfahren zeichnet sich durch spezifische Vor- und Nachteile aus. So zeichnet sich die Transfektion der Zellen unter Verwendung kationischer Polymere durch eine geringere Zelltoxizität sowie häufig Erzielung höherer Transfektionseffizienzen als das Verfahren der Lipofektion aus (185, 186). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wählten wir dennoch das Verfahren der Lipofektion zur Transfektion der Zellen, da Burkhart et al. 2017 im Rahmen einer Untersuchung der Transfektion primärer Gehirndothelzellen und Astrozyten von Ratten die Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden zur Expression von Erythropoietin verglichen und sich die stärkste Effizienz für das Verfahren der Lipofektion ergab (187). Voruntersuchungen, die 2015 ebenfalls von Burkhart et al. veröffentlicht wurden, zeigten zudem, dass das Verfahren der Lipofektion zu einer adäquaten Transfektionseffizienz auch in primären Gehirndothelzellen von Mäusen führt (188).

Ergänzend zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte zudem untersucht werden, ob und im Kontext welcher nativen Promotersequenzen die Lokalisation des kurzen Introns vor oder hinter der nativen Promotersequenz zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivierung führt.

Ergänzend wäre es denkbar, neben den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten kurzen genregulatorischen Sequenzen des langen und kurzen Introns des *Tie2*-Gens, des CMV-Enhancers und des Woodchuck-Elements weitere alternative genregulatorische Sequenzen zu untersuchen. Beispiele für weitere kurze genregulatorische Elemente, die mit den untersuchten Promotersequenzen kombiniert werden könnten, sind z.B. Intronsequenzen. Intronsequenzen unterstützen die Prozessierung der mRNA und erhöhen somit die Transgenexpression (123, 189). Bezüglich der Effekte auf die Expression von Reportergenen in Endothelzellen wurde bisher nur das erste Intron des *Tie2*-Gens, das auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, untersucht (122, 175, 190, 191). Weitere Intronsequenzen, deren Effekte auf die Transgenexpression in Kombination mit den nativen Promotersequenzen untersucht werden könnten, wäre z.B. die von der Arbeitsgruppe von Wu beschriebene Intronsequenz des zur Gruppe der Parvoviren gehörenden „Minute Virus of Mice“. Bei Untersuchung der Steigerung der Transgenexpression in Leberzellen im Kontext eines AAV2-Vektors führte die Verwendung dieser Sequenz zu einer 80-fachen Steigerung der Transgenexpression im Vergleich zu genregulatorischen Sequenzen ohne Intronsequenz (124). Darüber hinaus wurden insbesondere in den letzten Jahren Methoden und Verfahren zur Identifizierung von zellspezifischen „Enhancersequenzen“ etabliert (192, 193). Zudem wurden mathematische Modelle entwickelt, mit denen die Interaktion zwischen „Enhancer“- und Promotersequenz sowie der ideale Abstand zwischen den beiden Sequenzelementen bestimmt werden kann (194). Eine Nutzung dieser neu entwickelten Verfahren könnte zu einer signifikanten Steigerung der Transgenexpression führen.

Weiterführende Untersuchungen der beschriebenen und der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kurzen genregulatorischen Elemente sind insbesondere erforderlich, da gezeigt werden konnte, dass bei Einsatz von retroviralen Vektorsystemen die Verwendung von Promotersequenzen, die mit „Enhancersequenzen“ kombiniert wurden, einen entscheidenden Stimulus zur Protoonkogenaktivierung darstellt und somit das

onkogene Potential der Vektoren erhöht (195). Diese durch „Enhancersequenzen“ vermittelte Effekte konnten bisher in Vektorsystemen, bei denen Adeno-assoziierte Viren verwendet wurden, nicht nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen der Mechanismen, die zur Erhöhung der Genotoxizität Adeno-assoziiierter Viren führen, sind jedoch erforderlich.

Darüber hinaus ist es aufgrund der limitierten Packungskapazität Adeno-assoziiierter Viren von maximal 4.700 bp erforderlich, möglichst kurze Promotersequenzen zu verwenden. Eine Verwendung kurzer Promotersequenzen erlaubt die Verwendung längerer Transgene für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze. Die Länge der im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* untersuchten Promotersequenzen ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Promoter	Länge der untersuchten synthetischen Promotersequenz ohne Woodchuck-Element [bp]
CAG	1.620
S-C-Cdh	1.348
C-Ocln	1.809
C-Slc2a1-S	2.203
C-Slco1c1	1.708

Tab. 15: Länge der in dieser Arbeit in *in vivo* Untersuchungen verwendeten Promotersequenzen.

Aufgeführt ist in Tabelle 15, dass die Länge der *in vivo* untersuchten synthetischen Promotersequenzen zwischen 1.348 bp und 2.203 bp liegt. Im Vergleich zu den von der Arbeitsgruppe um Prof. Elizabeth Simpson (CMMT, Vancouver, Kanada) identifizierten gehirndothelzellspezifischen Promotersequenzen ist die Sequenz der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten synthetischen Promotersequenzen deutlich kürzer und erlauben somit die Expression längerer Transgene in Adeno-assoziierten Vektoren. Ein Vergleich der Endothelzellspezifität sowie der Stärke der Reporterexpression (z.B. gemessen an der Länge der Reporter-gen-exprimierenden Gefäße) war auf Grundlage der von der Arbeitsgruppe publizierten Daten nicht möglich (116).

Bezüglich der Länge der untersuchten Promotersequenzen wäre eine weitere interessante Fragestellung für weiterführende Untersuchungen, ob die Promotersequenzen *Cdh*, *Ocln*, *Slc2a1*, *Slco1c1* verkürzt werden könnten, ohne dass es zu Einbußen hinsichtlich der gehirndothelzellspezifischen Expression oder der Stärke der

Expression in den Targetzellen kommt. Diesbezüglich wäre insb. für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sequenz des Promoters *Slco1c1* zu untersuchen, ob die Verwendung eines alternativen Promoterabschnitts sinnvoll wäre. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sequenz des Promoters *Slco1c1* handelt es sich um einen Ausschnitt der Sequenz des Promoters GXP_244577 (EIDorado 2017-12), da die vollständige Sequenz des Promoters mittels Gradienten-PCR von genomischer Maus-DNA aufgrund von repetitiven Sequenzelementen nicht amplifiziert werden konnte. Zudem wäre eine Modifikation der verwendeten Promotersequenzen dahingehend möglich, dass in die Promotersequenz Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren eingefügt werden, die die durch die Promotersequenz regulierte Expression des Transgens in Gehirndothelzellen erhöhen. Ebenso wäre eine Deletion von Transkriptionsfaktorbindungsstellen denkbar, die zu einer Erhöhung der vektorkodierten Transgenexpression in extraendothelialen Zellen führen. Zudem könnten aus den genregulatorischen Sequenzen Transkriptionsfaktorbindungsstellen entfernt werden, die eine „Silencer“-Wirkung auf die Expression der vektorkodierten Transgene haben.

Neben den bereits in vorherigen Textabschnitten beschriebenen Möglichkeiten zum Einsatz des Vektors AAV-BR1 in Kombination mit einem gehirndothelzellspezifischen Promoter im Rahmen gentherapeutischer Ansätze, könnte die Verwendung eines AAV-Vektors in Kombination mit einem gehirndothelzellspezifischen Promoter ein mögliches experimentelles Werkzeug zur Modifikation genetischer Eigenschaften von Gehirndothelzellen darstellen. Eine stereotaktische Injektion von Vektoren, der von einem gehirndothelzellspezifischen Promoter ohne regulatorische Aktivität in Neuronen und Astrozyten reguliert wird, könnte in spezifischen Gehirnarealen eine isolierte Veränderung der Endothel Eigenschaften ermöglichen. Eine Nutzung des Vektors in diesem Rahmen würde die Untersuchung von Funktionsmechanismen sowie Auswirkungen von zahlreichen neurovaskulären Rezeptoren, Transportern und Signalwegen ermöglichen.

Eine weitere wichtige, zu untersuchende Fragestellung wäre, ob es Unterschiede in der durch die synthetischen Promotersequenzen erzielte transkriptionelle Aktivierung zwischen verschiedenen Spezies gibt. Erste Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deuten bei Vergleich der *in vitro* erhobenen Ergebnisse zwischen

Mausgehirnendothelzellen, Schweinegehirnendothelzellen und Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 darauf hin, dass die Effekte der transkriptionellen Aktivierung speziesunabhängig sind.

Neben der Fragestellung, ob es speziesabhängige Effekte in der transkriptionellen Aktivierung durch die synthetischen Promotersequenzen gibt, ist eine weitere wichtige Fragestellung, ob es Unterschiede in den durch die kurzen genregulatorischen Elemente sowie in den durch die untersuchten Promotoren vermittelten Effekte in Abhängigkeit des angewendeten Vektorsystems gibt. Bei Vergleich der durch die unterschiedlichen in Tabelle 2 dargestellten Promotersequenzen, vermittelten Effekte, die in verschiedenen Vektorsystemen untersucht wurden, waren die durch die Promotersequenzen vermittelten Effekte überwiegend zwischen den Vektorsystemen übertragbar. Diesbezüglich ist jedoch eine strukturierte und detaillierte Untersuchung erforderlich.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der Reportergene eGFP und Luciferase als Modellgene, deren Proteine zuverlässig detektierbar sind, für in Zukunft zu exprimierende Transgene. Zu prüfen wäre, ob es Unterschiede in der Transgenexpression in Abhängigkeit des zu exprimierenden Transgens gibt.

