
Vektor-Design: Die funktionelle Organisation der Gene als Lehrmeister

J. Bode¹, K. Nehlsen¹, S. Götze¹, A. Baer¹, S. Akopov², M. Scinteie³, I. M. Stehle³
und H. J. Lipps³

Zusammenfassung

Zu einer Zeit, in der Sequenzinformationen ganzer Genome publik werden, erlangt das funktionelle Verständnis der Gene besondere Bedeutung. Wichtige Fortschritte auf diesem Gebiet folgen aus der Architektur des Zellkerns. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, diese Grundprinzipien für die Entwicklung neuartiger, „Chromosom-basierter“ Vektorsysteme nutzbar zu machen. Von zentraler Bedeutung für unsere Arbeiten sind Ankersequenzen, mit denen unabhängig regulierbare Chromatindomänen mit dem Proteinskelett des Zellkerns verbunden werden, sog. scaffold/matrix attachment elements (S/MARs). S/MARs verfügen über eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, die sie zu wertvollen Werkzeugen bei der Vektorkonstruktion machen. So unterstützen sie die Umschreibung der genetischen Information (Transkription), sie schützen bei entsprechender Anordnung fremdes genetisches Material vor den inaktivierenden Einflüssen des Genoms der Wirtszelle und sie ermöglichen für extrachromosomale Vehikel (Episomen) die Nutzung des zellulären Vielfältigungsapparates (Replikation). Neben der Konstruktion eigenständiger Gendomänen ist es somit gelungen, einen autonom replizierenden Vektor zu konstruieren, der in Abwesenheit von Selektionsdruck über viele hundert Generationen als Episom erhalten bleibt. Dieses Prinzip war bisher nur von Derivaten viraler Genome bekannt, die hierfür jedoch durch ein Onkogen unterstützt werden müssen und daher in ihrer Anwendung eingeschränkt sind. Vermittelt durch das S/MAR Element vereint dieses neuartige Episom eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften, da aktivierende Prozesse (Histonhyperacetylierung) gefördert und – damit gekoppelt – inaktivierende Prozesse (DNA- und Histon-Methylierung) unterbunden werden. Das System findet steigendes Interesse für vielfältige Ansätze, zunächst in den Bereichen Biotechnologie und Gentherapie.

¹ Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Braunschweig, Germany

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123 182, Russia

³ Institut für Zellbiologie, Universität Witten/Herdecke, Witten, Germany

1 Einleitung

Die erfolgreiche genetische Modifikation einer Zelle erfordert die langfristig stabile Übersetzung (Expression) des eingeführten Gens. Vehikel, sog. Vektoren, mit denen therapeutisch relevante Gene eingeführt werden, verbinden sich entweder mit den Chromosomen der Wirtszelle oder sie verbleiben als autonome Einheiten, die durch zelluläre Chromosomen nach dem „Huckepack-Prinzip“ (‘hitchhiking-’oder ‘piggyback- principle’; BODE et al. 2001) an Tochterzellen weitergegeben werden. Derartige Episomen sind im einfachsten Falle ringförmige DNA-Strukturen, deren Verdopplung durch einen Replikationsursprung und deren Weitergabe durch eine chromosomale „Haftsequenz“ ermöglicht wird (LIPPS et al. 2001). Während integrierende Genkopien in ihren Eigenschaften durch die chromosomale Umgebung geprägt werden, die durch klassische Techniken nicht zu beeinflussen ist, und während sie bei ihrer Verbindung mit dem zellulären Genom Mutationen hervorrufen können, sind Episomen als autonome genetische Einheiten im Prinzip frei von solchen Komplikationen (BODE et al. 2002). Klassische Vertreter dieses Typs gehen allerdings nach wenigen Zellgenerationen verloren, da sie nicht gezielt an die Tochterzellen vermittelt werden oder letztlich doch integrieren. Kürzlich konnten wir Erfolge bei der Entwicklung einer Vektorgeneration verzeichnen, bei der die Organisationsprinzipien des Zellkerns Berücksichtigung fanden (PIECHACZEK et al. 1999). Aufbauend auf der Struktur autonom regulierter Gendomänen möchten wir hier wesentliche Schritte auf dem Wege zur Konstruktion nichtviraler episomaler Vektoren beschreiben, die nichtsdestotrotz die Überlebensstrategien von Viren mit einbeziehen.

