

HIV-1 basierter Gentransfer in die Lunge zur Behandlung von Surfactant Protein B Mangel

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anne Himmel
aus Magdeburg

2011

Diese Arbeit wurde vom 01. Oktober 2007 bis zum 30. Juni 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Müller und PD Dr. Carsten Rudolph am Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals in München durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Müller
Institut für Pharmazie
Pharmazetische Technologie
Freie Universität Berlin

2. Gutachter: PD Dr. Carsten Rudolph
Klinikum der Universität München
Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik
Dr. von Haunersches Kinderspital

Disputation am 24. Juni 2011

Ich danke meinen Vorbildern: Steffi und Jürgen Himmel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Eine kurze Geschichte der (lentiviralen) Gentherapie	3
1.2	Lentiviren	4
1.2.1	Aufbau	4
1.2.2	Genom	5
1.3	Lentiviraler Vektor	6
1.3.1	Produktion eines lentiviralen Vektors	7
1.4	Surfactant Protein B Mangel	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Allgemeines	11
2.2	Molekularbiologische Methoden	11
2.2.1	Verdau mit Restriktionsenzymen	11
2.2.2	Erzeugung von glatten DNA-Enden	12
2.2.3	Dephosphorylieren von DNA-Enden	12
2.2.4	Ligierung	13
2.2.5	Gelelektrophorese:	13
2.2.6	DNA-Reinigung	14
2.2.7	Gewinnung kompetenter Bakterien	15
2.2.8	Transformation von Bakterien	16
2.2.9	Plasmid-Präparation	18
2.2.10	PCR	19
2.2.11	Einführung beliebiger Schnittstellen mittels PCR	20
2.3	Zellkultur	21
2.3.1	HEK293T	21
2.3.2	A549	22
2.3.3	MLE12	23
2.3.4	Zellzahlbestimmung	24
2.3.5	Transfektion	25
2.3.6	Analyse von Zellen mit der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	27
2.3.7	Transiente Virusproduktion	30
2.3.8	Titration	31
2.3.9	Extraktion genomischer DNA	35
2.3.10	Luciferase-Messung	35
2.3.11	Bradford-Test	36
2.3.12	Western Blotting	37
2.4	Tierversuche	39
2.4.1	Konditionale SP-B knockout Mäuse	40
2.4.2	Narkose	41
2.4.3	Nasale Instillation	41
2.4.4	<i>In vivo</i> Imaging	41
2.4.5	Blutentnahme	43
2.4.6	Organentnahme	44
2.5	Liste der verwendeten Geräte:	47

3	Ergebnisse	48
3.1	Klonierung der Transfervektoren	48
3.2	Ermittlung der optimalen Produktionsbedingungen	50
3.3	Ermittlung der optimalen Reinigungs- und Konzentrierungsbedingungen	55
3.4	<i>In vitro</i> Vergleich der lentiviralen Vektoren	59
3.5	<i>In vivo</i> Charakterisierung des lentiviralen Vektor pWPXLmG*	62
3.6	<i>In vitro</i> Testung von pWPX-SPB	66
3.7	<i>In vivo</i> Versuch pWPX-SPB	68
3.8	<i>In vivo</i> Versuch pWPXLacZ	68
4	Diskussion	71
4.1	Klonierung der Transfervektoren	71
4.2	Ermittlung der optimalen Produktionsbedingungen	72
4.3	<i>In vitro</i> Vergleich der lentiviralen Vektoren	76
4.4	<i>In vivo</i> Charakterisierung des lentiviralen Vektor pWPXLmG*	78
4.5	<i>In vitro</i> Testung von pWPX-SPB	80
4.6	<i>In vivo</i> Versuch pWPX-SPB	81
4.7	Ausblick	84
5	Anhang	86
5.1	Zusammenfassung	86
5.2	Summary	88
5.3	Referenzen	90
5.4	Vektorkarten	94
5.5	Primer	103
5.6	Abbildungsverzeichnis	103
5.7	Tabellenverzeichnis	105
5.8	Abkürzungsverzeichnis	106
5.9	Lebenslauf Anne Himmel	108

1 Einleitung

Viele Erkrankungen sind nach wie vor trotz des umfangreichen medizinischen Fortschritts nicht bzw. nur unzureichend oder unter zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen behandelbar.

Die großen Fortschritte in Molekularbiologie, Genetik und Zellkultur in den letzten 20 Jahren haben die Voraussetzung für einen neuen Therapieansatz geschaffen: Die Behandlung der zugrunde liegenden biologischen Mechanismen, auf Ebene der Gene.

Diese Behandlung, Gentherapie genannt, erfolgt durch einen *ex vivo* oder *in vivo* Gentransfer in Zellen des Patienten. Dort soll das Gen zu einem kompensatorischen, therapeutischen, präventiven oder diagnostischen Nutzen exprimiert werden [1, 2].

1.1 Eine kurze Geschichte der (lentiviralen) Gentherapie

Tatsächlich wurde die erste Gentherapie schon in den frühen 1970er Jahren durchgeführt. Drei Patienten mit Hyperargininämie erhielten eine Impfung mit Cottontail rabbit Papillomavirus, denn die virus-codierte Arginase sollte die Krankheit korrigieren. Die Tierversuche waren asymptomatisch verlaufen und hatten den gewünschten therapeutischen Zweck erfüllt. Leider konnte bei den Blutwerten der Patienten keine Reduzierung des Argininlevels festgestellt werden. Der Misserfolg wurde der Instabilität des Virus zugeschrieben [3, 4]. Trotz dieses Misserfolges wurde die Gentherapie durch die rasanten wissenschaftlichen Entwicklungen vom unrealistischen Szenario zu einer möglichen zukünftigen Option.