Auf Grundlage der erhobenen Ergebnisse sowie der vielfältigen Möglichkeiten zum Einsatz eines gehirnendothelzellspezifischen Promoters wäre eine weitere Optimierung der identifizierten synthetischen Promotorsequenz wünschenswert. Nichtsdestotrotz sind bereits die im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* untersuchten Promotersequenzen der synthetischen Promotoren *S-C-Cdh-W* und *C-Slc2a1-S-W* Sequenzen, die für die Untersuchung vielfältiger Fragestellungen einsetzbar wären.

6.3 Sicherheitsprofil des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO

Zudem erfolgte, zur Erkennung schwerwiegender langfristiger Komplikationen nach Applikation des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO, der zu der Subgruppe Adeno-assoziiierter Viren vom Subtyp AAV-BR1 gehört, eine Langzeituntersuchung über elf Monate. Makroskopisch ergaben sich nach Tötung der Mäuse und Organentnahme nach elf Monaten keine Hinweise auf die Entwicklung von Tumoren oder Organinsuffizienzen. In

ergänzend erfolgten histologischen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Zunahme entzündlicher hepatischer Infiltrate nach Vektorinjektion kommt (178).

Wie bereits im Vorfeld aufgeführt, wurde eine Assoziation Adeno-assoziiierter Viren zu der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome nachgewiesen (28). Zudem zeigten sich in Tierversuchen an Mäusen nach Administration Adeno-assoziiierter Vektoren in hohen Dosierungen zur Transduktion von Neuronen hepatozelluläre Karzinome (48). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einer Vektordosis von $6,0 \times 10^{10}$ genomischen Partikeln/Maus in neonatalen Mäusen (Körpergewicht zwischen 1,5 und 2 g) sowie mit einer Vektordosis von $1,8 \times 10^{11}$ genomischen Partikeln/Maus in einem Alter von 25-31 Tagen (Körpergewicht zwischen 16 und 21 g) vergleichsweise moderate Vektordosierungen gewählt.

Den Nachweis entzündlicher Infiltrate aus Lymphozyten und Plasmazellen in einer ansonsten histologisch unauffälligen Leber elf Monate nach der Vektorinjektion werteten wir zunächst im Rahmen sekundärer immunologischer Reaktionen auf die Transduktion von Leberzellen durch den Vektor AAV-BR1-CAG-NEMO. Auch andere Arbeitsgruppen konnten nach Applikation Adeno-assoziiierter Viren für gentherapeutische Untersuchungen die Entwicklung entzündlicher Infiltrate der Leber nachweisen (196). Die Bedeutung dieser Infiltrate insb. hinsichtlich der Entwicklung weiterer Pathologien im weiteren Zeitverlauf bleibt zunächst unklar.

Diesbezüglich wäre daher zu untersuchen, ob die in der Leber nachgewiesenen Infiltrate auch nach Applikation anderer Adeno-assoziiierter Vektoren vom Typ AAV-BR1 auftreten, oder ob es sich um eine immunologische Reaktion handeln könnte, die durch das Transgen NEMO bewirkt wird.

Zusammenfassend besteht auf Grundlage der bisher erhobenen Daten kein Hinweis darauf, dass es im Langzeitverlauf nach Applikation der Adeno-assoziierten Vektoren AAV-BR1 in Mausmodellen zu der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome kommt. Die bisher erhobenen Daten zum Langzeit-Sicherheitsprofil der Adeno-assoziierten Viren AAV-BR1 weisen darauf hin, dass es sich bei diesem Vektorsystem um einen potenziellen

therapeutischen Vektor ohne das Risiko schwerwiegender systemischer Komplikationen handelt.

6.4 Zusammenfassende Beurteilung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Vektor AAV-BR1, der sich durch eine Erhöhung der Spezifität für Gehirndothelzellen im Vergleich zum Wildtyp AAV vom Serotyp 2 auszeichnet, im Rahmen gentherapeutischer Ansätze neurogenetischer Erkrankungen genutzt werden kann. Dies wurde exemplarisch am Beispiel der Modellerkrankung des Morbus Sandhoff gezeigt. Anhand der Modellerkrankung des Morbus Sandhoff konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus der endothelialen Transduktion eine Behandlung monogenetisch vererbter Erkrankungen von Zellen des Gehirnparenchyms darstellen kann.

Zudem konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei synthetische Promotersequenzen identifiziert werden, die sich bei Verwendung *in vivo* in Kombination mit dem Kapsid des Vektors AAV-BR1 durch eine hohe Spezifität für die vektorkodierte Genexpression in Gehirndothelzellen auszeichnen.

Des Weiteren ergab sich in einer Untersuchung des Langzeit-Sicherheitsprofils Adeno-assoziiierter Viren mit modifiziertem Kapsid vom Typ AAV-BR1 kein Hinweis auf die Entwicklung von durch die Vektorapplikation bedingten Organinsuffizienzen oder Tumorerkrankungen.

Somit bieten sich zusammenfassend für den Einsatz Adeno-assoziiierter Vektoren mit modifiziertem Kapsid (AAV-BR1) in Kombination mit einer der identifizierten Promotersequenzen durch die hohe Spezifität der Genexpression in Gehirndothelzellen zahlreiche Möglichkeiten für gentherapeutische Ansätze und Möglichkeiten zur Untersuchung pathophysiologischer Abläufe in spezifischen Gehirnarealen.

7 Literaturverzeichnis

1. Körbelin J, Dogbevia G, Michelfelder S, Ridder DA, Hunger A, Wenzel J, u. a. A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med*. Juni 2016;8(6):609–25.
2. Ehrlich P. Über das Sauerstoffbedürfnis des Organismus: eine farbenanalytische Studie. Hirschwald, Berlin. 1885;167.
3. Lewandowsky M. Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. 1900;(40):480–94.
4. Goldmann EE. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abhandl Konigl Preuss Akad Wiss*. 1913;1:1–60.
5. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. Juli 1967;34(1):207–17.
6. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 27. September 2017;96(1):17–42.
7. Van Bree JB, De Boer AG, Danhof M, Breimer DD. Drug transport across the blood-brain barrier. II. Experimental techniques to study drug transport. *Pharm Weekbl Sci*. 11. Dezember 1992;14(6):338–48.
8. Stewart PA, Wiley MJ. Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *J Comp Neurol*. 20. Oktober 1981;202(2):157–67.
9. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. November 2012;72(5):648–72.
10. Rosenberg GA. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. Juli 2012;32(7):1139–51.
11. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. März 1969;40(3):648–77.
12. Westergaard E, Brightman MW. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol*. 1. November 1973;152(1):17–44.
13. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2. Februar 2007;100(2):174–90.
14. Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res*. Juli 1985;30(1):99–115.
15. Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, u. a. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15. Februar 1997;158(4):1825–32.
16. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5. Januar 2015;7(1):a020412.
17. Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother*. Januar 2005;2(1):86–98.

18. Mittapalli RK, Manda VK, Adkins CE, Geldenhuys WJ, Lockman PR. Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules. *Ther Deliv.* Dezember 2010;1(6):775–84.
19. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol.* Mai 1977;1(5):409–17.
20. Ferguson AV, Bains JS. Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front Neuroendocrinol.* Oktober 1996;17(4):440–75.
21. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* Januar 2007;12(1–2):54–61.
22. Lu C-T, Zhao Y-Z, Wong HL, Cai J, Peng L, Tian X-Q. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:2241–57.
23. Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(5):753–70.
24. Monahan PE, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today.* November 2000;6(11):433–40.
25. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* Oktober 2008;21(4):583–93.
26. Hareendran S, Balakrishnan B, Sen D, Kumar S, Srivastava A, Jayandharan GR. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev Med Virol.* November 2013;23(6):399–413.
27. Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* Januar 2010;18(1):80–6.
28. Nault J-C, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, u. a. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet.* Oktober 2015;47(10):1187–93.
29. Nault J-C, Mami I, La Bella T, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, u. a. Wild-type AAV Insertions in Hepatocellular Carcinoma Do Not Inform Debate Over Genotoxicity Risk of Vectorized AAV. *Mol Ther.* April 2016;24(4):660–1.
30. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science.* 13. August 1965;149(3685):754–6.
31. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum Gene Ther.* 2016;27(7):478–96.
32. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;807:1–23.
33. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol.* 2012;507:229–54.
34. Skubis-Zegadło J, Stachurska A, Małecki M. Vectrology of adeno-associated viruses (AAV). *Med Wieku Rozwoj.* September 2013;17(3):202–6.

35. Salganik M, Hirsch ML, Samulski RJ. Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol Spectr.* August 2015;3(4).
36. Pillay S, Zou W, Cheng F, Puschnik AS, Meyer NL, Ganaie SS, u. a. Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. *J Virol.* 15. September 2017;91(18).
37. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, u. a. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature.* 4. Februar 2016;530(7588):108–12.
38. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, u. a. Corrigendum: An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature.* 17 2016;539(7629):456.
39. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 2016;21:75–80.
40. Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R, Kleinschmidt JA. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol.* November 2006;80(22):11040–54.
41. Ni TH, Zhou X, McCarty DM, Zolotukhin I, Muzyczka N. In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J Virol.* Februar 1994;68(2):1128–38.
42. Nowrouzi A, Penaud-Budloo M, Kaepfel C, Appelt U, Le Guiner C, Moullier P, u. a. Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Mol Ther.* Juni 2012;20(6):1177–86.
43. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* August 2001;75(15):6969–76.
44. Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, u. a. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol.* November 1998;72(11):8568–77.
45. Chen SJ, Tazelaar J, Moscioni AD, Wilson JM. In vivo selection of hepatocytes transduced with adeno-associated viral vectors. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* Mai 2000;1(5 Pt 1):414–22.
46. Wu P, Phillips MI, Bui J, Terwilliger EF. Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol.* Juli 1998;72(7):5919–26.
47. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, u. a. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* Dezember 1991;10(12):3941–50.
48. Walia JS, Altaieb N, Bello A, Kruck C, LaFave MC, Varshney GK, u. a. Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. *Mol Ther.* März 2015;23(3):414–22.
49. Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon C-S, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, u. a. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther.* 2017;28(6):510–22.

50. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 20. Januar 1999;281(3):249–54.
51. Anderson RGW. THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. *Annu Rev Biochem*. Juni 1998;67(1):199–225.
52. Hakomori S, Yamamura S, Handa AK. Signal transduction through glyco(sphingo)lipids. Introduction and recent studies on glyco(sphingo)lipid-enriched microdomains. *Ann N Y Acad Sci*. 19. Juni 1998;845:1–10.
53. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett*. 3. Mai 2010;584(9):1741–7.
54. Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, Howes MT, Benzing C, Arumugam S, u. a. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. Juni 2014;16(6):595–606.
55. Cachon-Gonzalez MB, Zaccariotto E, Cox TM. Genetics and Therapies for GM2 Gangliosidosis. *Curr Gene Ther*. 2018;18(2):68–89.
56. van Meer G, Lisman Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem*. 19. Juli 2002;277(29):25855–8.
57. vom Dahl S, Gebert U, Poll L. Gaucher-Krankheit. In: vom Dahl S, Lammert F, Ullrich K, Wendel U, Herausgeber. *Angeborene Stoffwechselkrankheiten bei Erwachsenen [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [zitiert 24. September 2020]. S. 413–23. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-45188-1_46
58. O'Dowd BF, Klavins MH, Willard HF, Gravel R, Lowden JA, Mahuran DJ. Molecular heterogeneity in the infantile and juvenile forms of Sandhoff disease (O-variant GM2 gangliosidosis). *J Biol Chem*. 25. September 1986;261(27):12680–5.
59. www.dropviz.org (Zugriff: 16.08.2018).
60. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, u. a. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*. Dezember 2013;16(12):1896–905.
61. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1359–69.
62. Hasilik A, Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem*. 25. Mai 1980;255(10):4937–45.
63. Hasilik A, Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J Biol Chem*. 25. Mai 1980;255(10):4946–50.
64. Tsuji D, Kuroki A, Ishibashi Y, Itakura T, Itoh K. Metabolic correction in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J Neurochem*. September 2005;94(6):1631–8.
65. Wada R, Tiffet CJ, Proia RL. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26. September 2000;97(20):10954–9.

66. Yamaguchi A, Katsuyama K, Suzuki K, Kosaka K, Aoki I, Yamanaka S. Plasmid-based gene transfer ameliorates visceral storage in a mouse model of Sandhoff disease. *J Mol Med Berl Ger.* März 2003;81(3):185–93.
67. Huang JQ, Trasler JM, Igdoura S, Michaud J, Hanal N, Gravel RA. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet.* Oktober 1997;6(11):1879–85.
68. Pan X, De Aragão CDBP, Velasco-Martin JP, Priestman DA, Wu HY, Takahashi K, u. a. Neuraminidases 3 and 4 regulate neuronal function by catabolizing brain gangliosides. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2017;31(8):3467–83.
69. Jarnes Utz JR, Kim S, King K, Ziegler R, Schema L, Redtree ES, u. a. Infantile gangliosidoses: Mapping a timeline of clinical changes. *Mol Genet Metab.* 2017;121(2):170–9.
70. Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Priestman DA, Dwek RA, Butters TD, u. a. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis.* April 2001;24(2):275–90.
71. Shapiro BE, Pastores GM, Gianutsos J, Luzy C, Kolodny EH. Miglustat in late-onset Tay-Sachs disease: a 12-month, randomized, controlled clinical study with 24 months of extended treatment. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* Juni 2009;11(6):425–33.
72. Tsuji D, Akeboshi H, Matsuoka K, Yasuoka H, Miyasaki E, Kasahara Y, u. a. Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann Neurol.* April 2011;69(4):691–701.
73. Seyrantepe V, Demir SA, Timur ZK, Von Gerichten J, Marsching C, Erdemli E, u. a. Murine Sialidase Neu3 facilitates GM2 degradation and bypass in mouse model of Tay-Sachs disease. *Exp Neurol.* Januar 2018;299:26–41.
74. Lawson CA, Martin DR. Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitations. *Appl Clin Genet.* 2016;9:111–20.
75. Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, u. a. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet.* Oktober 1995;11(2):170–6.
76. Akli S, Guidotti JE, Vigne E, Perricaudet M, Sandhoff K, Kahn A, u. a. Restoration of hexosaminidase A activity in human Tay-Sachs fibroblasts via adenoviral vector-mediated gene transfer. *Gene Ther.* September 1996;3(9):769–74.
77. Bourgoïn C, Emiliani C, Kremer EJ, Gelot A, Tancini B, Gravel RA, u. a. Widespread distribution of beta-hexosaminidase activity in the brain of a Sandhoff mouse model after coinjection of adenoviral vector and mannitol. *Gene Ther.* Oktober 2003;10(21):1841–9.
78. Arfi A, Bourgoïn C, Basso L, Emiliani C, Tancini B, Chigorno V, u. a. Bicistronic lentiviral vector corrects β -hexosaminidase deficiency in transduced and cross-corrected human Sandhoff fibroblasts. *Neurobiol Dis.* November 2005;20(2):583–93.
79. Cachon-Gonzalez MB, Wang SZ, Lynch A, Ziegler R, Cheng SH, Cox TM. Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proc Natl Acad Sci.* 5. Juli 2006;103(27):10373–8.

80. Jeyakumar M, Norflus F, Tifft CJ, Cortina-Borja M, Butters TD, Proia RL, u. a. Enhanced survival in Sandhoff disease mice receiving a combination of substrate deprivation therapy and bone marrow transplantation. *Blood*. 1. Januar 2001;97(1):327–9.
81. Sargeant TJ, Wang S, Bradley J, Smith NJC, Raha AA, McNair R, u. a. Adeno-associated virus-mediated expression of β -hexosaminidase prevents neuronal loss in the Sandhoff mouse brain. *Hum Mol Genet*. 15. November 2011;20(22):4371–80.
82. Niemir N, Rouvière L, Besse A, Vanier MT, Dmytrus J, Marais T, u. a. Intravenous administration of scAAV9-Hexb normalizes lifespan and prevents pathology in Sandhoff disease mice. *Hum Mol Genet*. 15 2018;27(6):954–68.
83. Batista L, Miller F, Clave C, Arfi A, Douillard-Guilloux G, Couraud P-O, u. a. Induced secretion of beta-hexosaminidase by human brain endothelial cells: a novel approach in Sandhoff disease? *Neurobiol Dis*. März 2010;37(3):656–60.
84. Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther*. 20. Oktober 1996;7(16):1947–54.
85. Lee CH, Liu M, Sie KL, Lee MS. Prostate-specific antigen promoter driven gene therapy targeting DNA polymerase-alpha and topoisomerase II alpha in prostate cancer. *Anticancer Res*. August 1996;16(4A):1805–11.
86. Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KM, Stratford IJ, u. a. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med*. Mai 1997;3(5):515–20.
87. Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, u. a. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med*. August 1995;1(8):786–91.
88. Müller F, Williams DW, Kobolák J, Gauvry L, Goldspink G, Orbán L, u. a. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos. *Mol Reprod Dev*. August 1997;47(4):404–12.
89. Vile RG, Hart IR. In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res*. 1. März 1993;53(5):962–7.
90. Nettelbeck DM, Jérôme V, Müller R. A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. *Gene Ther*. Dezember 1998;5(12):1656–64.
91. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One*. 29. Oktober 2010;5(10):e13741.
92. Assmann JC, Körbelin J, Schwaninger M. Genetic manipulation of brain endothelial cells in vivo. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. März 2016;1862(3):381–94.
93. Davidoff AM, Nathwani AC, Spurbeck WW, Ng CYC, Zhou J, Vanin EF. rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice. *Cancer Res*. 1. Juni 2002;62(11):3077–83.

94. Nicklin SA, Reynolds PN, Brosnan MJ, White SJ, Curiel DT, Dominiczak AF, u. a. Analysis of Cell-Specific Promoters for Viral Gene Therapy Targeted at the Vascular Endothelium. *Hypertension*. Juli 2001;38(1):65–70.
95. Jaggar RT, Chan HY, Harris AL, Bicknell R. Endothelial Cell-Specific Expression of Tumor Necrosis Factor- α from the KDR or E-Selectin Promoters Following Retroviral Delivery. *Hum Gene Ther*. 10. Dezember 1997;8(18):2239–47.
96. Walton T, Wang JL, Ribas A, Barsky SH, Economou J, Nguyen M. Endothelium-specific expression of an E-selectin promoter recombinant adenoviral vector. *Anticancer Res*. Juni 1998;18(3A):1357–60.
97. De Palma M, Venneri MA, Naldini L. In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 10. August 2003;14(12):1193–206.
98. Merlin S, Follenzi A. Transcriptional Targeting and MicroRNA Regulation of Lentiviral Vectors. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. März 2019;12:223–32.
99. Dai C, McAninch RE, Sutton RE. Identification of synthetic endothelial cell-specific promoters by use of a high-throughput screen. *J Virol*. Juni 2004;78(12):6209–21.
100. Mimuro J, Muramatsu S, Hakamada Y, Mori K, Kikuchi J, Urabe M, u. a. Recombinant adeno-associated virus vector-transduced vascular endothelial cells express the thrombomodulin transgene under the regulation of enhanced plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *Gene Ther*. November 2001;8(22):1690–7.
101. Jäger U, Zhao Y, Porter CD. Endothelial Cell-Specific Transcriptional Targeting from a Hybrid Long Terminal Repeat Retrovirus Vector Containing Human Prepro-Endothelin-1 Promoter Sequences. *J Virol*. 1. Dezember 1999;73(12):9702–9.
102. Cho JY, Lim W, Jang S, Lee Y. Development of an efficient endothelial cell specific vector using promoter and 5' untranslated sequences from the human preproendothelin-1 gene. *Exp Mol Med*. August 2003;35(4):269–74.
103. Kaliberov SA, Kaliberova LN, Hong Lu Z, Preuss MA, Barnes JA, Stockard CR, u. a. Retargeting of gene expression using endothelium specific hexon modified adenoviral vector. *Virology*. Dezember 2013;447(1–2):312–25.
104. Pariente N, Mao S-H, Morizono K, Chen ISY. Efficient targeted transduction of primary human endothelial cells with dual-targeted lentiviral vectors. *J Gene Med*. März 2008;10(3):242–8.
105. Yang G, Kramer MG, Fernandez-Ruiz V, Kawa MP, Huang X, Liu Z, u. a. Development of Endothelial-Specific Single Inducible Lentiviral Vectors for Genetic Engineering of Endothelial Progenitor Cells. *Sci Rep [Internet]*. Dezember 2015 [zitiert 26. April 2020];5(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep17166>
106. Varadi K, Katus H, Mueller O. P237Targeted adeno-associated virus (AAV) vector for efficient gene transfer into endothelial cells in vivo. *Cardiovasc Res*. 15. Juli 2014;103(suppl 1):S42.3-S42.
107. Kaliberov SA, Kaliberova LN, Buchsbaum DJ. Combined ionizing radiation and sKDR gene delivery for treatment of prostate carcinomas. *Gene Ther*. März 2005;12(5):407–17.

