

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Fachbereich Biologie

Untersuchungen kombinierter DNA-Protein-Transduktion
zur Optimierung nicht-viralen Gentransfers

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Alexander Bohla

aus

Ingolstadt

- 2011 -

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Wolf-Michael Weber
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Carsten Rudolph
Tag der mündlichen Prüfung:	6. April 2011
Tag der Promotion:	8. April 2011

Für Melanie

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an PD Dr. Carsten Rudolph, der mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, und der mich durch seine Begeisterung für die Forschung und seinen unerschütterlichen Optimismus immer wieder aufs Neue motiviert und inspiriert hat. Die konstruktive Zeit in seinem Labor und auch die Möglichkeit, meine Arbeit auf internationalen Konferenzen zu präsentieren und diskutieren waren eine sehr wertvolle Erfahrung für mich.

Ebenso danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolf-Michael Weber für seine Unterstützung, die netten Treffen und die Betreuung dieser Arbeit von Münster aus.

Vielen Dank auch an alle Mitglieder des Prüfungskomitees.

Meinen lieben Kollegen aus der AGGEN möchte ich für ihre Unterstützung und die angenehme Atmosphäre danken, insbesondere meiner Kellercrew Christoph Maucksch und Elisabeth Hennen für ihre Hilfe und Freundschaft, aber auch Anne Himmel, Corinna Pfeifer, Günther Hasenpusch, Manish Aneja, Marta Illenyi, Michael Kormann, Rabea Imker, Senta Üzgün und allen anderen für eine tolle Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Meinen Eltern und meinem Bruder Andy danke ich für ihre Unterstützung und Förderung in all den Jahren.

Mein ganz besonderer Dank geht an die Meine Melli für ihre Liebe, ihre Geduld und den kompromisslosen Rückhalt.

1. Einleitung	1
1.1 Gentherapie im Überblick	1
1.2 Vektoren der Gentherapie	3
1.2.1 Virale Vektoren	3
1.2.2 Nicht-viraler Gentransfer	6
1.3 Nicht-virale Integrationssysteme.....	12
1.4 Proteintransduktionsdomänen	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien.....	20
2.1.3 Antikörper	21
2.1.4 Enzyme	22
2.1.5 Oligonukleotide	22
2.1.6 Plasmide	24
2.1.7 Medien.....	26
2.1.8 Puffer.....	27
2.1.9 Verbrauchsmaterial	28
2.1.10 Kommerzielle Kits	28
2.1.11 Organismen	29
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	31
2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	34
2.2.3 Expression von Φ C31-Integrase-Protein.....	40
2.2.4 PAGE und Western Blot.....	41
2.2.5 Luziferase-Reportergen-Assay	42

2.2.6 Durchflusszytometrie	43
2.2.7 Bandshift-Assay	43
2.2.8 Konfokalmikroskopie	43
2.2.9 Statistik.....	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Expression der Φ C31-Integrase in E. coli.....	45
3.1.1 Design der kodierenden Sequenz der Φ C31-Integrase	45
3.1.2 Klonierung in pET-20b	46
3.1.3 Klonierung in pGS-21a.....	47
3.1.4 Expression und Aufreinigung	50
3.2 Funktionelle Charakterisierung	55
3.2.1 In vitro Rekombinationsassays	55
3.2.2 Bandshift Assay	65
3.2.3 Genomische Transgenintegration mittels rekombinanter Φ C31-Integrase	67
3.2.4 Subzelluläre Lokalisation.....	85
4. Diskussion	91
5. Zusammenfassung	99
6. Literaturverzeichnis	101
7. Lebenslauf.....	113
8. Publikationen	115

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindeaminasemangel
Amp	Ampizillin
<i>attB</i>	bakterielle attachment site
<i>attP</i>	Phagen-attachment site
bidest	doppelt destilliert
BMI1	polycomb ring finger oncogene
bp	Basenpaar
br-PEI	branched PEI
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
cds	coding sequence
Cl ⁻	Chloridanion
Cre	Causing recombination
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOGS	Diocetylaminoglycylspermin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSPA	2,3 Dioleyloxy-N-[2[Sperminkarboxaminino]ethyl]-N,N-dimethyl-1-Propanaminitrifluoroacetat
DOTAP	1,2-Dioleyl-3-Trimethylammoniumpropan
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EF1 α	Elongation Factor 1 α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
H ⁺	Wasserstoffkation
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horse radish Peroxidase
HSV1	<i>Herpes simplex</i> Virus I
IMAC	immobilisierter Metallaffinitätschromatographie
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	inverted repeat
kb	kilobasen
kDa	Kilodalton
I-PEI	linear PEI
LB	Luria-Bertani
LMO2	LIM domain only 2
MEM	Minimum Essential Medium
miRNA	Mikro-RNA
mM	millimolar
MMLV	Murines Moloney Leukämie Virus
mRNA	Messenger-RNA
N/P	Nitrogen/Phosphate
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimin

Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PTD	Proteintransduktionsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SB	Sleeping Beauty
SCID	Schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering RNA
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAT	Transactivator of Transcription
U	Unit
V	Volt
w/v	Weight/Volume
X-SCID	X-chromosomale schwere kombinierte Immundefizienz
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1 Gentherapie im Überblick

Als relativ junges Feld der Medizin verfolgt die Gentherapie die Behandlung von Krankheiten mit genetischem Material in Form von Nukleinsäuren. Hierbei können entweder Körperzellen, sogenannte somatische Zellen, oder Ei- bzw. Samenzellen, als Zellen der Keimbahn, behandelt werden. Während in der somatischen Gentherapie der Effekt der Behandlung auf das jeweilige Individuum beschränkt bleibt, bewirken erfolgreich behandelte Zellen der Keimbahn eine Weitergabe des therapeutischen Effekts auf die Nachkommen. Aufgrund aus ethischen Gesichtspunkten auferlegter Beschränkungen (in Deutschland: § 5 Embryonenschutzgesetz (ESchG)) werden derzeit ausschließlich autosomale Zellen, vornehmlich Stammzellen, für gentherapeutische Zwecke verwendet. Auch die Nutzung embryonaler Stammzellen unterliegt gewissen Grenzen, so dürfen nur vor dem 1. Mai 2007 gewonnene Zellen verwendet werden. Daher ist die Umprogrammierung von Zellen zu sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) als Alternative zur Zeit ein intensiv erforschtes Gebiet.

Auto- oder gonosomal rezessiv vererbte, monogenetische Krankheiten wie z. B. zystische Fibrose, Duchenne'sche Muskeldystrophie oder schwere Immundefizienzsyndrome (SCID) (134 Studien), aber auch Krebs sind das Ziel von gentherapeutischen Ansätzen, mit 1060 Studien bis zum Juni 2010 (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Eine der ersten Studien wurde 1990 an zwei Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz aufgrund von Adenosindeaminasemangel (ADA-SCID) durchgeführt (Blaese, Culver et al. 1995). Polygenetisch bedingte Krankheiten wie Diabetes sind dagegen schwerer zu behandeln, da in diesen Fällen nicht nur ein Gen oder Genprodukt ersetzt werden muss, hier spielen komplexe Expressionsmuster eine Rolle. Die Behandlungsmöglichkeiten in der somatischen Gentherapie gehen allerdings über die Korrektur eines defekten Gens hinaus. Ebenso können zusätzliche, intakte Genkopien eines beschädigten oder fehlenden Gens eingebracht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Herabregulierung der Genexpression pathogener Genprodukte mittels siRNA oder miRNA.

Es werden zwei grundsätzliche Arten der Gentherapie von Zellen unterschieden, die sich auch durch die Natur der zu behandelnden Krankheit ergeben: Bei der *in vivo*-Behandlung wird das genetische Material in den Organismus appliziert. Dies geschieht vorzugsweise nahe dem zu behandelnden Organ durch Injektion in Gewebe oder ein Gefäß und wurde z. B. bereits in der Krebstherapie (Adams, McCarthy et al. 2009) oder zur Behandlung von zystischer Fibrose (Conese and Rejman 2006; Conese, Gioia et al. 2008) angewandt. Eine andere Möglichkeit ist die der *ex vivo*-Therapie. Dabei werden dem Körper des Patienten Zellen entnommen und nach erfolgreicher Behandlung wieder reimplantiert. Diese Form der Therapie wurde u.a. schon bei Hautkrankheiten (Warrick, Bergoglio et al. 2008) oder schweren Immundefizienzen (Cavazzana-Calvo and Fischer 2007) angewandt.

Neben erfolgreichen Studien musste die Gentherapie aber auch einige schwere Misserfolge hinnehmen. Bereits 1999 starb ein Patient mit Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz während einer Studie an einer schweren Entzündungsreaktion als Resultat der Therapie mit einem adenoviralen Vektor (Raper, Chirmule et al. 2003). In einer Studie zur Therapie des schweren kombinierten Immundefekts (X-SCID) wurden zunächst 10 Kinder retroviral behandelt, 9 davon erfolgreich mit ganzer oder teilweiser Wiederherstellung der T- und Natürlichen Killer (NK-)-Zellen, deren Fehlen charakteristisch für diese Krankheit ist. Ursache ist der Defekt oder die Defizienz der γ c-Zytokinrezeptoruntereinheit (Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey et al. 2000). Vier der Patienten erkrankten jedoch nach 3 Jahren an Leukämie, von denen drei wiederum mit Hilfe von Chemotherapie erfolgreich behandelt werden konnten. Ein Patient starb an den Folgen der lymphoproliferativen Erkrankung. Es stellte sich heraus, dass die retrovirale Therapie zur Integration in die Promotorregionen der Protoonkogene LMO2, BMI1 und CCND2 und zudem zur Deletion von Tumorsuppressorgenen und chromosomalen Translokationen geführt hatte (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003; Thrasher, Gaspar et al. 2006; Hacein-Bey-Abina, Garrigue et al. 2008). Nach diesen Vorkommnissen wurden diese Studien zunächst gestoppt. Inklusiv einer ähnlichen Studie in London wurden 17 von 20 X-SCID-Patienten jedoch erfolgreich behandelt (Cavazzana-Calvo and Fischer 2007).

1.2 Vektoren der Gentherapie

Das wichtigste Werkzeug der Gentherapie sind Vektoren, um genetisches Material wie Nukleinsäuren in den Zielorganismus einzubringen. Hierbei können virale und nicht-virale Vektoren als die zwei Hauptklassen unterschieden werden. Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren stellen die in der Gentherapie am häufigsten verwendeten Systeme dar. Daneben wurden auch Herpes-, Pox- und Vacciniaviren bereits für gentherapeutische Zwecke verwendet. In der nicht-viralen Gentherapie werden neben der Anwendung physikalischer Methoden wie z. B. Injektion nackter DNA oder Elektroporation vor allem Lipo- und Polyplexe eingesetzt. Um die genomische Integration der eingebrachten Transgene zu erzielen, werden auch Rekombinasen viralen Ursprungs oder Transposasen getestet (siehe auch 1.3).

1.2.1 Virale Vektoren

Viren sind definitionsgemäß Partikel, die ihre Erbinformation in die Zellen von Wirtsorganismen einbringen und sich dort replizieren. Sie bestehen aus einzel- oder doppelsträngiger RNA oder DNA, welche von einer Hülle umgeben sein kann. Modifizierte humanpathogene Viren als Vektoren präsentieren eine potente Methode des Gentransfers im Rahmen der gentherapeutischen Anwendung. Diese Viren wurden teilweise ihrer Replikations- oder Integrationsfähigkeit beraubt und angepasst, um Zellen im entsprechenden Gewebe eines Patienten zu transduzieren und dort ein therapeutisches Transgen zu platzieren. Der große Vorteil von Viren im Rahmen der Gentherapie besteht in der hohen Transduktionseffizienz.

1.2.1.1 Adenoviren

Adenoviren sind unbehüllte, ikosaedrische Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom von 26 bis 45 kb Größe. Es gibt sechs Subgenera (A -F), die 51 Serotypen

umfassen. Ziel dieser Viren sind vor allem die oberen Atemwege. Die bevorzugt in der Gentherapie verwendeten Adenovirus-Subtypen sind Ad2 und Ad5. Adenoviren können sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen transduzieren, sie integrieren jedoch nicht in das Wirtsgenom und persistieren somit nur episomal. Das Transgen wird somit langsam durch Zellteilung herausverdünnt. Die ersten exprimierten Gene des Adenovirusgenoms sind unter anderem zuständig für Transkriptionsaktivierung, zelluläre Transformation und virale DNA-Replikation (Volpers and Kochanek 2004). Zur Verringerung immunogener Reaktionen wurden einige dieser E1 bis E4 genannten frühen Gene deletiert, daraus resultierten drei Generationen an therapeutischen Adenoviren (Gao, Yang et al. 1996). Der ersten Generation fehlen E1 und teilweise auch E3. Diese Adenoviren, fast vollständig replikationsdefizient, verursachen jedoch immer noch Immunreaktionen (Engelhardt, Yang et al. 1993; Rich, Couture et al. 1993). Deletion von E2a oder E4 charakterisieren die zweite und dritte Generation, welche sich durch reduzierte Immunogenität und höhere Stabilität des Transgens auszeichnen, infizierte Zellen exprimieren weniger Virusprotein und werden seltener von zytotoxischen T-Zellen eliminiert (Engelhardt, Ye et al. 1994; Andrews, Kadan et al. 2001). Bei sogenannten Helfer-abhängigen Adenoviren werden die entfernten Mechanismen und Funktionen durch einen Helfervirus bereitgestellt. Sie sind jedoch aufwändig in der Produktion (Alba, Bosch et al. 2005).

1.2.1.2 Adeno-assoziierte Viren

Die nicht pathogenen, unbehüllten Adeno-assoziierten Viren (AAV) besitzen ein Genom aus einzelsträngiger DNA von etwa 4,7 kb, das nur zwei Gene umfasst (Young, Searle et al. 2006). Ihr aus verschiedenen Phasen bestehender Lebenszyklus umfasst eine replikative Phase, die die Koinfektion eines Adeno- oder Herpesvirus erfordert, und eine latente Phase, in welcher sich das AAV in das Chromosom 19 des Wirtsgenoms integriert (Buning, Perabo et al. 2008). Diese spezifische Integration von AAV ist ein großer Vorteil für die gentherapeutische Anwendung. Es existieren verschiedene Subtypen, die unterschiedliche Tropismen für Zielgewebe aufweisen. AAV-5 zeigt eine Affinität für Atemwege, während AAV-6

sehr gut von Muskelzellen aufgenommen wird und AAV-8 bevorzugt in Leberzellen transduziert (Young, Searle et al. 2006). Nachteile von AAV als Gentherapievektor sind jedoch seine beschränkte Kapazität von 4,9 kb, was für viele Anwendungen zu wenig ist, und die weit verbreitete Präsenz von neutralisierenden Antikörpern aufgrund einer hohen Durchseuchung (Chirmule, Propert et al. 1999). Der starken humoralen Antwort auf die Gabe von AAV kann möglicherweise durch Einsatz verschiedener Serotypen begegnet werden.

1.2.1.3 Herpesviren

Herpesviren wie das *Herpes simplex*-Virus aus der Unterfamilie der *Alphaherpesvirinae* sind behüllte, doppelsträngige DNA-Viren mit einem relativ großen Genom von ca. 150 kb. Sie replizieren in Epithelzellen und persistieren daraufhin z. B. in Neuronen (Kennedy 1997). Während der latenten Phase besteht das HSV-Genom episomal in der Zelle, es integriert also nicht in das Wirtsgenom (Rock and Fraser 1983). Einige für die Virusreplikation essentielle Proteine des *Herpes simplex I*-Virus (HSV1) besitzen Ähnlichkeit mit Enzymen, die in ruhenden Zellen nicht zu finden sind, aber in sich stark teilenden Zellen hochreguliert sind. Diese Proteine sind auch in Krebszellen stark präsent, und modifizierte HSV1, welche diese Proteine nicht besitzen, können sich speziell in Tumorzellen vermehren (Young, Searle et al. 2006). Aufgrund ihrer Eigenschaften sind Herpesviren für die Krebstherapie oder den Einsatz im zentralen Nervensystem geeignet. So bestehen z. B. Studien zur Behandlung von malignen Gliomen mit HSV1 (Markert, Parker et al. 2006).

1.2.1.4 Retro- und Lentiviren

Retroviren gehören zur Gruppe der behüllten Viren mit einzelsträngigem, 7 - 12 kb umfassendem RNA-Genom. Sie sind unter anderem unterteilt in Lentiviren,

onkogene Retroviren und Spumaviren. Ihr Genom enthält vier Gene: *gag* kodiert für Matrix- und Kapsidproteine, *pro* und *pol* für Enzyme wie Proteasen, reverse Transkriptase (RT) oder Integrasen, und *env*, das für Hüllproteine kodiert. Die reverse Transkriptase übersetzt das Virusgenom in DNA, die dann als Prophage in die Wirts-DNA integriert wird (Young, Searle et al. 2006; Schaffer, Koerber et al. 2008). Die in der Gentherapie hauptsächlich verwendeten Retroviren sind der Murine Moloney Leukämie Virus (MMLV) oder auch der Humane Immundefizienz-Virus (HIV), der zur Unterfamilie der Lentiviren gehört. Diese sind, im Gegensatz zu den anderen Retroviren, in der Lage, neben sich teilenden Zellen auch ruhende Zellen zu befallen. Der Nachteil der Retroviren als Genvektoren liegt in ihren integrierenden Eigenschaften, die zu den bereits beschriebenen fatalen Folgen durch insertionelle Mutagenese im Rahmen von Gentherapiestudien geführt haben (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003; Bushman 2007).

1.2.2 Nicht-viraler Gentransfer

Neben den viralen Genvektoren sind die nicht-viralen Gentransfersysteme der zweite Arm der gentherapeutischen Werkzeuge. Physikalische Methoden wie Elektroporation oder hydrodynamische Injektion nackter DNA gehören ebenso zu den nicht-viralen Transfektionssystemen wie Lipo- und Polyplexe. Diese Ansätze teilen den Vorteil der geringeren Immunogenität im Vergleich zu den viralen Systemen. Zudem besteht eine geringere Wahrscheinlichkeit der insertionellen Mutagenese. Der große Nachteil liegt jedoch in der geringen Effizienz und Persistenz dieser Gentransfermethoden. Nicht-virale Integrationssysteme wie Rekombinasen oder Transposasen werden daher untersucht, um diesen Nachteil wenigstens teilweise auszugleichen.

1.2.2.1 Physikalische Methoden

Die einfachste Methode, um Erbinformation in einen Organismus einzubringen, besteht in der Injektion nackter DNA, wie es schon früh in Zellkultur durch Mikroinjektion, aber auch *in vivo* demonstriert wurde (Capecchi 1980; Fazio, Fazio et al. 1994). Dies umfasst ebenso die effektive Transfektion von Hepatozyten durch hydrodynamische Injektion eines großen Volumens (entsprechend 8 - 10 % Körpermasse) an DNA-Lösung innerhalb einiger Sekunden in die Schwanzvene von Nagern (Liu, Song et al. 1999; Zhang, Budker et al. 1999; Song, Liu et al. 2002). Mit dieser Technik konnten auch andere Organe wie z. B. Gehirn, Muskel oder Pankreas erfolgreich transfiziert werden (Liang, Nishikawa et al. 2004; Bradley, Rastellini et al. 2005; Hino, Yokota et al. 2006).

Eine weitere, häufig angewandte Methode ist die Elektroporation oder Elektropermeabilisierung (Rols 2006). Hier wird durch Anwendung elektrischer Pulse eine kurzzeitige Permeabilisierung der Zellmembran erreicht, währenddessen können Moleküle wie DNA oder Proteine in die Zelle eindringen (Golzio, Rols et al. 2004). Diese Technik ist sehr effizient für die *in vitro* oder *ex vivo* Behandlung von Zellen. Auch *in vivo* Szenarien wie die Elektrochemotherapie oder Elektrogentherapie, z. B. in die Haut, bedienen sich der Elektroporation (Belehradek, Domenge et al. 1993; Bloquel, Fabre et al. 2004). Während diese Methode bereits weit verbreitet ist, sind die Grundlagen immer noch nicht vollständig verstanden. So sind die primären Poren, die sich durch Anwendung des elektrischen Feldes in der Zellmembran bilden sollen, noch nicht unmittelbar beobachtet worden, manche ziehen daher den Begriff Elektropermeabilisierung vor (Escoffre, Portet et al. 2009). Eine Weiterentwicklung ist die Nukleofektion. Hierbei können durch Anwendung bestimmter Feldparameter in Kombination mit speziellen Puffern Nukleinsäuren direkt in den Zellkern geschleust werden (Gresch, Engel et al. 2004). Das eröffnet die Möglichkeit, auch ruhende oder sich langsam teilende, sonst schwer transfizierbare primäre Zellen effizient zu erreichen.

Neben elektrischen wurden bereits auch Magnetfelder genutzt, um mit Plasmid-DNA beladenen, magnetischen Nanopartikeln mittels Magnetofektion Gentransfer, z. B. in Atemwegsepithel, zu erreichen (Gersting, Schillinger et al. 2004).

Zu den physikalischen Transfektionsmethoden zählt weiterhin der ballistische Gentransfer (*gene gun*). Ursprünglich wurden plasmidassoziierte Mikropartikel mit dieser Methode auf Pflanzen geschossen, dies wurde aber auch *in vitro* mit Zellen und *in vivo* mit Haut oder auch subdermalen Geweben etabliert (Dileo, Miller et al. 2003; Kitagawa, Iwazawa et al. 2003).

1.2.2.2 Lipide

Kationische Liposomen, wie sie zum Gentransfer eingesetzt werden, bestehen aus einem kationischen Lipid und einem neutralen Kolipid. Die positiv geladenen Lipide, bestehend aus einer positiv geladenen Kopfgruppe verbunden mit hydrophoben Ankergruppen, interagieren mit der negativ geladenen DNA, die resultierenden Komplexe aus Plasmid-DNA und Liposomen bezeichnet man im Allgemeinen als Lipoplexe. Als erstes Lipid zur Transfektion wurde 2,3-Di[oyleyl]oxipropyl-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) näher beschrieben (Felgner, Gadek et al. 1987). Weitere Lipide sind z. B. 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP), 2,3 Dioleyloxy-N-[2[Spermincarboxaminino]ethyl]-N,N-dimethyl-1-Propanaminitrifluoroacetat (DOSPA) oder Dioktadecylaminoglycylspermin (DOGS). Letztere besitzen mehrere protonierbare Amine in der Kopfgruppe und sind daher effektiver bei der Kondensierung von DNA. Mit steigender Ladung nehmen jedoch die Interaktion mit DNA und Mizellenbildung zu, was sich negativ auf die Transfektionseffizienz auswirkt (Behr, Demeneix et al. 1989; Ferrari, Nguyen et al. 1998). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass eine Kombination aus DOPE und einem kationischen Lipid, wie z. B. DOTMA, erfolgreicher transfizieren als ausschließlich kationische Lipide (Hui, Langner et al. 1996). Die Aufnahme der Lipoplexe erfolgt größtenteils über Endo- oder Pinozytose (Wrobel and Collins 1995). Dabei bestimmt die Partikelgröße maßgeblich die Art der Aufnahme. Während kleinere Partikel (< 200

nm) vornehmlich über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zellen und damit schnell in Lysosome gelangen, werden größere Komplexe über Caveolae-vermittelte Endozytose aufgenommen (Ross and Hui 1999). Dieser langsamere Vorgang könnte helfen, lysosomale Degradation zu vermeiden, da die DNA eher aus den Endosomen ins Zytoplasma gelangt (Xu, Hui et al. 1999). Einmal aus dem Endosom, muss die DNA noch in den Zellkern gelangen, dies ist bei aktiven, sich teilenden Zellen einfacher als bei ruhenden. Lipoplexe wurden bereits erfolgreich in *in vivo*- und klinischen Studien, z. B. für Cystische Fibrose getestet (Hyde, Gill et al. 1993; Hyde, Southern et al. 2000).

1.2.2.3 Kationische Polymere

Unter den Werkzeugen des nicht-viralen Gentransfers sind kationische Polymere wertvolle Instrumente. Durch die positive Ladung ihrer Amine sind sie in der Lage, die negativ geladenen Nukleinsäuren zu kondensieren und gleichsam zu maskieren, um den zellulären Eintritt der daraus resultierenden Polyplexe zu ermöglichen. Die weiteren Eigenschaften der Polymere wie Verzweigungsgrad, Kettenlänge oder auch das Verhältnis von DNA und Polymer zueinander, das in Stickstoff des Polymers zu Phosphat der DNA (N/P) definiert wird, bestimmen Eigenschaften der Polyplexe wie Größe, Bindungsstärke oder Nettoladung.

Poly-L-Lysin (PLL, Abbildung 1.1) ist eines der ersten und bisher mit am besten untersuchten Polymere für den Gentransfer, seit die Komplexbildung von PLL und Nukleinsäuren näher beschrieben wurde (Laemmli 1975). Es ist ein aus der Aminosäure Lysin bestehendes Polypeptid und daher gut bioabbaubar, was dem Einsatz *in vitro* und *in vivo* zugute kommt. Die Aufnahme von PLL-Polyplexen ist vergleichbar mit der anderer Polymere wie z. B. Polyethylenimin (PEI), jedoch ist die Transfektionseffizienz wesentlich geringer, was auf den fehlenden Protonenschwammeffekt zurückzuführen ist (Merdan, Kunath et al. 2002). Die DNA kann hierbei nicht aus den sauren Lysosomen entweichen und wird abgebaut. In Kombination mit endosomolytischen Agenzien wie Chloroquin oder konjugiert mit

Tryptophan oder Histidin konnte dieser Nachteil teilweise ausgeglichen werden (Wadhwa, Collard et al. 1997; Midoux, LeCam et al. 2002).

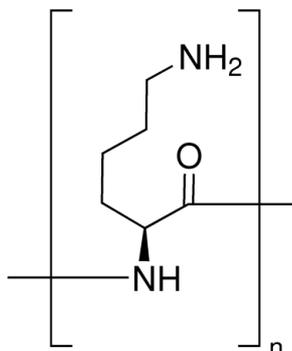


Abbildung 1.1: Poly-L-Lysin

Chitosan, ein Polysaccharid aus D-Glucosaminen und N-Acetyl-d-Glucosaminen, ist ein praktisch ungiftiges Biopolymer (Chandy and Sharma 1990). Parameter wie Ladung, Molekülgewicht und pH beeinflussen auch bei Chitosanen die Transfektionseffizienz. Chitosane mit niedrigem Molekülgewicht (22 kDa) sind gut löslich unter physiologischen Bedingungen und komplexieren gut mit DNA. Diese Polyplexe transfizieren besser als PLL bei geringerer Toxizität (Liu, Sun et al. 2005). Endosomolytisch wirkende Agenzien können auch bei Chitosan-Polyplexen zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz führen, was auf eine behinderte Freisetzung der Chitosan-DNA-Komplexe aus dem Endosom deutet (MacLaughlin, Mumper et al. 1998).

Polyethylenimin (PEI) ist wohl eines der am meisten zum Gentransfer genutzten kationischen Polymere, da es hohe Transfektionseffizienz in vielen verschiedenen Zelltypen aufweist. Man unterscheidet verzweigtes PEI (*branched*, br-PEI) und lineares PEI (l-PEI, Abbildung 1.2). Es besitzt sowohl primäre, sekundäre als auch tertiäre Amine (br-PEI), von denen unter physiologischen Bedingungen zwei Drittel protoniert sind (Park, Jeong et al. 2006).

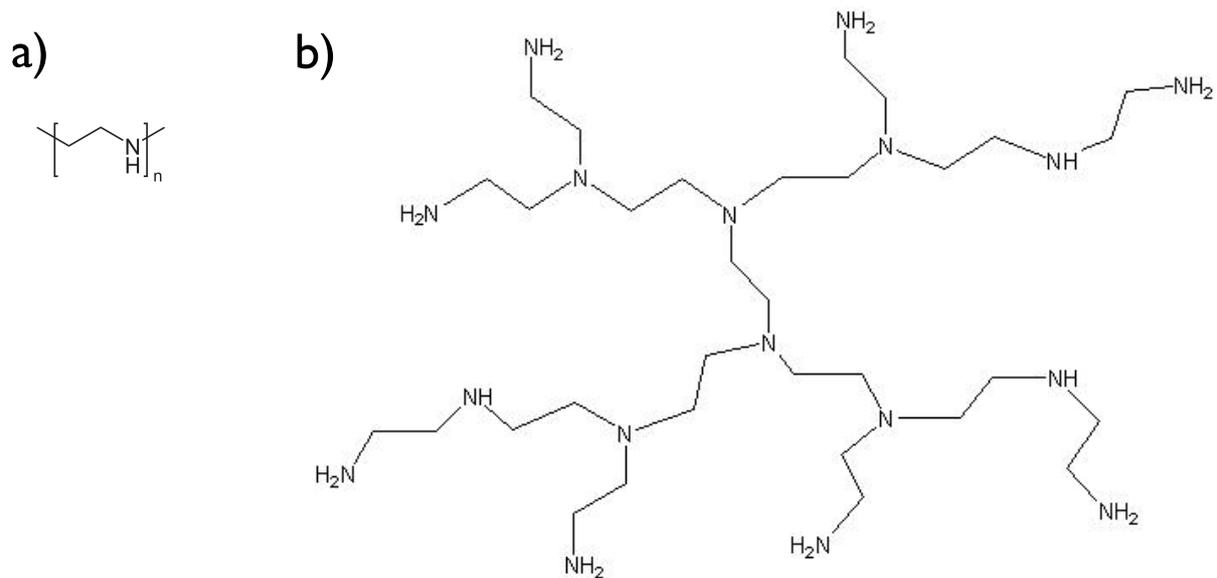


Abbildung 1.2: Polyethylenimin

a) lineares Polyethylenimin

b) verzweigtes Polyethylenimin

Das restliche Drittel der protonierbaren Amine trägt zu einem Puffereffekt über einen großen pH-Bereich bei. PEI-DNA-Polyplexe, welche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, wurden zunächst in Lysosomen lokalisiert, in denen ein saures Milieu vorherrscht. Protonierung der restlichen Amine führt zum Bestreben der endosomalen ATPasen, den sauren pH aufrecht zu erhalten und somit zu einem hohen H^+ - und Cl^- -Influx, was ein osmotisch verursachtes Schwellen und letztendlich ein Reißen des Endosoms zur Folge hat. Zusammen mit einer Entspannung der Polyplexe durch elektrostatische Abstoßung der positiven Ladungen führt dieser ‚Protonenschwammeeffekt‘ zur Freisetzung der Komplexe aus dem Endosom (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Behr 1997). Diese Eigenschaften führen auch zu einem gewissen Grad an Toxizität. Durch den Einsatz von I-PEI konnte diese, in Verbindung mit höherer Transfektionseffizienz, gesenkt werden (Jeong, Song et al. 2001; Wightman, Kircheis et al. 2001).

1.3 Nicht-virale Integrationssysteme

Um die Vorteile stabiler Transgenintegration mit denen nicht-viraler Gentransfersysteme zu verbinden, wurden u.a. Transposons und virale Rekombinasen für die Gentherapie untersucht. Damit gehen allerdings auch die Nachteile des nicht-viralen Gentransfers einher, insbesondere die niedrige Transfektionseffizienz. Die geringe Immunogenität und höhere Sicherheit verglichen mit viralen Methoden verschafft jedoch auch den nicht-viralen Integrationssystemen einen Platz unter den gentherapeutischen Werkzeugen. Vor allem das *Sleeping Beauty* (SB)-Transposon, die Cre-Rekombinase und die Φ C31-Integrase als Vertreter der Tyrosin- resp. Serin-Rekombinasen sind die wichtigsten Vertreter dieser Gattung.

Transposons wie *Sleeping Beauty* und *piggyBac* sind sogenannte springende Gene, DNA-Abschnitte, teilweise von repetitiven Sequenzen (*inverted repeats*, IRs) umgeben, welche mittels des Enzyms Transposase ihren Ort im Genom verändern können. Autonome Transposons kodieren für ihre eigene aktive Transposase. Für den Transpositionsvorgang reicht es jedoch aus, dass die Zelle eine Transposase exprimiert. Nicht-autonome Transposons besitzen ein defektes oder kein Transposasegen zwischen ihren IRs. Vertebraten besitzen keine autonomen Transposons mehr, es gelang jedoch, aus dem Genom von Fischen diverse Fragmente von Transposons der Tc1/*mariner*-Familie zu isolieren und daraus ein auch in Vertebraten funktionelles Transposon zu konstruieren, die *Sleeping Beauty* (SB) (Izsvak, Ivics et al. 1995; Ivics, Hackett et al. 1997). Die *Sleeping Beauty* ist aktiv in Säugerzellen (Belur, Frandsen et al. 2003). Die SB-vermittelte Integration verläuft nach einem „*cut-and-paste*“ Mechanismus in eine beliebige TA-Sequenz im Zielgenom. Schätzungsweise 35 % der Rekombinationsereignisse finden innerhalb von Genen statt, im Gegensatz zur viralen Integration, die zumeist auf aktive Genabschnitte abzielt. Im Hämophilie-Mausmodell konnte mit SB-vermittelter Rekombination therapeutische Langzeitexpression des Faktors IX vermittelt werden (Yant, Meuse et al. 2000). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehrere Varianten des *Sleeping Beauty*-Transposons entwickelt, unter anderem auch sogenannte hyperaktive Varianten mit einem Vielfachen an Integrationseffizienz, die SB100x

(Mates, Chuah et al. 2009). Die „*International Society for Molecular and Cell Biology and Biotechnology Protocols and Researches*“ hat die SB100x zum „Molekül des Jahres 2009“ gewählt.