Der Nachweis des Wirkprinzips von γ -retroviralem Gentransfer in hämatopoetischen Stammzellen wurde in den frühen 1990er Jahren erbracht [5] und die erste klinische Studie für die Korrektur von Schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) wurde 1991 von Anderson und Kollegen durchgeführt [6]. Periphere CD34⁺ Blutzellen von Patienten wurden mit einem γ -Retrovirus transduziert, der das Gen für die Adenosindeaminase enthielt. Obwohl die direkten positiven Effekte dieser Behandlung nach wie vor abgewogen werden, kann dies als erste erfolgreiche menschliche Gentherapie-Studie gezählt werden, zumindest was Sicherheitsfragen anbelangt. Ein großer Durchbruch war 2000 zu verzeichnen, als es Cavazzana-Calvo und Kollegen

gelang, bei 11 Kindern durch die Einführung der γ -Kette des Interleukinrezeptors in Knochenmarkszellen X-SCID zu korrigieren [7]. Dazu wurde ein Vektor verwendet der auf dem Murinen Leukämie Virus (MLV) basiert. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch später von der Arbeitsgruppe um Adrian Thrasher publiziert [8]. Bedauerlicherweise kam es bei beiden Studien zu mehreren Fällen von Leukämie bedingt durch insertionale Mutagenese des Vektors [9]. Im Laufe einer Studie zur Korrektur der Chronischen Granulomatose im Jahr 2006 wurden mit Hilfe eines γ -retroviralen Vektors, der für gp91phox kodiert, genügend Zellen des Knochenmarks transduziert werden, so dass ein klinischer Effekt beobachtet werden konnte. Dieser klinische Effekt wurde auf eine klonale Amplifikation aufgrund einer insertionalen Mutagenese zurück geführt [10]. Diese und andere erfolgreiche Anwendungen von γ -retroviralen Vektoren in Blut- und Immunzellen haben den Weg für die Entwicklung der verwandten lentiviralen Vektoren geebnet. Diese besitzen den Vorteil post-mitotische Zellen transduzieren zu können. Um diesen Prozess verstehen zu können, muss die Biologie der Lentiviren betrachtet werden:

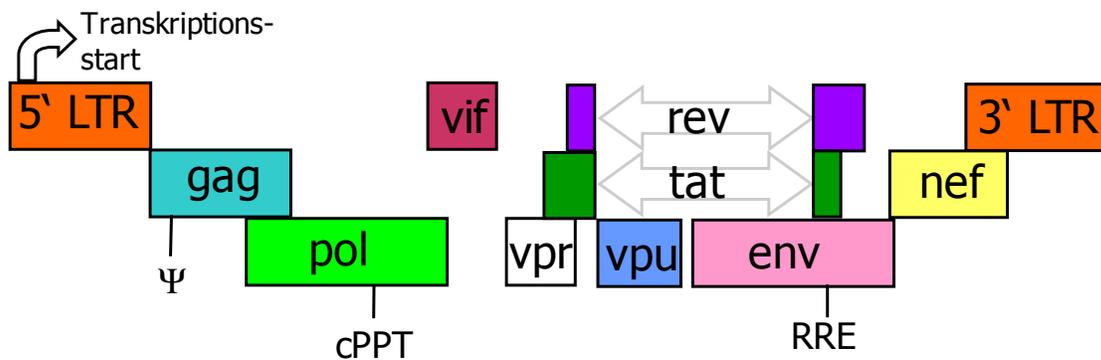
1.2 Lentiviren

1.2.1 Aufbau

Die Lentiviren gehören zur Familie der *Retroviridae*: dies sind einzelsträngige RNA Viren von spherischer Form und 80 – 120 nm Durchmesser. Der Kern eines retroviralen Partikels enthält zwei Kopien der positiv-strängigen RNA, sowie die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease komplexiert mit Nucleocapsidproteinen. Diese formen dann zusammen mit umgebenden Capsidproteinen die Kernhülle [11]. Matrixproteine formen eine Schicht außerhalb des Kerns und interagieren mit der von der Wirtszelle stammenden Lipidhülle. Aus dieser Lipidhülle ragen virale Glycoproteine (Envelope = env). Diese sind mit einem transmembranen Teil ausgestattet, der sie in der Lipidhülle verankert. Der herausragende Teil ist für die Erkennung von spezifischen zellulären Rezeptoren verantwortlich.

1.2.2 Genom

Basierend auf der Organisation des Genoms werden die *Retroviridae* in einfache (z.B. MLV) und komplexe (z.B. Lentiviren) Retroviren unterteilt. Hier ist der schematische Aufbau des Genoms des bekanntesten Vertreters der Lentiviren - dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) des Typs 1 - welche in dieser Arbeit von größter Bedeutung waren, da sie als Basis für die Vektoren verwendet wurden:



**Abbildung 1 Schematischer Aufbau HIV-1 Genom in der proviralen Form
(=Integriert in das Wirtsgenom)**

Im Folgenden sind die einzelnen Bestandteile und ihre Funktion in einer Tabelle dargestellt (siehe nächste Seite, Tabelle 1):

Tabelle 1 Bestandteile des HIV-1 Genoms und ihre Funktion

Bestandteil	Funktion
LTR (Long terminal repeat)	cis aktive Sequenzen für die Regulation von Genexpression, Reverse Transkription und Integration
Gag (Group specific antigens)	Capsid-, Matrix- und Nucleocapsidproteine
Pol	Reverse Transkriptase, Intergrase und Protease
Env (envelope)	Glykoproteine der viralen Hülle
vif, vpr, vpu, rev, tat, nef u.a.	Akzessorische Gene; ihre Produkte sind an der Regulation, Synthese und Prozessierung der viralen RNA beteiligt und wirken teilweise den Abwehrmechanismen der Wirtszellen entgegen
ψ -Element	Verpackungssignal
cPPT (zentraler Polypurintrakt)	Bindungsstelle während der Reversen Transkription
RRE (Rev Response Element)	Export der RNA aus dem Nukleus

Wie wird aus einem lentiviralen Partikel ein lentiviraler Vektor?