108. Bauerschmitz GJ, Nettelbeck DM, Kanerva A, Baker AH, Hemminki A, Reynolds PN, u. a. The *flt-1* promoter for transcriptional targeting of teratocarcinoma. *Cancer Res.* 1. März 2002;62(5):1271–4.
109. Reynolds PN, Nicklin SA, Kaliberova L, Boatman BG, Grizzle WE, Balyasnikova IV, u. a. Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol.* September 2001;19(9):838–42.
110. Luz-Madrigal A, Clapp C, Aranda J, Vaca L. In vivo transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human *flt-1* promoter. *Virol J.* 18. September 2007;4:88.
111. Richardson TB, Kaspers J, Porter CD. Retroviral hybrid LTR vector strategy: functional analysis of LTR elements and generation of endothelial cell specificity. *Gene Ther.* Mai 2004;11(9):775–83.
112. Song W, Sun Q, Dong Z, Spencer DM, Núñez G, Nör JE. Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. *Gene Ther.* Februar 2005;12(4):320–9.
113. Savontaus MJ, Sauter BV, Huang T-G, Woo SLC. Transcriptional targeting of conditionally replicating adenovirus to dividing endothelial cells. *Gene Ther.* Juli 2002;9(14):972–9.
114. Yang W-Y, Huang Z-H, Lin L-J, Li Z, Yu J-L, Song H-J, u. a. Kinase domain insert containing receptor promoter controlled suicide gene system selectively kills human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol.* 7. September 2006;12(33):5331–5.
115. Ozaki K, Yoshida T, Ide H, Saito I, Ikeda Y, Sugimura T, u. a. Use of von Willebrand factor promoter to transduce suicidal gene to human endothelial cells, HUVEC. *Hum Gene Ther.* 20. August 1996;7(13):1483–90.
116. de Leeuw CN, Korecki AJ, Berry GE, Hickmott JW, Lam SL, Lengyel TC, u. a. rAAV-compatible MiniPromoters for restricted expression in the brain and eye. *Mol Brain* [Internet]. Dezember 2016 [zitiert 27. Juni 2018];9(1). Verfügbar unter: <http://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-016-0232-4>
117. D'Souza CA, Chopra V, Varhol R, Xie Y-Y, Bohacec S, Zhao Y, u. a. Identification of a set of genes showing regionally enriched expression in the mouse brain. *BMC Neurosci.* 14. Juli 2008;9:66.
118. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, u. a. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 3. September 2014;34(36):11929–47.
119. Saunders A, Macosko EZ, Wysoker A, Goldman M, Krienen FM, de Rivera H, u. a. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell.* August 2018;174(4):1015-1030.e16.
120. De Val S, Chi NC, Meadows SM, Minovitsky S, Anderson JP, Harris IS, u. a. Combinatorial regulation of endothelial gene expression by ets and forkhead transcription factors. *Cell.* 12. Dezember 2008;135(6):1053–64.
121. Nordeen SK. Luciferase Reporter Gene Vectors for Analysis of Promoter and Enhancers. *BioTechniques.* 1988;6(5):454–7.

122. Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, u. a. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. April 1997;94(7):3058–63.
123. Huang MT, Gorman CM. The simian virus 40 small-t intron, present in many common expression vectors, leads to aberrant splicing. *Mol Cell Biol*. April 1990;10(4):1805–10.
124. Wu Z, Sun J, Zhang T, Yin C, Yin F, Van Dyke T, u. a. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. Februar 2008;16(2):280–9.
125. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*. Juni 1985;41(2):521–30.
126. Huang ZM, Yen TS. Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J Virol*. Mai 1994;68(5):3193–9.
127. Huang ZM, Yen TS. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol*. Juli 1995;15(7):3864–9.
128. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*. Juni 1998;72(6):5085–92.
129. Paterna JC, Moccetti T, Mura A, Feldon J, Büeler H. Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther*. August 2000;7(15):1304–11.
130. Xu R, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, u. a. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther*. September 2001;8(17):1323–32.
131. Fagoe ND, Eggers R, Verhaagen J, Mason MRJ. A compact dual promoter adeno-associated viral vector for efficient delivery of two genes to dorsal root ganglion neurons. *Gene Ther*. März 2014;21(3):242–52.
132. Levitt N, Briggs D, Gil A, Proudfoot NJ. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev*. Juli 1989;3(7):1019–25.
133. Yew NS, Wysokenski DM, Wang KX, Ziegler RJ, Marshall J, McNeilly D, u. a. Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum Gene Ther*. 20. März 1997;8(5):575–84.
134. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med*. Januar 2015;19(102):49–57.
135. Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, u. a. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*. 15. Juli 1989;79(2):269–77.
136. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. „Green mice“ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 5. Mai 1997;407(3):313–9.

137. Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*. 1. Januar 1999;93(1):184–92.
138. Gruh I, Wunderlich S, Winkler M, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, u. a. Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J Gene Med*. Januar 2008;10(1):21–32.
139. Lee Y-B, Glover CPJ, Cosgrave AS, Bienemann A, Uney JB. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol*. Januar 2005;90(1):33–7.
140. Li S-P, Feng J-J, Wang H-G, Wang X-F, Lv Z-J. [The effects of SV40 PolyA sequence and its AATAAA signal on upstream GFP gene expression and transcription termination]. *Yi Chuan Hered*. Januar 2012;34(1):113–9.
141. Goodwin EC, Rottman FM. The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem*. 15. August 1992;267(23):16330–4.
142. Weksler B, Romero IA, Couraud P-O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 26. März 2013;10(1):16.
143. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263–73.
144. Bott TL, Brock TD. Bacterial growth rates above 90 degrees C in Yellowstone hot springs. *Science*. 20. Juni 1969;164(3886):1411–2.
145. Klenow H, Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Januar 1970;65(1):168–75.
146. Assmann JC, Müller K, Wenzel J, Walther T, Brands J, Thornton P, u. a. Isolation and Cultivation of Primary Brain Endothelial Cells from Adult Mice. *Bio-Protoc*. 20. Mai 2017;7(10).
147. Patabendige A, Skinner RA, Morgan L, Abbott NJ. A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. *Brain Res*. 12. Juli 2013;1521:16–30.
148. Patabendige A, Abbott NJ. Primary porcine brain microvessel endothelial cell isolation and culture. *Curr Protoc Neurosci*. 8. Oktober 2014;69:3.27.1-17.
149. Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp JoVE*. 19. Januar 2013;(71).
150. Summerford C, Samulski RJ. Viral receptors and vector purification: new approaches for generating clinical-grade reagents. *Nat Med*. Mai 1999;5(5):587–8.
151. Wu N, Atai MM. Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol*. April 2000;11(2):205–8.

152. Ridder DA, Wenzel J, Müller K, Töllner K, Tong X-K, Assmann JC, u. a. Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *J Exp Med*. 21. September 2015;212(10):1529–49.
153. Ridder DA, Lang M-F, Salinin S, Röderer J-P, Struss M, Maser-Gluth C, u. a. TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *J Exp Med*. 19. Dezember 2011;208(13):2615–23.
154. Zhu C, Gao J, Karlsson N, Li Q, Zhang Y, Huang Z, u. a. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. Mai 2010;30(5):1017–30.
155. Seier E. Comparison of Tests for Univariate Normality. :17.
156. Salkind NJ, Herausgeber. *Encyclopedia of research design*. Thousand Oaks, Calif: SAGE Publications; 2010. 3 S.
157. Schmider E, Ziegler M, Danay E, Beyer L, Bühner M. Is It Really Robust?: Reinvestigating the Robustness of ANOVA Against Violations of the Normal Distribution Assumption. *Methodology*. Januar 2010;6(4):147–51.
158. Lix LM, Keselman JC, Keselman HJ. Consequences of Assumption Violations Revisited: A Quantitative Review of Alternatives to the One-Way Analysis of Variance *F* Test. *Rev Educ Res*. Dezember 1996;66(4):579–619.
159. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull*. Juli 1992;112(1):155–9.
160. Breunig F, Knoll A, Wanner C. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: clinical implications. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. September 2003;12(5):491–5.
161. Chen YH, Clafin K, Geoghegan JC, Davidson BL. Sialic acid deposition impairs the utility of AAV9, but not peptide-modified AAVs for brain gene therapy in a mouse model of lysosomal storage disease. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. Juli 2012;20(7):1393–9.
162. Chen YH, Chang M, Davidson BL. Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nat Med*. Oktober 2009;15(10):1215–8.
163. Dogbevia G, Grasshoff H, Othman A, Penno A, Schwaninger M. Brain endothelial specific gene therapy improves experimental Sandhoff disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29. Juli 2019;0271678X1986591.
164. Wälchli T, Mateos JM, Weinman O, Babic D, Regli L, Hoerstrup SP, u. a. Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nat Protoc*. Januar 2015;10(1):53–74.
165. Harb R, Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. Januar 2013;33(1):146–56.
166. Zeller K, Vogel J, Kuschinsky W. Postnatal distribution of Glut1 glucose transporter and relative capillary density in blood-brain barrier structures and circumventricular organs during development. *Brain Res Dev Brain Res*. 26. Februar 1996;91(2):200–8.