Die Cre-Rekombinase („**C**auses **r**ecombination“) aus dem Bakteriophagen P1 gehört zur Familie der ortsspezifischen Rekombinasen. Dieses Protein katalysiert die Rekombination zweier DNA-Abschnitte zwischen spezifischen, 34 bp langen *loxP*-Erkennungssequenzen, bestehend aus einer Zentralsequenz und zwei *inverted repeats* (*IR*) (Hamilton and Abremski 1984). Die *loxP*-Stellen kommen nicht im Säugergenom vor. Zwei Cre-Moleküle binden die IRs und vermitteln Rekombination der Zentralsequenz. Wie beim *Sleeping Beauty*-System werden keine weiteren Kofaktoren benötigt. Aufgrund des molekularen Mechanismus der Rekombination vermittelt die Cre-Rekombinase sowohl Integration als auch die Entfernung von *loxP*-flankierten DNA-Sequenzen. Da die Entfernungsreaktion entropisch begünstigt ist, wird ein integriertes Transgen in Anwesenheit der Rekombinase mit hoher Wahrscheinlichkeit wieder entfernt (Mizuguchi, Kay et al. 2001). Die Verwendung von stringenten Selektionsstrategien kann hier Abhilfe schaffen. Die Cre-Rekombinase ist des Weiteren ein beliebtes Werkzeug zur Herstellung von transgenen oder auch Knockout-Mäusen. Oft zusammen mit Cre wurde die Flp-Rekombinase aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet. Die Flp-Erkennungssequenzen heißen FRT (Flp Recombination Target). Sie ähneln den *loxP*-Stellen, besitzen aber zusätzlich *direct repeats*. Die Integrationseffizienz der Flp-Rekombinase liegt unter der der Cre (Bode, Schlake et al. 2000).

Die Φ C31-Integrase gehört zur Familie der ortsspezifischen Serin-Resolvasen/Invertasen. Sie ist ein Protein des Bakteriophagen Φ C31, dessen natürlicher Wirt das Bodenbakterium *Streptomyces spp.* ist (Kuhstoss and Rao 1991). Genau wie die Tyrosin-Rekombinasen findet man die Φ C31-Integrase üblicherweise nur in einzelligen Organismen. Beide Rekombinasefamilien vermitteln Rekombination von DNA zwischen zwei ca. 30 bp langen Erkennungssequenzen, im Fall von Φ C31 *attB*, der Bindestelle im bakteriellen Genom, und *attP*, dem Gegenstück im Phagengenom (Rausch and Lehmann 1991). Diese Bindestellen besitzen maximal 50 % Sequenzhomologie. Sie besitzen die gleiche Kernsequenz TT. Die

Rekombinationsreaktion, an der vier Integrasemoleküle beteiligt sind, wandelt diese *attB*- und *attP*-Bindestellen in *attL* und *attR* um, welche ohne zusätzliche Kofaktoren nicht mehr von der Integrase prozessiert werden können (Abbildung 1.3). Damit verläuft die Reaktion im Gegensatz zu anderen Rekombinasen unidirektional (Thorpe, Wilson et al. 2000).

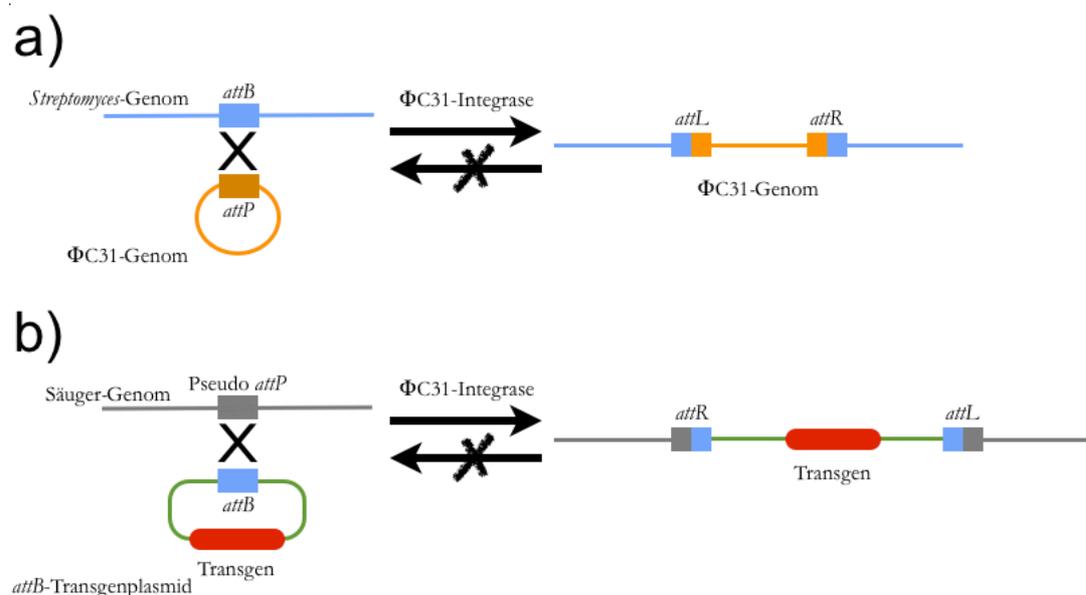


Abbildung 1.3: Mechanismus der Φ C31-Integrase

- a) Integration des Phagen in das Bakteriengenom
- b) Integration eines *attB*-Transgenplasmids ins Säugerengenom

Die Φ C31-Integrase benötigt, wie auch Cre und Flp, keine wirtsspezifischen Kofaktoren, was den Einsatz in Säugerzellen ermöglicht (Thorpe and Smith 1998). Diese besitzen eine noch nicht genau bekannte Zahl an sog. Pseudo-*attP*-Stellen, die aber über 400 liegen dürfte. Die Pseudo-*attP*-Stellen besitzen wie die Wildtyp-Stellen ca. 50 % Übereinstimmung (Thyagarajan, Olivares et al. 2001; Chalberg, Portlock et al. 2006). *In vivo* Versuche an Mäusen haben eine gewisse Bevorzugung bestimmter Pseudo-*attP*-Stellen ergeben, was deren hohe Anzahl relativiert (Held, Olivares et al. 2005; Bertoni, Jarrahan et al. 2006). Dennoch besteht aufgrund der hohen Zahl der Pseudo-*attP*-Stellen die Gefahr einer gewissen Genotoxizität, in Zusammenhang mit Φ C31-Rekombination wurden bereits chromosomale Aberrationen nachgewiesen, allerdings bisher nur *in vitro* (Ehrhardt, Engler et al. 2006; Liu, Jeppesen et al. 2006). Die Aktivität der Φ C31-Integrase liegt unter der der

Cre-Rekombinase, es gibt aber mittlerweile kodonoptimierte Varianten mit Kernlokalisierungssequenz, die eine vergleichbare Aktivität besitzen (Andreas, Schwenk et al. 2002). Außerdem wurden die Integrationseffizienz durch Mutationen der Integrasesequenz verbessert (Liesner, Zhang et al. 2010). Die Φ C31-Integrase wurde bis heute in einer Vielzahl von Organismen und Zelltypen eingesetzt, wie z. B. *Drosophila* (Fish, Groth et al. 2007), *Xenopus laevis* (Allen and Weeks 2005), Zebrafisch (Dong and Stuart 2004), aber auch in Rinderzellen (Ou, Huang et al. 2009) und natürlich in Nagern. Hier wurde sowohl Expression von Faktor IX durch Gentransfer in die Mausleber erreicht (Olivares, Hollis et al. 2002), als auch die Behandlung von Rattenretina (Chalberg, Genise et al. 2004), Mausmuskel (Bertoni, Jarrahan et al. 2006) und Lunge (Aneja, Geiger et al. 2009). Die Aktivität der Integrase ist in gewissem Maße zelltypspezifisch (Maucksch, Aneja et al. 2008).

1.4 Proteintransduktionsdomänen

Die Plasmamembran von Zellen stellt eine wirksame Barriere für den Eintritt von Makromolekülen über 500 Da dar. Es ist schon lange bekannt, dass polybasische Peptide wie Polylysin oder Polyornithin die Aufnahme von Proteinen in Zellen stark begünstigen (Ryser 1967). Auf der Suche nach Möglichkeiten, größere Proteine oder andere Moleküle in Zellen zu schleusen, wurden noch andere Peptide, Proteintransduktionsdomänen (PTD) oder auch Zell-penetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPP) genannt, entdeckt, die meist basische Eigenschaften aufweisen. Eine der ersten verwendeten PTDs war das Antp-Peptid, abgeleitet von der Homöobox des Antennapedia-Proteins aus *Drosophila* (Perez, Joliot et al. 1992). Antp kann in eine Vielzahl von Zelltypen, wie z. B. in Neuronen, transduzieren (Bloch-Gallego, Le Roux et al. 1993; Dietz and Bahr 2004). Die Antp-PTD wurde aber selten *in vivo* verwendet. Während Proteine bis 100 Aminosäuren gut durch Antp transduziert werden, ist der Erfolg bei größeren Proteinen gering, zudem zeigen höhere Konzentrationen an Antp lytische Effekte (Derossi, Chassaing et al. 1998). Andere PTDs sind z. B. das 70 kDa Heat Shock Protein (Fujihara and Nadler 1999), die viralen Peptide HSV-VP22 (Murphy and Murphy 1999) und HIV-TAT. Die TAT-PTD

wurde vom *transactivator of transcription*-Protein (101 Aminosäuren) des HI-Virus abgeleitet (Vives, Brodin et al. 1997). Dieses Protein ist notwendig für die Replikation des HI-Virus und reguliert dessen Transkription. Die Aminosäuren 47 - 57 erwiesen sich als Mediatoren der Transduktion dieses Proteins, die Sequenz RKKRRYRRR bindet an die Aktivator-RNA (TAR) des Virus. Der Mechanismus der Aufnahme von TAT-gebundenen Makromolekülen ist vermutlich Makropinozytose, die durch die TAT-spezifische Ladung an der Zellmembran induziert wird (Kaplan, Wadia et al. 2005). Fawell et al. zeigten die Fähigkeit der TAT-PTD, große Proteine wie β -Galaktosidase erfolgreich in mehrere Zelltypen zu transduzieren (Fawell, Seery et al. 1994). TAT-vermittelte Transduktion von β -Galaktosidase wurde auch erfolgreich *in vivo* an Mäusen gezeigt, das Protein ist sogar jenseits der Blut-Hirn-Schranke zu finden (Schwarze, Ho et al. 1999).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die nicht-virale Gentherapie stellt, insbesondere im Hinblick auf die klinischen Studien zur Behandlung von X-SCID in Paris und London, welche eindrucksvoll das Potential, aber auch die Gefahren viralen Gentransfers demonstrierten, ein wichtiges Gebiet der gentherapeutischen Forschung dar. Mittlerweile besteht ein wirkungsvolles Arsenal an nicht-viralen Gentransfermethoden mit unterschiedlichen Transfereffizienzen. Will man zusätzlich eine stabile Integration des therapeutischen Transgens erreichen, ist der Einsatz eines Integrationssystems wie der Integrase des Bakteriophagen Φ C31 sinnvoll, welches bereits effektiv für diesen Zweck adaptiert wurde. Die Φ C31-Integrase zeigt allerdings zellspezifische Unterschiede in ihrer Aktivität (Maucksch, Aneja et al. 2008). Ziel dieser Arbeit war daher, alternative Applikationsformen für die Φ C31-Integrase zu entwickeln, um dieses Enzym auch in Zelltypen wie z. B. hämatopoetischen Zellen nutzbar zu machen, in welchen bisher kaum Integraseaktivität ausgemacht werden konnte. Dafür sollte die rekombinante Expression des Φ C31-Integraseproteins etabliert werden, um durch Entwicklung eines Φ C31-Integrase-TAT-Fusionsproteins (INTAT) eine funktionelle und besser dosierbare Alternative zur bisher angewandten endogenen Expression der Φ C31-Integrase nach transienter Transfektion zu schaffen. Nach Charakterisierung der Funktionalität und der Lokalisierung des INTAT-Proteins sollten verschiedene Transduktionsmethoden wie Lipofektion, Polyfektion und Elektroporation in unterschiedlichen Zelllinien etabliert werden, um das Integraseprotein zusammen mit einem Transgen tragendem Plasmid in Zellen zu schleusen und so Langzeitexpression des jeweiligen Transgens zu erreichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Name	Bezugsquelle
Biologic HR FPLC	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland
CO2 Series Inkubator	Sheldon Mfg Inc., USA
Diana III Luminescence Imaging System	Raytest GmbH, Deutschland
Digital Sonifier 250	Branson Inc, USA
Excella E24 Shaker	New Brunswick Scientific Inc., USA
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
FACSCanto II	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
FACSScan	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
GenePulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
GFL Wasserbad	Unitec GmbH, Deutschland
Horizon 11.14 Gelelektrophoresekammer	Gibco-BRL, Großbritannien
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Deutschland
MS2 Minishaker	Ika GmbH & Co. KG, Deutschland
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Nucleofector II	Lonza Cologne AG, Deutschland
Nucleofector® 96-well Shuttle® System	Lonza Cologne AG, Deutschland
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Precision standard Tischwaage	Ohaus GmbH, Deutschland

Name	Bezugsquelle
Premium Tiefkühlschrank	Liebherr GmbH, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Uniflow KR130	Uniequip GmbH, Deutschland
Wallac Victor ² Multilabel Counter	Perkin-Elmer, Deutschland

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller
1 kbp DNA Ladder	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland
100 bp DNA Ladder	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland
5(6)-Carboxy-X-Rhodamine N-Succinimidyl ester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
Ampicillin	Bio-Line GmbH, Deutschland
BugBuster Master Mix	Novagen, Großbritannien
Carbenicillin	Bio-Line GmbH, Deutschland
Chloramphenicol	Bio-Line GmbH, Deutschland
Complete protease inhibitor mix w/o EDTA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
D-Luciferin 99%	Synchem OHG, Deutschland
DPBS 1x	Gibco-BRL, Großbritannien
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethanol p.a.	Merck KG, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Name	Hersteller
Imperial Protein Stain	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
IPTG	Bio-Line GmbH, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen Inc., Großbritannien
Metafectene Pro	Biontex Laboratories GmbH, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen GmbH, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL, Großbritannien
Polyethylenimin, linear	S. Üzgün, AG Mol. Pneumologie II, LMU München
Pro-DeliverIN	OZ Biosciences, Frankreich
Propidiumiodid	Molecular Probes, Niederlande
PVDF-Membran	Millipore, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co, KG, Deutschland
TAE 50x Puffer	Gibco-BRL, Großbritannien
Triton-X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL, Großbritannien
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
VectaShield	Vector Laboratories Inc., USA

2.1.3 Antikörper

Name	Hersteller
Anti-His HRP-Konjugat	Qiagen, Deutschland
Kaninchen-anti-C31 polyklonal	M. Smith, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD, United Kingdom
Ziege-anti-Kaninchen HRP-Konjugat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

2.1.4 Enzyme

Name	Hersteller
BamHI	Fermentas GmbH, Deutschland
EcoRI	Fermentas GmbH, Deutschland
EcoRV	Fermentas GmbH, Deutschland
HindIII	Fermentas GmbH, Deutschland
NdeI	Fermentas GmbH, Deutschland
NotI	Fermentas GmbH, Deutschland
Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase	Stratagene, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas GmbH, Deutschland
T4 Ligase	Fermentas GmbH, Deutschland
Taq-Polymerase	New England Biolabs Inc., USA
XhoI	Fermentas GmbH, Deutschland

2.1.5 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden über Metabion GmbH, GATC Biotech oder biomers.net GmbH bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Primer	Sequenz (3'-5')
GATC-INT2_90882	TGTTTCGGAGACGAAGGAG
HS1	AGGTCATATGGACACGTACGCGGGTGC
INT_Fw_EcoRV	ACAAGATATCGTGACCGGGGTGGAC
INT_Rev_NotI2	TCGCGCGGCCGCTACGTCTT

Primer	Sequenz (3'-5')
INT_Rev_XhoI	TCCTCGAGCGCCGCTACGTC
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
pGSINTAT_a911g_antisense	CGCATAACGGTTGCCGGGTCCCAGGCG
pGSINTAT_a911g_sense	CGCCTGGGACCCGGCAACCGTTATGCG
pGSINTAT_c123t_g124c_antisense	CGCGCTCGCGGAACTGACGGTCGTAAGCACC
pGSINTAT_c123t_g124c_sense	GGTGCTTACGACCGTCAGTTCCGCGAGCGCG
Puro FP	GCAAGGGTCTGGGCAGCG
Puro RP	TTGCCGATGTCGAGCCCG
T7-981079	TAATACGACTCACTATAG

Oligonukleotide	Sequenz (3'-5')
TAT(47-57) Gly-link sense	GGCCGGCTATGGCCGTAAAAACGTCGTCAGCGTCGTCGTGGC C
TAT(47-57) Gly-link antisense	TCGAGGCCACGACGACGCTGACGACGTTTTTTACGGCCATAGC C

2.1.6 Plasmide

pGS-21a

Der Vektor pGS-21a der Firma Genscript ist ein Expressionsvektor für prokaryotische Systeme. Er trägt einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor und drei Tags zur Aufreinigung rekombinanter Proteine, einen N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag, einen N- und einen C-terminalen His₆-Tag. Außerdem ist ein Ampizillinresistenzgen integriert.

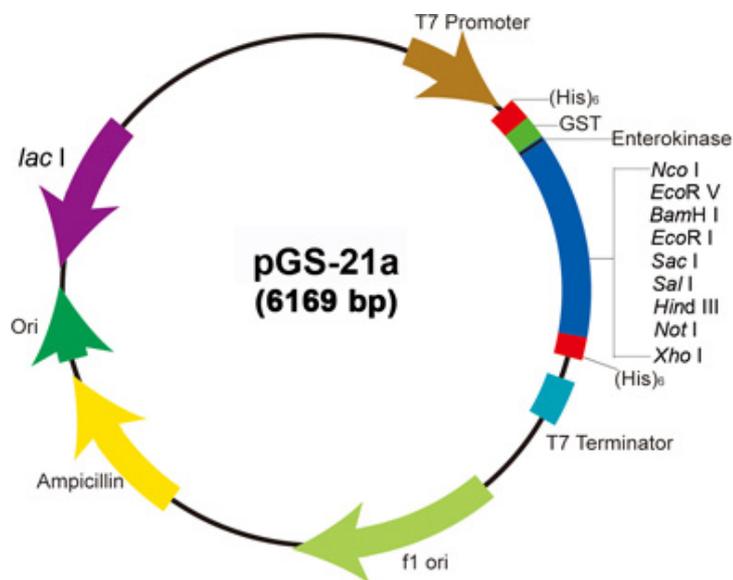


Abbildung 2.1: pGS-21a (Genscript)

pET-20b

Der Expressionsvektor pET-20b trägt neben einem T7-Promotor und einer Ampizillinresistenz eine *multiple cloning site*, welche N-terminal von einer pelB-Sequenz für potentielle periplasmatische Lokalisierung und C-terminal von einem His-Tag flankiert wird.

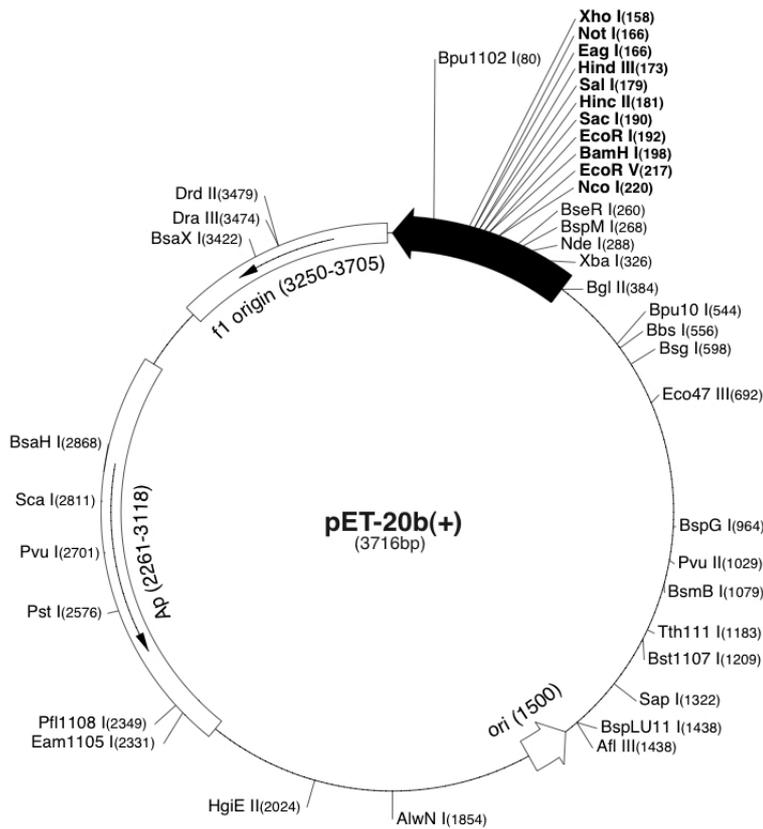


Abbildung 2.2: pET-20b (Novagen)

Name

pEGFP-N1	Invivogen, USA
pET20b	Novagen, Merck KGaA Deutschland
pET20INT	aus pET20b
pGS21a	Genscript, USA
pGSINT	aus pGS21a
pGSINT2	aus pGS21a
pGSINTAT	aus pGS21a
pGSINTAT3	aus pGS21a
pGSmINTAT3	aus pGS21a
pCEF1αI-luc-attB	(Aneja, Geiger et al. 2009)

Name

pSVpaxattP50attB53

pUC18

pattP-BGHpolyA-attB-EGFP

Rep-Luc

2.1.7 Medien

Name	Hersteller/Zusammensetzung
DMEM	Gibco-BRL, Grossbritannien
FBS	PPA Laboratories, Österreich
FCS	PPA Laboratories, Österreich
LB- (Luria-Bertani)/LB _{amp} -Medium	1% NaCl 0,5% Bactoyeast 1% Bactotrypton in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren für LB _{amp} -Medium zusätzlich 100µg/ml Ampicillin/ Carbenicillin 1% Bactotrypton 0,5 % Bactoyeast 1 % NaCl
LB-/ LB _{amp} -Agarplatten	2 % Bactoagar in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren für LB _{amp} -Platten zusätzlich 100µg/ml Ampicillin in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen
MEM	Gibco-BRL, Grossbritannien
RPMI 1640	Gibco-BRL, Grossbritannien

2.1.8 Puffer

Name	Zusammensetzung
HEPES-Puffer	20 mM HEPES, 100 mM NaCl
Luciferaseassay-Puffer	470 μ M D-Luciferin, 270 μ M Coenzym A, 33,3 mM DTT, 530 μ M ATP, 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 2,67 mM MgSO_4 , 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA
Natriumphosphat-Denaturierungspuffer	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 8 M Urea
Natriumphosphat-Elutionspuffer	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 100-500 mM Imidazol
Natriumphosphat-Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20-80 mM Imidazol
Nukleofektionspuffer	0,42mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5,36 mM KCl, 0,41 mM MgSO_4 , 103 mM NaCl, 23,8 mM NaHCO_3 , 5,64 mM Na_2HPO_4 , 11,1 mM D-(+)Glucose, 3,25 μ M Glutathion, 20mM HEPES; pH 7,3
Zelllysepuffer (Luciferase-Messung / Bradford-Bestimmung)	250 mM Tris, 0,1 % Triton X-100; pH 7,8

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
12-well-Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
24-Well-Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platten	TPP; Trasadingen, Schweiz
Amicon Ultra-15	Millipore, USA
Falcons	Greiner, Deutschland
Filter 0.45 µm	Millipore, USA
Ni Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Tube 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH; Essen
Tube 2 ml	Greiner Bio-One GmbH; Essen
Zellkulturflaschen	BD Falcon, USA
µ-slide	Ibidi GmbH, Deutschland
Sephadex PD-10 Säule	GE Healthcare, Schweden

2.1.10 Kommerzielle Kits

Die folgenden Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Hersteller/Zusammensetzung
CD34 Multi Sort Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
DNeasy Tissue Kit	Qiagen AG, Deutschland
ECL chemiluminescence system	Amersham Bioscience, USA
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen AG, Deutschland
NucleoBond PC 2000 EF	Macherey-Nagel GmbH, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Deutschland

Name	Hersteller/Zusammensetzung
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel GmbH, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen AG, Deutschland

2.1.11 Organismen

In vorliegender Arbeit wurden folgende Organismen verwendet.

2.1.11.1 Bakterien

Name	Bezugsquelle
C41 pLysS	Lucigen, USA
C43 pLysS	Lucigen, USA
<i>E. cloni</i> BL21 (DE3) elektrokompetent	Lucigen, USA
<i>E. cloni</i> BL21 (DE3) pLysS elektrokompetent	Lucigen, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS chemisch kompetent	Novagen, Großbritannien
<i>E. coli</i> DH10B elektrokompetent	Invitrogen Inc., Großbritannien

2.1.11.2 Zelllinien

Name	Bezugsquelle
293EGFP <i>PattPattB</i> humane embryonale Nierenzellen	R. Liesner, Max-von-Pettenkofer Institut, München
A549 humane Alveolar-Typ II-Zellen	DSMZ Nr. ACC 107
CD34 ⁺ primäre hämatopoetische Stammzellen	Bayerische Stammzellbank, Gauting
Jurkat humane T-Lymphozyten	DSMZ Nr. ACC 282
MLE-12 murine Alveolar Typ II-Zellen	ATCC Nr. CRL-2110

293EGFP*PattPattB*

Die 293-Zelllinie ist eine humane embryonale Nierenzelllinie. Diese Zelllinie wurde immortalisiert, indem gescherte DNA des Adenovirus 5 in humane embryonale Nierenzellen transformiert wurde (Graham, Smiley et al. 1977). Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie 293EGFP*PattPattB* wurde mit dem Plasmid p*PattP*-Bghpolya-*attB*-EGFP stabil transfiziert. Sie wurde freundlicherweise von Raphael Liesner (Institut für Virologie Max-von-Pettenkofer Institut, München) zur Verfügung gestellt.

A549

A549 Zellen sind humane Alveolar Typ II Epithelzellen. Diese Zelllinie geht auf ein humanes Alveolarzellkarzinom zurück (Lieber, Smith et al. 1976).

CD34⁺ primäre hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen sind Zellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark, die das CD34-Antigen exprimieren.

MLE-12

Die murine Zelllinie MLE-12 ist eine immortalisierte Alveolar-Typ II-Epithelzelllinie.

Jurkat

Die T-Lymphozytenzelllinie Jurkat entstammt dem Blut eines 14 Jahre alten Lymphom-Patienten (Schneider, Schwenk et al. 1977). Ihr CD-Antigenprofil: CD2 +, CD3 +, CD4 (+), CD5 +, CD6 +, CD7 +, CD8 -, CD13 -, CD19 -, CD34 +, TCRalpha/beta +, TCRgamma/delta -.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien A549 und MLE12 wurden in Minimum Essential Medium (MEM), 293EGFP-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit zusätzlich 500 µg/ml G418 kultiviert. Zur Kultivierung der Jurkat T-Lymphozyten wurde RPMI 1640 verwendet. Primäre humane CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen wurden in X-VIVO Medium kultiviert. Bei Langzeitexperimenten über mehrere Wochen wurde den Medien noch 100 U/l Penicillin und 100µg/ml Streptomycin sowie 50 µg/ml Gentamycin zugesetzt. Die genannten Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 % FCS in einer 5 %igen Kohlendioxidatmosphäre kultiviert.

Die adhärenenten Zelllinien wurden alle 4 Tage oder bei 80-90% Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Medium aspiriert, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und mit ein bis zwei ml Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das Trypsin-EDTA wurde anschließend mit FCS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellen in neue Flaschen verteilt. Im Fall der

Suspensionszellen wurden zur Passagierung ein Teil der Zellen abzentrifugiert und mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen verteilt. Alle Zelllinien wurden maximal bis zur Passage 20 kultiviert.

2.2.1.2 Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen

Die CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen wurden aus bis zu 36 Stunden altem Nabelschnurblut der bayerischen Stammzellbank Gauting gewonnen. Hierzu wurden zunächst die mononukleären Zellen durch Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. 13 ml Ficoll-Hypaque wurden mit 39 ml heparinisierendem, mit PBS 1:3 verdünntem Blut vorsichtig überschichtet. Die mononukleären Zellen wurden nach 30 Minuten Zentrifugation bei 612 g aus der Phase zwischen Plasma und Ficoll gewonnen, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden über MACS (MAGnetic Cell Sorting)-Säulen durch magnetische Zellseparation die CD34⁺ Zellen separiert. Nach dem Herstellerprotokoll wurden mit autoMACS Running Buffer äquilibrierte LS⁺- oder MS⁺-Säulen an einem Magnet befestigt. Zu den mononukleären Zellen in autoMACS Running Buffer wurde FcR Blocking Reagenz gegen unspezifische Bindung und die CD34 Multisort Microbeads gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei circa 8 °C wurde die Zellsuspension auf die am Magnet befestigten äquilibrierten Säulen gegeben. Die Säulen wurden drei Mal mit autoMACS Running Buffer gewaschen, um unspezifische und nicht gebundene Zellen von den Säulen zu entfernen. Nach Entfernung der Säulen vom Magneten wurden die CD34⁺-markierten Zellen durch erneutes Waschen mit autoMACS Running Buffer von den Säulen eluiert.

2.2.1.3 Transfektion und Transduktion

Sofern nicht anders angegeben, wurden Zellen 24 Stunden vor Transfektion oder Transduktion in die entsprechenden Multiwellplatten ausgesät.

Vor der Kotransduktion von Integraseprotein und dem Plasmid pCEF1 α -luc-*attB* wurden Protein und Plasmid für 20 Minuten präinkubiert.

2.2.1.4 Lipofektion

Zur Lipofektion, oder auch Transfektion mit Hilfe kationischer Lipide, von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurden in der vorliegenden Arbeit Metafectene Pro (Biontex Laboratories GmbH, Deutschland) und Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Großbritannien) verwendet. Zur Transfektion von HEK293-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten wurden Metafectene Pro und Plasmid in einem Verhältnis von 2:1 (v/w) in serum- und antibiotikafreiem Medium gemischt. A549-, 293- und Jurkat-Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 im Verhältnis von 3:1 (v/w) zur Plasmid-DNA transfiziert. DNA und Reagenz wurden ca. 20 Minuten zur Komplexbildung inkubiert. Die Komplexe wurden 4 Stunden ohne Verwendung von Serum und Antibiotika auf den Zellen belassen und danach gegen Medium mit FCS getauscht.

Die Kotransduktion von Protein und Plasmid-DNA (0,2 μ g) mit kationischen Lipiden wurde mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Großbritannien) und Pro-DeliverIN (OZ Biosciences, Frankreich) durchgeführt. Zur Transduktion von Protein wurde dieses mit Pro-DeliverIN in einem Verhältnis von 2:1 (w/v) zur Komplexbildung für 10 Minuten in serumfreiem Medium gemischt und anschließend zu den Zellen gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Medium gegen serumhaltiges Medium gewechselt.

2.2.1.5 Polyethylenimin (PEI)

Transfektionen und Kotransduktion mit linearem Polyethylenimin wurden in serumfreiem Medium in einem N/P-Verhältnis von 10 durchgeführt. L-PEI und Plasmid-DNA bzw. Protein/DNA-Komplexe wurden separat in 50 μ l Medium vorgelegt und 20 Minuten zur Komplexbildung zusammengegeben. Die Komplexe wurden in

serumfreiem Medium auf die Zellen gegeben, nach 4 Stunden wurde das Medium gegen serumhaltiges ausgetauscht.

2.2.1.6 Nukleofektion

Die Nukleofektion stellt eine besondere Form der Elektroporation dar, hierbei werden zusätzlich zum elektrischen Puls spezielle Puffer eingesetzt, die das Plasmid in den Zellkern bringen.