1.3 Lentiviraler Vektor

Ein lentiviraler Vektor (LVV) entsteht, indem die Gene für gag, pol und env sowie die akzessorischen Gene durch das Reporter- bzw. Zielgen ersetzt werden [12]. Siehe Abbildung 2. Damit enthält der LVV nur die 5' und 3' LTR, das ψ -Element, welches für die Verpackung der viralen RNA wichtig ist und Sequenzen, die bei der Reversen Transkription und der Integration des Provirus eine Rolle spielen. Aus Sicherheitsgründen wird weiterhin nur eine trunkierte Form der LTR eingesetzt. Dies geschieht, weil die starken Promotoreigenschaften der LTR-Region mit der Aktivierung von Onkogenen, die in der Nähe der Integrationsstelle liegen, in Zusammenhang gebracht werden [13, 14]. Daher ist für die Expression des Transgens ein interner

Promotor von Nöten. Ein weiterer Bestandteil, der auf dem Transfektor vorhanden sein muss, ist ein Teil aus dem env-Gen. Dieses sogenannte Rev Response Element (RRE) ist essentiell für den Transport der RNA aus dem Nukleus. Als Verbesserung der Funktionalität wurde das WPRE (Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element) aus dem Woodchuck Hepatitis Virus als cis-aktives Element eingefügt. Der positive Effekt beruht auch auf der Verbesserung des Exports der RNA aus dem Nukleus [15]. Wie wird allerdings ein LVV produziert, wenn alle Strukturgene entfernt wurden – er somit replikations-inkompetent ist?

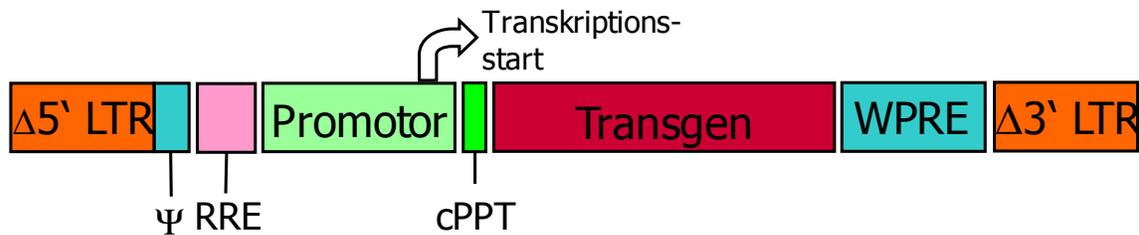


Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines lentiviralen Vektors in seiner proviralen Form

1.3.1 Produktion eines lentiviralen Vektors

Für die Produktion eines lentiviralen Vektors wird ein Verpackungssystem verwendet. Dieses besteht aus einem sogenannten Verpackungsplasmid, das für gag und pol codiert. Dieses Verpackungsplasmid wird zusammen mit einem Plasmid für die virale Hülle (env) und dem Plasmid für den Transfektor transient in Humane Embryonale Nierenzellen (HEK293T) transfiziert. Siehe Abbildung 3.

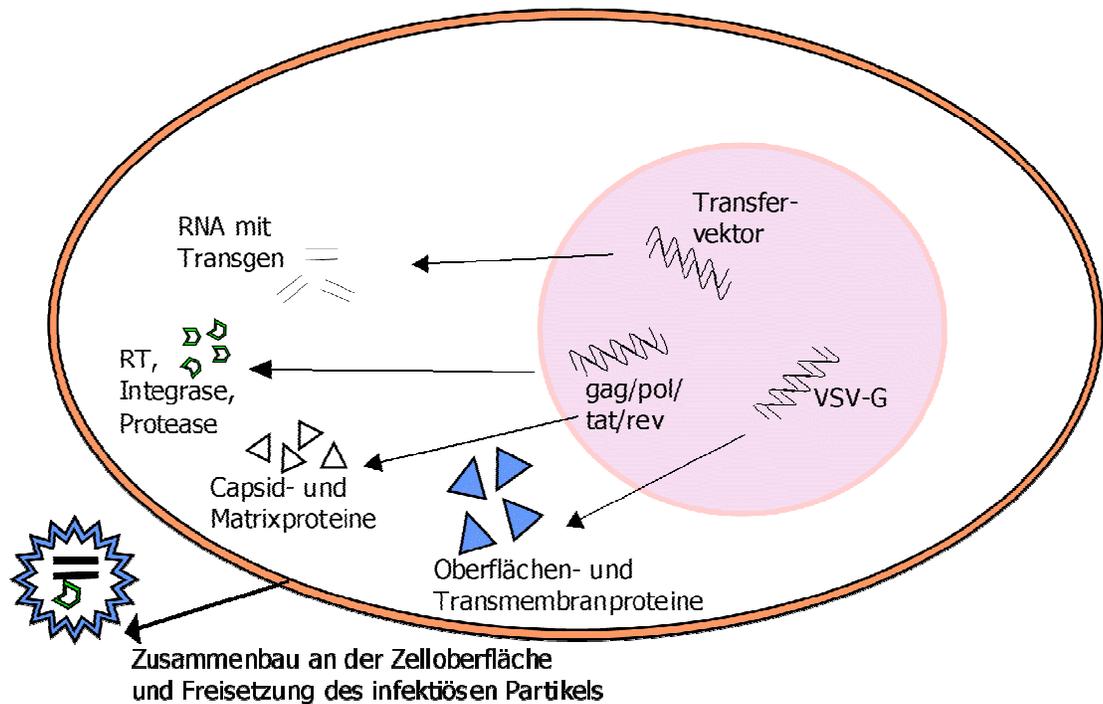


Abbildung 3 Schema einer transienten Vektorproduktion Nach einer erfolgreichen transienten Transfektion mit allen drei Plasmiden migrieren die Genprodukte an die Zellmembran und lösen die Bildung des sphärischen, membran-haltigen Partikels aus.