Berichte, wonach es möglich ist, nackte DNA für die Expression eines übertragenen, sog. „Transgens“ einzusetzen und dieses langfristig aktiv werden zu lassen, sind bislang weitgehend auf Muskelzellen beschränkt und beruhen vermutlich auf den besonderen Eigenschaften dieses Zelltyps, der sein Teilungsvermögen weitgehend eingebüßt hat. Darüber hinaus ist der Status der übertragenen DNA schlecht charakterisiert. In dieser Situation greift man häufig zu viralen Vektoren, wobei es jedoch wiederholt zu Problemen gekommen ist. Nach einem viel beachteten Zwischenfall bei der Verwendung adenoviraler Vektoren (HOLLON 2000) wurde kürzlich berichtet, dass integrierende, retrovirale Vektoren Leukämie auslösen können (LI et al. 2002). Wie oben eingeführt, beruhen neuartige Lösungsansätze zu diesem Problemkreis auf einem vertieften Verständnis regulatorischer chromosomaler Elemente (Abbildung 1).

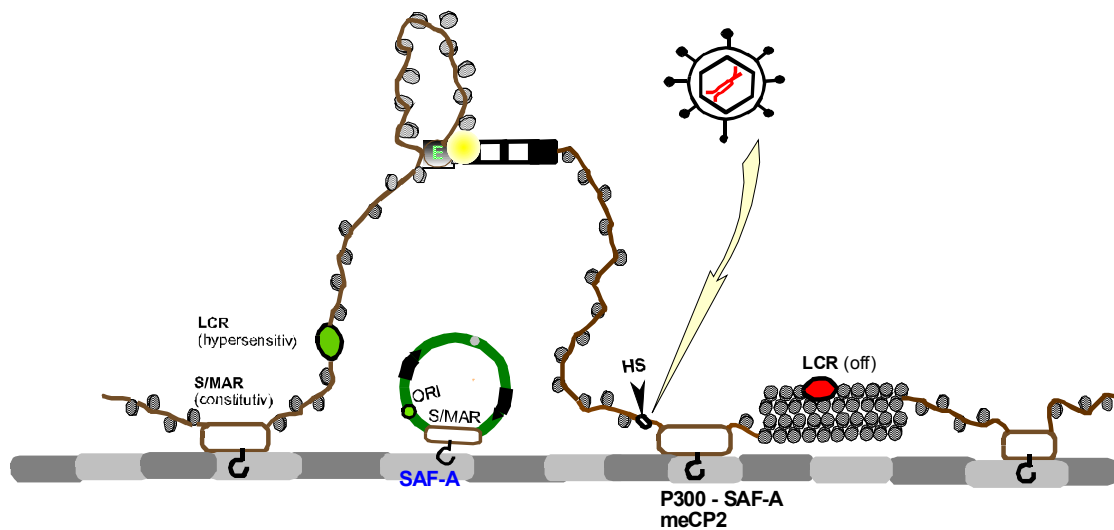


Abb. 1: Architektur und Funktion einer Chromatindomäne. Promotor (P), Enhancer (E), LCRs (locus-control regions in beiden Schalterstellungen; grün: ein; rot: aus) und S/MARs (Haken) als Domänengrenzen. Die Darstellung enthält ein Episom, zusammen mit dem hauptsächlichen Matrix-Interaktionspartner (SAF-A). Im Sinne einer besseren Übersicht (und im Unterschied zur Gendomäne) wird das Episom nicht in nucleosomaler Organisation dargestellt. Die Präferenz von Retroviren für S/MAR-assoziierte Strukturen (HS) ist gezeigt (BODE et al. 2002)