Für Nukleofektionen in 24-Wellplatten wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, trypsiniert und in Nukleofektionspuffer resuspendiert. Es wurden 1×10^6 Zellen mit 5 μg Plasmid in 100 μl in eine Küvette gegeben und im Nucleofector der Firma Lonza einem elektrischen Puls ausgesetzt. Die verwendeten Programme sind unter 3.2.3.3 angegeben. Anschließend wurden die Zellen in warmem Medium aufgenommen und in die Zellkulturplatten ausgesät. Für das 96-Well-Format wurden spezielle Nukleofektorplatten der Firma Lonza verwendet. Hierbei wurden 0,4 μg Plasmid-DNA und 2×10^5 Zellen in 20 μl Volumen eingesetzt. Auch hier wurden die Zellen nach Behandlung in warmem Medium in 96-Wellplatten überführt.

Im Fall der Proteintransduktion durch Nukleofektion wurde das Protein oder der Protein/DNA-Komplex zum Nukleofektionsansatz gegeben und analog verfahren.

2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zur Subklonierung von Plasmiden wurden u.a. Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese bakteriellen Enzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA an

spezifischen, oft palindromischen Sequenzen zu spalten. Dabei können glatte („*blunt ends*“) oder 3'- bzw. 5'-überhängende („*sticky ends*“) Enden entstehen.

Die Restriktionsansätze enthielten neben der Ausgangs-DNA jeweils 5-10 U des Restriktionsenzym, den passenden Puffer und Wasser. Verdaut wurde bei 37 °C für eine Stunde oder über Nacht, anschließend wurde die DNA über ein Agarosegel visualisiert und das Ergebnis des Verdau überprüft.

2.2.2.2 Annealing von Oligonukleotiden

Das Zusammenfügen von zwei komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden in gleichem stöchiometrischen Verhältnis in Annealingpuffer zusammengegeben und im Thermocycler für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt, um bereits vorliegende doppelsträngige Strukturen aufzulösen. Hierauf wurde der Thermocycler abgeschaltet, im langsam abkühlenden Puffer konnten sich nun die Einzelstränge der komplementären Oligonukleotide korrekt zusammenlagern. Der Reaktionsansatz wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Deutschland) von überschüssigen einzelsträngigen Oligonukleotiden gereinigt.

2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Wurden DNA-Fragmente in Plasmidvektoren subkloniert, so erfolgte zunächst eine Dephosphorylierung des Vektors, um eine interne Religation zu verhindern. Die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) entfernte dazu die Phosphatgruppen an den Enden der Restriktionsfragmente. Anschließend wurden die Enden von Vektor und Insert mit Hilfe der T4 Ligase zusammengefügt und das Ligationsprodukt in elektrokompente *E. coli* DH10B transformiert.

2.2.2.4 Transformation von Bakterien

Zum Transfer von Plasmid-DNA in Bakterien wurden sowohl elektrokompetente als auch chemisch kompetente Bakterienstämme vom Typ *E. coli* DH10B oder BL21 verwendet.

Die Transformation elektrokompetenter Bakterien erfolgte mit Hilfe des GenePulser II von Bio-Rad, Deutschland. Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde in H₂O_{bidest} vorgelegt. dazu wurden 4 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien gegeben und der Transformationsansatz in einer 1 mm-Küvette bei folgenden Parametern transformiert:

- Spannung 1800 V
- Widerstand 100 Ω
- Kapazität 25 µF
- Elektrodenabstand 1 mm

Unmittelbar nach der Transformation wurde der Ansatz in 0,5 - 1 ml vorgewärmtem LB- oder SOC-Medium aufgenommen, für 45 Minuten bei 37 °C im Inkubationsschüttler belassen und anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Bakterienkolonien auf einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte wurden mit einer Impfnadel gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt, das je nach Plasmid 100 µg/ml Carbenicillin oder zusätzlich 50 µg/ml Chloramphenicol enthielt. Für Mini-Präparationen wurden diese Kulturen über Nacht bei 37 °C und 220 min⁻¹ geschüttelt. Im Falle einer Maxi-Präparation dienten die 5 ml Kulturen als Vorkulturen und wurden nach 6 Stunden im Inkubationsschüttler bei 37 °C in 300 ml LB-Medium inklusive

Antibiotika überführt und über Nacht weiter geschüttelt. Die turbiden Bakterienkulturen wurden in einer Beckmann-Zentrifuge für 20 Minuten bei 5000 min⁻¹ pelletiert und unter Verwendung der Kits NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond PC 2000 EF (Macherey & Nagel, Deutschland) präpariert. Die Bakterienpellets wurden in Resuspensionspuffer S1 aufgenommen und für maximal fünf Minuten in Lysepuffer S2 (NaOH + SDS) inkubiert. Daraufhin wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von Neutralisationspuffer S3 (Kaliumacetat) gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation zur Entfernung der Zelltrümmer wurde der Überstand auf die mit Puffer N2 äquilibrierten Präparationssäulen gegeben. Die in den Säulen gebundene Plasmid-DNA wurde mit Puffer N3 gewaschen und anschließend in H₂O_{dest} oder Elutionspuffer N5 eluiert. Die durch Maxi-Präparation gewonnene Plasmid-DNA wurde zusätzlich per Isopropanol-Fällung gereinigt und konzentriert. Konzentration und Reinheit der präparierten Plasmid-DNA wurden per Nanodrop gemessen und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.6 Polymerase Kettenreaktion

Amplifikation von bestimmten DNA-Fragmenten zum Zweck der Analyse oder Mutagenese wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (Saiki, Gelfand et al. 1988). Für die einfache Amplifikation von DNA-Stücken wurde Taq-Polymerase (Fermentas GmbH, Deutschland) verwendet. Diese DNA-Polymerase wurde ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und übersteht auch Temperaturen von 95 °C. Für die Präparation von cDNA-Fragmenten und für zielgerichtete Mutagenese wurde die thermostabile *proofreading* DNA Polymerase Pfu Ultra II Fusion HS (Stratagene, USA) eingesetzt, die aus dem Archaeon *Pyrococcus furiosus* stammt. Die PCR-Reaktionen wurden im „Mastercycler“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

Das Protokoll für die Standard-PCR unter Verwendung von Ausgangs-DNA (template), spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotidprimern, PCR-Puffer, dNTP-Mix und Taq-Polymerase sieht einen initialen Denaturierungsschritt von

2 Minuten bei 95 °C vor, der für die Trennung der beiden Stränge der Template-DNA verantwortlich ist. Darauf folgten 30 Zyklen, die sich aus den folgenden Einzelschritten zusammensetzen:

- ein Denaturierungsschritt bei 95 °C für 30 Sekunden;
- ein Annealingschritt bei 55 °C für 30 Sekunden, währenddessen es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer mit der einzelsträngigen Ausgangs-DNA kommt;
- ein Elongationsschritt bei 72 °C für 90 Sekunden, hierbei werden die Primer von der Polymerase verlängert, worauf wieder doppelsträngige DNA vorliegt.

Abschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 5 Minuten, der die Vollständigkeit aller Produkte sicherstellen soll.

Für PCR-Reaktionen, für die die Pfu Ultra II Fusion HS Polymerase eingesetzt wurde, kam ein abgewandeltes Protokoll zur Anwendung. Denaturierungs- und Annealingschritte waren nur 20 Sekunden lang, Elongation erfolgte für 15 Sekunden pro 1000 Basenpaare bei 72 °C oder 68 °C. Der finale Elongationsschritt umfasste 3 Minuten.

Zur Herstellung der cDNA der Φ C31-Integrase wurden das Plasmid pCMVINT (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Calos, Stanford, USA) und die Primer HS1 (Thorpe and Smith 1998) und Int_Rev_NotI2 sowie die Pfu Ultra II Fusion HS Polymerase verwendet. Die Primer enthalten die zur Subklonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen.

2.2.2.7 Zielgerichtete Mutagenese

Deletion oder Austausch von einzelnen Nukleotiden oder Nukleotidsequenzen wurde mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese erreicht. Zum Zweck der Deletion von Nukleotidsequenzen aus Plasmiden wurden die unter 3.1.3 angegebenen Oligonukleotidprimer benutzt, welche die zu entfernende Sequenz flankieren. Im Gegensatz zur Standard-PCR bindet in diesem Fall der Vorwärtsprimer nach, der

Rückwärtsprimer vor den betreffenden Basen. Beide Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert, um eine Ligation des PCR-Produktes zu ermöglichen. Unter Verwendung einer *proofreading* Polymerase, in diesem Fall der Pfu Ultra II Fusion HS, welche eine sehr hohe Präzision bei der Amplifikation und die Kapazität zur Verarbeitung großer Plasmide besitzt, wurde das Ausgangsplasmid amplifiziert. Die Sequenz des resultierenden PCR-Produkts beginnt nach den zu entfernenden Basen und endet vor ihnen. Der Reaktionsansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Größe des PCR-Produkts zu überprüfen. Die korrekten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kit von Macherey&Nagel aufgereinigt. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *DpnI* durchgeführt und das PCR-Produkt in *E. coli* DH10B transformiert. Die Restriktionsendonuklease *DpnI* erkennt die palindromische Erkennungssequenz GATC und schneidet spezifisch *dam*-methylierte DNA. Da die Plasmid-DNA, die in der PCR als Vorlage diente, im Gegensatz zum PCR-Produkt in Bakterien amplifiziert wurde und somit methyliert ist, wird allein sie vom Restriktionsenzym erkannt und verdaut. Der Transformationsansatz enthält somit fast ausschließlich DNA mit der gewünschten Sequenz, die aufgrund der verwendeten phosphorylierten Primer in den Bakterien zu ringförmigen Plasmiden ligiert und amplifiziert wird. Er wurde auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen, einzelne Kolonien wurden gepickt und die Plasmid-DNA zum Zweck der Kontrolle durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse isoliert.

Analog zur Deletion wurde beim zielgerichteten Austausch von Nukleotidsequenzen verfahren. Im Unterschied zur Deletion wurden hierbei jedoch Primerpaare verwendet, bei denen beide Primer komplementär zur zu mutierenden Sequenz sind und die gewünschte Mutation enthalten. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass das 3'-Ende mindestens 10 homologe Basen aufweist, um die korrekte Bindung der Primer zu gewährleisten.

2.2.3 Expression von Φ C31-Integrase-Protein

2.2.3.1 Kultivierung von Bakterienkulturen für die Proteinexpression

Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in den *E. coli*-Stämmen „E. cloni“ BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS der Firma Lucigen sowie in BL21 (DE3)pLysS von Novagen. Außerdem wurden die Stämme ArcticExpress, C41pLysS und C43pLysS getestet. Vorkulturen (3-5 ml LB-Medium mit Carbenicillin, bei pLysS-Stämmen zusätzlich mit Chloramphenicol) für die Proteinexpression wurden entweder aus frisch mit dem Expressionsplasmid transformierten Kolonien oder aus Glyzerinkulturen angeimpft.

Die Vorkulturen wurden bei 37 °C im Inkubationsschüttler schrittweise auf 400-500 ml expandiert. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten, wurde die Temperatur auf den für die Expression vorgesehenen Wert (20 - 24 °C) gesenkt. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde mit 30 μ M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. IPTG bindet an den Inhibitor des *lac*-Operons und aktiviert somit die Expression von auf diese Weise regulierten Genen.

Nach der Induktion wurde die Inkubation für fünf Stunden fortgesetzt und die Bakterien anschließend bei 5000 min⁻¹ pelletiert. Die Lagerung der Bakterienpellets erfolgte bei -20 °C.

2.2.3.2 Aufreinigung von rekombinantem Protein

Zunächst wurden kleinere Kulturen von 1-2 ml Volumen gezogen, nach Induktion mit 0,5 - 1 mM IPTG 3 Stunden geschüttelt und mit BugBuster Mastermix aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 14.000 min⁻¹ in der Eppendorffzentrifuge wurde der Überstand über Qiagen Ni-NTA Spin Columns aufgereinigt.

Gefrorene Bakterienpellets wurden zunächst im lauwarmen Wasserbad aufgetaut und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Das auf diese Weise in den Bakterien freigesetzte T7-Lysozym beschleunigt den Aufschluss der Zellwände. Die Pellets wurden in BugBuster Mastermix (Novagen, Merck, Deutschland) mit 20 mM Imidazol resuspendiert und lysiert. Pro 5 Gramm Bakterienpellet wurde mindestens 1 ml Bugbuster zugegeben. Gegebenenfalls wurde der Digital Sonifier 250 verwendet, um die Bakterien komplett aufzuschließen. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt bei 30.000 g trennte unlösliche Zelltrümmer von den löslichen Proteinen. Der Überstand wurde auf zuvor mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Säulen gegeben, diese wurden mit HEPES-Puffer mit steigenden Konzentrationen (50, 75, 85, 100 mM) an Imidazol gewaschen. Die über den His-Tag an die Ni-Agarose gebundenen Proteine wurden darauf mit Eluierungspuffer von der Säule eluiert und aufgefangen. Von allen Wasch- und Eluierungsschritten wurden Proben genommen, um diese auf Western Blots oder über Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihren Proteingehalt zu überprüfen.

Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden zusammengeführt und über Amicon15-Säulen (Millipore GmbH, Deutschland) umgepuffert und aufkonzentriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch mit dem Nanodrop oder über einen Bradford-Proteinbestimmungsassay ermittelt. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert und mit 1 % Glycerin in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -86 °C.

2.2.4 PAGE und Western Blot

Zur qualitativen Analyse von Proteinen wurden diese über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurden Protein- oder Bakterienkulturproben mit Auftragspuffer bei 95 °C denaturiert und auf 7,5 % oder 10-20 % Gradienten-Tris-HCL-Acrylamidgele (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) geladen. Im elektrischen Feld bei 120 V wanderten die nun durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Gel zur Anode und wurden entsprechend

ihrem Molekulgewicht aufgetrennt. Durch Färbung der Gele mit Imperial Protein Staining Solution (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) wurden alle Proteine auf dem Gel sichtbar gemacht. Als Referenz zur Größenbestimmung diente der Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland).

Im Falle des Western Blots wurde das Tris-HCl-Gel nicht gefärbt, sondern im elektrischen Feld auf eine Polyvinylidenfluoridmembran übertragen, die anschließend reversibel mit Ponceau-S-Lösung gefärbt wurde, um den Transfer zu kontrollieren. Diese Membran wurde nun gewaschen, gegen unspezifische Antikörperbindung mit Serum/BSA geblockt und mit Kaninchen-anti- Φ C31 Integrase-Antikörpern oder anti-His-HRP-Konjugat (Qiagen, Deutschland) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden sekundäre, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) gegen die primären Antikörper verwendet. Die mit ECL (GE Healthcare, Schweden) behandelte Membran wurde mit einem Diana III Luminescence Imaging System (Raytest GmbH, Deutschland) oder auf Röntgenfilm photographiert.

2.2.5 Luziferase-Reportergen-Assay

Die Bestimmung der Luziferaseexpression fand im Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Deutschland) statt. Dazu wurden zunächst die betreffenden Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 μ l Lysepuffer 15 Minuten aufgeschlossen. Vom Lysat wurden 50 μ l im Wallac Victor² mit 100 μ l Luziferaseassaypuffer (Surovoy, Flechsler et al. 1998) versetzt, dann wurde für 5 Sekunden die Photonenemission gemessen. Die zuvor bestimmte Hintergrundemission wurde herausgerechnet. Zur Normalisierung wurden 10 μ l des Zelllysats für einen Proteinbestimmungsassay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) basierend auf Bradford (Bradford 1976) verwendet.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Analyse von EGFP-exprimierenden Zellen und der Transduktion von rekombinantem Phycoerythrin wurden die Durchflusszytometer FACScan, FACSCalibur sowie FACSCanto II der Firma Becton Dickinson GmbH verwendet. Für die Anregung des EGFP-Signals wurde der 488 nm-Laser eingesetzt. Die korrekten Zellpopulationen wurden anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts bestimmt. Die Detektion der EGFP-Emission erfolgte mit dem 530/30-Filter, Propidiumiodid wurde mit dem 670/LP-Filter gemessen. Zur Messung wurden die Programme CellQuest, CellQuest Pro und FACSDiva (Becton Dickinson GmbH, Deutschland), zur Auswertung CellQuest und FCSEXPRESS (Denovosoftware, USA) verwendet.

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und trypsinisiert, Suspensionszellen abzentrifugiert und in 400-500 μ l PBS resuspendiert. Zur Identifikation toter Zellen wurde mit 1 μ l Propidiumiodid gefärbt. Es wurden 2000 bis 10000 Zellen pro Probe gemessen.

2.2.7 Bandshift-Assay

Zur Überprüfung der Bindung der Φ C31-Integrase und *attB*-enthaltender Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Mengen an Protein und Plasmid gemischt und auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Gel mit einem Kodak Imager (Kodak GmbH, Deutschland) photographiert.

2.2.8 Konfokalmikroskopie

Die Lokalisierung von Φ C31-Integraseprotein in transduzierten Zellen wurde mit einem Olympus Konfokalmikroskop analysiert. Hierzu wurden 293EGFP Reporterzellen mit Φ C31-Integrase nukleofiziert und auf μ -slides (ibidi GmbH,

Deutschland) oder Glasobjektträgern ausgesät. Nach 16 oder 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 8% Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend 45 Minuten mit Serum/1% BSA in PBS gegen unspezifische Bindung geblockt, mit PBS gewaschen und eine Stunde mit Kaninchen-anti- Φ C31 Integrase-Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Alexa555-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper für 30 Minuten zugegeben. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

2.2.9 Statistik

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Statistisch signifikante Ausreißer wurden mit dem Grubbs-Test ermittelt und ausgeschlossen. Statistische signifikante Unterschiede zwischen zwei Messwerten wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test ermittelt, zum Vergleich von drei oder mehr Messwerten wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Tukey- oder Dunnett-Post-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde nur unter der Voraussetzung ähnlicher Varianzen der verglichenen Gruppen angenommen, welche vor Anwendung von t-Test bzw. ANOVA mit dem F-Test überprüft wurden. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte vorwiegend mit der Software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Expression der Φ C31-Integrase in *E. coli*

Für die rekombinante Expression des Φ C31-Integraseproteins wurde das *E. coli* BL21(DE3)-System verwendet. Dazu wurde die kodierende Sequenz per PCR mit Hilfe spezieller Primer mit passenden Restriktionsschnittstellen versehen und in den jeweiligen Expressionsvektor kloniert. Dieser wurde dann in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Dieser Bakterienstamm trägt den Prophagen λ DE3, der für die T7-RNA-Polymerase kodiert. Die Genexpression vermittelt der T7-Promotor, der spezifisch mit der durch den *lacUV5*-Promotor-kontrollierten T7-RNA-Polymerase und nicht mit bakteriellen RNA-Polymerasen zusammenarbeitet. Dabei wird eine spezifisch durch IPTG induzierte und sehr hohe mRNA-Produktion erzielt (Studier and Moffatt 1986). Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS besitzt das pLysS Plasmid, welches für das T7-Lysozym kodiert. Dieses Enzym inhibiert die T7-RNA-Polymerase und reduziert somit basale Expression des rekombinanten Proteins (Zhang and Studier 1997). Außerdem fördert T7-Lysozym den Aufschluss der Zellmembran.

3.1.1 Design der kodierenden Sequenz der Φ C31-Integrase

Die kodierende Sequenz (*cds*) für die Φ C31-Integrase wurde per High Fidelity PCR aus dem Plasmid pCMVINT hergestellt, um durch Restriktionsschnittstellen bedingte überflüssige Aminosäuren im rekombinanten Integraseprotein zu vermeiden. Die in allen Konstrukten der vorliegenden Arbeit verwendete Kernsequenz besteht aus 1815 Nukleotiden. Sie entspricht der Referenzsequenz NC_001978.2, wie sie in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* der *U.S. National Library of Medicine* zu finden ist. Als Start des Proteins wurde das native Startcodon GTG (Position 38447 im Φ C31-Genom, (Smith, Burns et al. 1999)) ausgewählt, allerdings zugunsten einer besseren Transkription in *E. coli* BL21 gegen das Startcodon ATG getauscht. Das Ende der verwendeten Kernsequenz markiert

das Codon GTG an Position 40261 des Phagengenoms, welches für die Aminosäure Alanin kodiert. Auf das native Stopcodon TAG wurde verzichtet, an dessen Stelle trat das Stopcodon des jeweils verwendeten Expressionsvektors. An Position 48 befindet sich eine stille Mutation (Guanin→Adenin), welche bereits im für die Herstellung verwendeten Plasmid pCMVINT vorhanden ist und die dort befindliche Restriktionsschnittstelle EcoRI unbrauchbar macht.

Alle Konstrukte wurden nach Klonierung zur Überprüfung bei der Firma GATC Biotech sequenziert. Dazu wurden die Sequenzierungsprimer T7-981079, GATC-INT2-90882 und pET-RP verwendet. Zur Analyse wurden die Programme GATC Sequence Viewer (GATC Biotech AG, Deutschland) und GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de/>) verwendet.

3.1.2 Klonierung in pET-20b

Für die Klonierung in den Vektor pET-20b wurde die Integrase-*cds* mittels PCR mit dem Vorwärtsprimer INT_Fw_EcoRV und dem Rückwärtsprimer INT_Rev_XhoI hergestellt. Diese Primer beinhalten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRV und XhoI und sind so konzipiert, dass das PCR-Produkt nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen in den Expressionsvektor kloniert werden konnte und dort im korrekten Leseraster vorlag. Das resultierende Konstrukt pET20INT (Abbildung 3.1) kodiert für ein Φ C31-Integrasefusionsprotein, das am N-Terminus ein Pectate Lyase B (*pelB*)-Sekretionssignal trägt. Das *pelB*-Signal veranlasst den Transport des jeweiligen Proteins in das Periplasma, wo das Signal von einer membranassoziierten *pelB*-Peptidase abgespalten wird (Hauser and Ryan 2007). Am C-Terminus des Integraseproteins befindet sich ein 6xHis-Tag, über den das Protein mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt wurde.

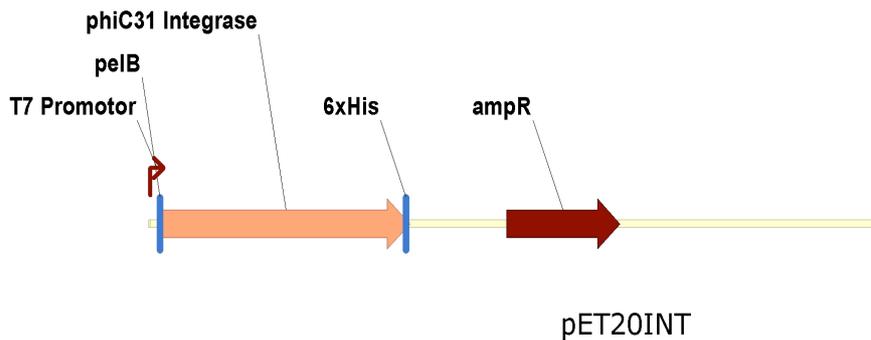


Abbildung 3.1: pET20INT

3.1.3 Klonierung in pGS-21a

Die Multiple Cloning Site des Expressionsvektors pGS21a (Genscript, USA) ist N-terminal von einem 6xHis-Tag und einem Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag flankiert. C-terminal sitzt ein weiterer 6xHis-Tag. Zur Herstellung der Integrase-Inserts für diesen Vektor wurden zwei verschiedene Vorwärtsprimer verwendet, INT_FW_EcoRV und HS1. Diese tragen die Restriktionsschnittstellen EcoRV resp. NdeI. Als Rückwärtsprimer wurden INT_Rev_NotI2 und INT_Rev_XhoI eingesetzt, welche die Restriktionsschnittstellen NotI resp. XhoI besitzen.

Für den Vektor pGSINT1 wurde die *cds* der Φ C31-Integrase mit den Primern INT_FW_EcoRV und INT_Rev_XhoI amplifiziert und Vektor pGS-21a und Insert mit den Restriktionsenzymen EcoRV und XhoI geschnitten. Nach Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors mit SAP wurden dieser mit dem Insert ligiert. Die resultierende Φ C31-Integrase-Expressionskassette besitzt N- sowie C-terminale 6xHis-Tags und einen GST-Tag am N-Terminus, der mittels Enterokinase entfernt werden kann.

Die für das Insert des Vektors pGSINT2 verwendeten Primer HS1 (Thorpe and Smith 1998) und INT_Rev-NotI2 besitzen die Restriktionsschnittstellen NdeI respektive NotI. Auch hier wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und

das Insert in den Vektor pGS-21a kloniert. Aufgrund der Lage der Schnittstelle für NdeI im Vektor besitzt das resultierende rekombinante Protein nur den 6xHis-Tag am C-Terminus, jedoch nicht die N-terminalen His- und GST-Tags (Glutathion-S-Transferase). Die Integrase-CDS des Plasmids pGSINT2 trägt an Position 823 des Leserahmens die *missense*-Mutation Guanin zu Adenin (c.823G>A), welche die Mutation p.A275T (Alanin→Threonin) in der Aminosäuresequenz des INT2-Proteins nach sich zieht. Zur Korrektur der Punktmutation wurde das Guaninnukleotid an der Stelle 911 des Plasmids pGSINT2 mittels zielgerichteter Mutagenese gegen ein Adenin getauscht. Hierzu wurde eine High Fidelity PCR mit den Primern pGSINTAT_a911g_sense und pGSINTAT_a911g_antisense durchgeführt, welche das gesamte Plasmid amplifiziert und den Austausch der entsprechenden Nukleotide vorgenommen hat. Der daraus resultierende Vektor ist pGSINT3.

Um die Proteintransduktionsdomäne HIV-TAT, ein Peptid abgeleitet aus dem Protein „*transactivator of transcription*“ des HI-Virus, in den Vektor pGSINT2 einzubringen, wurde ein Oligonukleotid mit der entsprechenden Sequenz in diesen Vektor kloniert. Hierzu wurden zunächst die zwei einzelsträngigen komplementären Oligonukleotide TAT(47-57)-Gly-link-sense und TAT(47-57)-Gly-link-antisense entworfen und zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid zusammengesetzt („annealing“). Dieses TAT-Oligonukleotid weist neben der die TAT-PTD kodierenden Sequenz (YGRKKRRQRRR), welche den Aminosäuren 47 bis 57 des HIV-TAT-Proteins entspricht, noch zwei die TAT-Sequenz flankierende Glycine auf. Sie sollen für eine gesteigerte Beweglichkeit und somit für eine verbesserte Exposition des TAT-Peptids sorgen. Außerdem besitzt das TAT(47-57)-Gly-link-Oligonukleotid Basenüberhänge am 5'- und 3'-Ende, welche mit den Restriktionsschnittstellen der Enzyme NotI und XhoI kompatibel sind. Der Vektor pGSINT2 wurde mit diesen Restriktionsenzymen verdaut und das TAT(47-57)-Gly-link-Oligonukleotid in den Vektor ligiert, das neu entstandene Plasmid ist pGSINTAT2.

Analog zur Reparatur der Mutation in der Integrase-CDS im Vektor pGSINT2 wurde diese auch in pGSINTAT2 mittels zielgerichteter Mutagenese korrigiert, der resultierende Vektor heißt dementsprechend pGSINTAT3 (Abbildung 3.2).

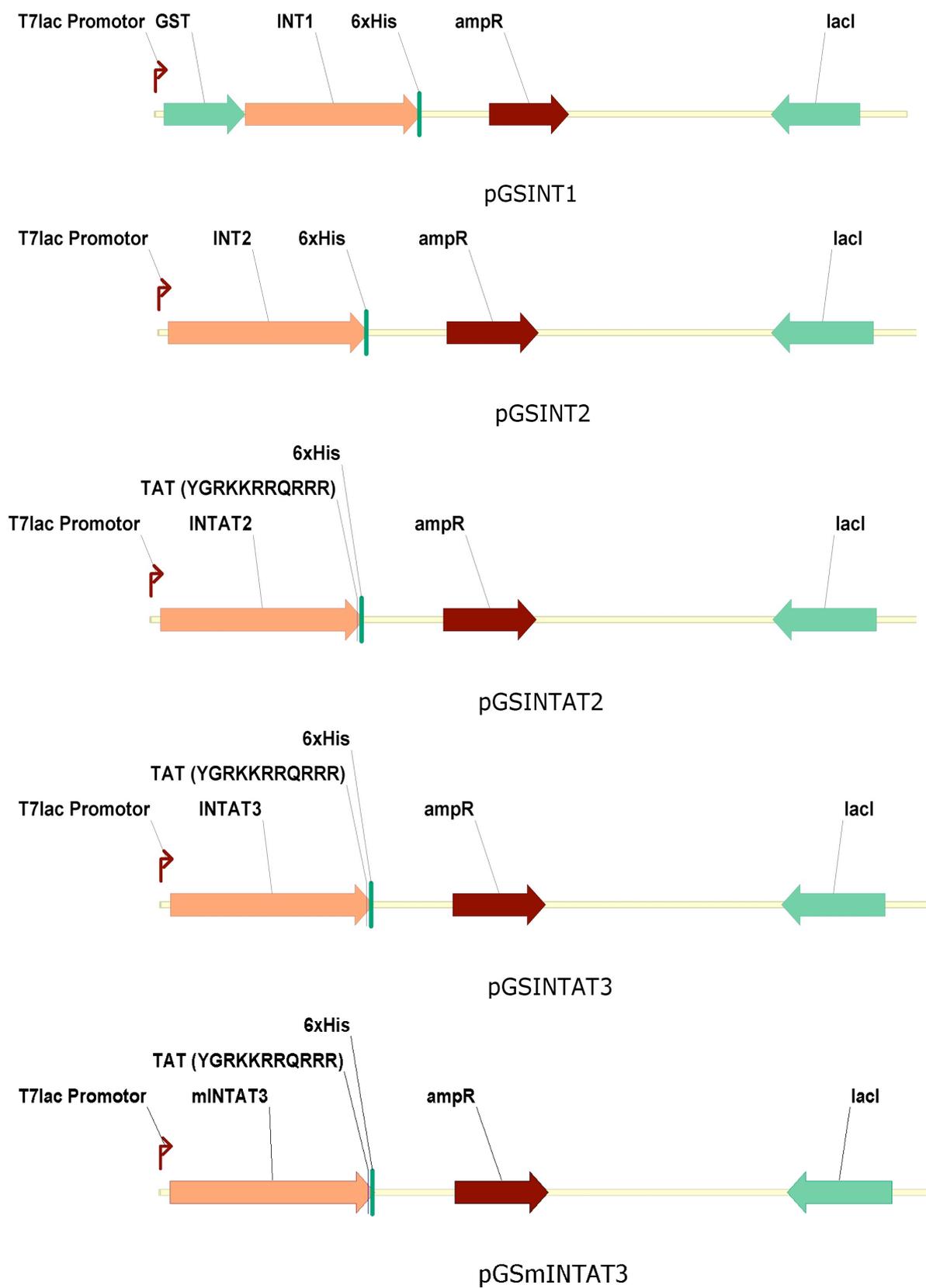


Abbildung 3.2: pGS-21a-basierte Plasmide.

Als Negativkontrolle zu funktionellem Φ C31-Integraseprotein in Transduktionsexperimenten wurde eine nicht-funktionale Variante erzeugt, indem die *missense*-Mutation S12F (Thorpe and Smith 1998) mittels zielgerichteter Mutagenese in die Φ C31-Integrase-kodierende Sequenz des Vektors pGSINTAT3 eingeführt wurde, was in dem Vektor pGSmINTAT3 resultierte. Hierfür wurden die Primer pGSINTAT_c123t_g124c_antisense und pGSINTAT_c123t_g124c_sense verwendet. Die Aminosäure Serin an Position 12 des Φ C31-Integraseproteins ist essentiell für dessen Funktionalität, durch die Mutation dieses Serins in ein Phenylalanin im Protein mINTAT3 ist dieses nicht mehr zur Rekombination von *attachment*-Sequenzen fähig.

3.1.4 Expression und Aufreinigung

Im Folgenden werden die Bedingungen für die Expression der rekombinanten Φ C31-Integrasekonstrukte mit Hilfe der verwendeten Expressionsvektoren näher beschrieben, diese waren wesentlich für den Erhalt von unlöslichem oder löslichem und somit funktionellem Integraseprotein.

3.1.4.1 Expression mittels pET-Vektoren

Zur Expression der Φ C31-Integrase mittels des Vektors pET20INT wurden zunächst 1 ml-Kulturen („E. cloni“ *E. coli* BL21 (DE3)) gezogen, mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C für 3 Stunden geschüttelt. Die Bakterienpellets wurden mit Lysepuffer aufgeschlossen und die Integrase über Ni-NTA-Säulen in der Eppendorfszentrifuge aufgereinigt.

Im größeren Maßstab wurden 3 ml Vorkultur bei 37 °C auf 400 ml Volumen expandiert. Nach Induktion der Expression durch 0,5 - 2 mM IPTG wurde die Kultur nach 4 Stunden Inkubation geerntet. Die Bakterienpellets wurden mit Novagen

BugBuster Mastermix aufgeschlossen und über Ni-NTA Säulen aufgereinigt (Abbildung 3.3). Nach vier Waschschritten wurde das gereinigte Protein (INTP) von der Säule eluiert.