Seit der erstmaligen Produktion von LVV für einen *in vivo* Versuch durch Naldini *et al.* [16] wurden sowohl Sicherheit als auch Leistungsfähigkeit der Verpackungssysteme kontinuierlich erhöht. Dies geschah unter anderem durch Veränderungen des Verpackungsplasmids. In der ersten Generation lagen alle Sequenzen für gag und pol, die viralen regulatorischen Gene tat und rev, sowie die Gene für vif, vpr, vpu und nef auf einem einzigen Plasmid. Die fortschreitende Identifizierung der HIV-Gene ermöglichte es schließlich in der zweiten Generation die Gene für vif, vpr, vpu und nef wegzulassen, ohne negative Effekte auf Vektorausbeute und Transduktionseffizienz [17]. Dieser Schritt hatte große Auswirkungen auf die Sicherheit, denn dadurch konnte kein, eventuell durch Rekombination auftretender replikations-kompetenter Vektor, Virulenzfaktoren besitzen. Durch die dritte Generation konnte die Sicherheit noch weiter verbessert werden: Die cDNA für das Rev Gen wurde auf ein zusätzliches Plasmid verlagert und die 5' LTR des Transfervektors wurde durch einen starken, aber Tat unabhängigen konstitutiven Promoter ersetzt [18]. Dieses Verfahren ermöglicht große biologische Sicherheit, aber

für die meisten experimentellen Anwendungen genügt die leichter zu verwendende zweite Generation. Daher wurde auch in dieser Arbeit auf Verpackungsplasmide der zweiten Generation zurückgegriffen.

Diese LVV sollten zur Behandlung des Surfactant Protein B Mangels eingesetzt werden.

1.4 Surfactant Protein B Mangel

1993 berichtete Lawrence M. Noguee von einem Fall, bei dem drei Neugeborene einer Familie, mit drei anderen, gesunden Kindern innerhalb der ersten fünf Monate ihres Lebens an Atemversagen verstarben. Immunologische und molekularbiologische Untersuchungen von Lungenbiopsien ergaben das Fehlen von Surfactant Protein B (SP-B) und seiner mRNA [19]. Innerhalb eines Jahres konnte die zugrunde liegende Mutation aufgeklärt werden. Es handelte sich um eine Frameshift Mutation in Codon 121 der SP-B cDNA. Da die Mutation bei den erkrankten Kindern homozygot vorlag konnte man auf einen autosomal rezessiven Vererbungsvorgang schließen, der auch bei zwei anderen, nicht verwandten Geschwisterpaaren belegt werden konnte [20, 21].

Surfactant ist ein sehr wichtiger Bestandteil der Lunge. Die zyklische In- und Deflation der Lunge führt an der Grenze der Zellstruktur zu dem Problem der Oberflächenspannung. Ist diese zu groß, kann die Lunge nicht mehr die Kraft aufbringen um diese Oberflächen nach dem Ausatmen wieder zu trennen. Pulmonaler Surfactant dient daher dem Zweck, die Oberflächenspannung der feuchten Zelloberflächen herabzusetzen, so dass diese sich wieder von einander lösen können. Es handelt sich um eine komplexe Mischung aus Phospholipiden (PL), neutralen Lipiden (besonders Cholesterol) und Surfactant Proteinen. Diese Mischung wird in Alveolaren Pneumozyten vom Typ II (ATII) prozessiert und in Lamellarkörperchen bis zur Exozytose gespeichert. Das Fehlen von SP-B führt dazu, dass der Surfactant seinen Zweck nicht mehr erfüllen kann. Es kommt zu Atemversagen, einhergehend mit Symptomen wie Alveolarproteinosen, RDS (Respiratory Distress Syndrome), persistierendem pulmonalem Hypertonus und bronchopulmonaler Dysplasie [20, 21]. Die einzige derzeitig verfügbare Therapie besteht in einer Lungentransplantation [22].

Eine Gentherapie, die das korrekte Gen für SP-B in ATII Zellen bereitstellen könnte, wäre daher eine kausale Behandlungsoption für die Erkrankung.

Für das Transduzieren von bestimmten Zielzellen, wie in diesem Fall ATII Zellen ist das Glykoprotein der viralen Hülle von entscheidender Bedeutung. Das Wildtyp-Glykoprotein – ein Komplex aus gp120 und gp41 – ist für die spezifische Infektion von CD4⁺-Zellen verantwortlich [23]. Um andere Zielzellen zu erreichen, wird eine sogenannte Pseudotypisierung vorgenommen. Pseudotypisierung ist normalerweise ein Prozess, den man bei Zellen beobachten kann, die mit zwei oder mehr verschiedenen Viren infiziert sind. Dabei kommt es zur Vermischung der Phänotypen der neuentstehenden, viralen Partikel [24]. Dieser Effekt kann auch künstlich herbeigeführt werden, indem ein Plasmid mit einem artfremden, viralen Glykoprotein co-transfiziert wird. In dieser Arbeit wurde das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) verwendet. Dieses ist zum Einen leicht verfügbar, zum Anderen wurde von Buckley *et al.* gezeigt, dass es zu einer starken, fast ausschließlichen Transduktion der Alveoli und alveolaren Makrophagen führt, bei einer intranasalen Applikation in adulten Mäusen [25].