In Eukaryonten erfolgt die Regulation der Expression auf vielen Ebenen. Seit langem ist akzeptiert, dass die Transkription durch Bindung sequenzspezifischer Proteine und deren Wechselwirkung mit der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht wird. Darüber hinaus wird zunehmend deutlich, dass solche Prozesse nur im Kontext der Kernorganisation ablaufen können und eine potenzierende (Chromatin-)Struktur voraussetzen (COOK 1999; JACKSON 2002). Allerdings zeichnet sich auch ab, dass wesentliche Merkmale aktiven Chromatins auf eine überschaubare Zahl aktiver Elemente, nämlich Enhancer, Kontrollregionen ('locus-control regions', LCRs), Isolatoren und Matrix-Haftstellen zurückgehen. Ein Verständnis solcher Elemente und ihrer Kommunikation ermöglicht den Aufbau autonom regulierter genomischer Einheiten (Abbildung 1 sowie BODE et al. 2002).

2 Expressionskontrolle: Ein Konzert mit vielen Spielern

Die Erkenntnis, dass die Verpackungsart (Chromatinstruktur) genomischer Bereiche die wohl wichtigste Voraussetzung transkriptioneller Aktivität darstellt, ist jüngerer Datums. Im Grundzustand liegt DNA in einer stark kondensierten Form vor, die nicht abgelesen

und umgesetzt werden kann. Nur über gezielte Veränderungen dieser Chromatinstruktur lassen sich Gene übersetzen (exprimieren).

2.1 Enhancer: einfach, aber auch komplex

Enhancer sind die Schlüssel für die Aufhebung jeder Chromatin-bedingten Repression. In ihrer aktivierten Form ermöglichen sie als genomische Schaltelemente eine Anhebung der Genaktivität um mehrere Größenordnungen. Ihre Funktion setzt bei höheren Organisationsformen des Chromatins an, das in Form von Schlaufen an ein Kerngerüst geheftet ist. Dieses Gerüst, die sogenannte Kernmatrix, welche zusammen mit dem Cytoskelett und der extrazellulären Matrix ein kontinuierliches strukturgebendes und doch dynamisches Netzwerk bildet, ist an der Weiterleitung extrazellulärer Signalen beteiligt. So bedingen Änderungen in der zellulären Umgebung neue Expressionsmuster.

Jede der (mikroskopisch zu visualisierenden) Schlaufen stellt eine funktionelle Einheit (Gendomäne) dar und kann unabhängig von Nachbardomänen reguliert werden. Dies setzt zunächst zweierlei voraus

- einen zentralen Schalter. Dies ist entweder ein Enhancer oder eine ‚locus-control region‘ (LCR). LCRs beinhalten Enhancer-Elemente und davon unterscheidbare Module. Im Gegensatz zu reinen Enhancern ist ihre Wirkung von der Position in der Domäne und von ihrer Orientierung abhängig;
- Domänengrenzen. Grenzstrukturen (‚bordering elements‘) limitieren die Reichweite der Enhancer und LCRs. Einem klassischen Modell zufolge handelt es sich um relativ ausgedehnte DNA-Sequenzen, die an die Kernmatrix binden, sog. ‚scaffold/matrix attachment elements‘ (S/MARs). In einigen Fällen wurde für diese S/MARs die zu erwartende Isolatorwirkung gezeigt, nach der sie eine Enhancer-Promoter Interaktion unterbinden (ANTES et al. 2001). In anderen Fällen wurden Isolatoren nachgewiesen, die offenbar auf alternativen Wegen zu ähnlichem Ergebnis führen.

Typische LCRs beinhalten neben Enhancer-Elementen Elemente mit Domänen-öffnender Wirkung, Elemente, welche eine Gewebespezifität vermitteln und in vielen Fällen auch S/MARs. Allen gemeinsam ist das Auftreten von DNase I hypersensitiven Stellen, die die lokale Unterbrechung einer regulären Chromatinstruktur anzeigen.