Mit dem Plasmid pET20INT wurden bei geringer Induktion relativ niedrige Expressionsraten erzielt, bei stärkerer Induktion lag der Großteil des rekombinant exprimierten Integraseproteins in unlöslichen Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vor. Hierbei handelt es sich um akkumuliertes, fehlgefaltetes Protein, das keinerlei enzymatische Aktivität mehr besitzt. Einschlusskörperchen wurden gereinigt und mit Harnstoff in Lösung gebracht, anschließend wurde der Harnstoff zum Zweck der Rückfaltung des denaturierten Integraseproteins per Dialyse oder Gelfiltration entfernt.

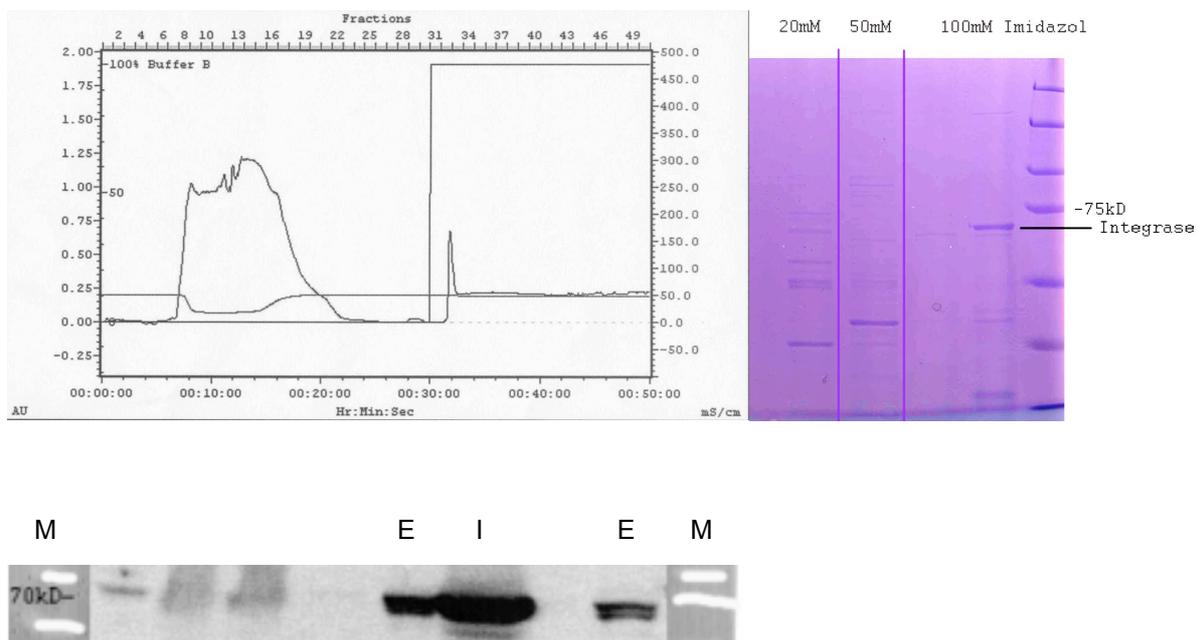


Abbildung 3.3: Aufreinigung von INTP.

Oben links: Profil der Aufreinigung von pET20INT-kodierter Φ C31-Integrase auf einer BioRad-FPLC.

Oben rechts: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des über FPLC gereinigten Integraseproteins.

Unten: Western Blot-Analyse des INTP-Proteins; M: Größenmarker; E: Eluat; I: Einschlusskörper

3.1.4.2 Expression mittels pGS21a-basierter Vektoren

Der Vektor pGSINT1 kodiert für ein Glutathion-S-Transferase (GST)- Φ C31 Integrase-Fusionsprotein mit N- und C-terminalen His-Tags. Analog zu pET20INT konnten im Kleinmaßstab bei 37 °C und 1 mM Induktion durch IPTG in „E. cloni“ *E. coli* BL21 Bakterien (Lucigen, USA) kleine Mengen löslichen GST-Integraseproteins exprimiert und über Ni-NTA Spincolumns aufgereinigt werden. Wurde die Expression in höheren Volumina bei 37 °C durchgeführt, konnte wiederum entweder geringe lösliche Ausbeute an Integraseprotein bei niedriger Induktion (0,1-0,5 mM IPTG) oder größere Mengen an unlöslichen Einschlusskörperchen erzielt werden.

Die Vektoren pGSINT2, pGSINT3, pGSINTAT2, pGSINTAT3 und pGSmINTAT3 kodieren für Integraseproteine ohne GST-Tag. Verwendung dieser Konstrukte in den Bakterienstämmen *E. coli* C41 oder C43 (Lucigen) mit 1 mM IPTG bei 37 °C führte zu geringer bis keiner Expression rekombinanter Φ C31-Integrase. Im *E. coli* Stamm Arctic Express führte Induktion dieser Plasmide bei 0,5 - 1 mM IPTG und 12 °C zu Expression geringer Mengen an löslichem rekombinatem Φ C31-Integraseprotein.

Als weitere Alternative für die Expression von Φ C31-Integrase und Integrase-TAT-Fusionsprotein (INTAT) wurden die entsprechenden Plasmide in elektrokompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS („E. cloni BL21 pLysS“, Lucigen, USA) transformiert. Für Vorkulturen wurden frisch transformierte oder mit Glycerol eingefrorene Bakterien verwendet. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler herangezogen und schrittweise auf ein maximales Endvolumen von 400 ml pro 2 l-Erlenmeyerkolben expandiert. Expression von rekombinatem Integraseprotein bei 37 °C und 0.1 - 2 mM IPTG erbrachte eine Ausbeute von bis zu 10 mg/l Bakterienkultur, das Protein lag jedoch wiederum in unlöslichen Einschlusskörpern vor. Zur Expression löslichen Proteins wurde die Temperatur auf 24 °C gesenkt und nach Adaption die Proteinexpression mit 30 μ M IPTG für 5 Stunden induziert.

Die Bakterien wurden mit BugBuster-Lysepuffer (Novagen-Merck, Deutschland) aufgeschlossen. In Einschlusskörperchen vorliegende Proteine INTAT2 und INTAT3 wurden mit 8 M Urea in Lösung gebracht, lösliches Protein wurde direkt

weiterverarbeitet. Die Aufreinigung erfolgte über den Hexa-Histidin-Tag (6xHis-Tag) am C-Terminus der rekombinanten Integraseproteine mittels Ni-NTA Agarose. Das gelöste Protein wurde auf der Säule mit Bindepuffer und Waschpuffer mit steigenden Konzentrationen an Imidazol gewaschen und mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen der Aufreinigung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot analysiert (Abbildung 3.4). Integrasehaltige Fraktionen wurden gepoolt und aufkonzentriert. INTAT-Protein in ureahaltigem Puffer wurde über PD-10 Sepharosesäulen umgesalzt.

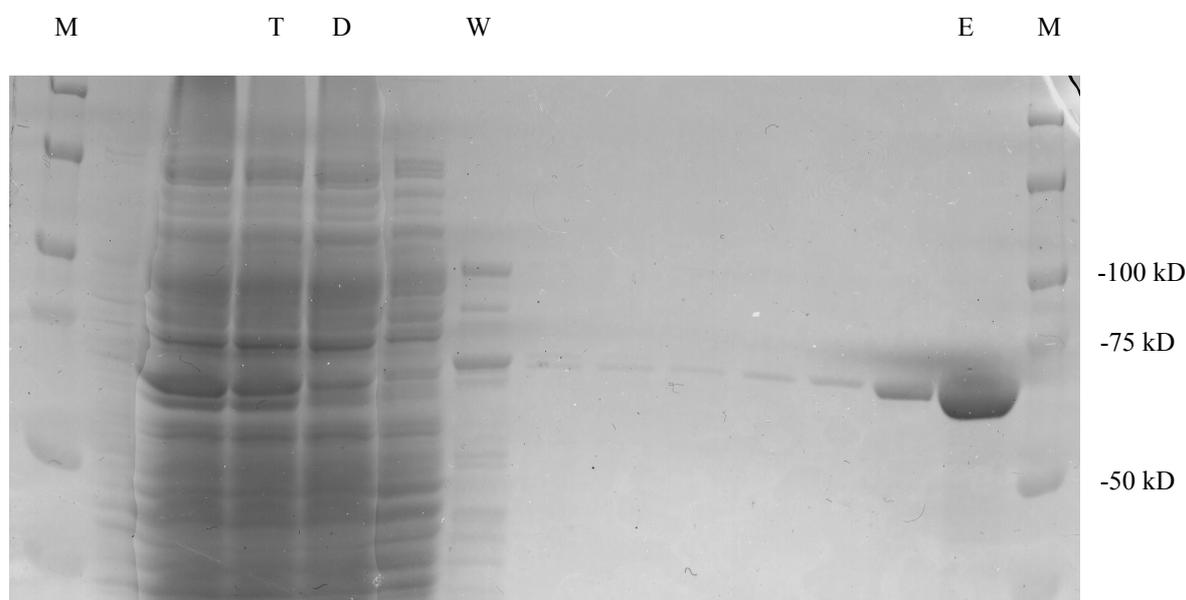


Abbildung 3.4: SDS-PAGE einer INTAT3 Aufreinigung.

M: Größenmarker; T: Gesamtprotein; D: Durchfluss; W: Waschfraktionen; E: Eluat

Tabelle 3.1 bietet eine Übersicht über die für diese Arbeit hergestellten Expressionsplasmide und die Eigenschaften ihrer Produkte. Aufgrund der guten Löslichkeit und der Transduktionseigenschaften (siehe 3.2.3) des Proteins wurde im Folgenden vorwiegend das pGSINTAT3-Plasmid und das INTAT3-Protein verwendet.

Vektor	Protein	GST-Tag	HIV-TAT	His-Tag	Löslichkeit
pET20INT	INTP	x	x	✓	-
pGSINT1	INT1	✓	x	✓	+
pGSINT2	INT2	x	x	✓	+
pGSINT3	INT3	x	x	✓	+
pGSINTAT2	INTAT2	x	✓	✓	++
pGSINTAT3	INTAT3	x	✓	✓	++
pGSmINTAT3	mINTAT	x	✓	✓	++

Tabelle 3.1: Übersicht über Plasmide, Namen, Zusammensetzung und Eigenschaften von Plasmidprodukten.

Legende: ✓ vorhanden; x nicht vorhanden; - gering; + gut; ++ sehr gut

3.2 Funktionelle Charakterisierung

Um das aufgereinigte Integraseprotein auf Funktionalität zu prüfen, wurden verschiedene Aktivitätsassays angewandt. Das Protein wurde sowohl in einem *in vitro* Funktionalitätstest auch in einer Säugerzelllinie getestet, welche ein stabil transfiziertes Reporterkonstrukt besitzt.

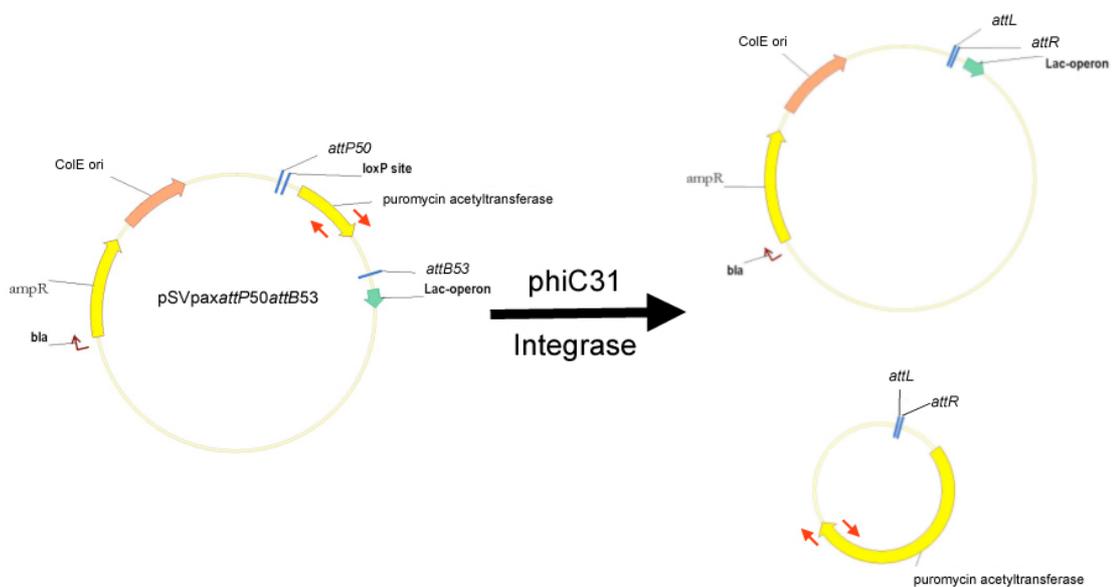


Abbildung 3.5: Schema des intramolekularen Rekombinationsassays.

Das Integraseprotein bindet an den *attP*- und *attB*-Bindestellen des parenteralen Plasmids (7,4 kb), im Laufe der Rekombinationsreaktion entstehen zwei Tochterplasmide von 6,4 kb und 1,2 kb Größe mit den charakteristischen *attL*- und *attR*-Stellen. Die roten Pfeile markieren die Bindestellen und Ausrichtung der PCR-Primer.

3.2.1 *In vitro* Rekombinationsassays

Um die Aktivität der rekombinant exprimierten Φ C31-Integrase zu testen, wurde ein *in vitro* Reporterassay entwickelt, der auf der intramolekularen Rekombination eines Plasmids durch die Φ C31-Integrase beruht (Thorpe and Smith 1998). Hierzu wurde das Plasmid pSVpaxattP50attB53 zusammen mit rekombinanter Φ C31-Integrase

inkubiert. Das Plasmid *pSVpaxattP50attB53* besitzt eine *attP*- und eine *attB*-Bindestelle, welche spezifisch von der Φ C31-Integrase erkannt werden. Diese Bindestellen flankieren ein ca. 1,2 kb großes Fragment des 7,4 kb großen Plasmids. Im Falle einer intramolekularen Rekombination des Plasmids durch die Φ C31-Integrase entstehen somit aus dem parenteralen Plasmid zwei neue ringförmige DNA-Moleküle von je 6,2 kb und 1,2 kb Größe.

Nach Inkubation des Reporterplasmids mit rekombinantem Φ C31-Integraseprotein, welches mit Hilfe des Expressionsplasmids *pET20INT* hergestellt wurde (siehe 3.1.4.1), konnte zunächst nur das parenterale Plasmid über Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Es bestand dennoch eine geringe Aktivität der Integrase, wie mit einem PCR-basierten Assay nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde der Reaktionsansatz als Template für eine PCR mit den Primern Puro FP und Puro RP eingesetzt, welche im Bereich des kleineren, 1,2 kb großen Plasmidfragments binden und das Plasmid invers amplifizieren lassen. Sollte keine Rekombination stattgefunden haben, findet sich kein PCR-Produkt, da das ca. 7,4 kb große, parenterale Plasmid von der verwendeten Taq-Polymerase nicht amplifiziert werden kann, da diese maximal 5 kb verarbeiten kann. Im Falle erfolgreicher Rekombination wird ein PCR-Produkt von ca. 900 bp erzeugt, da die Primer ausschließlich auf dem kleineren Fragment binden. Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis des PCR-Nachweises für *pET20INT*-kodierte Integrase. Im Falle von rekombinanten Φ C31-Integraseproteinen, welche mit Hilfe des *pGS-21a*-Expressionsvektors hergestellt wurden (*INT2*, *INT3*, *INTAT2*, *INTAT3*), konnte die Rekombination ohne den Schritt des PCR-Nachweises direkt über die Agarosegelelektrophorese dargestellt werden (Abbildung 3.7). Nach Inkubation von INT-Protein und Reporterplasmid und Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI zur Linearisierung der Reaktionsprodukte werden zwei bis drei Banden auf dem Agarosegel sichtbar. Die kleinste Bande stellt das kleinere der beiden Produkte der intramolekularen Rekombination dar, es ist erwartungsgemäß ca. 1,2 kb groß.

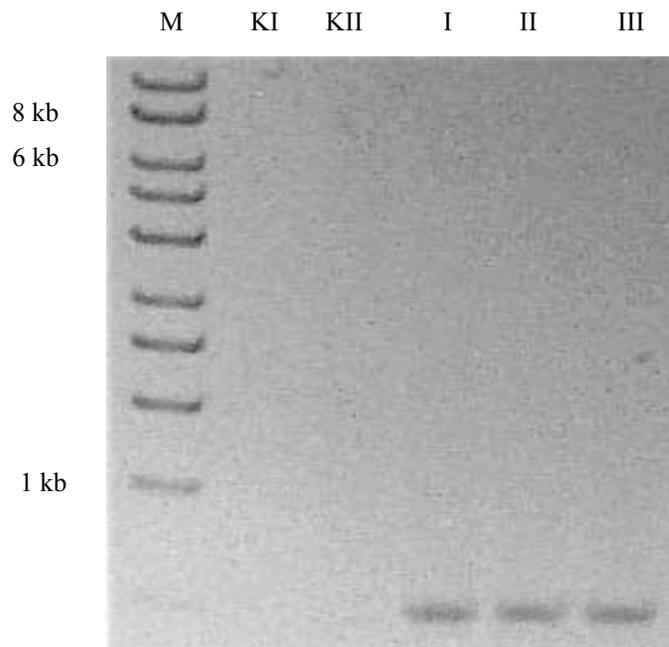


Abbildung 3.6: Das Plasmid *pSVpaxattP50attB53* wurde mit pET20INT-kodiertem rekombinatem Φ C31-Integraseprotein inkubiert, das Plasmid wurde anschließend als Template in eine PCR eingesetzt und das Rekombinationsprodukt per Gelelektrophorese detektiert.

M: Größenmarker; KI: Kontrolle H₂O; KII: Kontrolle *pSVpaxattP50attB53*; I, II, III: Φ C31-Integrase

Im Bereich 6 kb bis 8 kb sind ein bis zwei Banden auf dem Gel zu sehen, das parenterale Plasmid (7,5 kb) und das größere Rekombinationsprodukt (6,3 kb). Drei Banden deuten auf unvollständige Rekombination des parenteralen Plasmids hin.

Um die Temperaturabhängigkeit der rekombinanten Φ C31-Integrase zu untersuchen, wurde der Rekombinationsassay bei 4 °C, bei Raumtemperatur und bei 37 °C durchgeführt. Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich, ist die Aktivität bei 4 °C deutlich geringer als bei 37 °C oder Raumtemperatur.

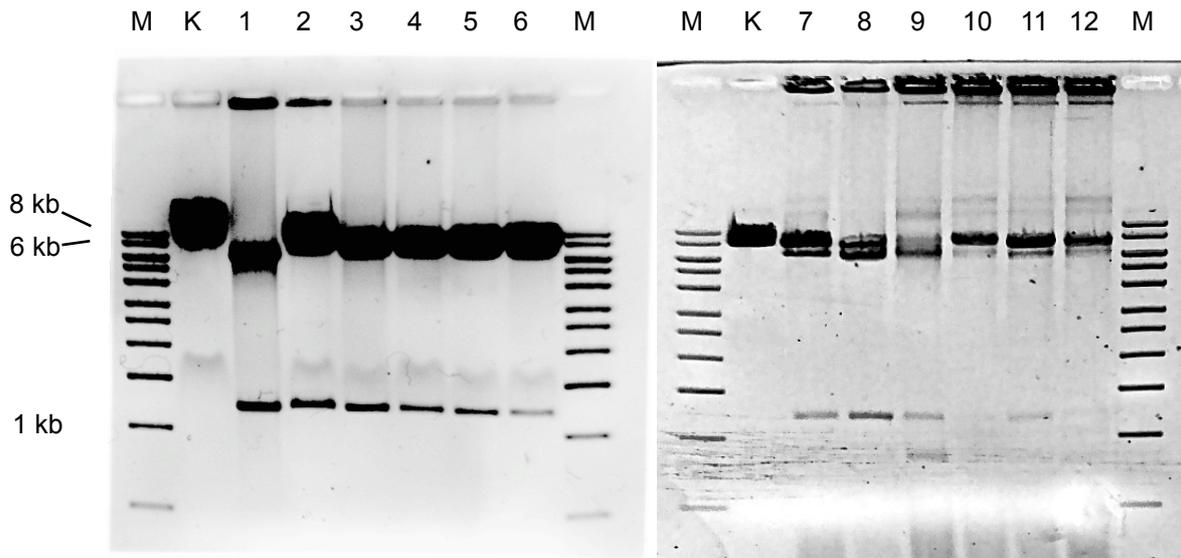
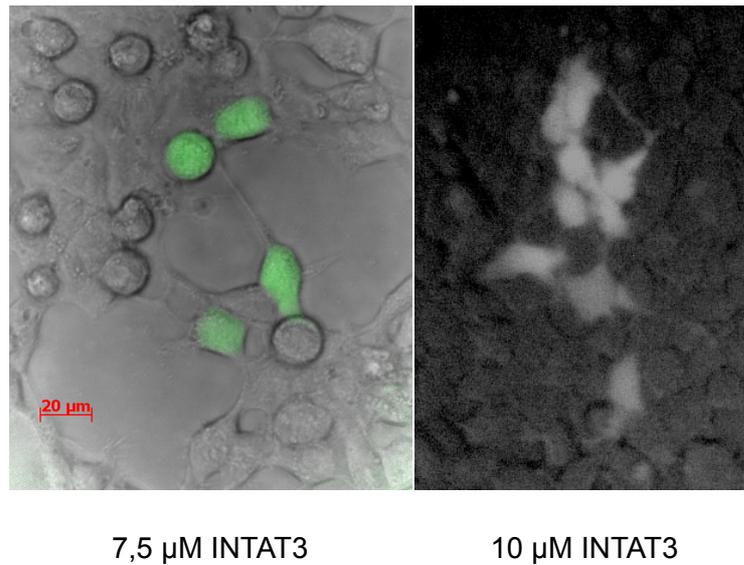
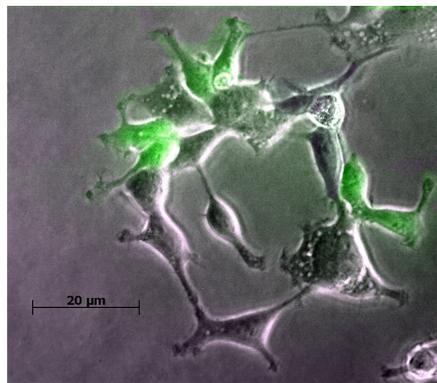


Abbildung 3.7: links: Rekombinationsassay mit INTAT3; **rechts:** Temperaturabhängigkeit der phiC31-Integrase-vermittelten Rekombination.

Nach Inkubation von INTAT3-Protein und Reporterplasmid und Verdau mit dem Restriktionsenzym BamHI zur Linearisierung der Reaktionsprodukte werden zwei bis drei Banden auf dem Agarosegel sichtbar. Die kleinste Bande stellt das kleinere der beiden Produkte der intramolekularen Rekombination dar, es ist erwartungsgemäß ca. 1,2 kb groß. Im Bereich 6 kb bis 8 kb sind ein bis zwei Banden auf dem Gel zu sehen, das parenterale Plasmid (7,5 kb) und das größere Rekombinationsprodukt (6,3 kb). Die Banden links 1 bis 6 zeigen die beiden Rekombinationsprodukte, bei abnehmender Integrasekonzentration, die Reaktion lief bei 37 °C ab. Banden 7 bis 9: Raumtemperatur, 10 bis 12: 4 °C.

M: Größenmarker; K: Kontrolle

Des Weiteren wurde die Aktivität der INTAT-Proteine auch in Säugerzelllinien überprüft. Hierfür wurde zunächst die humane embryonale Nierenzelllinie 293EGFP $attP$ attB verwendet (siehe 2.1.11.2). Diese HEK293-Zelllinie trägt ein stabil transfiziertes Reporterkonstrukt, welches nach dem Prinzip des zuvor erwähnten pSVpax $attP$ 50 $attB$ 53 aufgebaut ist. Die Expressionskassette enthält ein von $attP$ - und $attB$ -Bindestellen flankiertes DNA-Element, welches die Transkription und somit die Expression eines nachgeschalteten EGFP-Gens verhindert.

7,5 μM INTAT310 μM INTAT3**Abbildung 3.8:** Transduktion von INTAT3 in 293EGFPattPattB-Zellen.

Oben: Auf 293EGFPattPattB-Zellen wurde 7,5 μM (links, Überlagerung Epi-Fluoreszenz/Hellfeld) und 10 μM (rechts, Epi-Fluoreszenz) rekombinantes INTAT3-Protein gegeben. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Unten: Per Pro-DeliverIN INTAT3-transduzierte 293EGFPattPattB-Zellen. (Überlagerung Epi-Fluoreszenz/Hellfeld, 40x)

Dieses EGFP-Gen kodiert für das Enhanced Green Fluorescent Protein, ein verbessertes grün fluoreszierendes Protein, das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Gelangt nun funktionelles ΦC31 -Integraseprotein in den Zellkern der 293EGFPattPattB-Zelle, bindet es an die *attP*- und *attB*-Stellen, und das Stoppelement wird durch intramolekulare Rekombination entfernt. Die somit

aktivierte EGFP-Genexpression kann mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie gemessen werden (Abbildung 3.10).

In ersten Versuchen wurde das INTAT3-Protein in Konzentrationen von 0,2 μM bis 10 μM auf die 293EGFP*PattPattB*-Zellen gegeben. Aufgrund der HIV-TAT Proteintransduktionsdomäne ist INTAT3 in der Lage, mittels Makropinozytose von den Zellen aufgenommen zu werden. Obwohl das INTAT3 Protein in den Zellen nachweisbar war (siehe 3.2.4), fand kaum Rekombination statt, wie die geringe EGFP-Expression nahelegt. Erst mit Konzentrationen von 7,5 bis 10 μM INTAT3 konnten geringe Mengen (ca. 1 %) an EGFP-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Abbildung 3.8). Höhere Konzentrationen an rekombinanter ΦC31 -Integrase hatten toxische Auswirkungen auf die Zellen. Die Applikation von Integraseprotein ohne TAT-Proteintransduktionsdomäne hatte keinen Effekt, daher wurden alle weiteren Versuche mit INTAT3 durchgeführt.

Alternativ zur alleinigen Gabe von INTAT3-Protein wurden das Proteintransduktionsreagenz Pro-DeliverIN (Oz Biosciences, Frankreich) und das Amaxa Nucleofector System (Lonza, Deutschland) eingesetzt, um die Effizienz der Proteintransduktion zu steigern. Die Effizienz von ProDeliverIN wurde durch Transduktion des fluoreszierenden Proteins Phycoerythrin ermittelt. Etwa 60 % der eingesetzten Zellen konnten mittels Durchflußzytometrie als Phycoerythrin-positiv bestimmt werden. Durch die Verwendung von Pro-DeliverIN mit INTAT3 konnten jedoch nur relativ geringe Mengen an EGFP-positiven 293EGFP*PattPattB*-Zellen induziert werden (Abbildung 3.9).

Der Nucleofector ist ein Elektroporationssystem, welches als nonvirale Methode zur Einbringung von Nukleinsäuren wie z. B. Plasmid-DNA oder siRNA in Säugerzellen verwendet wird. Über ein proprietäres System aus Elektroporationsbedingungen und Pufferzusammensetzung wird hierbei ein Transfer der nackten Nukleinsäure in den Zellkern erreicht. In dieser Arbeit wurden sowohl das Nucleofector-System, welches mit Einzelküvetten arbeitet, als auch das 96-well Shuttle System eingesetzt.

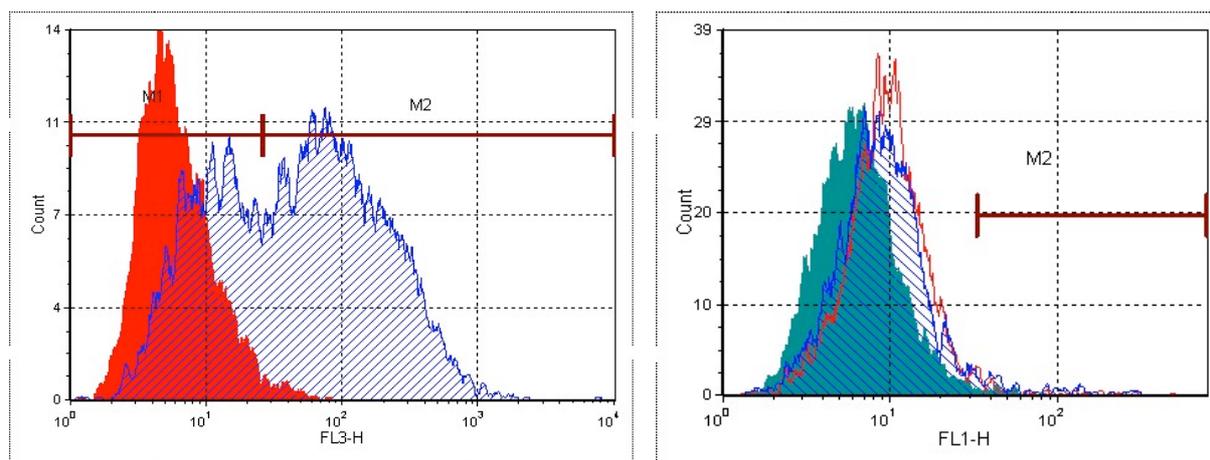


Abbildung 3.9: Transduktion von 293EGFPattPattB-Zellen mittels ProDeliverIN.

Links: 293EGFPattPattB-Zellen wurden mittels ProDeliverIN mit 1 μ g Phycoerythrin transduziert, um die Effizienz des Transduktionsmittels zu verifizieren. Die Fluoreszenz der transduzierten Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Ca. 60 % der eingesetzten Zellen waren Phycoerythrin-positiv.

Rot: Mock-transduzierte 293EGFPattPattB-Zellen; Blau: Phycoerythrin-transduzierte 293-Zellen

Rechts: Mit Chloroquin behandelte INTAT3 transduzierte 293-Reporterzellen wurden im FACScan auf EGFP-Expression untersucht. Es wurden ca. 3 % EGFP-positive Zellen gemessen, was der Integrase-vermittelten Rekombination entspricht.

Grün: Mock-transduzierte 293-Zellen; Blau: INTAT3-transduzierte 293-Zellen (ProDeliverIN, 1:1 (w/v)), 200 nM Chloroquin; Rot: INTAT3-transduzierte 293-Zellen, 1 μ M Chloroquin.

Zunächst wurden die von Amaxa für die Zelllinie 293 und den Nucleofector empfohlenen Programme A23 und Q01 getestet, hier stellte sich A23 als das besser geeignete heraus. Das INTAT3-Protein wurde zusammen mit 1×10^6 293-Reporterzellen in den Nucleofektionsansatz gegeben, nach der Transduktion wurde der Ansatz in Zellkulturschalen ausgesät und 24 oder 48 Stunden später per Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie untersucht. Abhängig von der eingesetzten Konzentration an Φ C31-Integraseprotein ergaben sich in der FACS-Analyse bis zu 70 % EGFP-positive Zellen, in welchen folglich Integrase-vermittelte Rekombination stattfand. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Plasmid pC31Intopt transfiziert. Die Φ C31-Integrase als Protein aus einem Bakteriophagen ist auf RNA-Ebene auf optimale Expression in Bakterien ausgelegt, die Integrase-kodierende Sequenz in pC31Intopt wurde auf die in Säugetieren am häufigsten benutzten Kodons optimiert, um Translation und somit Expressionsrate der Φ C31-

Integrase in Säugerzellen zu steigern (Raymond and Soriano 2007). 48 Stunden nach Transfektion mit pC31Intopt konnten ca. 30 % EGFP positive Zellen gemessen werden (Abbildung 3.10).