167. Tran CHT, Peringod G, Gordon GR. Astrocytes Integrate Behavioral State and Vascular Signals during Functional Hyperemia. *Neuron*. 05 2018;100(5):1133-1148.e3.
168. Letourneur A, Chen V, Waterman G, Drew PJ. A method for longitudinal, transcranial imaging of blood flow and remodeling of the cerebral vasculature in postnatal mice. *Physiol Rep*. 1. Dezember 2014;2(12).
169. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 25. November 2010;468(7323):562–6.
170. Kniesel U, Risau W, Wolburg H. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 23. Oktober 1996;96(1–2):229–40.
171. Xu J, Ling EA. Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *J Anat*. April 1994;184 (Pt 2):227–37.
172. Ge W-P, Miyawaki A, Gage FH, Jan YN, Jan LY. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*. 28. März 2012;484(7394):376–80.
173. Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S. Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15. August 2012;32(33):11285–98.
174. Arcuri C, Mecca C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:191.
175. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol*. 15. Februar 2001;230(2):230–42.
176. Zhao Q, Eichten A, Parveen A, Adler C, Huang Y, Wang W, u. a. Single-Cell Transcriptome Analyses Reveal Endothelial Cell Heterogeneity in Tumors and Changes following Antiangiogenic Treatment. *Cancer Res*. 1. Mai 2018;78(9):2370–82.
177. Sabbagh MF, Heng JS, Luo C, Castanon RG, Nery JR, Rattner A, u. a. Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells. *eLife [Internet]*. 6. September 2018 [zitiert 7. Juni 2020];7. Verfügbar unter: <https://elifesciences.org/articles/36187>
178. Dogbevia GK, Töllner K, Körbelin J, Bröer S, Ridder DA, Grasshoff H, u. a. Gene therapy decreases seizures in a model of Incontinentia pigmenti. *Ann Neurol*. Juli 2017;82(1):93–104.
179. Lobsiger CS, Boillée S, Cleveland DW. Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. Mai 2007;104(18):7319–26.
180. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, u. a. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther*. September 2001;8(17):1343–6.

181. Zhong L, Malani N, Li M, Brady T, Xie J, Bell P, u. a. Recombinant adeno-associated virus integration sites in murine liver after ornithine transcarbamylase gene correction. *Hum Gene Ther.* Mai 2013;24(5):520–5.
182. Smidt D, Monzavifar H. Untersuchungen zur phänotypischen Ausprägung unterschiedlicher Fruchtbarkeitsveranlagung bei Mäusen. *Z Für Tierz Zücht.* 26. April 2010;87(1–4):69–80.
183. Tropak MB, Yonekawa S, Karumuthil-Melethil S, Thompson P, Wakarchuk W, Gray SJ, u. a. Construction of a hybrid β -hexosaminidase subunit capable of forming stable homodimers that hydrolyze GM2 ganglioside in vivo. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3:15057.
184. Boussif O, Lezoualc’h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, u. a. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. August 1995;92(16):7297–301.
185. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 5. August 1999;60(2–3):149–60.
186. Goula D, Benoist C, Mantero S, Merlo G, Levi G, Demeneix BA. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther.* September 1998;5(9):1291–5.
187. Burkhart A, Andresen TL, Aigner A, Thomsen LB, Moos T. Transfection of primary brain capillary endothelial cells for protein synthesis and secretion of recombinant erythropoietin: a strategy to enable protein delivery to the brain. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(13):2467–85.
188. Burkhart A, Thomsen LB, Thomsen MS, Lichota J, Fazakas C, Krizbai I, u. a. Transfection of brain capillary endothelial cells in primary culture with defined blood-brain barrier properties. *Fluids Barriers CNS.* 7. August 2015;12:19.
189. Niwa M, Rose SD, Berget SM. In vitro polyadenylation is stimulated by the presence of an upstream intron. *Genes Dev.* September 1990;4(9):1552–9.
190. Fadel BM, Boutet SC, Quertermous T. Octamer-dependent *in Vivo* Expression of the Endothelial Cell-specific *TIE2* Gene. *J Biol Chem.* 16. Juli 1999;274(29):20376–83.
191. Minami T. Ets Motifs Are Necessary for Endothelial Cell-Specific Expression of a 723-bp Tie-2 Promoter/Enhancer in Hprt Targeted Transgenic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 4. September 2003;23(11):2041–7.
192. Jin F, Li Y, Ren B, Natarajan R. Enhancers: multi-dimensional signal integrators. *Transcription.* Oktober 2011;2(5):226–30.
193. The FANTOM Consortium, Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, u. a. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.* März 2014;507(7493):455–61.
194. Gaffney DJ. Mapping and predicting gene–enhancer interactions. *Nat Genet.* Dezember 2019;51(12):1662–3.
195. David RM, Doherty AT. Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci.* Februar 2017;155(2):315–25.

196. Bell P, Wang L, Lebherz C, Flieder DB, Bove MS, Wu D, u. a. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. August 2005;12(2):299–306.

8 Anhänge

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über den Aufbau der Neurovaskulären Einheit bestehend aus Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, extrazellulären Matrixproteinen und Neuronen.

Abb. 2: Experimentelle Therapieansätze zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke als zentrales Hindernis in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems.

Abb. 3: Übersicht über die Erkrankungsgruppe der Sphingolipidosen.

Abb. 4: Übersicht über die Nomenklatur der β -N-Acetylhexosaminidasen A, B und S auf Gen- sowie Proteinebene.

Abb. 5: Typischer Krankheitsverlauf bei Vorliegen eines infantilen Typs des Morbus Sandhoff.

Abb. 6: Übersicht über das Konzept der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten vektorbasierten Gentherapie der Modellerkrankung Morbus Sandhoff.

Abb.7: Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide p-CAG-*mHexA* und p-CAG-*mHexB*.

Abb.8: Nachweis der RNA-Synthese der vektorkodierten Gene der humanen β -Hexosaminidase A und B in Gehirndothelzellen.

Abb. 9: Vektorbasierte Expression der β -Hexosaminidase A/B verbessert das Überleben sowie die Symptome nach Injektion zu den Zeitpunkten P0/1 sowie P25-30.

Abb. 10: Die vektorbasierte Genexpression der β -Hexosaminidasen A und B in Gehirndothelzellen reduziert die Akkumulation von Glycosphingolipiden in Mäusen mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-}.

Abb. 11: Schematische Darstellung des Konzeptes des „Transcriptional Targeting“.

Abb. 12: Darstellung der Reihenfolge der Elemente, aus denen die Plasmide zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der synthetischen Promotersequenzen zusammengesetzt sind.

Abb. 13: Native Promotersequenzen, die nicht mit dem CMV-Enhancer oder dem kurzen Intron des *Tie2*-Gens kombiniert wurden, führen nur zu einer geringen transkriptionellen Aktivierung nach Lipofektion *in vitro*.

Abb. 14: Kurze genregulatorische Elemente verstärkten die Genexpression nach Transfektion von primären Endothelzellen, die aus Gehirnen von Mäusen isoliert wurden, und mit Plasmiden transfiziert wurden, die eGFP unter der Regulation synthetischer Promotersequenzen exprimieren.

Abb.15: Kurze genregulatorische Elemente erhöhten die relative Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase als Maß für die transkriptionelle Aktivierung in Zellen der Zelllinie hCMEC/D3.

Abb. 16: Analyse der Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von eGFP nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3.

Abb. 17: Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der verwendeten synthetischen Promotersequenzen im Kontext des *Tbx3*-, *Plvap*- und des *Poglut1*-Promoters *in vitro* nach Lipofektion von Zellen der Zelllinie hCMEC/D3.

Abb. 18: Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von eGFP nach Lipofektion von aus Mausgehirnen isolierten primären corticalen Astrozyten.

Abb. 19: Der Einsatz synthetischer Promotorsequenzen im Sinne des „Transcriptional Targeting“ erhöht die Spezifität des Vektors AAV-BR1 für die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke *in vivo*.

Abb. 20: Untersuchung der extracerebralen Genexpression *in vivo* nach intravenöser Injektion von Vektoren (AAV-BR1), die eGFP unter Regulation der synthetischen Promoterkonstrukte S-C-Cdh-W, C-Ocln-W, C-Slc2a1-S-W und C-Slco1c1-W exprimieren.

Abb. 21: Erhebung des Sicherheitsprofils des Vektors AAV-BR1-CAG-NEMO (kurz BR1-NEMO) elf Monate nach Vektoradministration in neonatalen C57BL/6-Mäusen.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die möglichen für die Transduktion eines Organs zu verwendenden AAV-Serotypen.

Tab. 2: Übersicht über die in verschiedenen Vektorsystemen untersuchten genregulatorischen Sequenzen, die zu einer panendothelialen Expression der Reportergene führen.