2.2 Domänen-Grenzstrukturen

Wie oben erwähnt, ist eine funktionelle Trennung von Enhancern, LCRs und S/MARs letztlich nicht möglich und sinnvoll. Möglich ist allerdings eine Klassifizierung aufgrund der biochemischen Eigenschaften und biologischen Aktivitäten, die ursprünglich zu ihrer Charakterisierung geführt haben. Alle herkömmlichen Verfahren zur Gewinnung von S/MARs basieren auf der schonenden Extraktion von Zellkernen, welche die löslichen Faktoren (Histone, Transkriptionsfaktoren) beseitigen und lediglich die strukturgebenden

Komponenten des Kerngerüsts (Lamine und Matrone, darunter ‚scaffold-attachment‘-Faktoren, SAFs) zurücklassen. S/MARs sind dann definitionsgemäß jene DNA-Segmente, die am Kerngerüst haften, zusammen mit diesem isoliert werden oder mit hoher Affinität an diese binden. Die Art solcher Prozeduren ist häufig als Artefakt-anfällig disqualifiziert worden. Im vorliegenden Zusammenhang interessiert lediglich, dass das Spektrum biologischer Aktivitäten im Einklang mit dem vorgeschlagenen Modell steht: neben einer Kontext-abhängigen Isolatorwirkung wurden S/MARs, wie erwähnt, in Beziehung zu Enhancern, LCRs und, darüber hinaus, Replikationsursprüngen gebracht. Nur am Rande sei vermerkt, dass das klassische Modell durch neue Präparations und Crosslinking-Methoden Unterstützung erfährt.

2.3 S/MARs als Teil des Transkriptionsapparates

In Transfektionsversuchen zeigt sich die S/MAR Wirkung nicht, bevor das Transgen eine geordnete Chromatinstruktur angenommen hat, was typischerweise eine oder mehrere Replikationsrunden voraussetzt (HÖRTNAGEL et al. 1995; SCHÜBELER et al. 1996). Dies gilt sowohl für integrierende als auch für episomale Systeme (HÖRTNAGEL et al.) und unterscheidet S/MARs von Enhancern. Diese Anhebung transkriptioneller Initiationsraten umfasst mehrere Wirkungsebenen wie die Öffnung der Chromatindomäne, die Entlastung superhelikaler Spannung während der Transkription (BENHAM et al. 1997) und die Bevorzugung besonders geeigneter chromosomaler Integrationsorte. S/MAR-Konstrukte zeigen eine langfristig stabile Expression, offenbar durch Begünstigung der Histon-Hyperacetylierung und (damit verbunden) der Unterbindung von Methylierungsprozessen, sowohl auf DNA- als auch auf Histonebene. Diese Wirkung hat für die Konstruktion retroviraler Vektoren, die ansonsten einem ausgeprägten ‚silencing‘ unterliegen, große Beachtung gefunden (DANG et al. 2000). Besondere Bedeutung scheint hier einem Protein zuzukommen, das zunächst als hnRNP-U, ein an der RNA-Prozessierung und -stabilisierungen beteiligtes Protein beschrieben wurde. Dieses Protein wurde später als prominenter ‚scaffold-attachment factor‘ (SAF-A) bzw. als Protein SP120 wiederentdeckt (KIPP et al. 2000). MARTES et al. (2002) berichten über die Interaktion einer Histon-Acetyltransferase (p300) und SAF-A, welche durch virale Proteine (E1A or SV40 large-T) unterbrochen werden kann. Solche Beobachtungen führten zu der Vorstellung, dass p300 eine Brücke zwischen S/MAR-assoziiertem SAF-A und Promoter-bindenden Faktoren bildet. In dieser Konstellation ist die schnelle Ausbreitung der Histon-Acetylierung und damit die Öffnung der betroffenen Domäne zu erreichen.