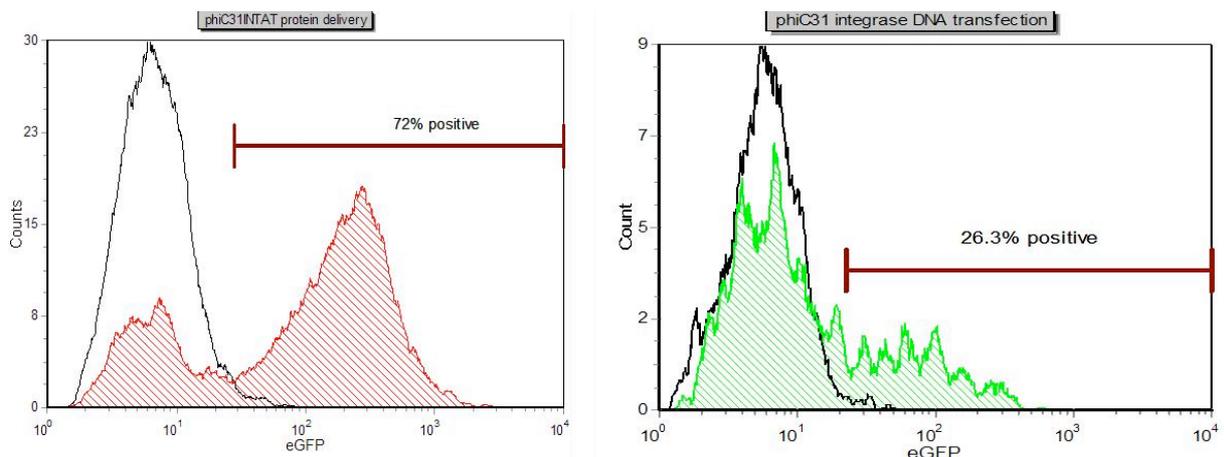
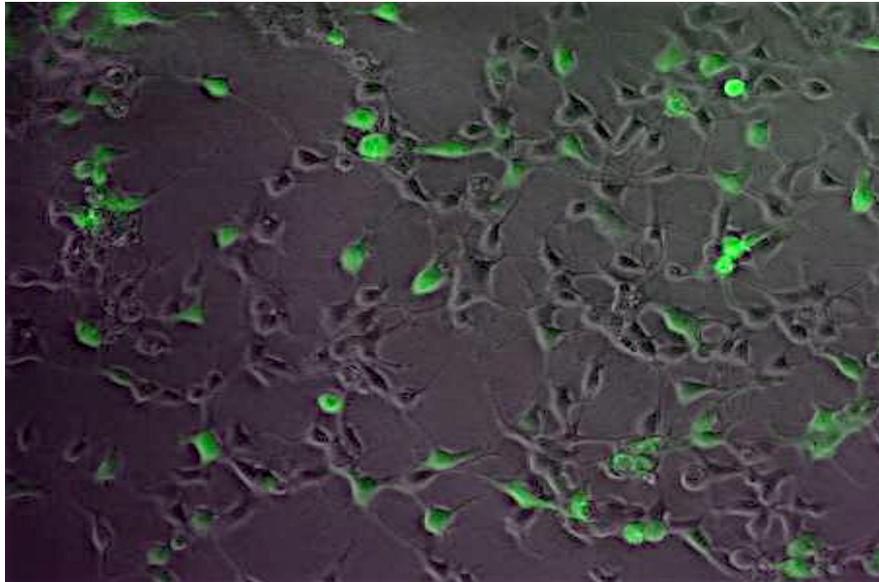


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische und mikroskopische Analyse von mit Φ C31-Integrase behandelten 293EGFP*attBattP* Reporterzellen.

Oben: Überlagerungsbild Hellfeld/Fluoreszenz, (20x)

Unten: Die Zellen wurden durch Nukleofektion mit 8 μ M INTAT3-Protein (links) transduziert oder mit 5 μ g des kodonoptimierten Integraseplasmids pC31Intopt transfiziert (rechts) und nach 48 Stunden mit einem BD FACScan untersucht. In Zellen, welche Fluoreszenz aufweisen, hat eine Integrase-vermittelte Rekombination stattgefunden, die zur Expression von EGFP führte.

Die Rekombinationsaktivität der rekombinanten Φ C31-Integrase sollte auch in Zelltypen aus anderen Geweben wie z. B. Lunge oder in hämatopoetischen Zellen validiert werden. Repräsentativ für die Lunge wurden A549- und MLE-12-Zellen untersucht, alveolare Epithelzelllinien vom Typ II. Des Weiteren wurde die Aktivität in Jurkat T-Zellen bestimmt. Für diese Tests wurden die entsprechenden Zellen mit rekombinantem INTAT-Protein und einem Reporterplasmid kotransduziert. Die verwendeten Reporterkonstrukte Rep-Luc und *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP (Rep-EGFP) sind vom Aufbau her identisch mit dem bereits erwähnten pSVpax*attP50attB53*, sie bestehen aus einem Reportergen, dessen Transkription von einem von *attB*- und *attP*-Bindungsstellen flankiertem DNA-Fragment so lange unterbunden wird, bis funktionelle Φ C31-Integrase dieses Fragment durch intramolekulare Rekombination aus dem Plasmid entfernt und somit die Expression des Reportergens ermöglicht. Im Falle von Rep-Luc ist dieses Reportergen die Firefly-Luciferase, *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP trägt die Sequenz für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse des Aktivitätstests mit dem Plasmid *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP in der murinen alveolaren Epithelzelllinie MLE-12 dargestellt. Mittels Nukleofektion wurden Reporterplasmid, INTAT3-Protein und als Kontrollen Bovines Serumalbumin (BSA) oder defektive mINTAT-Integrase in unterschiedlichen Konzentrationen kotransduziert. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid allein und mit BSA eingesetzt, um eine eventuelle Grundexpression von EGFP zu bestimmen. Das Plasmid pEGFPN1, das ebenso eine EGFP-Expressionskassette trägt, wurde als Transfektionskontrolle verwendet, und die gemessene EGFP-Expression mit den pEGFPN1-Expressionswerten normalisiert. So konnte mit 1 μ M INTAT3-Protein eine Rekombinationsrate von ca. 74 % in MLE-12-Zellen gemessen werden, mit 0,2 μ M INTAT3 wurde noch Rekombination in 42 % der Zellen festgestellt. Höhere Konzentrationen an INTAT3-Protein beeinträchtigten die Zellviabilität und brachten keine Verbesserung der Rekombinationsrate.

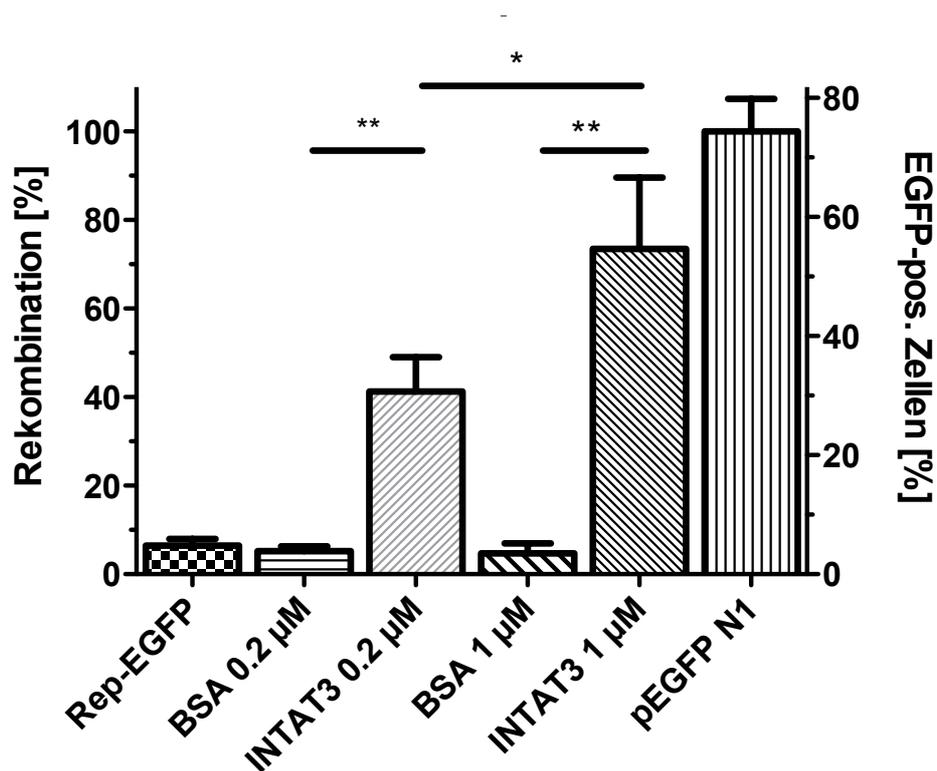


Abbildung 3.11: Intramolekularer Rekombinationsassay zur Aktivitätsbestimmung von rekombinantem INTAT3-Protein in MLE-12 Zellen. Integraseprotein und Reporterplasmid wurden durch Nukleofektion in die Zellen eingebracht. Außer bei der pEGFPN1-Transfektionskontrolle wurde überall das Plasmid *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP (=Rep-EGFP) allein oder mit Protein eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde der Anteil der Zellen, die EGFP-Fluoreszenz zeigten, per Durchflusszytometrie bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA)

In Jurkat-Suspensionszellen konnte mit diesem Assay Rekombination in 28 % der Zellen unter Verwendung von 1 µM INTAT3-Protein gemessen werden. Eine Erhöhung der eingesetzten Integrasemenge brachte keine weitere Verbesserung (Abbildung 3.12).

Es wurden auch CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen in diesem Assay getestet, aufgrund niedriger verfügbarer Zellzahlen erbrachten diese Versuche jedoch keine verwertbaren Ergebnisse.

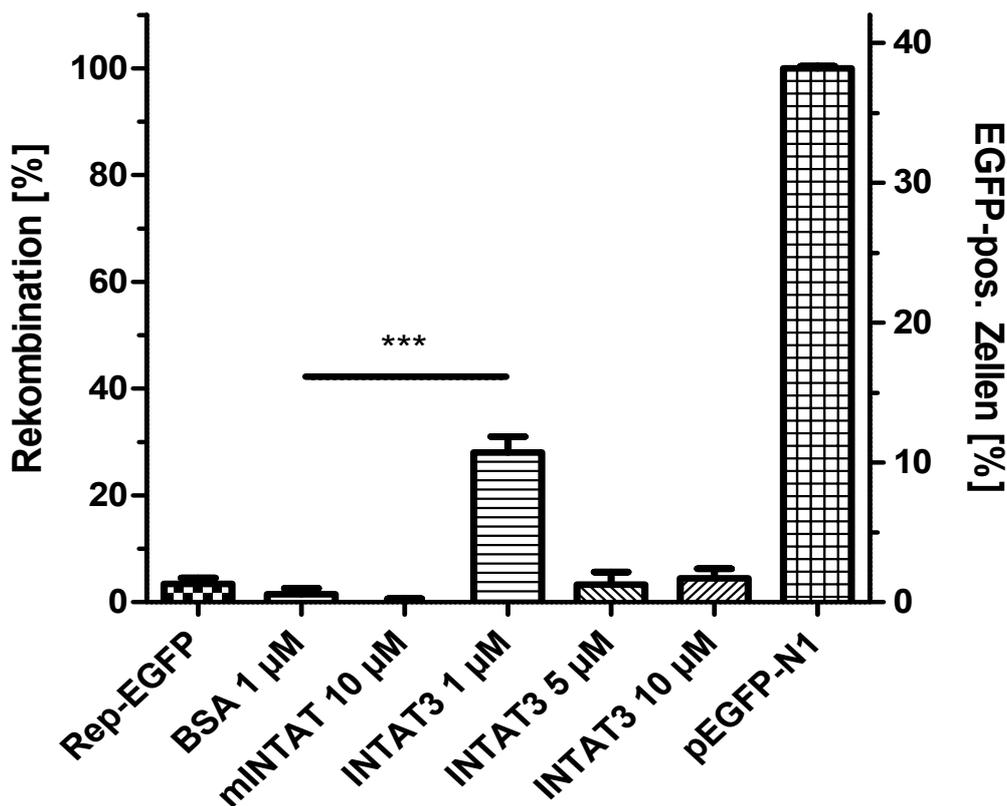


Abbildung 3.12: EGFP-Expression resultierend aus einem intramolekularen Rekombinationsassay zur Aktivitätsbestimmung von rekombinantem INTAT3-Protein in Jurkat-T-Zellen. Integraseprotein und *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP Reporterplasmid wurden kotransduziert, außer bei der pEGFPN1-Transfektionskontrolle wurde überall das Plasmid *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP (=Rep-EGFP) allein oder mit Protein eingesetzt. Die Anzahl EGFP-positiver Zellen in der FACS-Analyse normalisiert gegen die Transfektionseffizienz repräsentiert die integrasevermittelten Rekombinationsereignisse. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde mINTAT verwendet. (***) $p < 0,001$; ANOVA)

3.2.2 Bandshift Assay

Um die Bindungseigenschaften des rekombinanten Φ C31-Integraseproteins zu überprüfen, wurde ein auf dem EMSA-Prinzip (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

beruhender abgewandelter Bandshift-Assay eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Test, der die Bindung von DNA und Proteinen, meist Transkriptionsfaktoren, untersucht. DNA und das betreffende Protein werden inkubiert, mittels Gelelektrophorese werden die Eigenschaften dieses Ansatzes untersucht. Im Gegensatz zur nackten DNA wandert ein Protein/DNA-Komplex langsamer bzw. kürzer im elektrischen Feld durch das Gel. Das Ergebnis ist also eine Verschiebung der DNA-Protein-Bande im Gel in Relation zur Kontrolle (*band shift*). Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis dieses Versuchsansatzes mit dem Plasmid pCEF1 α -luc-*attB* und rekombinantes INTAT3-Protein. Als Kontrolle wurden nackte DNA, DNA mit BSA und INTAT3 mit pUC21 eingesetzt. INTAT3 und das Plasmid mit der Φ C31-Integrasebindestelle zeigen eine deutliche Verschiebung im Vergleich zu den Kontrollen.

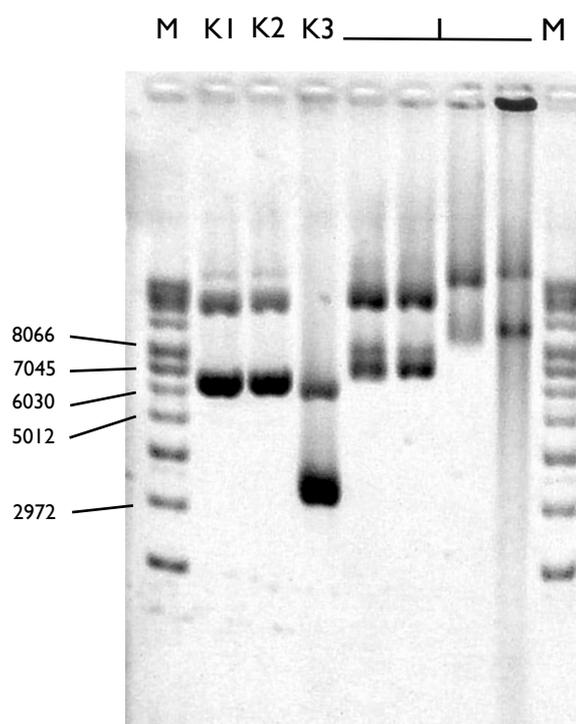


Abbildung 3.13: Bandshift Assay.

Rekombinantes INTAT3-Protein wurde mit dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* inkubiert und per Agarosegel aufgetrennt, um die Bindung des Integraseproteins an ein Plasmid mit *attB*-Bindestelle zu überprüfen. K1 zeigt das nackte Plasmid, K2 Plasmid+BSA als Kontrolle für unspezifische Bindung; K3: 6 μ g INTAT3-Protein + pUC21; I: INTAT3-Protein (1,5 μ g, 3 μ g, 6 μ g, 9 μ g)+ pCEF1 α -luc-*attB*; M: supercoiled-Größenmarker (bp)

Das Reporterplasmid zusammen mit Bovinem Serumalbumin (BSA) zeigt keine Anzeichen von Verschiebung in Relation zum nackten Plasmid, was unspezifische Bindung anderer Proteine ausschließt. Ebenfalls sind bei INTAT3-Protein zusammen mit pUC21, einem Plasmid ohne Bindestellen, keine Veränderungen zu beobachten, pUC21 ist im Gel an der zu erwartenden Position zu finden. Lediglich das Integraseprotein zusammen mit dem Reporterplasmid zeigt einen klaren Shift, was eine spezifische Bindung zwischen Integraseprotein und *attB*-Bindestellen des Plasmids nahelegt (Abbildung 3.13). Diese Bindungseigenschaften sind ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Entwicklung eines kombinierten DNA-Protein-Transfers.

3.2.3 Genomische Transgenintegration mittels rekombinanter Φ C31-Integrase

Die primäre Aufgabe der Φ C31-Integrase im Kontext gentherapeutischer Ansätze ist die stabile Integration einer therapeutischen Nukleinsäure ins Zielgenom. In dieser Arbeit wurde die Funktionalität der rekombinant produzierten Integrase im Zellkulturmodell getestet. Hierzu wurden die unter 3.2.2 beschriebenen Komplexe aus rekombinantem Φ C31-Integraseprotein und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* mit verschiedenen Methoden in unterschiedliche Zelltypen transduziert. Das Plasmid pCEF1 α -luc-*attB* besteht unter anderem aus einem Elongationsfaktor 1 α -Promotor, einer Luziferase-Expressionskassette und einer *attB*-Bindestelle. Plasmid und Integraseprotein wurden präinkubiert und anschließend durch lineares Polyethylenimin, Lipofektion oder Nukleofektion in die Lungenepithelzelllinien A549 und MLE-12 sowie in Jurkat-T-Zellen und HEK293-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

3.2.3.1 Transduktion durch Polyethylenimin

Ein Ansatz zur Transduktion von Nukleinsäure-Integrasekomplexen war die Verwendung von linearem Polyethylenimin (L-PEI). Dieses kationische Polymer ist als Transfektionsreagenz für Nukleinsäuren weit verbreitet. Das rekombinante Φ C31-INTAT3-Protein wurde zunächst in Verhältnissen zwischen 4:1 und 8:1 (w/w) mit dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* inkubiert, um eine Bindung zwischen Integraseprotein und *attB*-Bindestelle herzustellen. Durch Zugabe von linearem Polyethylenimin in einem N/P-Verhältnis von 10 wurde das DNA-Protein-Gemisch weiter komplexiert und die negativen Ladungen der Nukleinsäuren maskiert. Als Negativkontrolle wurde das rekombinante INTAT3-Protein durch BSA oder defektive mINTAT3-Integrase ersetzt, der ganze Vorgang fand in serumfreiem Medium statt. Im Falle der Lungenepithelzelllinien A549 und MLE-12 wurden die Komplexe in serumfreiem MEM auf die Zellen in Multiwellplatten gegeben. Jurkat-Suspensionszellen wurden auf diese Weise in RPMI-Medium behandelt, 293-Zellen in DMEM.

Nach 7, 14 und 29 Tagen wurde die Luziferaseexpression in den transduzierten Zellen bestimmt, die durch das pCEF1 α -luc-*attB*-Konstrukt vermittelt wurde. Im Falle der transduzierten Jurkat-T-Zellen konnte nach 7 Tagen noch eine Luziferaseexpression von ca. 20 % und nach 29 Tagen immerhin noch 1 % Expression nachgewiesen werden, verglichen mit 2,9 % respektive 0 % bei der Negativkontrolle (Abbildung 3.14).

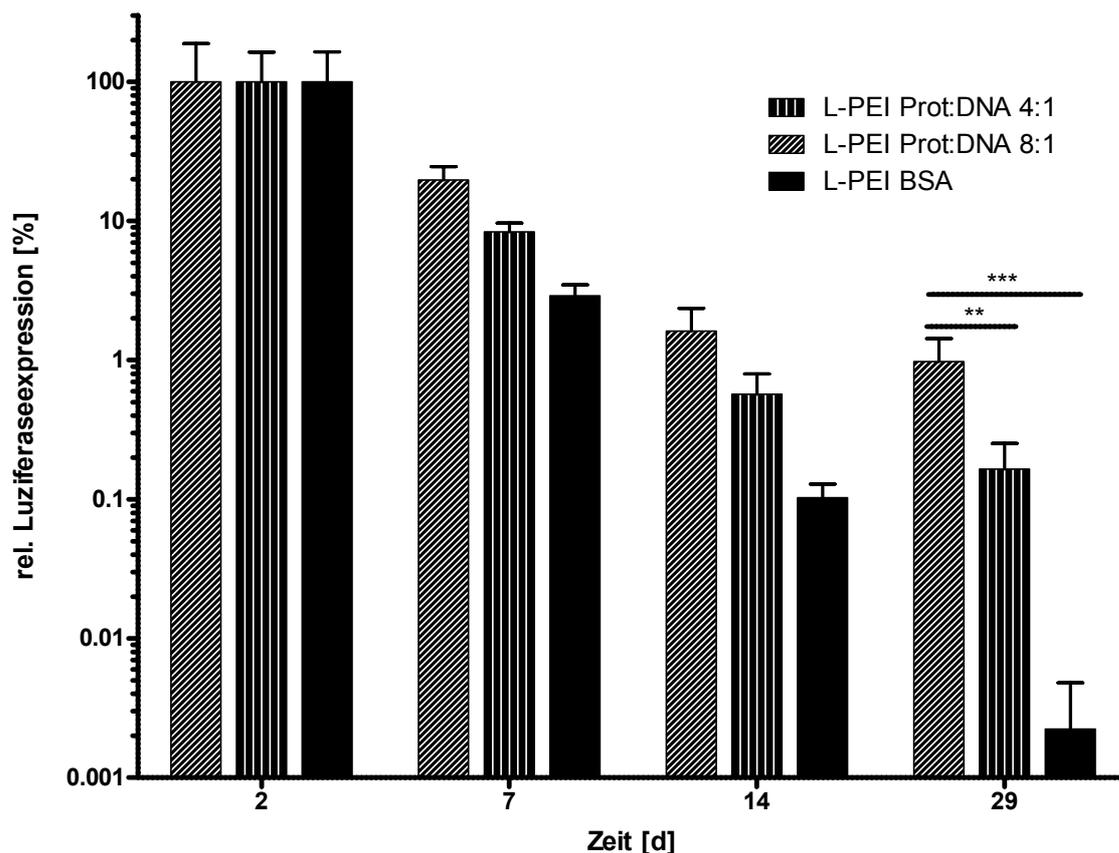


Abbildung 3.14: Luziferaseexpression in Jurkat T-Zellen.

Jurkat T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von linearem Polyethylenimin transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA)

Alveolare Epithelzellen vom Typ II, die Zelllinie A549 humanen Ursprungs, wurden ebenfalls mit den Protein-DNA-PEI-Komplexen behandelt. A549-Zellen wiesen 2 Wochen nach der Transduktion mit INTAT3-Protein und Reporterplasmid im Verhältnis 8:1 noch 2,4 % der initialen Luziferaseexpression auf, nach 29 Tagen konnten noch ca. 0,1 % gemessen werden. Ein Verhältnis von 4:1 führte nur zu ca. 0,013 % Expression nach 14 Tagen und 0,007 % nach 29 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt war die Luziferaseexpression in der Kontrollgruppe nicht mehr nachweisbar (Abbildung 3.15).

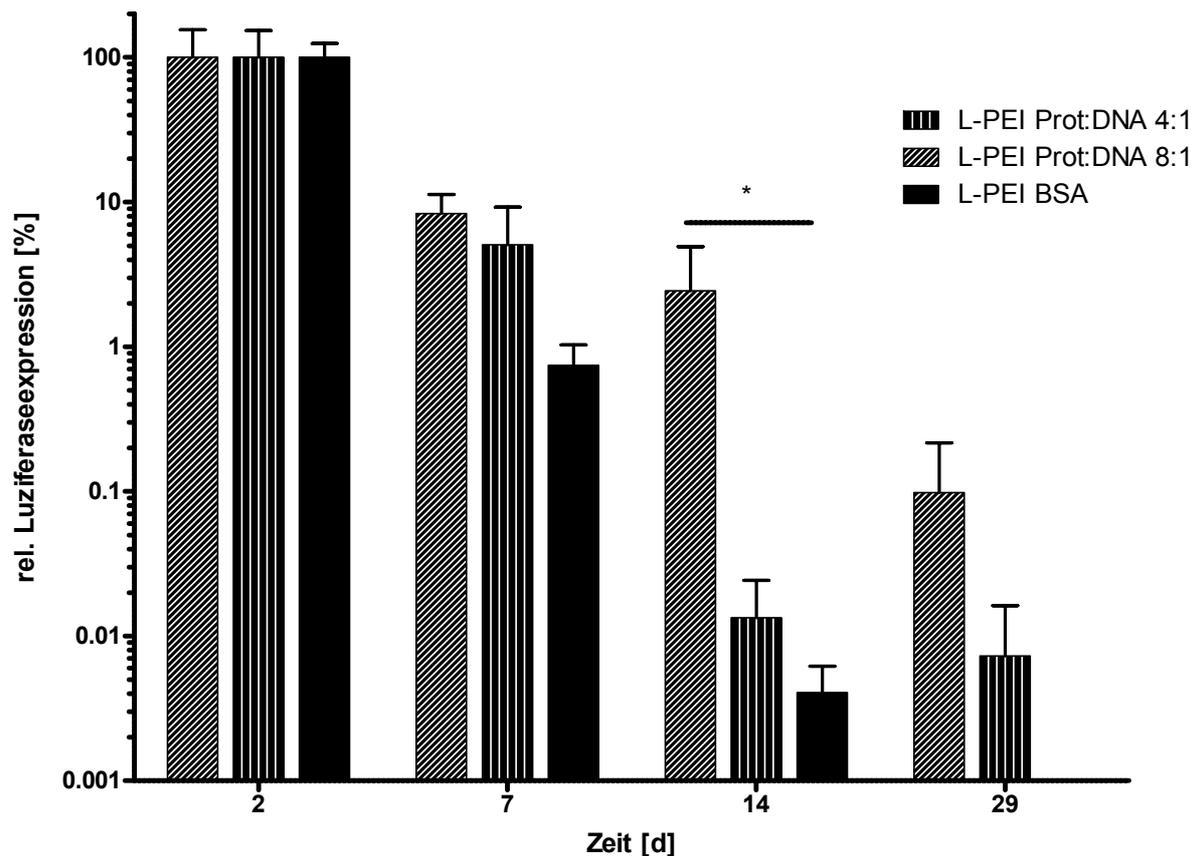


Abbildung 3.15: Luziferaseexpression in A549-Zellen (L-PEI).

A549-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem INTAT3-Integraseprotein und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von linearem Polyethylenimin transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(* $p < 0,05$; ANOVA)

Des Weiteren wurden die Integrase/Plasmid-Komplexe mit der Polyethylenimin-Methode auch in die bereits erwähnten 293EGFP*attB*-Reporterzellen (siehe 3.2.1) eingebracht (Abbildung 3.16). Bei einem verwendeten Protein-DNA-Verhältnis von 8:1 waren nach 3 Wochen noch ca. 4 % des Luziferaseexpressionslevels von Tag 1 feststellbar. Am Tag 29 konnte noch 1 % der initialen Luziferaseexpression gemessen werden. Die Expression der Kontrollgruppe, in welcher BSA verwendet wurde, war bereits ab Tag 14 auf einen Level von ca. 0,3 % gesunken.

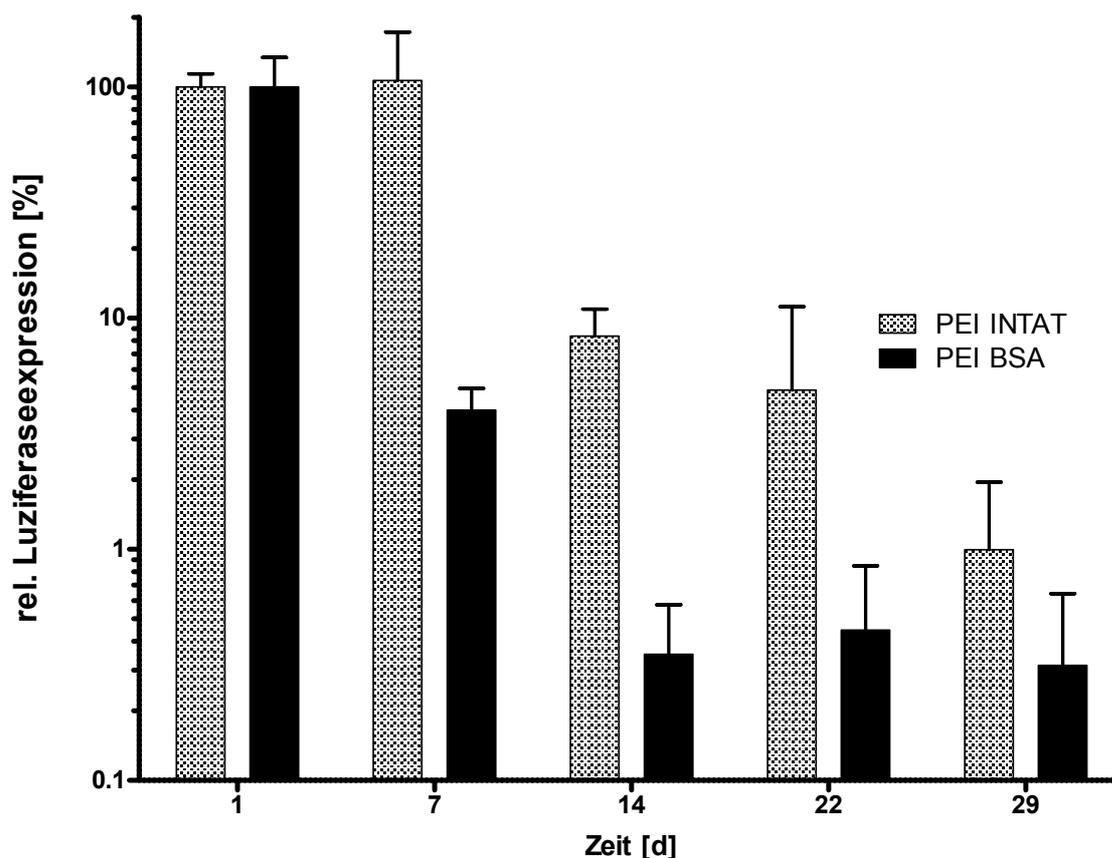


Abbildung 3.16: Luziferaseexpression in 293EGFPattPattB-Reporterzellen (L-PEI).

293EGFPattPattB-Reporterzellen wurden mit rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-attB (8:1) unter Verwendung von linearem Polyethylenimin transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

3.2.3.2 Transduktion durch Lipofektion

Die Lipofektion als Transfektion von Nukleinsäuren mit Hilfe von synthetischen kationischen Polylipiden ist eine etablierte Standardprozedur in der Biologie, beginnend z. B. mit der Nutzung von N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) zur Einbringung von Plasmid-DNA in Zellen (Felgner, Gadek et al. 1987). Analog zur Transduktion von Komplexen aus rekombinantem INTAT3-Integraseprotein und zu integrierender Plasmid-DNA mit Hilfe von kationischen Polymeren (siehe 3.2.3.1) wurden in dieser Arbeit kationische

Polylipide genutzt, um die genannten Komplexe effektiv in Zellen einzuschleusen. Dazu wurden hauptsächlich zwei kommerziell erhältliche Polylipide eingesetzt, Pro-DeliverIN (Oz Biosciences, Frankreich) und Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Großbritannien). Während Pro-DeliverIN ein speziell für die Transduktion von Proteinen entwickeltes Polylipidreagenz ist, stellt Lipofectamine 2000 ein Transfektionsreagenz im klassischen Sinn dar, das vor allem dazu verwendet wird, DNA in Zellen einzubringen.

Für die Kotransduktion von INTAT3-pCEF1 α -luc-*attB*-Komplexen mit Pro-DeliverIN wurden, wie schon in 3.2.3.1 beschrieben, Protein und Plasmid präinkubiert, um die Bildung von Komplexen zu gewährleisten. Die Komplexe wurden, den Vorgaben des Herstellers entsprechend, mit dem Reagenz in serumfreiem Medium gemischt und auf in Multiwellplatten vorbereitete Zellen gegeben. Es wurden vier verschiedene Mischverhältnisse von Reagenz zu Protein (v/w) untersucht, 2:1, 4:1, 2:2 und 4:2. Nach einem Zeitraum von 4 Stunden wurde das Medium gegen serumhaltiges erneuert und die Zellen über den jeweiligen Zeitraum weiterhin kultiviert. In bestimmten Intervallen wurden Proben entnommen und die Transgenexpression anhand der Luziferaseaktivität bestimmt.

In dementsprechend behandelten Jurkat-T-Zellen konnte auch 14 resp. 29 Tage nach Kotransduktion der Integrase/Plasmid-Komplexe noch im Vergleich zur Kontrolle deutlich höhere Luziferaseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Die Transgenexpression lag an Tag 29 bei Verwendung der 2:1- und 2:2-Verhältnisse immer noch bei bis zu 1,8 % der initialen Expression an Tag 1 und damit fünf- resp. sechsfach über der Kontrollprobe, in der bovines Serumalbumin (BSA) anstatt Integraseprotein verwendet wurde.