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Wasser:

Mit Wasser ist im Folgenden immer Aqua ad iniectabilia, Wasser für Injektionszwecke entsprechend dem gültigen Europäischen Pharmacopeia, von Braun gemeint.

Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien wiesen mindestens den Qualitätsgrad „zur Analyse“ auf und wurden von den Firmen Applichem, Merck, Sigma oder Invitrogen bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Enzyme:

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen Fermentas, New England Biolabs oder Roche.

Alle weiteren DNA-abhängigen Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Roche oder Invitrogen bezogen.

Verbrauchsmaterialien:

Verbrauchsmaterialien, wie Reaktionsgefäße, serologische Pipetten, PP-Teströhrchen, Pipettenspitzen oder Petrischalen wurden von den Firmen Peske, Corning oder Greiner bio-one verwendet.

2.2.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

Die Grundlage für alle molekularbiologischen Arbeiten ist das Schneiden von DNA mit Hilfe der Restriktionsenzyme, größtenteils Restriktionsendonukleasen des Typs II. Diese erkennen ihre meist palindromische Zielsequenz auf der DNA und schneiden dort ATP-unabhängig und ohne Methyltransferasetätigkeit. Alle Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers mit ihren spezifischen Puffern verwendet, wobei ein Kontrollverdau für 30 min bei 37°C und ein präparativer Verdau über Nacht (ü.N.) bei 37°C erfolgt.

Beispielhafter Ansatz:	Kontrollverdau	präparativer Verdau
	1 µg DNA	2 – 10 µg DNA
	1 – 5 U ¹ Enzym	10 U Enzym
	Puffer 1x	Puffer 1x
	ad. 7 µL Wasser	ad. 7 – 10 µL Wasser

2.2.2 Erzeugung von glatten DNA-Enden

Die T4-DNA Polymerase (Roche) füllt 5'-Überhänge mit Nukleotiden auf, so dass glatte Enden entstehen. Dafür wurde die DNA zusammen mit einem dNTP-Mix (10 mM), einem Inkubationspuffer (Roche) und der T4-Polymerase für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Polymerase erfolgte für 10 min bei 75°C.

Beispielhafter Ansatz:	1 – 2 µg geschnittene, gereinigte DNA
	1 U T4-Polymerase
	Inkubationspuffer 1x
	122 µM dNTP-Mix (33 µM je dNTP)
	ad. 30 µL Wasser

dNTP-Mix:

Der dNTP-Mix wurde aus dem Deoxynucleosid Triphosphate Set (PCR Grade) von Roche hergestellt:

- 2,5 mM dATP
- 2,5 mM dTTP
- 2,5 mM dGTP
- 2,5 mM dCTP

Lagerung bei –20°C.

2.2.3 Dephosphorylieren von DNA-Enden

Um ein Religieren eines einfach geschnittenen Vektors zu verhindern, reicht es die DNA-Enden mit einer Phosphatase zu dephosphorylieren. Hierfür wurde die inaktivierbare Antarktische Phosphatase (New England Biolabs) zusammen

¹ U = Unit; Hersteller- und enzymbespezifische Definition der Enzymaktivität.

mit der DNA und dem entsprechenden Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert und danach für 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Beispielhafter Ansatz: 1 µg geschnittene, gereinigte DNA
 5 U Antarktische Phosphatase
 Puffer 1x
 ad. 10 µL Wasser

2.2.4 Ligierung

Um DNA zu rekombinieren, muss zuvor geschnittene DNA ligiert werden. Eine Ligierung ist die enzymatische Verknüpfung von 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppe der DNA.

- bei glatten Enden:

Um DNA mit glatten Enden zu ligieren wurde ein molares Vektor : Insert Verhältnis von 1:5 verwendet. Die Endmenge an DNA sollte 100 ng nicht übersteigen. Die Inkubation mit Ligase-Puffer (Roche) und 1-5 U T4 DNA Ligase (Roche) erfolgte über Nacht im 4°C Kühlschranks und anschließend noch 1 – 2 h bei Raumtemperatur.

- bei überhängenden Enden:

Hier sollte das molare Vektor : Insert Verhältnis bei 1:2 liegen. Dank der Stabilität aneinander gelagerter komplementärer Enden läuft die Reaktion mit höherer Effizienz ab. Aus diesem Grund war schon eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und 1 – 2 U Enzym ausreichend.

2.2.5 Gelelektrophorese:

2.2.5.1 Agarose Gel:

Zum elektrophoretischen Auftrennen der DNA im Längenbereich von 0,5 – 12 kb wurde ein 1% Agarose Gel verwendet. Nach dem Aufkochen in der Mikrowelle wurde das Gel in eine Kammer mit Probenkamm gegossen. Nach dem Abschluss der Gelierung wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1x TAE als Laufpuffer befüllt war. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer in die Kammern pipettiert. Als Größenmarker (siehe Abbildung 4) wurde der DNA Ladder 1 kb verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte für 30 – 40 min bei 80 V, mit anschließender Geldokumentation auf dem UV-Tisch mit Kamera und Sofort-Drucker.

1% Agarose Gel:

1 g Agarose (Invitrogen) / 100 mL 1x TAE
1 µg Ethidiumbromid / 100 mL

10x DNA-Ladepuffer

50% Glycerol
0,5% Orange G
25 mM EDTA
10 mM Tris-HCl pH 8

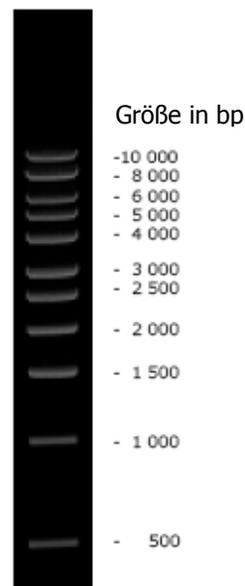


Abbildung 4 1 kb DNA Ladder von PlasmidFactory

TAE 50x

242 g Tris-Base
57,1 mL Essigsäure
100 mL 0,5 M EDTA
auf 1 L

2.2.6 DNA-Reinigung

2.2.6.1 aus Agarose-Gelen

In Wasser suspendiertes SiO₂, so genannte „Glasmilch“ bindet in Anwesenheit hoher, chaotroper Salzkonzentrationen DNA.