2.4 S/MARs und die DNA-Replikation

Vor der Zellteilung beginnt die Verdopplung der DNA bei allen terrestrischen Lebensformen mit der Aktivierung von Replikationsursprüngen (ORIs). Dieser Prozess zeigt weitgehende Gemeinsamkeiten: unter dem Einfluss eines Initiatorproteins (dnaA in *E. coli*, T antigen in SV40, die E1 and E2 Proteine for BPV und EBNA1 in Epstein-Barr Virus) formt sich ein Initiationskomplex der – auf DNA-Ebene – eine weitgehend AT-reiche Um-

gebung voraussetzt. Soche 'base-unpairing regions' (BURs) sind die Stellen, an denen die Strangtrennung beginnt. In Mammalia wird eine solche Funktion von S/MARs übernommen. Der ORI wird daraufhin an die Kernmatrix gelenkt und endgültig aktiviert. (PEMOV et al. 1998; Review: BODE et al. 2001).

2.5 Künstliche Gendomänen

Bis hierher wurden die hauptsächlichen Komponenten zum Aufbau einer künstlichen Chromatindomäne eingeführt, die an nahezu jeder genomischen Position zur vorhersagbaren Expression gebracht werden kann: das Gen unseres Interesses (GOI) befindet sich unter der Kontrolle eines Promoters, der die erforderlich Gewebespezifität vermittelt. Ein Enhancer übernimmt die Überführung des Transgens in ein Kernkompartiment mit aktiver Transkription und schützt dieses vor Inaktivierungsprozessen. Falls diese Prozesse verstärkt werden müssen, ist der Ausbau des Enhancers zum LCR zu erwägen. Schließlich sind diese Prozesse durch S/MARs zu verstärken, die einerseits zur Öffnung der Domäne beitragen, die sie begrenzen und andererseits die Reichweite enhancerartiger Elemente limitieren. Während diese Wechselbeziehungen auf der Ebene kultivierter Zellen wohl untersucht sind, ergaben sich beim Einsatz für gentherapeutische Zwecke unerwartete Schwierigkeiten. Diese sind zum überwiegenden Teil darauf zurückzuführen, dass die Integration von Transgenen mit geringer Effizienz erfolgt und dass ihre Expression auf eine kaum beeinflussbare Zahl an Genkopien zurückzuführen ist. Hierdurch werden zelluläre Verteidigungsmechanismen („repeat-induced silencing“) aktiviert, und die Expression erlischt zumeist nach nur kurzen Zeiträumen (Review: BODE et al. 2002). Diese Erwägungen erklären die unverminderte Anwendung viraler Systeme (Übersicht: Tabelle 1), insbesondere von Retroviren, welche im Rahmen ihrer Überlebensstrategie Wege gefunden haben, ihr Genom als Einzelkopie in transkriptionell bevorzugte Orte zu integrieren. Die gezielte Verbesserung retroviraler Genome aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes wurde vielfältig beschrieben und genutzt (DANG et al. 2000; Review: BODE et al. 2002).

Tab. 1: Gentransfersysteme und ihre Eigenschaften

Transportsystem (Kapazität)	Ursprung	Vorteile	Nachteile
A - Viral			
Retrovirus (RV) (7-7.5 kb)	Murine Leukemia Virus (MLV)	stabile Integration in hochexprimierte genomische Loci	trifft nur proliferierende Zellen. Schneller Expressionsverlust. Gefahr der Insertionsmutagenese. Ermöglicht nur ex-vivo Behandlungen
Lentivirus (7-7.5 kb)	HIV-2/ SIV	stabile Expression auch in nicht-teilenden Zellen	Insertionsmutagenese
Adenovirus (AV) (30 kb)	Adenovirus (Lebendvakzin)	effiziente Überführung; Status überwiegend episodisch	transiente Expression. Möglicher Immunrespons.
Adenoassociated Virus (AAV) (3.5-4 kb)		stabile, gezielte Integration (Chr19); stabile Expression	Immunabwehr; Produktion aufwendig
Virus-like Particles (VLP)		sicher	
B - Nichtviral			
Liposomen-vermittelter DNA-Transfer <i>oder</i> Elektroporation		sicher	niedrige Transfereffizienz
nackte DNA (linear)		in Muskelzellen: stabile Expression	nicht generell anwendbar
nackte DNA (episomal)		Kopienzahl abhängige Expression; kein Silencing; keine Insertionsmutagenese	?