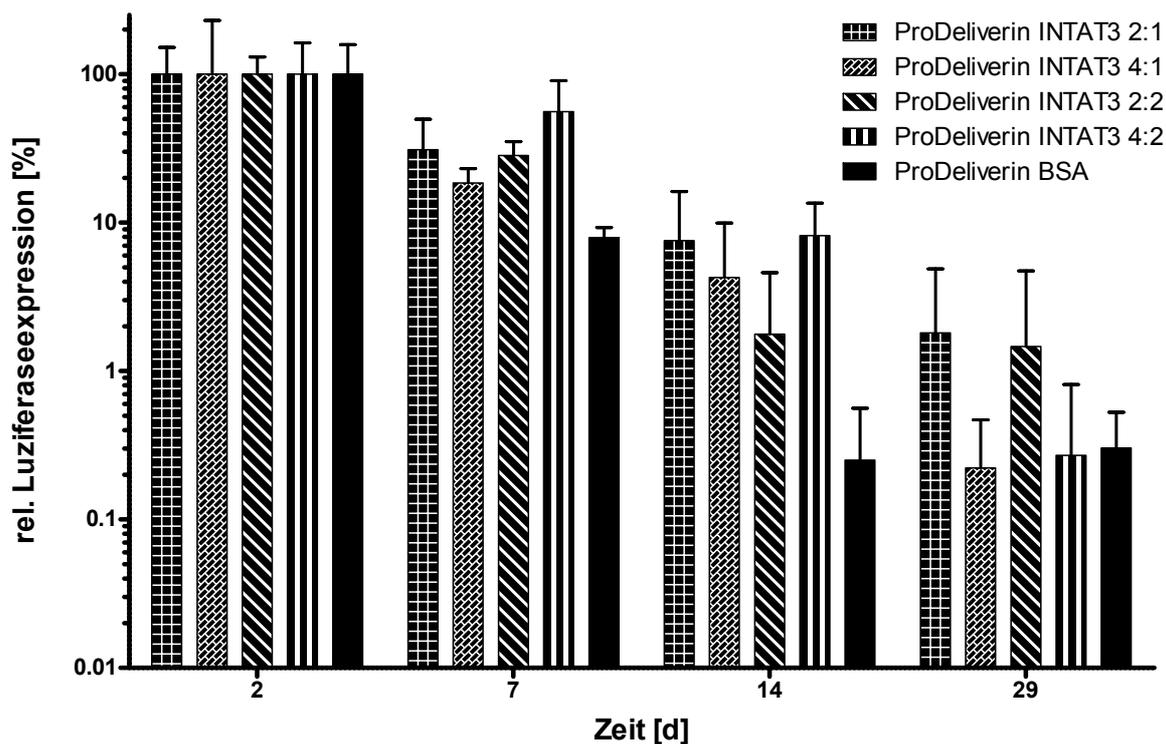


Abbildung 3.17: Luziferaseexpression in Jurkat T-Zellen (Pro-DeliverIN).

Jurkat T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von Pro-DeliverIN transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

Alveolare Epithelzellen vom Typ II wurden ebenfalls mit Pro-DeliverIN und den beschriebenen Integrasekomplexen transduziert. An Tag 14 zeigten noch 2,8 % der mit Pro-DeliverIN und INTAT3-Plasmid-Komplex im Verhältnis 2:2 transduzierten A549-Zellen Luziferaseexpression, am Tag 29 nach Transduktion waren es noch 0,3 %, verglichen mit 0,017 % der Negativkontrolle. Dieses Reagenz-Protein-Verhältnis erbrachte die besten Ergebnisse im Zusammenhang mit A549-Zellen (Abbildung 3.18).

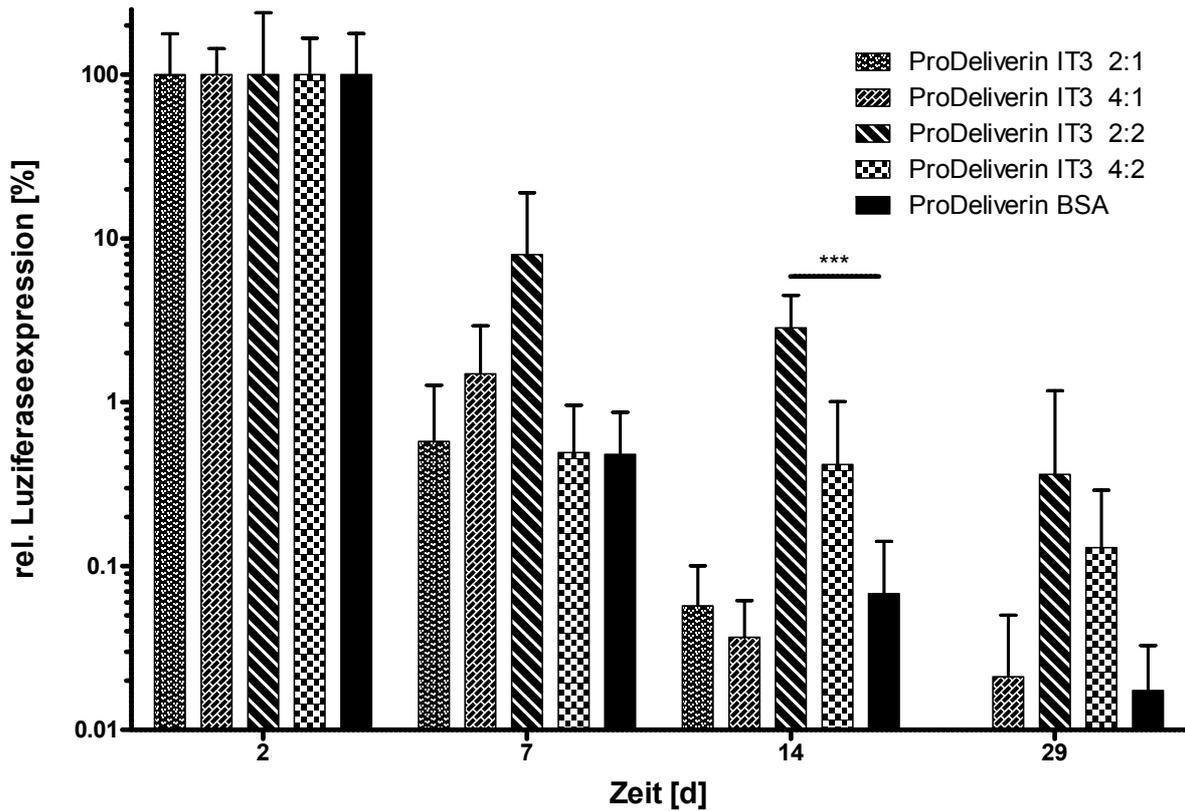


Abbildung 3.18: Luziferaseexpression in A549-Zellen (Pro-DeliverIN).

A549-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von Pro-DeliverIN transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(*** $p < 0,001$; ANOVA)

Die Transduktion von 293EGFP*attPattB*-Reporterzellen mit den INTAT3/pCEF1 α -luc-*attB*-Komplexen resultierte in ca. 11-fach höherer Luziferaseaktivität relativ zur Negativkontrolle an Tag 22 nach Transduktion, an Tag 29 betrug die Luziferaseexpression noch 2,4 % und war damit ca. 8-fach höher als die Kontrolle (Abbildung 3.19).

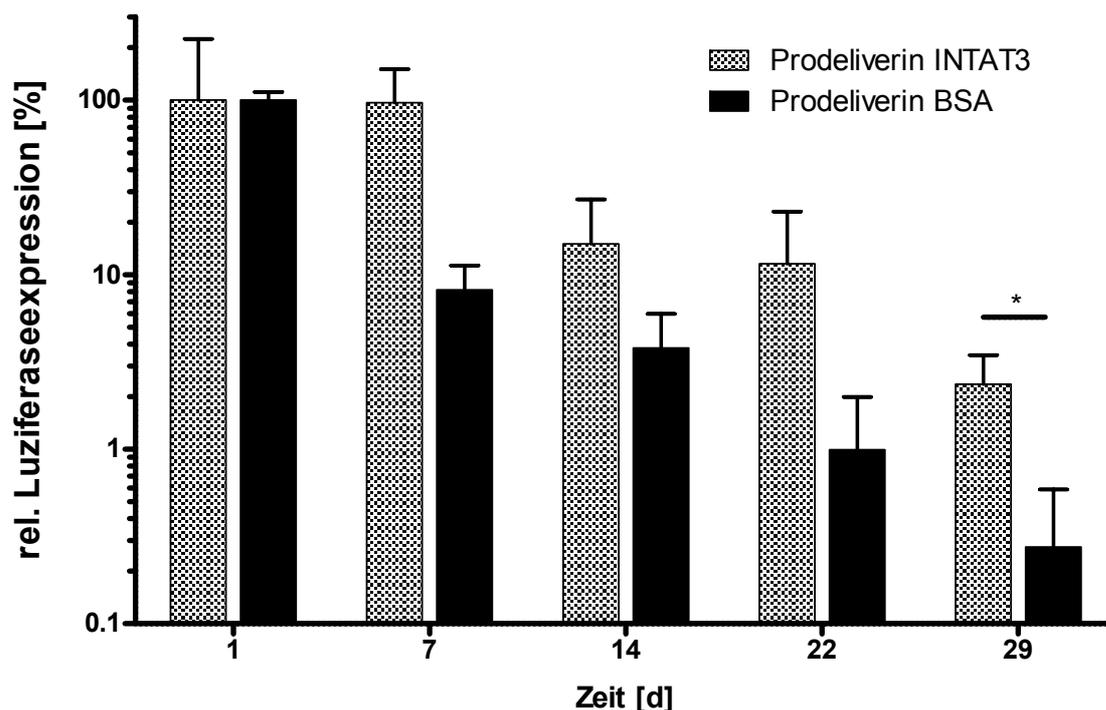


Abbildung 3.19: Luziferaseexpression in 293EGFPattPattB-Zellen (Pro-DeliverIN).

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-attB unter Verwendung von Pro-DeliverIN transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(*p<0.05)

Als zweites Transfektionsreagenz auf Polylipidbasis wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Großbritannien) eingesetzt. Dieses Reagenz ist im Gegensatz zum bereits beschriebenen Pro-DeliverIN nicht speziell zur Transduktion von Proteinen in Zellen konzipiert, sondern stellt vielmehr ein klassisches und weit verbreitetes Transfektionsreagenz für Nukleinsäuren dar.

Analog zu den bereits beschriebenen Lipofektionsversuchen wurden die Zelllinien Jurkat, A549 und 293EGFPattPattB mit rekombinanter INTAT3-Integrase und dem Luziferase-Reporterplasmid pCEF1 α -luc-attB, welche vor dem Versuch zum Zweck der Komplexierung vorinkubiert wurden, mit Lipofectamine 2000 gemäß den Herstellerangaben kotransduziert. Dazu wurden Komplexe und Reagenz in serumfreiem Medium gemischt und zu den Zellen gegeben, welche bereits in entsprechender Dichte in Multiwellplatten ausgesät waren. Nach einer

Inkubationszeit von ca. 4 Stunden wurden die Komplexe entfernt und serumhaltiges Medium zu den Zellen gegeben. Als Maß für die Transgenexpression wurde die Luziferaseaktivität an den Tagen 2, 7, 14 und 29 bestimmt.

Jurkat-T-Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 mit dem Integrase/ Plasmidkomplex transduziert. Dazu wurden rekombinante INTAT3-Integrase und das zu integrierende Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* im Verhältnis 8:1 und 4:1 verwendet. Das Verhältnis 8:1 erzielte zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere Transgenexpression im Vergleich zur Negativkontrolle, z. B. an Tag 29 17 % Luziferaseexpression gegenüber 1 %. Des Weiteren wurde auch im Vergleich zum verwendeten Protein:DNA-Verhältnis 4:1 an Tag 7, 14 und 29 nach Transduktion signifikant höhere Luziferaseexpression gemessen (Abbildung 3.20).

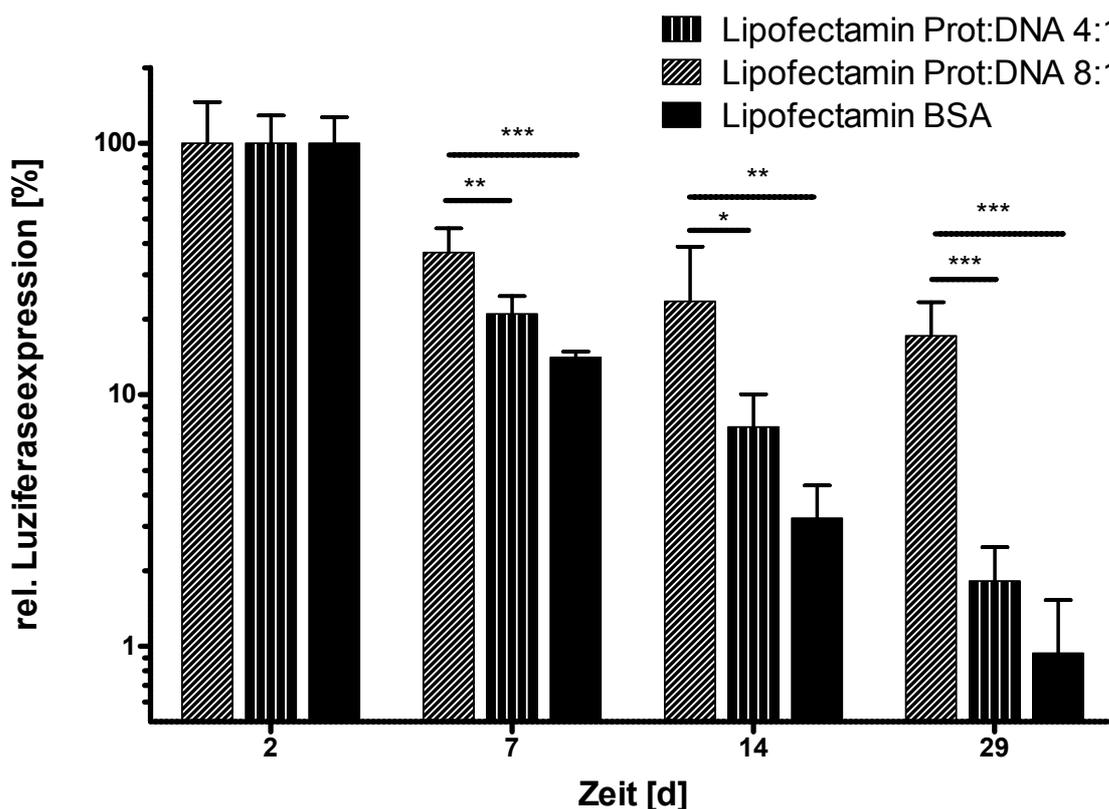


Abbildung 3.20: Luziferaseexpression in Jurkat-Zellen (Lipofectamine 2000).

Jurkat-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von Lipofectamine 2000 transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA)

A549-Zellen wurden in gleicher Weise wie Jurkat-T-Zellen mittels Lipofectamine 2000 mit den Integrase/Plasmid-Komplexen transduziert. Hier konnte kein Unterschied in der relativen Transgenexpression im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden.

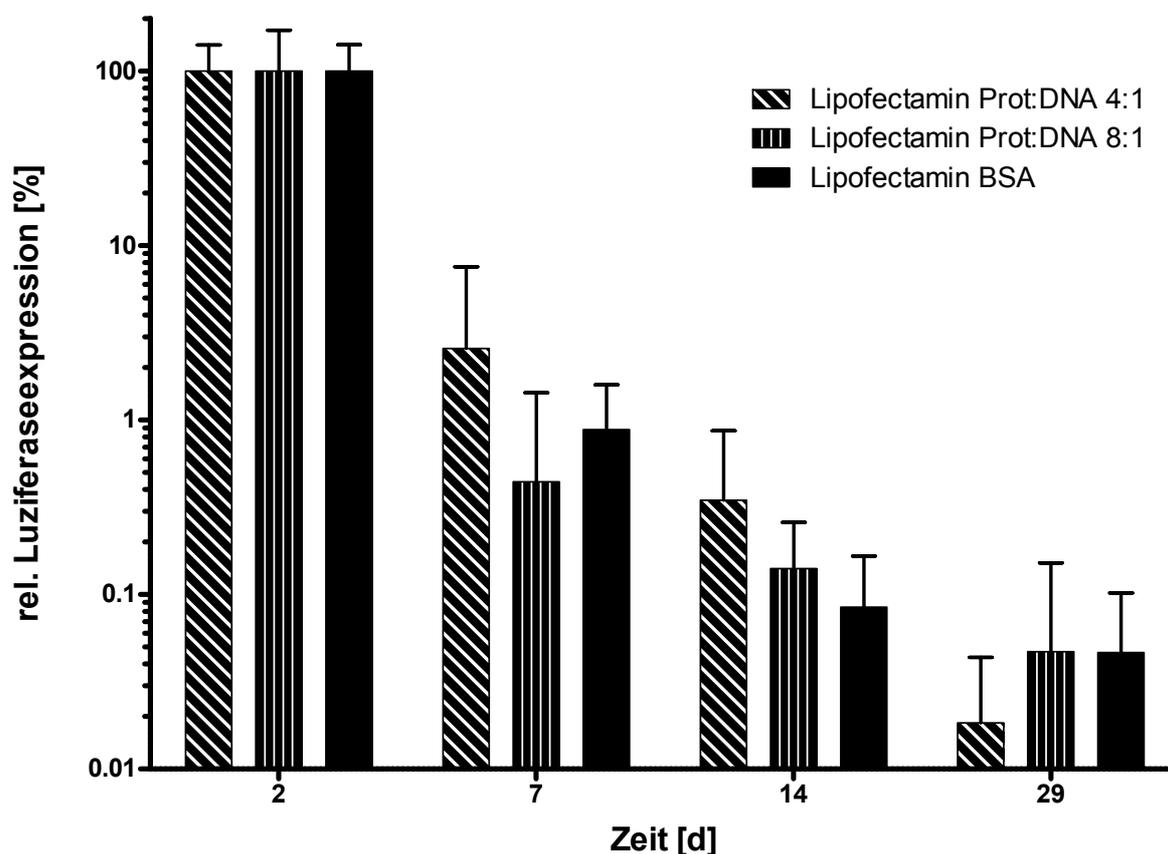


Abbildung 3.21: Luziferaseexpression in A549-Zellen (Lipofectamine 2000).

A549-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von Lipofectamine 2000 transduziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

293EGFP α luc-*attB*-Zellen, die mit rekombinanter INTAT3 und dem Luziferase-Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* mittels Lipofectamine kotransduziert wurden, zeigten zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Transgenexpression relativ zur Negativkontrolle. An Tag 29 wurde mit 7,1 % bei Verwendung von INTAT3 immer

noch ca. 14-fach höhere Luziferaseaktivität, verglichen mit der Negativkontrolle, gemessen (Abbildung 3.21). Zusätzlich wurde das kodonoptimierte, Φ C31-Integrase-kodierende Plasmid pC31-Intopt zusammen mit pCEF1 α -luc-*attB* transfiziert. Die resultierende Luziferaseexpression bewegte sich jedoch auf dem Level der Negativkontrolle (Abbildung 3.22).

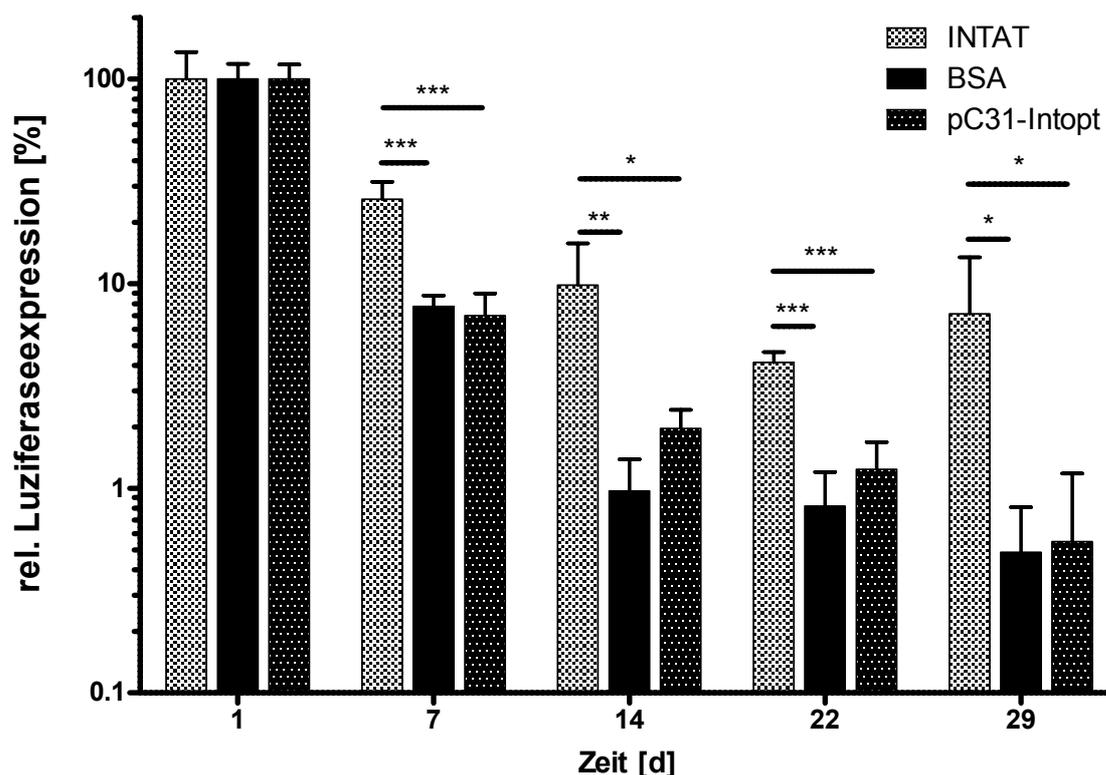


Abbildung 3.22: Luziferaseexpression in 293-Zellen (Lipofectamine 2000).

293-Zellen wurden mit rekombinanter INTAT3 und dem Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* unter Verwendung von Lipofectamine 2000 transduziert. Als Positivkontrolle wurde das für eine kodonoptimierte Version der Φ C31-Integrase kodierende Plasmid pC31Intopt transfiziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA)

Um die Aktivität der Integrase in 293EGFP*attBattP*-Zellen nach Transduktion mit dem INTAT3-pCEF1 α -luc-*attB*-Komplex zu beurteilen, wurde nach 24 Stunden zusätzlich die intrazelluläre EGFP-Expression per Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 3.23). Diese Messung ergab 18 % aktivierte Zellen nach Transduktion mit

Lipofectamine 2000, während 1,8 % der mit L-PEI transduzierten Zellen EGFP exprimierten. Diejenigen Zellen, die mit dem Plasmid pC31Intopt transfiziert wurden, wiesen mit 32 % die höchste Expression in diesem Vergleich auf.

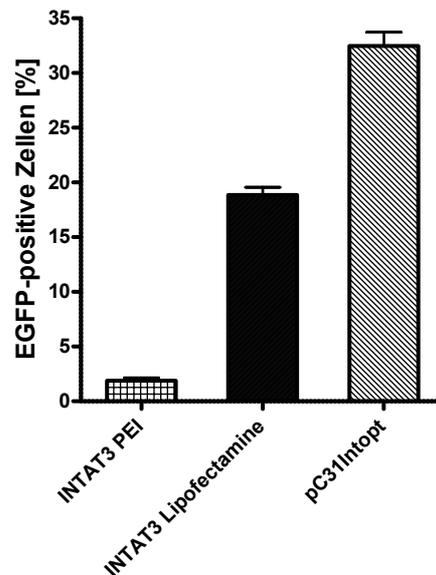


Abbildung 3.23: EGFP-Expression in 293EGFP*attBattP*-Zellen an Tag 1 nach Transduktion mit INTAT3-pCEF1 α -luc-*attB*-Komplexen.

Die 293-Reporterzellen wurden zur Untersuchung von Luciferase-Langzeitexpression mittels L-PEI oder Lipofectamine 2000 mit INTAT3-pCEF1 α -luc-*attB*-Komplexen transduziert. Nach 24 Stunden wurde die EGFP-Expression als Maß der Integraseaktivität gemessen. Zum Vergleich wurde das integrasekodierende Plasmid pC31Intopt, ebenfalls mit Lipofectamine, transfiziert.

3.2.3.3 Transduktion durch Elektroporation

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Transduktionsmethoden, die auf polykationischen Reagenzien beruhen, wurde auch Elektroporation verwendet, um Komplexe aus rekombinantem Φ C31-Integraseprotein und einem Reporterplasmid gemeinsam in Säugerzellen zu transduzieren. Wie schon beim *in vitro*-Assay wurden hierfür die Nucleofector-Geräte von Lonza verwendet. Dabei kam sowohl der Nucleofector für Küvetten als auch das Modell für 96-Well-Platten zum Einsatz. Das rekombinante Φ C31-Integraseprotein und das Luciferase-Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* wurden wie unter 3.2.2 beschrieben bereits vor der Transduktion inkubiert. Die daraus resultierenden Komplexe wurden in Nucleofektionspuffer aufgenommen und zusammen mit den zu transduzierenden Zellen in das jeweils verwendete Nucleofektionsgefäß gegeben. Danach wurde die Nucleofektion entsprechend Kapitel 2.2.1.7 durchgeführt. Dabei wurden je nach zu nukleofizierendem Zelltyp unterschiedliche Presets des Gerätes verwendet, welche nach Empfehlung des Herstellers ausgewählt wurden. Waren mehrere Alternativen verfügbar, wurden diese getestet und die beste ermittelt. Die Zellen wurden nach Nucleofektion über einen Zeitraum von circa einem Monat auf Luziferaseexpression getestet, welche nach diesem Zeitraum Rückschlüsse über Integration des Transgens in das Genom der transduzierten Zelle zulässt.

Stellvertretend für alveolare Epithelzellen vom Typ II wurden die humane Zelllinie A549 und die murine Lungenepithelzelllinie MLE-12 mit rekombinanter Φ C31-INTAT3-Integrase und dem Reporterplasmid nukleofiziert. Die A549-Zellen und das Protein-Plasmid-Gemisch wurden in einem Volumen von 20 μ l mit dem 96-Well Nucleofector mit dem Programm 96-FF-137 behandelt. Am Tag 16 nach Nucleofektion zeigten die mit 1 μ M INTAT3 behandelten A549-Zellen noch eine relative Luziferaseaktivität von 3,9 % im Vergleich zu Tag 2. Dies entsprach dem 33-fachen der Negativkontrolle, welche BSA und das Reporterplasmid enthielt.

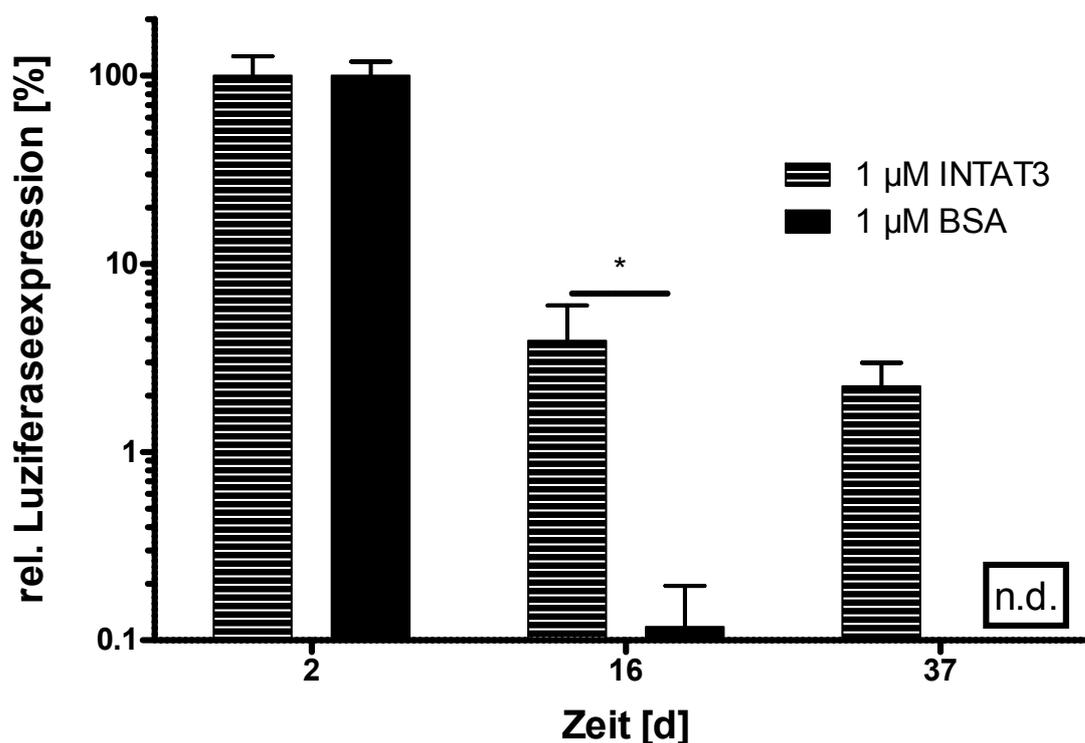


Abbildung 3.24: Langzeit-Luziferaseexpression in A549-Zellen nach Nukleofektion.

Rekombinante INTAT-Integrase und das Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* wurden in A549-Zellen nukleofiziert. Als Negativkontrolle wurde BSA verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 37 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

(*p < 0,05; n. d.: nicht messbar)

Die entsprechende Luziferaseaktivität der Integrase-behandelten A549-Zellen an Tag 37 betrug 2,4 %, die Luziferaseexpression der Negativkontrolle war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr messbar (Abbildung 3.24). Die Viabilität der Zellen wurde von Konzentrationen des Integraseproteins über 1 μ M beeinträchtigt, diese konnten dabei nicht über einen längeren Zeitraum kultiviert werden.

Des Weiteren wurden MLE-12-Zellen mit der Nukleofektionsmethode mit INTAT3 und pCEF1 α -luc-*attB* transduziert. Die Expressionslevel des Luziferase-Reportergens fielen jedoch schnell auf ein geringes Level. Unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen des Φ C31-Integraseproteins bewegte sich die relative Luziferaseaktivität in den transduzierten MLE-12-Zellen nach zwei Wochen bei 0,1 % verglichen mit Tag 2, und damit auf Höhe der Negativkontrollen, in denen BSA oder als zusätzliche Kontrolle die defektive mINTAT3-Variante der Φ C31-Integrase verwendet wurden (Abbildung 3.25).

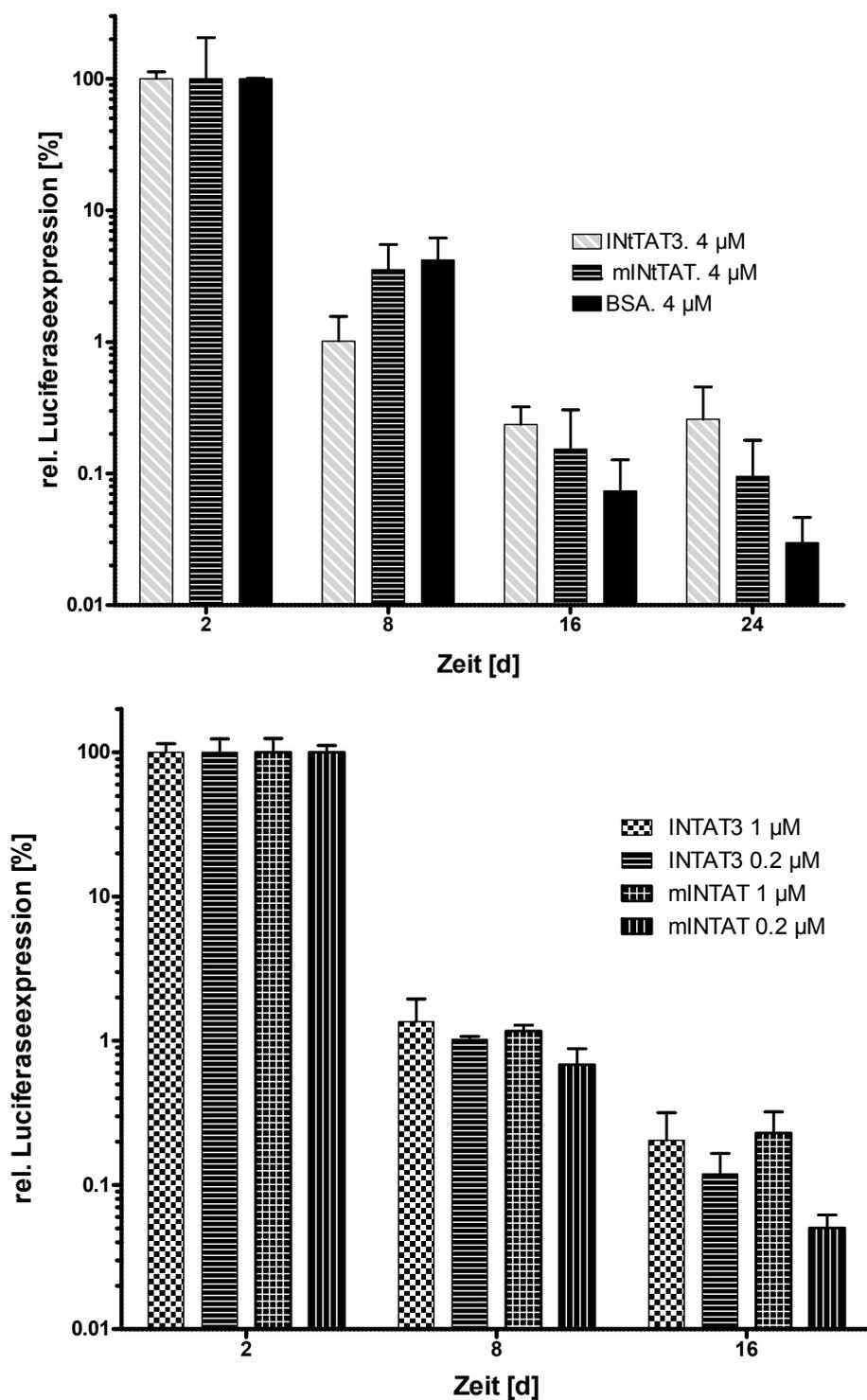


Abbildung 3.25: Luziferaseexpression in MLE-12-Zellen nach Nukleofektion.