Das Lösen des ausgeschnittenen Gelstücks erfolgte in 6M NaI bei ca. 50°C im Thermoschüttler bis kein Gel mehr erkennbar war. Die DNA wurde dann mit Hilfe von 8 – 10 µL Glasmilch aus der Lösung adsorbiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µL Waschpuffer wurde das Pellet getrocknet und in 10 – 20 µL Wasser resuspendiert. Nach 20 min bei ca. 50°C auf dem Thermoschüttler hat sich die DNA von der Glasmilch gelöst und konnte nach kurzem Zentrifugieren bei 13.000 U/min (Umdrehungen pro Minute) abpipettiert werden.

Waschpuffer:

100 mM NaCl

20 mM Tris-HCl pH 7,5

5 mM EDTA

50% Ethanol

2.2.7 Gewinnung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, in die DNA eindringen kann, heißen kompetente Zellen. Um die Zellen aufnahmebereit für DNA zu machen wurde die CaCl₂ Methode angewendet.

Diese Methode beruht darauf, dass die zweiwertigen Calcium-Ionen einwertige Ionen in der Phospholipiddoppelschicht der Bakterienzellwand ersetzen und diese somit für DNA leichter passierbar machen.

Es wurde nach den Angaben der „Current Protocols in Molecular Biology“ von Wiley (1997, Unit 1.8) verfahren.

Protokoll:

- Über Nacht-Kultur einer Kolonie des gewünschten Stammes (meist DH10B, siehe Tabelle 2 Verwendete *E. coli* Stämme) in 50 mL LB-Medium
- mit 4 mL der ü.N.-Kultur 400 mL LB-Medium animpfen; auf einem Schüttler bei 250 U/min und 37°C bis zu einer OD₅₉₀ von 0,375
- Kultur auf acht vorgekühlte 50 mL PP-Teströhrchen verteilen und 5 bis 10 min auf Eis belassen → ab diesem Schritt müssen die Zellen immer kalt gehalten werden

-
- Zentrifugieren für 7 min bei 1.600x g und 4°C
 - Überstand verwerfen und jedes Pellet in 10 mL eiskalter CaCl₂ Lösung resuspendieren
 - Zentrifugieren für 5 min bei 1.100x g und 4°C
 - Überstand verwerfen und jedes Pellet in 2 mL eiskalter CaCl₂ Lösung resuspendieren
 - Verteilen von 250 µL Aliquots auf vorgekühlte, sterile Reaktionsgefäße
 - In Trockeneis/Ethanol einfrieren und bei -70°C lagern

CaCl₂ Lösung

60 mM CaCl₂

15% Glycerol

10 mM PIPES (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure))

autoklavieren

Lagerung bei Raumtemperatur

2.2.8 Transformation von Bakterien

Für die Gewinnung von Klonen, mit denen dann Plasmid-DNA amplifiziert wird, werden Bakterien transformiert. Für eine Transformation wurden chemisch oder elektrisch kompetente Zellen verwendet. Die Gewinnung chemisch kompetenter Zellen geschah mit Hilfe der CaCl₂ Methode (s. vorheriges Kapitel). Als elektrisch kompetente Bakterien wurden ElectroMAX DH10B von Invitrogen verwendet.

Für eine chemische Transformation wurden die aliquotierten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und je 100 µL auf die vorgelegte Plasmid-DNA pipettiert. Nach 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 0,5 - 1 min. Zum Abkühlen verblieben die Zellen 2 min auf Eis, bis sie mit 1 mL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt wurden. Zum Ausbilden der Resistenz wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert und danach auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsdruck ausplattiert. Nach 16 h konnten die Kolonien für eine Mini-Präparation gepickt werden.

Für eine Elektroporation wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 2 µL der Zellen wurden zu der vorgelegten DNA pipettiert. Die verwendete DNA musste salzfrei sein, da sonst eine Art Kurzschluss zwischen den zwei Aluminium-Elektroden stattfindet, welcher alle Zellen töten würde. Es wurde daher eine Tröpfchen-Dialyse auf einem MF-Membranfilter von Millipore durchgeführt. Zellen und DNA wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µL gebracht. Dieses Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (bio-rad, Breite 1 mm) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit den folgenden Einstellungen:

1800 V

100 Ω

25 µF

Das anschließende Vorgehen war analog zu den chemisch kompetenten Zellen.

Für alle Arbeiten mit Bakterien wurde einer der folgenden *Escherichia coli* Stämme verwendet:

Tabelle 2 Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Firma
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F'proAB lacIqZ-M15 Tn10 (Tetr))	Stratagene
DH5α	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG	Invitrogen

Agar-Platten:

LB-Medium
+ 1,5% (w/v) Agar
autoklavieren
abkühlen bis ca. 50°C,
Zugabe Selektionsdruck,
gießen in Petrischale

LB-Medium:

20 g LB Broth (Invitrogen)
[enthält
10 g Trypton,
5 g NaCl und
5 g Hefeextrakt]
ad. 1 L Wasser
autoklavieren

SOC-Medium:

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
20 mM Glucose
ad. 1 L Wasser
autoklavieren

2.2.9 Plasmid-Präparation

Eine Plasmid-Präparation ist in verschiedenen Maßstäben möglich. So benötigt ein Kontrollverdau nach einer Transformation nur geringe Mengen (ca. 1 µg). Es wurde daher eine Mini-Präparation durchgeführt. Für Klonierungszwecke wurden größere Mengen hergestellt und gelagert. Diese Mengen wurden mit einer Midi-Präparation (ca. 100 – 300 µg) gewonnen. Die großen DNA-Mengen, die für die Vektorproduktionen benötigt wurden, sind mit einer Maxi-Präparation hergestellt worden.