Während derzeit das Schicksal nichtviraler integrierter DNA-Abschnitte noch als nicht kontrollierbar gilt, so soll doch erwähnt werden, dass für murine Stammzellen Methoden entwickelt wurden, die nach dem 'tag and exchange' Prinzip die wiederholte Nutzung charakterisierter genomischer Integrationsstellen erlauben und dies auf der Grundlage einer Einzelkopie. (Reviews: BODE et al. 2000; BAER et al. 2001). Im 'tagging' Schritt wird an bekannten genomischen Orten ein Satz von Erkennungssequenzen für ortsspezifische Rekombinasen (Cre, besser aber Flp-Rekombinase) eingeführt. In einem RMCE (recombinase-mediated cassette exchange) genannten Schritt kann dann zwischen diese Erkennungsstellen (FRT und FRTmut, d.h. ein 'Flp-recombinase target' vom Wildtyp und eine Mutante) jegliche Genkassette eingeführt werden. Beachtet man den gegenwärtigen Erfolg beim somatischen Kerntransfer in Stammzellen und die gelungene Herstellung auch humaner embryonaler Stammzellen (GEARHART 1998) so eröffnen sich hier völlig neue Perspektiven, die schließlich ein therapeutisches Klonen, möglicherweise aber auch missbräuchliche Anwendungen, ermöglichen werden. Einer aktuellen Vision zufolge können die modifizierten Zellen als Quelle zahlreicher Zelltypen und Gewebe dienen.

3 Episomale Vektoren

Nichtvirale Episomen benutzen zwar den Replikationsapparat des Zellkerns und dessen Chromosomen für den Transfer in die Tochterzellen, sie sind darüber hinaus aber autonom. Ihre hauptsächlichsten Vorteile im Vergleich zu alternativen Systemen (Tabelle 1) seien nochmals zusammengefasst:

- sie interferieren nicht mit vorhandenen genomischen Funktionen, da sie nicht integrieren;
- sie unterliegen aus eben diesem Grunde keiner positionsabhängigen Expression, sind in ihren Eigenschaften also vorhersagbar.

In höheren Eukaryonten erfolgt die Replikation in enger Assoziation mit der Kernmatrix, dies ist geradezu die Voraussetzung für einen Eintritt in die S-Phase (COOK 1999). Wohl aus diesem Grunde verfügen alle bisher charakterisierten ORIs über ein S/MAR-Element (DE PAMPHILIS 1999) und es wurden zahlreiche S/MAR-Vektoren konstruiert. Dabei zeigte sich, dass Aufrechterhaltung des episomalen Status im allgemeinen Anlegen eines Selektionsdruckes erfordert. (NIELSON et al. 2000).

In unseren Labors gelang es 1999, für einen SV40-basierten Vektor die Funktionen des 'large T oncogens' durch ein S/MAR Element zu ersetzen, d.h. die notwendigen Faktoren aus dem Repertoire der Wirtszelle zu rekrutieren. Dieser Vektor (pEPI-1) repliziert bei einer mittleren Kopienzahl von 10 in einer wachsenden Zahl von Zelltypen und bleibt typischerweise für mehrere hundert Generationen als Episom erhalten. Wichtige Nachweismethoden, die zu dieser Feststellung führten wurden beschrieben (PIECHACZEK et al. 1999, BAIKER et al. 2000). Weitergehende Studien zeigen, dass die eingeführten

