

7. ZUSSAMENFASSUNG

Die dauerhafte und homogene Expression, das heißt Transkription und Translation, des Transgens ist die Voraussetzung für biologische Untersuchungen, die auf der genetischen Manipulation des Genoms basieren. Sowohl in der Zellbiologie als auch bei der Forschung mit transgenen Tieren wurde in der Vergangenheit jedoch beobachtet, dass die Expression von stabil in das Genom integrierten Genen im zeitlichen Verlauf häufig abnimmt und letztlich völlig zum Erliegen kommt. Dieses Phänomen, auch als *Silencing* bezeichnet, stellt u.a. eine ernsthafte Beschränkung für die Gentherapie dar. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die heterogene Expression des Transgens und das *Silencing* durch epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen verursacht werden. Von diesen sind entweder das Transgen selbst oder die direkte Umgebung des Insertionsortes betroffen. Die epigenetische Kontrolle der Genexpression ist ein Regulationsmechanismus, der z.B. der Positionseffekt-Variegation zugrunde liegt, aber auch der durch Wiederholung des gleichen DNA-Abschnitts induzierten Geninaktivierung (*repeat-induced gene silencing*) und der Pathogen-Abwehr von Wirtszellen. Die epigenetische Kontrolle der Expression des Transgens wird neben anderen Faktoren vor allem durch die Wahl des Promotors und die Eigenschaften des Transgens beeinflusst.

Die in dieser Dissertation präsentierte Arbeit konzentrierte sich anfänglich auf Untersuchungen im Flp-Rekombinase-System. Mit Hilfe der FACS-Analyse (*Fluorescence-Activated Cell Scanning*) sollte erforscht werden, wie sich eine Einzelkopie-Integration auf die Stabilität der Expression eines EGFP-Transgens auswirkt. Nach Insertion der Konstrukte in den FRT-Locus von Flp-In 293-Zellen wurden Stabilität und Homogenität der EGFP-Expression verfolgt. Als Promotoren kamen der virale CMV-Promotor und der Promotor des EF-1-Gens, einem sogenannten *housekeeping gene*, zum Einsatz. Zunächst wuchsen die Zellen unter selektiven Bedingungen. Wurde das Antibiotikum vom Medium entfernt, so kam es zu einer zunehmenden Unterdrückung der Expression des Transgens. Der EF-1-Promotor zeigte im Vergleich zum CMV-Promotor keinerlei Vorteile in der Beibehaltung der transgene Expression. Dieser Zustand besserte

sich nicht, wenn die EGFP-cDNA in den Konstrukten durch eine CpG-freie Version (EGFP^{CpG-}) ersetzt wurde. Desweiteren wurde im Flp-System beobachtet, dass prokaryontische Sequenzen, die als Teil des Transgens in das Genom der Zelle gelangten, offensichtlich zu einer beschleunigten Inaktivierung des FRT-Locus' führten. Interessant war die Beobachtung, dass es zwei unterschiedliche Mechanismen der Geninaktivierung gab. Das System mit dem CMV-Promotor war einem Rheostaten vergleichbar, während das mit dem EF-1-Pomotor einem Ein/Aus-Modus unterlag.

Weiterhin wurde eine neue Methode (*Sorting-Subcloning*) entwickelt, die es ohne den traditionellen Einsatz von Selektionsmarkern ermöglicht, transgene, EGFP-positive Klone zu erzeugen. Dabei werden mit Hilfe des FACS' Integrationsereignisse selektiert, die keiner epigenetischen Modulation unterliegen und damit das Transgen ungehindert exprimieren können. Die Kultivierung der Klone über mehrere Monate zeigte, dass dieser Ansatz zu einer dauerhaften, homogenen und sogar verbesserten Expression des Transgens führte. Außerdem lieferte dieses Experiment Hinweise darauf, dass Protokolle, die mit der herkömmlichen Selektionsmethode arbeiten, häufiger in der Inaktivierung des Transgens enden. Die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse werden die Untersuchung von Transgenen in kultivierten Zellen deutlich erleichtern. Weitere Experimente sind notwendig, um den Mechanismus der epigenetischen Kontrolle von Transgenen zu entschlüsseln. Dies wird die Möglichkeit schaffen, die Transkriptionsprogramme von Transgenen ohne störende epigenetische Effekte zu analysieren