Tab. 3: Auswahl von 5'-flankierenden regulatorischen Sequenzen mit möglicher Spezifität für Gehirnendothelzellen.

Tab. 4: Informationen zu den im Rahmen der Arbeit verwendeten Promotersequenzen, die hinsichtlich ihrer Endothelzellspezifität untersucht wurden.

Tab. 5: Informationen zu den verwendeten kurzen genregulatorischen Elementen, die zur Verstärkung der Genexpression der oben aufgeführten Promotersequenzen eingesetzt wurden.

Tab. 6: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung der Phusion-DNA-Polymerase.

Tab. 7: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Dephosphorylierung von DNA-Fragment-Enden unter Verwendung der Schrimp Alkaline Phosphatase.

Tab. 8: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Ligation von DNA-Fragmenten unter Verwendung der T4-DNA-Ligase.

Tab. 9: Übersicht über die verschiedenen Protokolle der Transformation zum Einbringen von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen

Tab. 10: Übersicht über die durchgeführten tierexperimentellen Versuche.

Tab. 11: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Überlebensstudien zum Nachweis der Effekte, die nach Administration von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (AAV-BR1), durch die vektorkodierte Genexpression auf Symptome sowie Überleben der Mäuse mit dem Genotyp *Hexb*^{-/-} erzielt werden können.

Tab. 12: Überleben der Mäuse der Versuchsgruppen in der Überlebensstudie 1.

Tab. 13: Überleben der Mäuse der Versuchsgruppen in der Überlebensstudie 2.

Tab. 14: Analyse der in Abbildung 18 dargestellten Daten mittels Two-Way ANOVA.

Tab. 15: Länge der in dieser Arbeit in *in vivo* Untersuchungen verwendeten Promotersequenzen.

8.3 Weitere Anhänge

8.3.1 Abbruchkriterien und Scoring zur Einschätzung der momentanen Belastung aus dem Tierversuchsantrag V 242-7224.122-22 (35-4/18)

Überwachungshäufigkeit: 1x pro Tag

1-2	Bei nur einem Punkt wird das Tier weiterhin einmal täglich (ggf. auch mehrmals) beobachtet. Spätestens bei zwei Punkten wird das Tier dem Projektleiter vorgestellt.
3	Bei 3 Punkten wird das Tier dem Projektleiter vorgestellt.
≥4	Das Tier wird unverzüglich (innerhalb von 20 Minuten nach Entdecken der Symptomatik) schmerzlos in Narkose getötet.

Symptome	Punkte
Körpergewicht, Nahrungs- und Wasseraufnahme	
10 % Gewichtsreduktion über > 2 Tage	2
20 % Gewichtsreduktion	4
Verhalten	
Tier isoliert	1
Tier vermeidet Bewegungen	1
Teilnahmslosigkeit, Ruhelosigkeit	1
Stereotype Bewegungen im Kreis (circling), Stelzgang	1
Automutilation	3
Allgemeinzustand	
Struppiges Fell, ungepflegtes Fell, Augenränder, Piloerektion	1
Verletzungen, Hautveränderungen	1
Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (einzeln oder kombiniert)	1
Verstärkte Atmung	1
Aufgetriebener Leib	2
Schmerz (Gesichtsausdruck, Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen)	3
Kopfschiefhaltung, Parese(n)	3
Postoperative Wundheilungsstörungen, lokale Infektion(en), Abszess(e)	3

Bauch hart oder gespannt	3
Krampfanfälle, Apathie	4
Paralysen, spätestens sobald die Gefahr besteht, dass die Tiere aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen	4
Moribund	4

8.3.2 Sequenzen der untersuchten Promotoren

Verwendete Gensequenz des CAG-Promoters

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAACATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGCA GCGATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGCGGAG AGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGCCCTATA AAAAGCGAAGCGCGGGCGGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCC GCCCGCCCCGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCCGGGTGTAATTAG CGCTTGGTTAATGACGGCTGTGTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGG GGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCGCGCTGCCGGCGGCTGTG AGCGCTGCGGGCGGGCGGGGGCTTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGG TGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGGTC GGTCCGGGTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGG GCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGTGGCGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCC GGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGGCAGCCGAGCCATTGCCT TTTATGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGACTTCTTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGC GCACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCCTTCGTGCGTGC CCGCGCCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG GCGGGGTTCGGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGGCTCTAGACAATTGTACTAACCTTCTTCTTCTCTCTCTGACAGGT TGGTGTACAGTAGCTTCCAC

Verwendete Gensequenz des T81-Promoters

TGTCATTGGCGAATTGAAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGCGGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGA CGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGCA

Verwendete Gensequenz des *Tie2*-Promoters

AGCTTACTAAGATCTAATGAAAATCAAGATGTTAGGCACAGTGCCAGATACCTTAAACATAGTAATATGACTCTTTAGAGT TTTGAGACAGGGCCTCATATAGTTTATGATGAATTCACGTGTTTTGTCAAAGATGACCTTGAACCTTAAATCCATTCCCAA AGTGTGTTGTGCATATGTTTGCACCACCTCTGGCTTCATAGTGTGTTTTAAACACCCATGGAGAGTCGGGTGTGAAGATC CACACGCTCAACCTCAGCATCTGGTGAATCAAGGCAGGAGGGCGGGTGGTTGCAGGCTGGCTATAATATCTAAGTTTCAG TTAGTAAGGGCTGCATAATGAAACACTGTCTTAAACACAAAACAAAACCCATGAAGGAGATACTATTGCCATTTAAAAG TCTCTGGAATGAAATAGCTATCATAATCTTACCTCTGAGCCAGTGTCTGCCCTCAGGTGTGCTGAGGACTGAACAGGG CTATCGACTCCTCAGTTTGAACACATTAAGTCTAGTCTCAGTGTCTGCTCTTACCTGTTAACAGCTGAGTCAGGGTCTGCC CTCAGCTGTGCTGAGGACAGAGCTGAGCTATCTACCCCTGCAGATTGGAAGCATTACAGGCACTCAAGATCAGCCCTGA AGTGATAAAAACCTAAGGCAGAAATCCACCAAGACTAGCAGTGCCCTCCGTGTCTTCTCTGTGGCTGGTGGGAAAGGGAGG GGCAGTCTTCTTGATGCAAGGTCGTGTGTCTAGTGGCATGCTTGCTTCCAGTGCAGGCAAGTGATCACCTGGG TAAGGAAGTTTCAGGTGCCTGAGCTTGTGAGAGAAATTCATCACTCATCCATCACTCTGCTCTGTAGACATAATCACTTC TGTGTTGGTCTTTATAGAGATGATTTATAACTTTGTTGTTTATAGTTTTTATGAATGTGTGTAATTCATTTAGGTCACATGG GAGGTGCACATTTTCAGGTGTCTGTCTTTCCATCACACGGGCTTTGAATTAAACTCAGTCTTGGTTTTACCGGCTGAGCC ATCTCACCTGCCGTGATTTTAAAAATCTCCGGAGTAATCCAAGAGTGTGGTTTATGATTGTAGTATCAACACTCGGGAG GCTGAGGGAGCATCGTTATCATGAGCTCCAGGCTAGTTCCAGGCTTGCCCTAAGCTGTAGAGCAAGTCACTCTCTTAAAAA GTGCCTCTCCCATATTTTGTATATAATTTGCATCTGAAATCTGTTTGCCAAATACTATGAAAT TATTCACATTAATAA ATCTTCTGTGCCAAGTTCTCCAACGAATTAGATCACACTCAGATGAAATGCTAATAAAAAATTAAGCTGTAGCCAGTA

GCATGCGTATATTTGGGCTCAGGGCCAACAGGCAGGCGATCTGGGTGTAAGAAAAAGGCTAATGGCTGTGGAATCTGGT
CTCTAGTGGCTCCGCTGAGAGCTGACCTCAACCACGCTCCCTCAAATGATTGCCTTCCAGGTTATGATTTCTCATCACA
GGAAACTTTGTTGCCAATTCAAACCCCTGTGAGTGAACAAAAACAGGAGAGCAAGTGTGCTCCCGTGCCCAAAGC
CCCTTCTGTCAGGGATCCCAAATGCACCCAGAGAACAGCTTAGCCTGCAAGGGCTGGTCCATCGCATACCATACATA
GGTGGAGGGCTTGTATTCAATTCCTGGCCTATGAGAGGATACCCCTATTGTTCTGAAAATGCTGACCAGGACCTTACT
TGTAACAAAGATCCCTCTGCCCCACAATCCAGTTAAGGCAGGAGCAGGAGCCGGAGCAGGAGCAGAAGATAAGCCTTGGA
TGAAGGGCAAGATGGATAGGGCTCGCTCTGCCCCAAGCCCTGCTGATACCAAGTGCCTTTAAGATACAGCCTTTCCCATC
CTAATCTGCAAAGGAAACAGGAAAAAGGAACTTAACCCCTCCCTGTGCTCAGACAGAAATGAGACTGTTACCGCTGCTTC
TGTGGTGTTCCTTCCGCGCAACTTGTAACAAGAGCGAGTGGACCATGCGAGCGGGAAGTCGCAAAGTTGTGAGTTG
TTGAA

Verwendete Gensequenz des *Cdh*-Promoters

TCGAGACAAaCGCGTAGCTTAGAGCCCCACAGCTACCCCTAGGCTCACAGCTCCTCCGATGAGACCTAGAATTGAGGTA
TGAGTTGAATACCCAGGCAGGTCCAAGGCTTCCACGGGCCAGGCTGACCAGCTGAGGCCGCCACCGTAGGGCTTGC
CTATCTGCAGGCAGCTCACAAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCAGGGGAAAGTGGGCCAGGGCCAGTTGGAAAACCT
GCCTCCCTCCAGCCTGGGTGTGGCTCCCTCTCCCTCTGAGGCAATCAACTGTGCTCTCCACAAAGCTCGGCCCTGG
ACAGACTCTGCAGAAGTTGGTCTGAGGCAGTGGGAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAG
AAACTGGGCTGTGCGAGACAGAGAAGACTCTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTT
TCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCC
TCGACGGTACCGGGGCCG