Transgene keinem 'silencing' unterliegen. Dieses Verhalten beruht auf der delikaten Balance aller enthaltenen Elemente (S/MAR, Teile der SV40 Promoter/Enhancer-Kombination, aktiver Transkription und bestimmten Terminationskriterien). Kern-Fraktionierungsmethoden und FISH ('fluorescence-in-situ-hybridization')-Techniken zeigen, dass pEPI-1 über die S/MAR nicht-kovalent mit Metaphase-Chromosomen assoziiert ist. Ein wichtiger Bindungspartner ist offenbar das mehrfach erwähnte prominente Kernmatrix-Protein SAF-A (BAIKER et al. 2000; JENKE et al. 2002).

4 Ausblick

Als Hauptziel Vektor-basierter Zellmodifikationen gilt die langfristige Hochexpression des interessierenden Gens. Traditionelle Expressionssysteme beruhen auf integrierenden Vektoren mit geeigneten Promoter-Enhancer-Kombinationen. Aufgrund von Erkenntnissen über zelluläre Abwehrsysteme gegen Fremd-DNA beginnt sich die Strategie zu wandeln, wobei sich wachsendes Interesse den Systemen zuwendet, die entweder die Integration singulärer Kopien an geeignetem Ort versprechen, oder denen solche Elemente mitgegeben wurden, welche unabhängig vom Integrationsort funktionieren. Derartige Ansätze werden bisher durch Eigenschaften klassischer Gentransfer-Techniken limitiert, da in der Wirtszelle unvorhersagbare Rearrangements auftreten können. Auf diesem Gebiet ist jedoch in dem Maße mit Fortschritten zu rechnen, wie neue Kassetten-Austauschtechniken verfügbar werden (BODE et al. 2000; BAER et al. 2001; BODE et al. 2002). Mittlerweile werden die Charakterisierung chromosomaler Kontrollelemente mit Hilfe viraler Systeme vorangetrieben, die bereits den Wert Chromosomen-basierter Vektoren bewiesen haben, vorausgesetzt, diese funktionieren unter den authentischen topologischen Gegebenheiten des Wirtsgenoms (DANG et al. 2000).

Zur Zeit stellen kleine zirkuläre, nichtvirale episomale Vektoren eine sehr attraktive Alternative dar. Aufgrund ihrer Topologie bieten sie willkommene Minimalsysteme für die Untersuchung chromosomaler Elemente ; eine Anwendung für gentherapeutische Zwecke steht vor der Tür und damit wird wohl auch der Einsatz beim Doping denkbar. Vektoren dieses Typs haben den Vorteil leichter Handhabbarkeit, allerdings mag ihre Klonierungskapazität begrenzt sein. Zweifellos gehört den Chromosomen-basierten Vektoren - integrierend oder episomal - die Zukunft.

Arbeiten in den Labors der Autoren wurden durch Stipendien der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Alfred von Bohlen und Halbach-Foundation und durch einen NATO-Grant gefördert.