Rekombinante INTAT3-Integrase und das Reporterplasmid pCEF1 α luc-*attB* wurden durch Nukleofektion in MLE-12-Zellen transduziert. Als Negativkontrolle wurden defektive Integrase und BSA verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 16 resp. 24 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

Auch die Reporterzelllinie 293EGFPattBattP wurde durch Nukleofektion mit INTAT3 und pCEF1 α l-luc-attB transduziert, als Negativkontrolle diente BSA und das Reporterplasmid. Als geeignetste Einstellung des Nukleofektors stellte sich hierbei das Programm A-23 heraus. 21 Tage nach Nukleofektion konnte noch 5,7 % relative Luziferaseexpression registriert werden, nach 42 Tagen waren es noch 4 % und damit das 4-fache der Negativkontrolle (Abbildung 3.26).

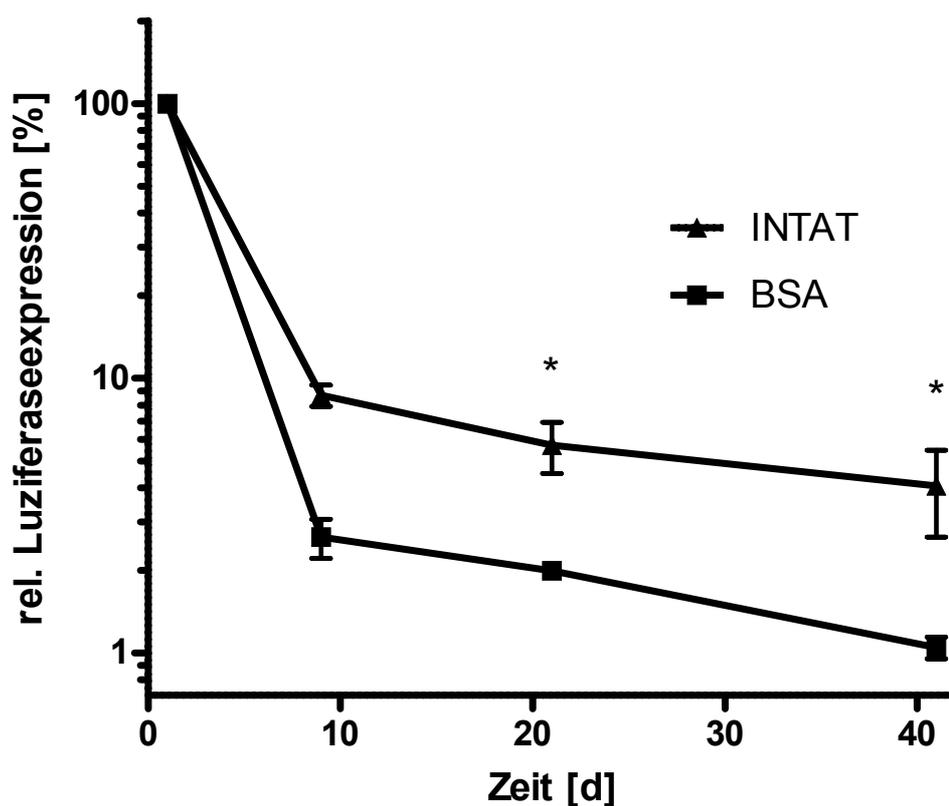


Abbildung 3.26: Langzeit-Luziferaseexpression in 293EGFPattBattP-Zellen nach Nukleofektion. 293EGFPattBattP-Zellen wurden mit rekombinanter INTAT3-Integrase oder BSA (je 4 μ M) und dem Reporterplasmid pCEF1 α l-luc-attB nukleofiziert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht. (*p < 0,05)

Auch Jurkat-T-Zellen wurden mit der oben beschriebenen Methode auf Langzeittransgenexpression getestet. Sie wurden mit dem Preset S-18 oder X-01 mit

rekombinantes Integraseprotein und pCEF1 α -luc-*attB* nukleofiziert. Am Tag 36 nach Nukleofektion bewegte sich die relative Luziferaseexpression verglichen mit Tag 1 bei ca. 40 %, die Lumineszenz der mit Reporterplasmid und BSA transduzierten Kontrollen befand sich auf Hintergrundniveau (Abbildung 3.27).

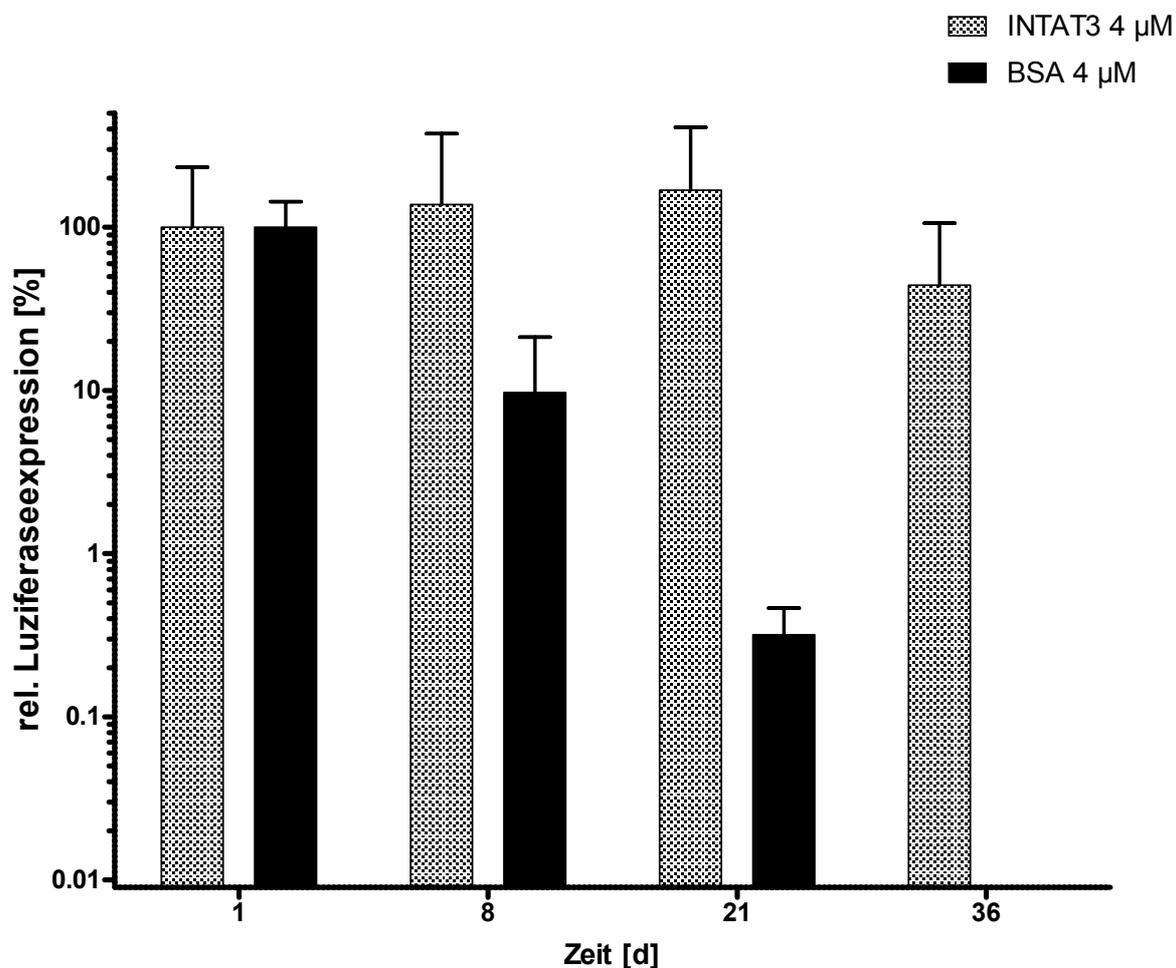


Abbildung 3.27: Jurkat-T-Zellen zeigen Langzeit-Luziferaseexpression nach Nukleofektion. Rekombinante INTAT3-Integrase und das Reporterplasmid pCEF1 α -luc-*attB* wurden in Jurkat-T-Zellen nukleofiziert. Als Negativkontrolle wurde BSA verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 36 Tagen auf Luziferaseexpression untersucht.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation

Ein weiterer interessanter Aspekt der Charakterisierung des rekombinanten Φ C31-Integrase-TAT-Fusionsproteins war die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation nach Transduktion des Proteins. Zu diesem Zweck wurde die aufgereinigte rekombinante Integrase einerseits mit 5-ROX (5(6)-Carboxy-X-Rhodamine)-N-Succinimidylester markiert. Rhodamin ist ein im roten Bereich des sichtbaren Spektrums emittierender Fluoreszenzfarbstoff. Die hier verwendete Succinimidylesterform des Rhodamins kann mit freien Amingruppen des Integraseproteins reagieren und eine Carboxyamidbindung eingehen, welche der natürlichen Peptidbindung entspricht (Abbildung 3.28).

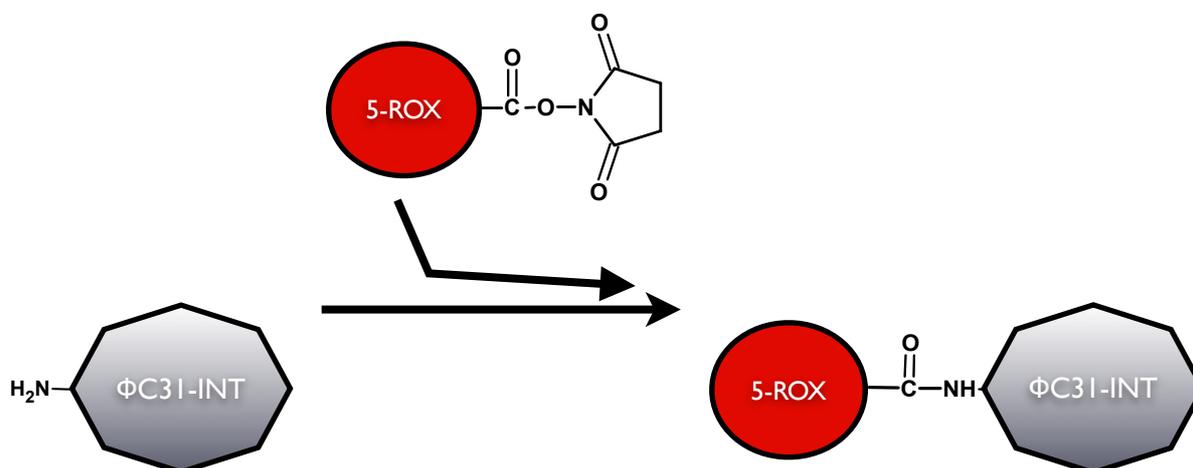


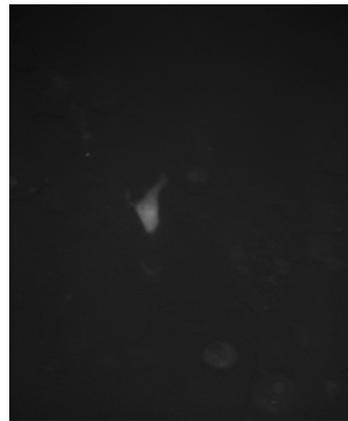
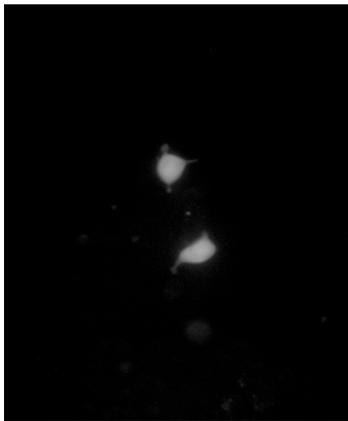
Abbildung 3.28: Markierung von INTAT-Protein mit 5-ROX.

5-ROX-Succinimidylester wird an rekombinantes Φ C31-Integraseprotein gekoppelt.

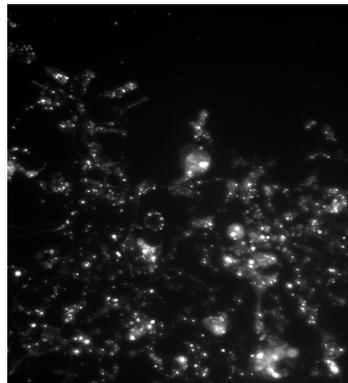
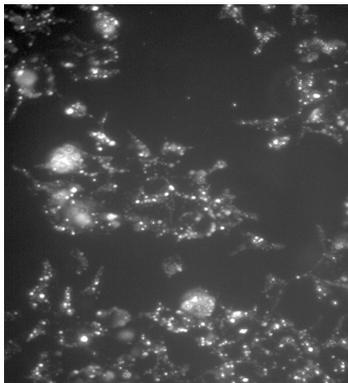
Der Fluoreszenzfarbstoff wurde in zehnfachem Überschuss zum INTAT3-Protein gegeben. Nach Inkubation wurde der Reaktionsansatz mittels Gelfiltration mit einer PD-10-Säule von überschüssigem Rhodamin gereinigt. Das fluoreszenzmarkierte Integraseprotein wurde zu 293EGFP*PattPattB*-Reporterzellen gegeben oder mit Hilfe des Proteintransduktionsreagenz ProDeliverIN in die Zellen transduziert. Dabei wurde deutlich, dass das Integrase-TAT-Fusionsprotein durchaus in die Zellen gelangt, aber anscheinend ein Großteil des Proteins in Endosomen bzw. Makropinosomen vorliegt (Abbildung 3.29).



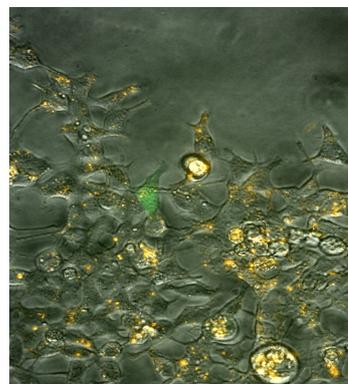
Hellfeld



EGFP



Rhodamin



Überlagerung

Abbildung 3.29: Epifluoreszenzaufnahmen von Rhodamin-markiertem INTAT3-Protein in 293EGFP*attBattP*-Reporterzellen.

(Grün: EGFP; Orange: Rhodamin; Objektiv 20x)

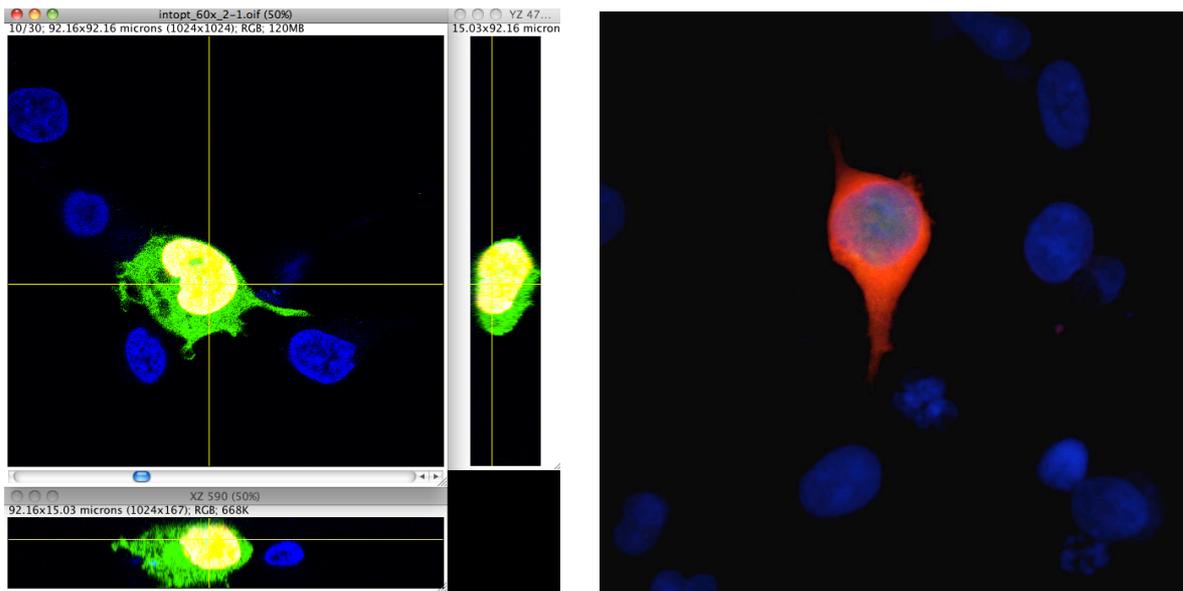


Abbildung 3.30: Lokalisation von Φ C31-Integrase (Plasmid).

293EGFP*PattPattB*-Zellen wurden mit Plasmid-DNA transfiziert, welche für verschiedene Konstrukte der Φ C31-Integrase kodierten. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit anti- Φ C31-Integrase-Antikörper markiert und mit einem Konfokalmikroskop photographiert.

Links sieht man die kodonoptimierte pC31Intopt-Integrase, dieses Protein trägt eine zusätzliche Kernlokalisierungssequenz. Weiß markiert Kolokalisierung von Zellkern und Integraseprotein, rechts von und unter der Abbildung befinden sich orthogonale Ansichten;

Rechts wurde das Plasmid pCMV-INT transfiziert; das Bild wurde aus einem Z-Stapel bestehend aus mehreren Ebenen zusammengesetzt.

Blau: DAPI; Grün: EGFP; rot: Φ C31-Integrase; Weiß: Kolokalisation Zellkern & Integraseprotein. Objektiv 60x.

Dementsprechend gelangt nur ein geringer Teil des Integraseproteins ins Zellgenom, wo es durch intramolekulare Rekombination die Expression des Reportergens EGFP initiieren kann.

Des Weiteren wurden 293EGFP*PattPattB*-Reporterzellen mit rekombinantem INTAT3-Protein nukleofiziert und anschließend mit einem Φ C31-Integrase-spezifischem Antikörper behandelt. Dieser wurde mit einem sekundären, mit Alexa 555 gekoppeltem Antikörper detektiert und konnte somit anhand seiner Fluoreszenz im roten Spektrum des sichtbaren Lichts visualisiert werden. Abbildung 3.30 verdeutlicht die Lokalisation von endogen exprimierter Φ C31-Integrase in den 293-Reporterzellen.

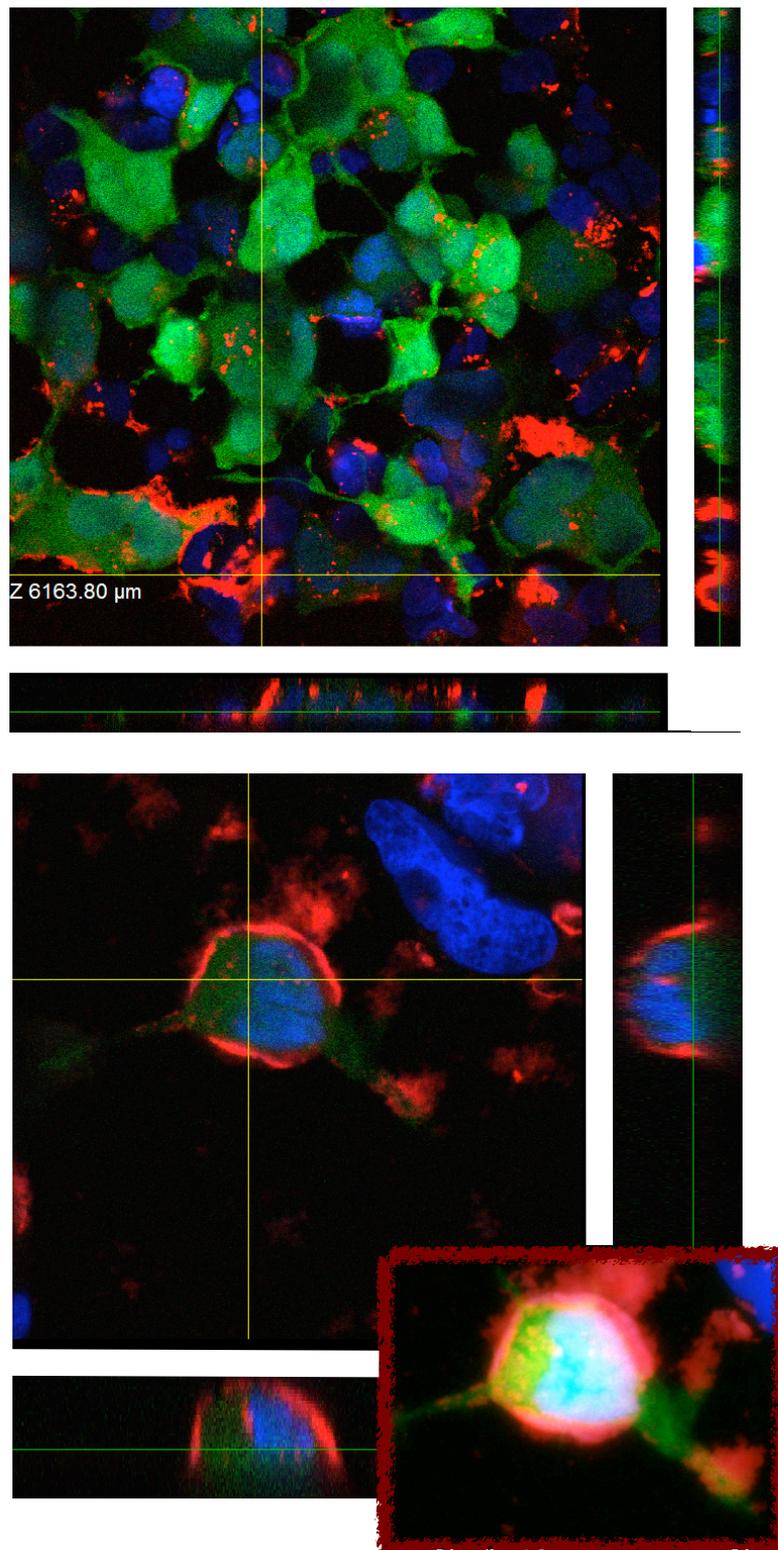


Abbildung 3.31: Bildstapel von 293 EGFP Reporterzellen 16 Stunden nach Nukleofektion mit IN-TAT3-Protein, im Konfokalmikroskop aufgenommen.

Rechts neben und unter den Bildern sind orthogonale Ansichten auf die Z-Ebene zu sehen, die gelben Linien markieren die Schnittachsen. Das kleine Bild rechts unten wurde aus mehreren Fokusebenen errechnet.

Blau: DAPI; Grün: EGFP; rot: Φ C31-Integrase

Während die Integrase mit Kernlokalisierungssequenz (pC31Intopt) exklusiv im Zellkern zu finden ist, bleibt die native Integrase (pCMVINT) im Zytoplasma.

Transduziert man rekombinantes INTAT3-Protein durch Nukleofektion, ist nach 16 Stunden nicht mehr viel intrazelluläres Integraseprotein zu detektieren, die EGFP-Expression verdeutlicht jedoch, in welchen Zellen aktives Enzym vorhanden war (Abbildung 3.31).

4. Diskussion

Die Rekombinase des Streptomyces-Phagen Φ C31 wurde bereits 1991 beschrieben (Kuhstoss and Rao 1991; Rausch and Lehmann 1991). Dieses Enzym gehört zur Resolvase/Invertase-Gruppe der sog. ortsspezifischen Rekombinasen, genauer zu den Serin-Rekombinasen. Auf der Suche nach einem Werkzeug zur stabilen genomischen Integration von DNA ist sie in den letzten Jahren, auch im Bereich der gentherapeutischen Forschung, intensiver untersucht worden. Ein Grund dafür liegt in der Arbeitsweise der Φ C31-Integrase: Während andere DNA-Rekombination vermittelnde Enzyme wie z. B. die Cre-Rekombinase des Coli-Phagen P1 oder die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* sowohl die Integration als auch die Exzision ihrer Substrate hervorrufen (Andrews, Proteau et al. 1985; Sauer and Henderson 1989), wirkt die Φ C31-Integrase ausschließlich in einer Richtung und rekombiniert zwei Nukleinsäuren, welche die passenden Bindungsstellen, die sog. *attachment sites attB* und *attP*, aufweisen (Thorpe and Smith 1998). Diese unidirektionale Wirkungsweise stellt einen klaren Vorteil gegenüber anderen Rekombinasen dar, wenn es um die Integration eines Transgens als Anwendung im Kontext der Gentherapie geht. Des Weiteren finden sich im Genom von Säugetieren bereits eine gewisse Anzahl Pseudo *attP-sites*, Bindestellen, die eine ausreichende Homologie zu den nativen *attP*-Bindestellen des Phagengenoms aufweisen, um von der Φ C31-Integrase erkannt und genutzt zu werden. Die begrenzte Anzahl dieser Bindestellen ist von Vorteil, da die Wahrscheinlichkeit, eine ungünstige Stelle im Zielgenom wie z. B. ein Protoonkogen zu treffen, relativ gering ist.

Bisher wurden mit der Φ C31-Integrase eine Reihe von Geweben/Organen von verschiedenen Spezies behandelt. Unter anderem wurde Φ C31-vermittelte Transgenintegration in muriner Leber (Olivares, Hollis et al. 2002; Ehrhardt, Yant et al. 2007), in Haut von Maus und Mensch (Ortiz-Urda, Thyagarajan et al. 2002; Ortiz-Urda, Thyagarajan et al. 2003), in der Mauslunge (Aneja, Imker et al. 2007) oder auch im Auge in Ratten nachgewiesen (Chalberg, Genise et al. 2004). Allerdings wurden auch zellspezifische Unterschiede in den Orten der Integration (Ehrhardt, Engler et al. 2004) und der Integraseaktivität (Maucksch, Aneja et al. 2008) gefunden. Die Hintergründe der variablen Aktivität der Φ C31-Integrase in verschiedenen Zelllinien sind nicht vollständig klar, als ein möglicher Inhibitor wurde

das zelluläre Protein DAXX identifiziert (Chen, Ji et al. 2006), welches zudem als hemmender Faktor der HIV-Integrase beschrieben wurde (Huang, Xu et al. 2008).

Um eine mögliche Hemmung der Φ C31-Integrase zu überwinden, könnten höhere Konzentrationen an Integrase-kodierender mRNA in den Zielorganismus eingebracht werden, wie schon an hämatopoetischen Zellen oder auch *Drosophila melanogaster*-Embryonen demonstriert (Fish, Groth et al. 2007; Maucksch, Aneja et al. 2008). Der nächste konsequente Schritt, dem zentralen Dogma der Molekularbiologie (Crick 1958) folgend, war die Applikation von Φ C31-Integraseprotein, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Damit lassen sich die Expression der Integrase im Zielgewebe und damit eventuell einhergehende Einschränkungen komplett umgehen. Zudem können mit dieser Methode auch Zellen, welche sich nur langsam oder gar nicht teilen, erreicht werden. Da die Φ C31-Integrase aus einem Bakteriophagen stammt und damit schlussendlich ein prokaryotisches Protein darstellt, besteht keine Notwendigkeit, eine rekombinante Expression dieses Proteins in Insekten- oder Säugerzellen zu etablieren, da keine posttranslationalen Modifikationen vonnöten sind. Daher wurde die Expression des rekombinanten Φ C31-Integraseproteins in dieser Arbeit in Bakterien der Art *Escherichia coli* BL21 pLysS vorgenommen, was eine gute Ausbeute an rekombinantem Protein ermöglichte. Allerdings neigt das rekombinante Integraseprotein unter standardmäßigen Expressionsbedingungen zur Bildung von Einschlusskörperchen. Diese ermöglichen zwar sehr hohe Ausbeuten und erleichtern in gewisser Hinsicht die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem Zellextrakt, zudem konnten sie unter Verwendung von denaturierenden Reagenzien wie Urea aufgeschlossen und das Protein somit wieder in Lösung gebracht werden. Es gelang jedoch nicht, eine Rückfaltung des Integraseproteins in seine katalytisch aktive Form zu erzielen, auch nach Entfernung der Denaturantien (Becker-Hapak and Dowdy 2003) blieb die rekombinante Integrase ohne Aktivität. Durch eine Optimierung von Expressionstemperatur und -induktion konnte die Bildung der Einschlusskörper vermieden und das rekombinante Φ C31-Integraseprotein in löslichem und aktivem Zustand produziert werden.

Als geeignete Expressionsvektoren erwiesen sich hierbei die auf dem Plasmid pGS-21a basierenden Konstrukte, während der verwendete pET20b-Vektor wenig Ausbeute an löslichem Integraseprotein lieferte. Nach Etablierung des Vektors pGSINTAT3 wurde aufgrund der guten Löslichkeit und der Transduktionseigenschaften seines Produktes hauptsächlich dieses Expressionsplasmid für die weiteren Versuche verwendet. Es besitzt die Φ C31-Integrase kodierende DNA-Sequenz und den kurzen Plasmidabschnitt, welcher für das sechs Histidinreste lange Peptid kodiert, das bei der eingesetzten Nickelaffinitätschromatographie als Markierung diente. Dazwischen befindet sich eine 11 Aminosäuren umfassende Sequenz aus dem *transactivator of transcription*-Protein des HI-Virus. Das Tat-Protein ist essentiell für die virale Genexpression und wird u.a. aufgrund seiner positiven Ladung schnell von Zellen aufgenommen (Green and Loewenstein 1988). Notwendig für diese Transduktion ist aber nur ein kleiner Teil des Proteins (Fawell, Seery et al. 1994; Vives, Brodin et al. 1997). Dieses sogenannte HIV-TAT Peptid stellt die oben genannte Proteintransduktionsdomäne (PTD) dar, die als Teil der pGSINTAT-Konstrukte eine Aufnahme der Φ C31-Integrase-TAT Fusionsproteine in die verwendeten alveolären und hämatopoetischen Zellen bewirken sollte. Des Weiteren besitzt die Sequenz der TAT-PTD den Charakter einer Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localisation signal*, NLS) (Ruben, Perkins et al. 1989), was dem Transport des Integraseproteins in den Zellkern zugute kommen sollte. In der Tat zeigen Kollokalisierungsexperimente (siehe 3.3) in dieser Arbeit, dass sich endogen exprimierte Φ C31-Integrase mit NLS ausschließlich im Zellkern, Integrase ohne NLS aber vorwiegend im Zytoplasma wiederfindet. Transduziert man rekombinantes Φ C31-Integrase-TAT Protein durch Nukleofektion in 293EGFPattPattB-Reporterzellen, sieht man nach 16 Stunden nur wenig Protein im Zellkern oder Zytoplasma. EGFP-Expression in diesen Zellen lässt jedoch eindeutig auf Integrase-vermittelte Rekombination und damit auf Aktivität von Integraseenzym im Zellkern schließen. Vermutlich ist die kernlokalisierende Eigenschaft der HIV-TAT-Proteintransduktionsdomäne in den verwendeten Zelllinien zu schwach oder unwirksam, um die gesamte Proteinfraction in den Zellkern zu schleusen, oder das Protein ist in Zellkompartimenten, die diese Wirkung nicht zulassen. Um dies abzuklären, sind weitere Studien notwendig. Aufgrund der überlegenen Transduktionseigenschaften gegenüber den anderen Integrasekonstrukten wurde

ausschließlich das INTAT3-Protein in den Rekombinations- und Transduktionsexperimenten verwendet.