Verwendete Gensequenz des *Foxq1*-Promoters

TCGAGTTTGCCTGAAGGTAATGCTGCAAAGGAAACAATGGTTTTTAAAAATAGAACAGAGAACTAAATAACATTCATTT
GCAAAACAACCTTAGAGTCAGAACAATTCCTACGCCCCCTGCTCAAAGGTTCTCATCGCTTTTGTGCAAATGCTCA
GAGACACTTTTGGACAGCTCTGCTCACCCATAAGAGGTCAGTAGGTCAGTGTATCCATTTTCTGTTTGCACGGAATG
ACTCCCCAAGGAAAGGAGGGGGTAATAAAAACAATACTGTTATACCAAATAGTTTGTCTCTGATAACTAATACATAG
TTGGTTGGTGATGGACAGAAATATAGTCTACTTCTCTATGAGTTACAAATCCACCACAGAAATATCAAAATCTGCCTTA
AGTCTTTATAAAACAAAACACATAGGGCTCTTGAGAGTGGATATTAGAAAGTGACCTACTTCTACAATTCAGTCAAG
GACTAGCTAGTTTTCAAGGACCAGGTAGCAACTCCTCCTAGCTCCGAGCCTCAGATATGCATTTGCAAGGAGCTTTTCAT
ACCTATTTAGATGGGAAATGTAATCCTTCTCTCAGTAAGGCTATCAAGAACTCGCTTTAAAAATCCCTGAGGG
ATACAGAAATCATTTCTTTCAAAATAGCAATTTGGCTGTGGCAGCCGTTTTCCCATTCAGCAGCACAAGCCTATGGATGCTA
ATGGAGACAGCTAATGCCTTTTTGGTTTTCTGCGGGTGGAGGAAACTTACCATCATCTGTAATTAGTAAAAGAAATAGCA
GAAAGGAGACAATTGCTATAGAAGCTAAACTAAAACACACTAGCAAGTCTGTGAATGAACACCTTGAAGGGGTGATTT
CTGATGTCAAAAATACCTAACACTAACATGGGGTAATGGTGCAGGCTTTACCAGGACATCTCTGTATGAAGAGGAGAA
ATCCACAATAAAGTTCCAGGTGCCACACAACCTTCCCAATCTCTCTTCTGTGGTCTGGATTCTTCTCTGTGCGATGCCT
GGAGCCTCAAACCTCCACAGTAACAAGAATGGCAGTAGCACAAAGATGTTGGATATTAGTCACAAGACCACCTGCTGTGCA
CCAGAGTCTCTTTGACCTCGTCTGCTCACATGAGGCAGAAGTGATTACGTGAAGGCTTTGAAACCCATTTACAGAT
ATCCTGCTGGTCAAGT

Verwendete Gensequenz des *Ocln*-Promoters

AACTGCCACCGAAACTGGCTCCGCGTGCCCTCCCGCGCCTCGCCTCCCAGCCCCGGCGCTCACCTGGGGGACCCCG
GCACCGCACCTGCCTCGCACCCACCTTGGCGGCCGGAATCCCAAGGTGCTCACCTGGCCGGTGCACCTGCCGCGCCCGC
GCTGCCAATCCACAGTTCAACTGAGCCAGGAGGACCGTCTCCGCTTCCCCACCCCCCTACCCCGGGCATGCGCACCAA
TTTCTGGCCGAACCCGCGGGGCTGTGCGCTGGGACCCACTGCGGAGCCCCTAGCCGGTTGCTCCGTGCGCTGGACCG
CTCTCCCGCAACTCCACCGCTGTGCTTAAGGAAAGAGGGCCGGGAGGTGGGCACTAGCGACGAGGTGTGGCGTGGCCA
GCCTCCTCCCTCGGTGACCCATTACCTGAAACTCCGATGGGAGGGGAGGAGCGACGGAAGGAGGCGGGAGGACCG
GGCAGGGCTCACACCCAGCAAGCCGAGTTAAAGGAACAGCACCGACGTTGCCTGGAGAGGGGCGGGGCGTGGCGAG
AGAAGGGTCTCAAGATCGTGGAGGCAATGGGTGATCCTAGACCATTTTGGGTGTGCTCGGAGATACGCTGCTTCAGGG
CCCCTGTGGGGTGTGGTTCCGGGAGGAGTCAAGAGTCAAGAGGAGGAGTGTGTGCTGCTACTCAGAGAGGGTCCAAG
GGCGCTGGAGGCTGATGAGAAGGTCTGAGTCTCTCTCTACTGTGTTCTGCTGCCAGGTTTGATTAATGTCTGGTGA
AAACAGTACCCGATGCTTGGTCCAGCGAAAGAGTGGACTTTTTTTCAGAAGTGCCTATTACTAGCACCTCCGATTCAGAG
GATTCGGAAAAAGACTACCTCTGGTCTGGAGTGGTTAAATGAAGAGAGATTACTGTAGCTGTGTGAGTCAACGGAAT
CCCCAGGCCACAGGGCTTGTCCACGCATGCACGAAACGTAACCTACGGTGTGATTGAGGCTACTCTAAAGGGATTTAA
GCCGTTTCGGTATTCTTTCTGGCTCAAAACAAAACAAGCAACCAATCTGGTTGCTAAGGGTTGATTTTTTTACTCT
GTCTATAACTCTGTTGTTACAGACTTGTGCTGTGTGCGATTGTTGTTGATTTTCATATTCATTTTACTCTACGATATA
GAGATTTTAGTTCTTGTAGTTAACTATCTGCACCGAAGATAGTTAAAT

Verwendete Gensequenz des *Itih5*-Promoters

CCACCATCACACTGCCAACACTCTCTGTGTTTCTATAGACCTCATGATTATTATTGGCTGTCTAACGGGACATATCGTGCC
CTAGGATGGGGCAGCCACTTCCCCATTTTGGTACAGAAAGCCGTTTCTCACCTATCTAGATAGATGGAATTGCCAG
AGACAGAGTATGTCTTTGAGACAACCTGCCTTTTGCCTAAACACATAGCTACATTATTTGTGCACAGGGCAAAAAGACTG
CCCCTCCCCCACACCTACGGTTGCAAAAGGTGAGGCATGGCAGGTTTACCAGGAGTGGTTTTTCTGTGGCAAGTCAAGAA
ATAGAACCACATTCTGTAAATCAAGATACATGCTACTCATTCOCAGCTAAAATCCAAACAGGTTCAAATGTTCTATGTT
CTCAAAGCGAACGCAGGTTCTCTTTTCTGTCTCCAATACCAGAGTTCATCAATAAAATGGGACAATGCAGCTTGTGTG
CCTTAGACCATCAGTTGTCATCTCGTGTATTTGTGACTCTAGCATTGGTGGCAGATACTAAGGGGGGCCCTGTCAAC
TTTAGACTTCAGGTGAGCTTAAAAGCTGATCTGGGCAACAGGAATTATGCAATCCTAAAGCGAAGGAAACCGGGGGAT
GAAGGGTTGGAGTGTATGCTGCGAGCTACAGGCAGAGGAAACAAGTTCCTGAAAGTTTGTGACTGCATGCAGGACA
AAGTTCGCTTCGCTGTGCACTCACTAGGGCAGGCTGGAGTCTTTTCTCCTGGAACCAACATGGGAACCCAGTAGCT
CCTCAAGCTGGAGAGTGGAGTGGTGGCCCTGCAGAAAGCTGGCCTGCGGTCAACCTTGGAGCCAGGGGAGGCAAACTA
GGATCATAGGGATCATAGGGTGAAGTGTGGGCGGAGCCAGGATGCCCTCTAAACTCCCCAAGGGACAGAGAGGCGTGGC
CTGGGGTAGTGGTAGTGCAGGACAGGCGACAGGACTCAGGATGGCCTGAAGGGCATAAAGGGGGCGGGGACATTGATGG
GCGGGGCTTTGGTGGAGGAAAGGCTGGATGCAGCGTGTCTCTGCAGCCGCGGCTCCTCAACTCCCTGAAAAACCTTC
GCTGTCCAGAGAGGTGCGCGCTCTGGCTTCGCCATGCTCCTGCTGCTAGGGCTGTGCTTGGGGTTGCCCTCTTCTCA
GAGTCCCAGGAAGAGGCAAGGAGTTGG