2.2.9.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1976), abgewandelt von Cormack und Somssich (1998) [26]. Dabei wurden 250 µL der Bakterienkultur mit 250 µL einer 1% SDS und 0,2 N NaOH-Lösung für 2 min lysiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch die Zugabe von 250 µL einer 3 M Kaliumacetat-Lösung. Nach der anschließenden Zentrifugation für 3 min bei 13.000 U/min und Raumtemperatur befindet sich die genomische DNA im Kalium-SDS-Pellet, da sie auf Grund ihrer Größe noch nicht wieder renaturieren konnte. Die kleinere Plasmid-DNA ist im Überstand. Dieser wird mit 650 µL Isopropanol und für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA fällt aus und liegt als Pellet vor. Dieses wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 3,5 µL TE 0,1x gelöst. Wichtig war die anschließende Inkubation mit RNase, da die RNA zu einem sehr großen Teil mit ausgefällt wird.

Verwendung fanden die fertig angesetzten Lösungen E2 (Lyse) und E3 (Neutralisation) der Firma Genomed.

TE 1x

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA

2.2.9.2 Midi-Präparation/ Maxi-Präparation

Auch hierfür wird auf das Grundprinzip der alkalischen Lyse zurückgegriffen, nur dass die Plasmid-DNA aus dem Überstand über eine Anionenaustauschersäule gereinigt wird.

Für die Präparation wurde ein angeempfohlener Schikanekolben mit 70 / 120 mL LB-Medium (siehe 2.2.8) und entsprechendem Selektionsdruck ü. N. bei 37°C und sanftem Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 6.000 U/min für 10 min bei Raumtemperatur wurde weiter nach den Herstellerangaben des JetStar MidiPrep bzw. MaxiPrep-Kits der Firma Genomed gearbeitet.

2.2.10 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten verwendet. Hierfür durchläuft ein Ansatz mit einer temperaturstabilen Polymerase, zwei Primern und der DNA-Vorlage ca. 30-mal einen Zyklus von Denaturieren (95-98°C), Anlagerung der Primer (52-58°C) und Elongation durch die Polymerase (68-72°C).

Beispielhafter Ansatz:	DNA-Vorlage 10 ng/µL:	1 µL
	Primer (10 µM):	jeweils 1 µL
	dNTP-Mix (10mM):	2 µL
	Pfx-Polymerase (2,5 U/µL):	0,4 µL
	MgSO ₄ (50 mM):	0,75 µL
	„enhancer solution“ (10x):	2,5 µL
	Polymerase-Puffer (10x):	2,5 µL
	ad. 25 µL Wasser	

Zyklus 1:	Denaturierung bei 95°C für 5 min
Zyklus 2-30:	Denaturierung bei 95°C für 1 min
	Anlagerung der Primer bei 56°C für 0,5 min
	Elongation bei 68°C für 1 min/kb
Zyklus 31:	Elongation bei 68°C für 7 min
	Lagerung bei 4°C

Alle verwendeten Primer (siehe 5.5) wurden erst mit dem Programm VectorNTI entworfen und dann von der Firma Metabion synthetisiert.

Zur Aufreinigung des Amplifikats wurde eine Trennung auf einem 1% Agarose-Gel durchgeführt. Zur Reinigung aus diesem Gel siehe Abschnitt 2.2.6.1.

2.2.11 Einführung beliebiger Schnittstellen mittels PCR

Bei einer blunt-end Klonierung (siehe 2.2.4) einen gewünschten Klon zu finden ist durch die niedrige Effizienz der Ligierung und den möglichen Falsch-Einbau des Fragments oft nicht erfolgreich. Eine Möglichkeit, dies zu Umgehen ist die Einführung einer gewünschten Schnittstelle an die Enden des Fragments mittels PCR. Dafür ist ein spezielles Primer-Design nötig. Die Primer müssen sich am 3' Ende sehr gut und fest anlagern, so dass am 5' Ende die Sequenz für eine beliebige Schnittstelle stehen kann, die nicht bindet (siehe Abbildung 5). Zu beachten ist, dass manche Restriktionsenzyme nicht direkt am Ende schneiden können, sondern ein bis mehrere Basenpaare in Extension benötigen. Die gewünschten Informationen wurden dem Katalog der Firma New England Biolabs entnommen.

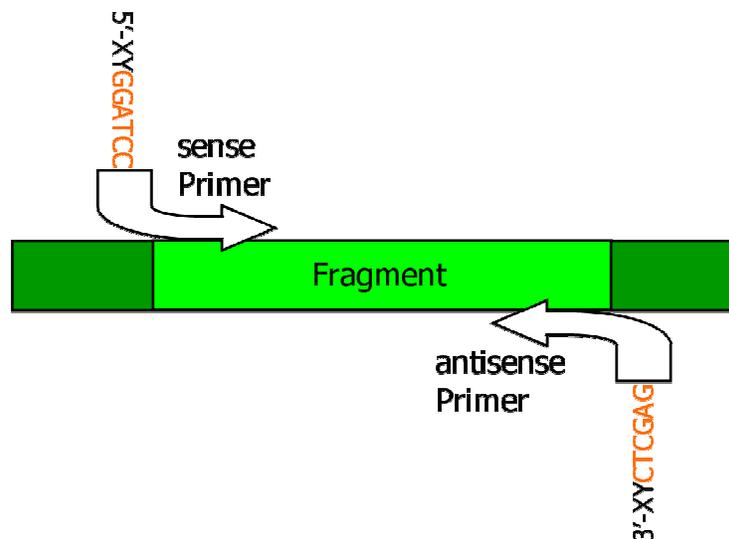


Abbildung 5 Primerdesign zur Einführung neuer Schnittstellen

Beispielhafter Ansatz:	DNA-Vorlage:	10 ng
	Primer:	0,2 μ M
	dNTP-Mix:	1 mM
	Pfu-Polymerase (2,5 U/ μ L):	1 μ L
	Polymerase-Puffer (10x):	5 μ L
	ad. 50 μ L Wasser	