Die Aktivität des rekombinant produzierten Integraseproteins wurde zunächst mittels *in vitro* Rekombinationsassays nachgewiesen (siehe 3.2.1). In diesem Rahmen konnte unter anderem gezeigt werden, dass die rekombinante Φ C31-Integrase in der Lage ist, ein Reporterplasmid mit den entsprechenden *attP*- und *attB*-Bindestellen im Reagenzglas zu rekombinieren. Die Produkte dieser Reaktion konnten gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Es konnte außerdem eine gewisse Temperaturabhängigkeit des Enzyms beobachtet werden. So ließ sich die o. g. Rekombination durch Senkung der Reaktionstemperatur auf 4 °C deutlich verlangsamen. Dies war für die folgenden *in vitro* Rekombinationsexperimente in Zelllinien insofern von Bedeutung, als eine vorzeitige Rekombination des Reporterplasmids durch Kühlung größtenteils vermieden werden konnte. In Kotransduktionsexperimenten mit rekombinantem INTAT3-Protein und dem Plasmid *pattP*-BGHpolyA-*attB*-EGFP konnte die intrazelluläre Aktivität der Integrase anhand der resultierenden EGFP-Expression quantifiziert werden. Diese Tests zeigten eine Rekombinationsaktivität der rekombinanten Integrase konzentrationsabhängig in bis zu 74 % der transduzierten MLE-12-Zellen, stellvertretend für alveoläre Epithelzellen vom Typ II. Im Fall von Jurkat-T-Zellen konnte noch in 28 % der Zellen Integraseaktivität gemessen werden. Das ist insbesondere von Interesse, da in diesem Zelltyp bisher nur sehr geringe Aktivität des Φ C31-Integraseenzym gemessen werden konnte (Maucksch, Aneja et al. 2008). Es ist denkbar, dass durch entsprechend hohe Dosierung des Proteins eine mögliche Hemmung der Integrase durch andere Faktoren überwunden wird. Die mit o. g. Assays gemessene Rekombinationsaktivität des Integraseenzym fand vermutlich im Zytoplasma statt.

Ein weiterer Aktivitätsassay bestand in der Transduktion rekombinanter Integrase in 293EGFP*pattPattB*-Reporterzellen, welche nur in Anwesenheit aktiver Φ C31-Integrase das grün fluoreszierende Protein exprimieren. Das Reporterkonstrukt ist in diesen Zellen stabil ins Genom integriert. Während Zellen, welche nur mit INTAT3-Protein oder mit dem Transduktionsreagenz ProDeliverIN mit Integrase transduziert wurden, nur geringe EGFP-Expression aufwiesen, zeigten bis zu 70 % der per

Nukleofektion mit Integrase behandelten Zellen EGFP-Expression und damit Rekombinationsaktivität der Φ C31-Integrase im Zellkern. Mit defektiver Integrase oder BSA transduzierte Zellen zeigten hingegen bei keiner Einbringungsmethode Hinweise auf Rekombination. Eine Transduktion der Reporterzellen mit Hilfe von Lipofectamine 2000 resultierte in 17 % aktivierten Zellen. Es ist möglich, dass im Falle der HIV-TAT-vermittelten Aufnahme des Integraseproteins ebenso wie bei Transduktion mittels ProDeliverIN eine endosomale Einlagerung der Integrase stattfindet, welche die Rekombination unterbindet. Dafür sprechen die immunhistochemischen Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen, welche das in die Zellen aufgenommene INTAT3-Protein in Vesikeln vermuten lassen. Die Nukleofektion als speziell auf Einbringung von Material in den Zellkern entwickelte Elektroporationsmethode konnte diese Hürden anscheinend umgehen. Der Mechanismus der TAT-vermittelten Transduktion ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, eine endosomale Aufnahme wird vermutet (Fittipaldi, Ferrari et al. 2003; Sebbage 2009).

Da die Funktionalität der rekombinant exprimierten Φ C31-Integrase erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend in Bindungstests, die dem klassischen *band shift assay* angelehnt sind, die Bindungseigenschaften von INTAT3-Integraseprotein und Plasmiden mit *attB*-Bindestelle näher untersucht. Hierbei konnte in der gelelektrophoretischen Analyse eine deutliche Affinität des Integraseproteins zum *attB*-Plasmid gezeigt werden. Diese Bindung ist möglicherweise von Vorteil, wenn rekombinante Integrase und ein Bindestelle und Transgenkassette umfassendes Plasmid zusammen in Zellen eingeschleust werden sollen, um dort eine genomische Integration des Transgens zu bewirken. Die weiteren Kotransduktionsexperimente wurden daher mit einem Komplex aus Plasmid und INTAT3-Integrase durchgeführt, um die Integration des Reporterplasmids pCEF1 α -luc-*attB* in das Genom der Zielzellen effizienter zu gestalten.

Die Untersuchungen zur Kotransduktion von Integraseprotein und Transgen wurden mit 3 verschiedenen Methoden zur Einbringung der Komplexe durchgeführt, es wurde lineares Polyethylenimin (L-PEI) als polykationisches Reagenz verwendet, außerdem kamen Lipofektion und Elektroporation zum Einsatz (3.2.3). Als

Zielzelllinien fungierten humane A549- und murine MLE-12-Zellen als alveolare Zellen, renale 293-Zellen und Jurkat-T-Zellen. Anhand der Luziferaseexpression über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen wurde die Integration des Transgens ins Genom bewertet. Nach diesem Zeitraum findet keine transiente Expression des eingebrachten Luziferasetransgens mehr statt, die Luziferaseaktivität ist somit ein Maß der Integration. Leider kann mit dieser Methode keine Aussage über die Quantität der Zellen mit integriertem Transgen getroffen werden. Die Detektion der Luziferaseaktivität ist jedoch sensitiver als z. B. von EGFP, somit können auch geringe Mengen an Luziferase bereits festgestellt werden.

Im Fall der kotransduzierten A549-Zellen konnte die beste Langzeitexpression nach Elektroporation bzw. Nukleofektion des INTAT3/Plasmid-Komplexes gemessen werden. Während nach einem Monat noch ca. 2,4 % Luziferaseaktivität bestand, befand sich die Aktivität der Negativkontrolle auf Hintergrundniveau, ebenso wie nach Transduktion mit L-PEI, hier konnten immer noch ca. 0,1 % gemessen werden. Nukleofizierte MLE-12-Zellen zeigten unabhängig von der eingesetzten Integrasemenge keine Langzeitexpression der Luziferase. Die Luziferaseaktivität nach Lipofektion mit ProDeliverIN lag nach 29 Tagen im Bereich von 0,3 % der initialen Aktivität, und damit ca. 17-fach höher als die der Negativkontrolle. Auch mit Lipofectamine 2000 befand sich die Luziferaseaktivität nach einem Monat auf Höhe der Negativkontrolle, was gegen erfolgreiche Transgenintegration spricht. Diese Ergebnisse wurden mit einem Protein:DNA-Verhältnis von 8:1 erzielt, welches sich als Optimum herausstellte. Höhere Mengen an Integraseprotein führten bei A549-Zellen zu vermehrtem Absterben der Zellen.

Auch mit den zur Bestimmung der Φ C31-Aktivität eingesetzten 293EGFP*PattPattB*-Zellen wurden Versuche zur Luziferase-Langzeitexpression angestellt. Hier erbrachte die Lipofektion der Protein/Plasmid-Komplexe mit Lipofectamine 2000 die besten Ergebnisse, nach einem Monat waren noch ca. 7 % der initialen Luziferaseaktivität messbar, was dem 14-fachen der Negativkontrolle entspricht. Nukleofektion resultierte in 4-5 % Luziferaseaktivität und damit dem etwa vierfachen der mit BSA und Luziferase-*attB*-Plasmid behandelten Zellen. Das Proteintransduktionsreagenz ProDeliverIN und L-PEI erreichten immerhin etwa 2,4 und 1 %, das 10-fache resp.

5-fache der jeweiligen Negativkontrollen. Mit dem kodonoptimierten pC31Intopt-Plasmid konnte keine relevante Langzeitexpression gemessen werden, in der Literatur wird über Werte von ca. 7 % berichtet (Thyagarajan, Olivares et al. 2001). Im Fall der 293-Zellen muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass hier bereits ein Reporterkonstrukt mit *attB*- und *attP*-Bindestellen im Genom vorhanden ist, was sich eventuell negativ auf die Integration des transduzierten Plasmid auswirken könnte.

Besonderes Augenmerk lag auf der Aktivität der Φ C31-Integrase in Jurkat-T-Zellen, die in der Literatur bisher unterschiedlich bewertet wurde ((Ishikawa, Tanaka et al. 2006; Maucksch, Aneja et al. 2008). Transduktion von rekombinanter Integrase und Luc-*attB* mittels linearem Polyethylenimin führte zu ca. 1 % Luziferaseaktivität nach 29 Tagen, signifikant höher als in der Negativkontrolle. Mit ProDeliverIN konnte mit 1,8 % noch das 5-fache der Negativkontrolle erreicht werden, Lipofektion mit dem Reagenz Lipofectamine 2000 resultierte in 17 % der Luziferaseaktivität von Tag 1, die Negativkontrolle lag hier auf Hintergrundniveau. Das beste Ergebnis konnte nach Nukleofektion von 4 μ M INTAT3-Protein gemessen werden, ca. 40 % der initialen Luziferaseaktivität waren nach einem Monat noch vorhanden. Auch in diesem Fall war die Negativkontrolle ohne messbare Luziferaseexpression. Auch bei den Langzeitexpressionsversuchen zeigte sich also ein Vorteil der Nukleofektion gegenüber den anderen Methoden zu Einbringung der rekombinanten Integrase in den meisten der untersuchten Zelltypen. Aber auch die verwendeten Lipofektionsreagenzien zeigten eine gewisse Effizienz. Möglicherweise ist der Transfer des INTAT3-Proteins in den Zellkern durch Nukleofektion besser gewährleistet als mit den anderen verwendeten Methoden.

Beim Einsatz der Φ C31-Integrase sollten potentielle Nebenwirkungen wie Chromosomenaberrationen nicht außer Acht gelassen werden (Ehrhardt, Engler et al. 2006). Für eine mögliche *in vivo*-Applikation sei angemerkt, dass sich die Aktivität der Integrase *in vitro* teilweise von der *in vivo* unterscheidet (Ehrhardt, Xu et al. 2005), was auch auf die Anwendung des rekombinanten Integraseproteins zutreffen könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Φ C31-Integrase als bereits gut untersuchtes Werkzeug des nicht-viralen Gentransfers vielversprechendes Potential besitzt. So konnte durch die Applikation von rekombinantem Φ C31-Integraseprotein *in vitro* auch in Zellen, in denen bisher wenig Integraseaktivität gemessen wurde (Maucksch, Aneja et al. 2008), Langzeittransgenexpression vermittelt werden. Dies verdeutlicht die Vorteile der Applikation von Integraseprotein gegenüber der Transfektion von Integraseplasmiden. Des Weiteren wurden zelltypabhängige Unterschiede in der Aktivität der Φ C31-Integrase beobachtet, so konnten überraschenderweise in A549-Zellen nur relativ geringe Langzeit-Expressionslevel verglichen mit den Jurkat-T-Zellen festgestellt werden. Die Gentransfermethode hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf die Effizienz der integrasevermittelten Rekombination.

5. Zusammenfassung

Enzyme, welche die Rekombination eines therapeutischen Transgens in das Genom des Patienten vermitteln können, sind seit einiger Zeit Thema der Erforschung nicht-viraler Integrationssysteme für die Gentherapie. Ein Vertreter ist die Integrase des Bakteriophagen Φ C31, welche bereits das Thema einiger gentherapeutischer Studien war (Calos 2006). Dabei wurde stets die genetische Information der Φ C31-Integrase als Plasmid-DNA in die Zielzellen transfiziert und das Integraseprotein dort endogen exprimiert, was nicht in allen Zelltypen zum gleichen Erfolg führt (Maucksch, Aneja et al. 2008). Eine direkte Applikation des Integraseproteins könnte die Effizienz dieses Systems verbessern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines rekombinanten Φ C31-TAT-Systems für den nicht-viralen Gentransfer. Dafür wurden verschiedene Integrase-Konstrukte in *E. coli* BL21 Bakterien rekombinant exprimiert, chromatographisch aufgereinigt und *in vitro* auf Funktionalität getestet. Die enzymatische Aktivität des rekombinanten Integraseproteins konnte in Rekombinationsassays nachgewiesen werden. Daneben wurde die Funktionalität der rekombinanten Integrase sowohl in renalen und alveolären als auch in T-Zelllinien bestätigt.

Um die Bindungseigenschaften der rekombinanten Φ C31-Integrase und Plasmiden mit einer Φ C31-spezifischen *attB*-Bindestelle zu prüfen, wurde ein modifizierter Bandshiftassay eingesetzt, der eine deutliche Bindung der Integrase an das *attB*-Plasmid zeigte. Dies war eine gute Voraussetzung um verschiedene Methoden zur Transduktion dieser Integrase-Plasmid-Komplexe in unterschiedliche Zelltypen zu testen. Dazu wurden Polyethylenimin als polykationisches Transfektionsreagenz, Lipofectamine 2000, ProDeliverIN und Metafectene Pro als Lipofektionsreagenzien und der Amaxa Nukleofektor als Elektroporationsgerät verwendet. Stellvertretend für Lunge, Niere und Lymphozyten wurden A549-, 293- und Jurkat-T-Zellen mit Komplexen aus rekombinanter Integrase und einem Luziferase-*attB*-Plasmid behandelt und über einen Zeitraum von einem Monat auf Luziferaseexpression getestet. Die mittels Polyfektion behandelten Zellen zeigten dabei nur geringe Langzeittransgenexpression. Lipofektion resultierte in guten Ergebnissen bei 293-

und A549-Zellen, die besten Werte waren hier bei den Jurkat-Zellen zu verzeichnen. Die besten Resultate bei der Induktion von Langzeittransgenexpression in Jurkat-T-Zellen erbrachte die Nukleofektion, im Falle der A549- und 293EGFP*attPattB*-Zellen war diese Methode etwas weniger erfolgreich. Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Langzeitversuche.

	Nukleofektion	Lipofektion	Polyfektion
293EGFP <i>attPattB</i>	++	++	+
A549	++	+	+
Jurkat	+++	+++	+

Tabelle 5.1: Übersicht über die Langzeitluziferaseexpression nach Transduktion von Integrase-Plasmid-Komplexen in verschiedene Zelllinien.

+++; sehr gut; ++; gut; +; gering

Zusammenfassend ist der kombinierte Φ C31-Integrase-Plasmid-Transfer eine vielversprechende Anwendung für den nicht-viralen Gentransfer, was insbesondere durch die Vermittlung stabiler Langzeittransgenexpression in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, C., H. O. McCarthy, et al. (2009). "Nitric oxide synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells." J Gene Med **11**(2): 160-168.
- Alba, R., A. Bosch, et al. (2005). "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." Gene Ther **12 Suppl 1**: S18-27.
- Allen, B. G. and D. L. Weeks (2005). "Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using phiC31 integrase." Nat Methods **2**(12): 975-979.
- Andreas, S., F. Schwenk, et al. (2002). "Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells." Nucleic Acids Res **30**(11): 2299-2306.
- Andrews, B. J., G. A. Proteau, et al. (1985). "The FLP recombinase of the 2[μ] circle DNA of yeast: Interaction with its target sequences." Cell **40**(4): 795-803.
- Andrews, J. L., M. J. Kadan, et al. (2001). "Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII." Mol Ther **3**(3): 329-336.
- Aneja, M. K., J. Geiger, et al. (2009). "Optimization of *Streptomyces* bacteriophage phi C31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type II cells." Exp Mol Med **41**(12): 919-934.
- Aneja, M. K., R. Imker, et al. (2007). "Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration and long-term gene expression in the lung after nonviral gene delivery." J Gene Med **9**(11): 967-975.
- Becker-Hapak, M. and S. F. Dowdy (2003). "Protein transduction: generation of full-length transducible proteins using the TAT system." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 20**: Unit 20 22.
- Behr, J. P. (1997). "The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit." CHIMIA International Journal for Chemistry **51**: 34-36.
- Behr, J. P., B. Demeneix, et al. (1989). "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6982-6986.
- Behr, M., C. Domenge, et al. (1993). "Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial." Cancer **72**(12): 3694-3700.

- Belur, L. R., J. L. Frandsen, et al. (2003). "Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the Sleeping Beauty transposon system." Mol Ther **8**(3): 501-507.
- Bertoni, C., S. Jarrahan, et al. (2006). "Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(2): 419-424.
- Blaese, R. M., K. W. Culver, et al. (1995). "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years." Science **270**(5235): 475-480.
- Bloch-Gallego, E., I. Le Roux, et al. (1993). "Antennapedia homeobox peptide enhances growth and branching of embryonic chicken motoneurons in vitro." J Cell Biol **120**(2): 485-492.
- Bloquel, C., E. Fabre, et al. (2004). "Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications." J Gene Med **6 Suppl 1**: S11-23.
- Bode, J., T. Schlake, et al. (2000). "The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes." Biol Chem **381**(9-10): 801-813.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-7301.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bradley, S. P., C. Rastellini, et al. (2005). "Gene silencing in the endocrine pancreas mediated by short-interfering RNA." Pancreas **31**(4): 373-379.
- Buning, H., L. Perabo, et al. (2008). "Recent developments in adeno-associated virus vector technology." J Gene Med **10**(7): 717-733.
- Bushman, F. D. (2007). "Retroviral integration and human gene therapy." J Clin Invest **117**(8): 2083-2086.
- Calos, M. P. (2006). "The phiC31 integrase system for gene therapy." Curr Gene Ther **6**(6): 633-645.
- Capecchi, M. R. (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells." Cell **22**(2 Pt 2): 479-488.

- Cavazzana-Calvo, M. and A. Fischer (2007). "Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?" J Clin Invest **117**(6): 1456-1465.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, et al. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-672.
- Chalberg, T. W., H. L. Genise, et al. (2004). "PhiC31 integrase for long-term non-viral gene therapy in rat retina." Molecular Therapy **9**: S405-S405.
- Chalberg, T. W., J. L. Portlock, et al. (2006). "Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome." J Mol Biol **357**(1): 28-48.
- Chandy, T. and C. P. Sharma (1990). "Chitosan--as a biomaterial." Biomater Artif Cells Artif Organs **18**(1): 1-24.
- Chen, J.-z., C.-n. Ji, et al. (2006). "DAXX interacts with phage {Phi}C31 integrase and inhibits recombination." Nucl. Acids Res. **34**(21): 6298-6304.
- Chirmule, N., K. Propert, et al. (1999). "Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans." Gene Ther **6**(9): 1574-1583.
- Conese, M., S. D. Gioia, et al. (2008). "Gene therapy for cystic fibrosis." Expert Opinion on Therapeutic Patents **18**(8): 929-943.
- Conese, M. and J. Rejman (2006). "Stem cells and cystic fibrosis." J Cyst Fibros **5**(3): 141-143.
- Crick, F. H. (1958). "On protein synthesis." Symp Soc Exp Biol **12**: 138-163.
- Derossi, D., G. Chassaing, et al. (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery." Trends Cell Biol **8**(2): 84-87.
- Dietz, G. P. and M. Bahr (2004). "Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach." Mol Cell Neurosci **27**(2): 85-131.
- Dileo, J., T. E. Miller, Jr., et al. (2003). "Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design." Hum Gene Ther **14**(1): 79-87.
- Dong, J. and G. W. Stuart (2004). "Transgene manipulation in zebrafish by using recombinases." Methods Cell Biol **77**: 363-379.
- Ehrhardt, A., J. A. Engler, et al. (2004). "The hotspots of integration targeted by the site-specific integrase PhiC31 may be cell line dependent." Molecular Therapy **9**: S307-S307.

- Ehrhardt, A., J. A. Engler, et al. (2006). "Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration." Hum Gene Ther **17**(11): 1077-1094.
- Ehrhardt, A., H. Xu, et al. (2005). "A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phiC31 and the Sleeping Beauty transposase." Mol Ther **11**(5): 695-706.
- Ehrhardt, A., S. R. Yant, et al. (2007). "Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels in vivo." Mol Ther **15**(1): 146-156.
- Engelhardt, J. F., Y. Yang, et al. (1993). "Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses." Nat Genet **4**(1): 27-34.
- Engelhardt, J. F., X. Ye, et al. (1994). "Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 6196-6200.
- Escoffre, J.-M., T. Portet, et al. (2009). "What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues." Molecular Biotechnology **41**(3): 286-295.
- Fawell, S., J. Seery, et al. (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 664-668.
- Fazio, V. M., S. Fazio, et al. (1994). "Accumulation of human apolipoprotein-E in rat plasma after in vivo intramuscular injection of naked DNA." Biochem Biophys Res Commun **200**(1): 298-305.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.
- Ferrari, M. E., C. M. Nguyen, et al. (1998). "Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes." Hum Gene Ther **9**(3): 341-351.
- Fish, M. P., A. C. Groth, et al. (2007). "Creating transgenic Drosophila by microinjecting the site-specific phiC31 integrase mRNA and a transgene-containing donor plasmid." Nat Protoc **2**(10): 2325-2331.

- Fittipaldi, A., A. Ferrari, et al. (2003). "Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins." Journal of Biological Chemistry **278**(36): 34141-34149.
- Fujihara, S. M. and S. G. Nadler (1999). "Intranuclear targeted delivery of functional NF-kappaB by 70 kDa heat shock protein." EMBO J **18**(2): 411-419.
- Gao, G. P., Y. Yang, et al. (1996). "Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy." J Virol **70**(12): 8934-8943.
- Gersting, S. W., U. Schillinger, et al. (2004). "Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection." J Gene Med **6**(8): 913-922.
- Golzio, M., M. P. Rols, et al. (2004). "In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression." Methods **33**(2): 126-135.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-72.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-1188.
- Gresch, O., F. B. Engel, et al. (2004). "New non-viral method for gene transfer into primary cells." Methods **33**(2): 151-163.
- Hacein-Bey-Abina, S., A. Garrigue, et al. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." J Clin Invest **118**(9): 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.
- Hamilton, D. L. and K. Abremski (1984). "Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites." J Mol Biol **178**(2): 481-486.
- Hauser, P. and R. Ryan (2007). "Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from a pelB fusion protein." Protein Expr Purif **54**(2): 227-233.
- Held, P. K., E. C. Olivares, et al. (2005). "In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery." Mol Ther **11**(3): 399-408.

- Hino, T., T. Yokota, et al. (2006). "In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **340**(1): 263-267.
- Huang, L., G.-I. Xu, et al. (2008). "Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression." Biochemical and Biophysical Research Communications **373**(2): 241-245.
- Hui, S. W., M. Langner, et al. (1996). "The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer." Biophys J **71**(2): 590-599.
- Hyde, S. C., D. R. Gill, et al. (1993). "Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy." Nature **362**(6417): 250-255.
- Hyde, S. C., K. W. Southern, et al. (2000). "Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **7**(13): 1156-1165.
- Ishikawa, Y., N. Tanaka, et al. (2006). "Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines." J Gene Med.
- Ivics, Z., P. B. Hackett, et al. (1997). "Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells." Cell **91**(4): 501-510.
- Izsvak, Z., Z. Ivics, et al. (1995). "Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*)." Mol Gen Genet **247**(3): 312-322.
- Jeong, J. H., S. H. Song, et al. (2001). "DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)." J Control Release **73**(2-3): 391-399.
- Kaplan, I. M., J. S. Wadia, et al. (2005). "Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis." J Control Release **102**(1): 247-253.
- Kennedy, P. G. (1997). "Potential use of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders." Brain **120** (Pt 7): 1245-1259.
- Kitagawa, T., T. Iwazawa, et al. (2003). "Advantages and limitations of particle-mediated transfection (gene gun) in cancer immuno-gene therapy using IL-10, IL-12 or B7-1 in murine tumor models." J Gene Med **5**(11): 958-965.
- Kuhstoss, S. and R. N. Rao (1991). "Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi C31." J Mol Biol **222**(4): 897-908.

- Laemmli, U. K. (1975). "Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(11): 4288-4292.
- Liang, K. W., M. Nishikawa, et al. (2004). "Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA." Gene Ther **11**(11): 901-908.
- Lieber, M., B. Smith, et al. (1976). "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." Int J Cancer **17**(1): 62-70.
- Liesner, R., W. Zhang, et al. (2010). "Critical amino acid residues within the phiC31 integrase DNA-binding domain affect recombination activities in mammalian cells." Hum Gene Ther **21**(9): 1104-1118.
- Liu, F., Y. Song, et al. (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." Gene Ther **6**(7): 1258-1266.
- Liu, J., I. Jeppesen, et al. (2006). "Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts." Gene Ther **13**(15): 1188 - 1190.
- Liu, W., S. Sun, et al. (2005). "An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes." Biomaterials **26**(15): 2705-2711.
- MacLaughlin, F. C., R. J. Mumper, et al. (1998). "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery." J Control Release **56**(1-3): 259-272.
- Markert, J. M., J. N. Parker, et al. (2006). "Oncolytic HSV-1 for the treatment of brain tumours." Herpes **13**(3): 66-71.
- Mates, L., M. K. Chuah, et al. (2009). "Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates." Nat Genet **41**(6): 753-761.
- Maucksch, C., M. K. Aneja, et al. (2008). "Cell type differences in activity of the Streptomyces bacteriophage {phi}C31 integrase." Nucl. Acids Res. **36**(17): 5462-5471.
- Maucksch, C., M. K. Aneja, et al. (2008). "Cell type differences in activity of the Streptomyces bacteriophage phiC31 integrase." Nucleic Acids Res **36**(17): 5462-5471.

- Merdan, T., K. Kunath, et al. (2002). "Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments." *Pharm Res* **19**(2): 140-146.
- Midoux, P., E. LeCam, et al. (2002). "Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors." *Somat Cell Mol Genet* **27**(1-6): 27-47.
- Mizuguchi, H., M. A. Kay, et al. (2001). "Approaches for generating recombinant adenovirus vectors." *Adv Drug Deliv Rev* **52**(3): 165-176.
- Murphy, A. L. and S. J. Murphy (1999). "Catch VP22: the hitch-hiker's ride to gene therapy?" *Gene Ther* **6**(1): 4-5.
- Olivares, E. C., R. P. Hollis, et al. (2002). "Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice." *Nat Biotechnol* **20**(11): 1124-1128.
- Ortiz-Urda, S., B. Thyagarajan, et al. (2002). "Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease." *Nat Med* **8**(10): 1166 - 1170.
- Ortiz-Urda, S., B. Thyagarajan, et al. (2003). "PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa." *Hum Gene Ther* **14**(9): 923-928.
- Ou, H. L., Y. Huang, et al. (2009). "A phiC31 integrase-mediated integration hotspot in favor of transgene expression exists in the bovine genome." *FEBS J* **276**(1): 155-163.
- Park, T. G., J. H. Jeong, et al. (2006). "Current status of polymeric gene delivery systems." *Adv Drug Deliv Rev* **58**(4): 467-486.
- Perez, F., A. Joliot, et al. (1992). "Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide." *J Cell Sci* **102 (Pt 4)**: 717-722.
- Raper, S. E., N. Chirmule, et al. (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." *Mol Genet Metab* **80**(1-2): 148-158.
- Rausch, H. and M. Lehmann (1991). "Structural analysis of the actinophage phi C31 attachment site." *Nucleic Acids Res* **19**(19): 5187-5189.
- Raymond, C. S. and P. Soriano (2007). "High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells." *PLoS ONE* **2**(1): e162.

- Rich, D. P., L. A. Couture, et al. (1993). "Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis." Hum Gene Ther **4**(4): 461-476.
- Rock, D. L. and N. W. Fraser (1983). "Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice." Nature **302**(5908): 523-525.
- Rols, M. P. (2006). "Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells." Biochim Biophys Acta **1758**(3): 423-428.
- Ross, P. C. and S. W. Hui (1999). "Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency." Gene Ther **6**(4): 651-659.
- Ruben, S., A. Perkins, et al. (1989). "Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein." J. Virol. **63**(1): 1-8.
- Ryser, H. J. (1967). "A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size." Nature **215**(5104): 934-936.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Sauer, B. and N. Henderson (1989). "Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome." Nucleic Acids Res **17**(1): 147-161.
- Schaffer, D. V., J. T. Koerber, et al. (2008). "Molecular engineering of viral gene delivery vehicles." Annu Rev Biomed Eng **10**: 169-194.
- Schneider, U., H.-U. Schwenk, et al. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." International Journal of Cancer **19**(5): 621-626.
- Schwarze, S. R., A. Ho, et al. (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." Science **285**(5433): 1569-1572.
- Sebbage, V. (2009). "Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications." Bioscience Horizons **2**(1): 64-72.
- Smith, M. C., R. N. Burns, et al. (1999). "The complete genome sequence of the *Streptomyces* temperate phage straight phiC31: evolutionary relationships to other viruses." Nucleic Acids Res **27**(10): 2145-2155.

- Song, Y. K., F. Liu, et al. (2002). "Hydrodynamics-based transfection: simple and efficient method for introducing and expressing transgenes in animals by intravenous injection of DNA." Methods Enzymol **346**: 92-105.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Surovoy, A., I. Flechsler, et al. (1998). "Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells." Adv Exp Med Biol **451**: 457-460.
- Thorpe, H. M. and M. C. Smith (1998). "In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5505-5510.
- Thorpe, H. M., S. E. Wilson, et al. (2000). "Control of directionality in the site-specific recombination system of the Streptomyces phage phiC31." Mol Microbiol **38**(2): 232-241.
- Thrasher, A. J., H. B. Gaspar, et al. (2006). "Gene therapy: X-SCID transgene leukemogenicity." Nature **443**(7109): E5-6; discussion E6-7.
- Thyagarajan, B., E. C. Olivares, et al. (2001). "Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase." Mol Cell Biol **21**(12): 3926-3934.
- Vives, E., P. Brodin, et al. (1997). "A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus." J. Biol. Chem. **272**(25): 16010-16017.
- Volpers, C. and S. Kochanek (2004). "Adenoviral vectors for gene transfer and therapy." J Gene Med **6 Suppl 1**: S164-171.
- Wadhwa, M. S., W. T. Collard, et al. (1997). "Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression." Bioconjug Chem **8**(1): 81-88.
- Warrick, E., V. Bergoglio, et al. (2008). "[Epidermal stem cells and ex vivo cutaneous gene therapy: application to xeroderma pigmentosum]." J Soc Biol **202**(1): 33-41.
- Wightman, L., R. Kircheis, et al. (2001). "Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo." J Gene Med **3**(4): 362-372.

- Wrobel, I. and D. Collins (1995). "Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 296-304.
- Xu, Y., S. W. Hui, et al. (1999). "Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes." Biophys J **77**(1): 341-353.
- Yant, S. R., L. Meuse, et al. (2000). "Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system." Nat Genet **25**(1): 35-41.
- Young, L. S., P. F. Searle, et al. (2006). "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." J Pathol **208**(2): 299-318.
- Zhang, G., V. Budker, et al. (1999). "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA." Hum Gene Ther **10**(10): 1735-1737.
- Zhang, X. and F. W. Studier (1997). "Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme." J Mol Biol **269**(1): 10-27.

7. Lebenslauf

8. Publikationen

Kneidinger N, Yildirim AO, Callegari J, Takenaka S, Stein MM, Dumitrascu R, **Bohla A**, Bracke KR, Morty RE, Brusselle GG, Schermuly RT, Eickelberg O, Königshoff M. Activation of the WNT/ β -Catenin Pathway Attenuates Experimental Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 1. [Epub ahead of print]
PMID: 20889911

Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, **Bohla A**, Hector A, Vitkov L, Wiedenbauer EM, Krautgartner WD, Stoiber W, Belohradsky BH, Rieber N, Kormann M, Koller B, Roscher A, Roos D, Griese M, Eickelberg O, Döring G, Mall MA, Hartl D. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*. 2010 Sep;16(9):1018-23. Epub 2010 Sep 5.
PMID: 20818377

Maucksch C, **Bohla A**, Hoffmann F, Schleef M, Aneja MK, Elfinger M, Hartl D, Rudolph C. Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells. *J Gene Med*. 2009 Mar 4. [Epub ahead of print]
PMID: 19263463 [PubMed - as supplied by publisher]

Maucksch C, Aneja MK, Hennen E, **Bohla A**, Hoffmann F, Elfinger M, Rosenecker J, Rudolph C. Cell type differences in activity of the *Streptomyces* bacteriophage phiC31 integrase. *Nucleic Acids Res*. 2008 Oct;36(17):5462-71. Epub 2008 Aug 21.
PMID: 18718925 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Todorov VT, Völkl S, Müller M, **Bohla A**, Klar J, Kunz-Schughart LA, Hehlhans T, Kurtz A.

Tumor necrosis factor-alpha activates NFkappaB to inhibit renin transcription by targeting cAMP-responsive element.

J Biol Chem. 2004 Jan 9;279(2):1458-67. Epub 2003 Oct 16.

PMID: 14563845 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Tagungsbeiträge:

Bohla A, Maucksch C, Aneja MK, Rudolph C

Long-term transgene expression in mammalian cells mediated by transduction of the recombinant phiC31 integrase-TAT fusion protein

Molecular Therapy: May 2009; 17 (Supplement 1), S332

Bohla A, Elfinger M, Maucksch C, and Rudolph C

Expression of Recombinant PhiC31 Integrase-TAT Fusion Protein and Delivery to Mammalian Cells, Molecular Therapy: May 2008; 16 (Supplement 1), S182, #483

Maucksch C, Bohla A, Aneja MK, Hoffmann F, Rudolph C

Different Activity of the ϕ C31 Integrase in Lung- and Blood Cells Molecular Therapy Abstracts ASGT 11th Annual Meeting May 28- June 1, 2008