5 Literatur

- ANTES, J.T.; NAMCIU, J.S.; FOURNIER, K.R.E.; LEVY-WILSON, B.: The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry* 23 (2001), 6731-6742
- BAIKER, A.; MAERCKER, C.; PIECHACZEK, C.; SCHMIDT, S.B.A.; BODE, J.; BENHAM, C.; LIPPS, H.J.: Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nature Cell Biol.* 2 (2000), 182-184
- BAER, A.; BODE, J.: Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotech.* 12 (2001), 473-480
- BENHAM, C.; KOHWI-SHIGEMATSU, T.; BODE, J.: Stress-Induced Duplex DNA Destabilization in Scaffold/Matrix Attachment Regions. *J. Mol. Biol.* (1997), 181-196
- BODE, J.; SCHLAKE, T.; IBER, M.; SCHÜBELER, D.; SEIBLER, J.; SNEZHKOVA, E.; NIKOLAEV, L.: The transgeneticist's toolbox - novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* 381 (2000), 801-813
- BODE, J.; FETZER, C.P.; NEHLSSEN, K.; SCINTEIE, M.; HINRICH, B.H.; BAIKER, A.; PIECHACZEK, C.; BENHAM, C.; LIPPS, H.J.: The Hitchhiking Principle. Optimizing episomal vectors for the use in gene therapy and biotechnology. *Int. J. Gene Ther. Mol. Biol.* 6 (2001), 33-46
- BODE, J.; GÖTZE, S.; ERNST, E.; HÜSEMANN, Y.; BAER, A.; SEIBLER, J.; MIELKE, C.: Architecture and utilization of highly-expressed genomic sites. In: MAKRIDES, S. (ed.): *New Comprehensive Biochemistry - Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam 2002 (in press)
- COOK, P.R.: The organization of replication and transcription. *Science* 284 (1999), 1790-1795
- DANG, Q.; AUTEN, J.; PLAVEC, I.: Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* 74 (2000), 2671-2678
- DEPAMPHILIS, M.L.: Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction. *Bioessays* 21 (1999), 5-16
- GEARHART, J.: New potential for human embryonic stem cells. *Science* 282 (1998), 1061-1062
- HOLLON, T.: Seeking Safer Treatment: Gutless adenovirus vectors optimized for better gene therapy. *The Scientist* 14 (2000) 7
<http://www.the-scientist.com/yr2000/apr/research1-000403.html/>
- HÖRTNAGEL, K.; MAUTNER, J.; STROBL, L.J.; WOLF, D.A.; CHRISTOPH, B.; GELTINGER, C.; POLACK, A.: The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation. *Oncogene* 10 (1995), 1393-1401
- JACKSON, D.A.: Chromosome structure and nuclear architecture: implications for gene therapy. *Curr. Op. Mol. Ther.* (2002) (in press)

- JENKE, B.H.; FETZER, C.P.; STEHLE, I.M.; JÖNSSON, F.; FACKELMAYER, F.O.; CONRADT, H.; BODE, J.; LIPPS, H.J.: An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Reports* 3 (2002) 4, 349-354
- KIPP, M.; GOHRING, F.; OSTENDORP, T.; van DRUNEN, C.M.; van DRIEL, R.; PRZYBYLSKI, M.; FACKELMAYER F.O.: SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000), 7480-7489
- LI, Z.; DÜLLMANN, J.; SCHIEDLMEIER, B.; SCHMIDT, M.; von KALLE, C.; MEYER, K.; FORSTER, M.; STOCKING, C.; WAHLERS, A.; FRANK, O.; OSTERTAG, W.; KÜHLCKE, K.; ECKERT, H.G.; FEHSE, B.; BAUM, C.: Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296 (2002), 497
- LIPPS, H.J.; BODE, J.: Exploiting chromosomal and viral strategies: The design of safe and efficient non-viral gene transfer systems. *Curr. Op. Mol. Ther.* 3 (2001), 133-141
- MARTES, J.H.A.; VERLAAN, M.; KALKHOVEN, E.; DORSMAN, J.C.; ZANTEMA, A.: Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound to acetylated nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002), 2598-2606
- NIELSEN, T.O.; COSSONS, N.H., ZANNIS-HADJOPOULOS, ???; PRICE, G.B.: Circular YAC vectors containing short mammalian origin sequences are maintained under selection as HeLa episomes. *J. Cell Biochem.* 76 (2000), 674-685
- PEMOV, A.; BAVYKIN, S.; HAMLIN, J.L.: Attachment to the nuclear matrix mediates specific alterations in chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 25, 14757-14762
- PIECHACZEK, C.; FETZER, C.P.; BAIKER, A.; BODE, J.; LIPPS, H.J.: A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucl. Acids Res.* 27 (1999), 426-428
- SCHÜBELER, D.; Mielke, C.; MAASS, K.; BODE, J.: Scaffold/matrix- attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* 35 (1996), 11160-11169