Verwendete Gensequenz des *Slc2a1*-Promoters

GAGGCAGGCTTGCAGTCAGCAGAAGAACTCGGGGGGGGGGGCAAAGTGGTGATCAGGAGAGAGGAGAAGGGGAACC
CCAGACTCACAGTTCACATGCTTTACTTTTTCAGGGTCCATGCTCAATTAGGGTGCCTCCTAGGCCAGCACCTGGCA
CACAGCTCAGCTTCTGTCTTAACAGAAAGTCAATTTCTCCAGATCCCCCTTCAGGTGAACCTAGATGGGACATGGAC
TGGAGGGACCACAGAGGCTATTGACTGTCTACTCACCCTCCAGGAGCTACCTGTAATTTTCATAGCCAGGGTTTGA
TAACAAATCTCATTTTATCCAGGAGAAACCCGCTGCTCATTTGGCTGGGAGCTTGGCCAGGACCAGCTAGAGGCGGTTTAT
AGGTGAGCTGGTTCAATGCCAAGGTGTTCTATGTCCTTAACCATTTAGACACCCAGCCTCTCTGGTCTTCACACTTAGGT
GTCACCATAAAGTCAGAAATGGAGGGAGGTGGTGGTTTTACAGCTTAGAGAAGTGGTGGGCATGGTGTCTAGGAGCAAAA
GAGGAGCTTGGCCTTGGGACAGGAACACGGAGCAAGGAGAGAGAATTCAGCTTCGGAGCCAGACCTCCCGTGGTCTCTC
TAATGAACCTAATGCCACTTTACACATAACACACGCGGTTGTAACACCATCCAAATACTAATCGTTAATCTTCTCTAA
TAACCCAGGAGGTTGTACTATTATTATGACTAGTCTACCAAGTTATCCGGCAGCCTAGTGAGGAAGCCAGAGTCCTAGC
GCTGGCTTACAGCCCCGACCAAGCGCTACCATTTTGCTAGTGGCCATTGAGACTCAGAGAGGTGTGCAAACCAGCTCAG
AGCCACACAGCGAGCGCCCCAACGGGTGCCCGCACACCCTGGGACTGCAGGTTCTAGCATCCAGAGCCAGACTGTGGT
CAGTAGCCCTCCGTCCCTCCCCACCTCCCCACAGAACCACGCTCTCAGAGTCCCGCCCCGAGCTGTCTCCCAAGCCCC
GCCCCCTTCGGGCCACCTTACACCCAGAACCAATGGCGGGCTCTATAAAAAGGCAGCTCCGCGCGCTCTCCCCAAG
AGCAGAGGCTTGTCTGTAGAGTGACGATCTGAGCTACGGGGTCTTAAGTGCCTCAGGGCGTGGAGGTCTGGCGGGAGACG
CATAGTTACAGCGCTCCGTCTCCGCTCAGCAGCCGGCACAGCTAGAGCTTCGAGCGCAGCGCGCCATGGATCCCAGC
AGCAAGGTGAGTAACGGGGCTGGGAGTCCCGGTAGGGATGTGCTGCCGAGCGCGGGCCGGGCGCCTGTCCGA

Verwendete Gensequenz des *Slco1c1*-Promoters

GGACTCCAGTTTCTGGGGATCCAACACCATTCTGACTAGGCGATTATATATGCATGTGGTGCAAATAAACTTATAGAA
ACACATATACATAAAAGCAAAAGTAAAAATGAAAACAACCTGGCTACTCATCGTAAACATTGTGGCAGCTGAAGTTACATC
TGTGATAAAGGCGCCACTGTCTGCTCATTTTGGATTTTTGTTTGGAGTAGATATGACATCATTTAATCTTTGGATATTCC
ATGGAATCTCATTCTGAATAACAAATACATAGCTCAATAGCAGAACATTTGAGATTAGGTGCCCTGCTCAGAGTCACA
GCCCTGGAAGACTAAGTTGAACCTTGGAGAACTCTGGTGACAAATTTACTTACTGGTGGAAATCAAATGGGAAAAA
TCAGTATTTCTCAAATCCTCAAATCAATCTCTTGGGAAGAGGTTTGGTTGAAATTTTTCTCAGAGCAAAGCTTTCTC
TTTCTTAGGCTTAGGTAGTGAAGTAACTGAATGCCAAAAATCCAATGCTATTTGTCAAATTTCAAGGCTCATAGG
GTGTGTGGATGGAGCTATTGATTTTTTTGCTTTGAAAGTGAACCTCCCCGGAAGGATCCTGCAGAGCTTTGATCCTGAC
CTGAAAGTATTTCTGCAGATTCTAGAAGCCCAATGGTGGGAAACAAAGCAGGGAACCTGGCCCAAGATATTTTTTTAA
AAAATAATAGCAAACAATAAATAACAACAACAAGCCGGCCCTTGATGTCCCTTAGGACTGGCTGGCTGGAGACTG
ATTGGAAGGAGAAGGGGAGGGGCTTTTGTACTAACTTCTTCCCTGCCCTGGCTTCTGTTTCTCACCCCCCAACCC
CCTGTGGAATGGTGTCTTTCTGGGATCAGCAAGTAAAAATCACAATGGTCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTATTTCTTG
TTCTCTATAAAACAAGCTTTATCACGTGTGGCCTTAAACTTGTGCTCAAATGCAAAGAAATGGCTCAAAGGCTCCAGCT
CTTTCTGTGCCCTGGGAGCTGAGATGCAGGGCAGTGCCTTCCAGGGTGCCTAATCCCTGCAGACTGCCAGAAAAA
GAGCCAACTGGAAAGACGAAAGAGAAAGACTGCTCAGGGGTGAGATCAGACCTTGGTCTTTTCTTTCTCTGCTGC
CCTGTCTGTGCCACCAGCTCTCTGACTTGCCAGAAGTGTCAACTTCTGTGGGGTGTGCTCAGTTTCTGTTCT
AGACTGTGCTGTGATCCAGACCCTTGCAGAACATTCTGAAAGAACTGGACAGCTT

Verwendete Gensequenz des *Pglyrp1*-Promoters

AAGGCTGTCTGTCTGAATCCCATGTGTGGTGGAGGCATGGGAATGGGAGTCTGACTGGGACAGAAGCCCAGGGACAG
CTCTCCACAAGACCTGAATGAATGTGACCTCTGCACCAGTGTCACTTCTCTCCAGAGCAGAACTGCGATGGTACCAT

TGGGATTAAAGGCGTGCGCCACCACCGCCCGGCCAGGGCTAGTCTCTTGTCCTACTTGTGCCTTAGTTTCCTCTGCGCCT
AGCCACCGGACTGTTAGATAACACGTCCCGGGAGCAGAGGGCACTGTCTGGCCATCTAAAGTGGGGTGTGTGGGGTTGG
AGTGGGAGAGTGGCGGTGGTGGAAACTGAGGCCGGACCAGGCTGGGGAAGCCAGTTCAGTCGTACCCAGTGAGTGCCCC
GCCCTCCACCTATCACAGCTGCCAGACTGTCAGTCAGTTCCCTCAACAGCCTGGGTGGGAGTGTGTGATAACCCACAGT
CCCCATTTCTCTGCGCCAGGAAGGAGCCGGGCAGAGGAAGCATTAAAGAGGAGTAATATAAACTCCCCCTGCCTGGC
GCAGTTCAGATCTGGCCAGGCAGACAACGCCAGACAGTGCGCCCTGTGGACACTGCGCAAATGGGGCTCTCCATGGACCG
CAGCCCATACGCCCGCACGGGGACCAGCAGCGGGCTGCTGGTACTACCTGCGCTATTTCTCTCTCTTCGTGTGCTCA
TTCAGTTCCTCATCATCCT

Verwendete Gensequenz des *Poglut1*-Promoters

ATGATACATAGCTTTAAAAAACGTCCAATTTGCTTTTTGTTGTTTGTGTTTTTTGAGACAGGGTTTCTCTGTATAGCCTT
GGCTGTCTGGAACCTCACTCTGTAGACCAGGCTGGTCTCGAACTCAGATTTCCGCCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCTGGG
ATTAAGGCATGCGCCACCACTGCCTGGCATCCAATTTGTTTATTGATAATCTGGTTTGGTATGGTCTTTTGCAGCCTAT
CACAAACCTCAGTACAAAACAAGGGCTTGTAAACACGGCCTATTTGTGTTATATTGCTAGAAATTCCTATTATAAATGG
ACCTGTGCAACCTTTTGGGACATCCGTTCAATACGATCAATAAATAAGTAGTTTGGTGTCTGGAGTGACCTAGCCAAG
GAATGATTTAACCTAAGCTCTGTGTATAGCTGAAGCACAAAAAACTACCTCCAACCTTCGGTTTGTACAGAACTGAC
CATTATTAATGTGCCACCCGAATGGGCTTCCTGCTGCCTTATTTCCCATGCCAGGCTCCCGGAGGCCTAGGGCGGGCT
CGGCAGCCATCTTTGTGTAGGGCAGCTCCCACGTGCCGTGGCGTCCGCCGCCATCCTTCTGCTGGGCGGGCTTCGCCG
GCGTGCGGGTGGGAATCCGAGTGGTCTGCGGGTGATGGAGCGTCCGGCGGGCTCTCGGCTTAGGGCATGGATGCTGTTA
CTGCTCTGTGCCCGTGCAGGGCCAGAAAGACTCAGGTGGGCTCCGGCGGGGCGGAGCTTACCGCCGCG

9 Abkürzungsverzeichnis

AAP	„assembly activating protein“ Adeno-assoziiertes Viren
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ANOVA	„analysis of variance“
bGHpA	Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal der Rinder
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNS
Cdh	Cadherin
CHE	Schweiz
CMV	Cytomegalovirus
C	CMV-Enhancer
Ct	„cycle threshold“ (PCR)
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ets	E26-Transformation specific family (Transkriptionsfaktorfamilie)
Gal	Galactose
GalNac	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
gp	genomische Partikel
Luc	Firefly-Luciferase
<i>hHEXA</i>	humane Gensequenz der Hexosaminidase A
<i>hHEXB</i>	humane Gensequenz der Hexosaminidase B
JP	Japan
KOR	Korea
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NEMO	essentieller NF- κ -B-Modulator
ITR	Inverted terminal repeats

L	langes Intron
<i>mHexA</i>	murine Gensequenz der Hexosaminidase A
<i>mHexB</i>	murine Gensequenz der Hexosaminidase B
MLC	Myosin light chain
MPS VII	Mukopolysaccharidose Typ 7
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid
Ocln	Occludin
P	Phosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RLuc	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
S	kurzes Intron
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
WHP	Woodchuck Hepatitis Virus
WPRE, W	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
ZNS	zentrales Nervensystem