Zyklus 1: Denaturierung bei 95°C für 2 min
Zyklus 2-30: Denaturierung bei 95°C für 20 s
Anlagerung der Primer bei 66°C für 30 s
Elongation bei 72°C für 150 s
Zyklus 31: Elongation bei 72°C für 3 min
Lagerung bei 4°C

Das entstandene PCR Fragment wurde in einem Agarose-Gel gereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in die Ligierungsreaktion mit dem gleichartig geschnittenen Vektor eingesetzt.

2.3 Zellkultur

Die Verbrauchsmaterialien, wie Zellkulturplatten und –schalen, sowie serologische Pipetten, Pipettenspitzen, PP-Teströhrchen und Pasteurpipetten wurden von den Firmen Nunc, Greiner bio-one, Corning und Eppendorf bezogen.

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.

Im Folgenden eine Auflistung der verwendeten Zelllinien, sowie Kulturhinweise:

2.3.1 HEK293T

Adhärente Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen transformiert mit mechanisch zerkleinerter Adenovirus Typ 5 DNA (1977, Graham); zusätzlich enthält sie das große T-Antigen des SV40 (Simian Virus) [27].

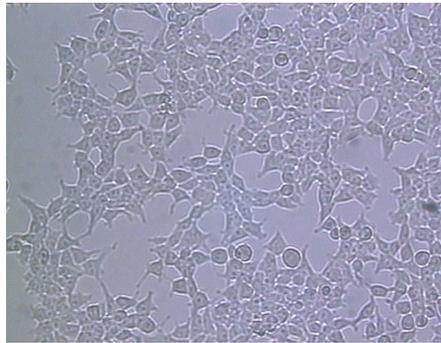


Abbildung 6 HEK293T Zellen unter dem Mikroskop

- Medium: D-MEM + GlutaMAX-I mit 10% FBS und 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Pen/Strep)
- Ablösen: Beispiel 10 cm-Schale: Waschen mit 5 mL vorgewärmter PBS; 1 mL TrypLE Select verteilen, wieder absaugen; 2 min bei 37°C inkubieren; Ablösen mit 4 mL Medium (oder zur FACS-Analyse: PBS)

Die HEK293T Zelllinie reagiert sehr sensibel auf Waschschritte oder andere Stressfaktoren. Diese können u. a. dazu führen, dass sich die Zellen vom Untergrund ablösen. Um dies zu vermeiden, wurden sie auf Poly-D-Lysin (PDL) beschichteten Platten kultiviert. PDL ist ein synthetisches Protein, welches sich an das negativ geladene Polystyrol der Zellkulturgefäße anlagert. Dadurch entsteht eine positiv geladene Oberfläche, an die sich die Zellen besser anlagern können.

PDL-Beschichtung

Poly-D-Lysin Hydrobromid von Sigma

Unter aseptischen Bedingungen:

1 mg / 10 mL steriles Wasser

0,5 mL / 25 cm² zu beschichtende Oberfläche für 5 min

Waschen mit sterilem Wasser

2 – 6 h Trocknen in der Sterilwerkbank

2.3.2 A549

Adhärente Zelllinie gewonnen aus dem Adenokarzinom eines 58-jährigen Kaukasiers. Aufgrund von morphologischen und biochemischen Übereinstimmungen werden sie als Modell für alveolare Pneumozyten vom Typ II verwendet [28].

-
- Medium: MEM + GlutaMAX-I mit 10% FBS und 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Pen/Strep)
- Ablösen: Beispiel 10 cm-Schale: Waschen mit 5 mL vorgewärmter PBS; 1 mL TrypLE Select verteilen, wieder absaugen; 2 min bei 37°C inkubieren; Ablösen mit 4 mL Medium (oder zur FACS-Analyse: PBS-EDTA)

2.3.3 MLE12

Adhärente Zelllinie aus einem Lungentumor einer weiblichen, transgenen FVB/N Maus. Bei dem Transgen handelt es sich um das große T-Antigen des SV40, dessen tumorigener Effekt beschränkt wurde, da es unter der Kontrolle des SP-C Promoters steht. Es handelt sich um Epithelzellen, die positiv auf die Sekretion von murinem SP-B und SP-C getestet wurden [29].

- Medium: MEM + GlutaMAX-I mit 10% FBS und 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Pen/Strep)
- Ablösen: Beispiel 9 cm-Schale: Waschen mit 5 mL vorgewärmter PBS; 1 mL TrypLE Select verteilen, wieder absaugen; 2 min bei 37°C inkubieren; Ablösen mit 4 mL Medium (oder zur FACS-Analyse: PBS-EDTA)

PBS

Phosphat gepufferte Saline
10x PBS von Invitrogen
Verdünnung erfolgt mit sterilem Wasser

PBS-EDTA

500 mL 1x PBS
1 mM EDTA (sterilfiltriert)

TrypLE-Select

Rekombinantes Enzym zur Ablösung
adhärent wachsender Zellen. Inaktivierung
auch durch Medium und nicht allein durch FBS.
1x Lösung von Invitrogen

D-MEM + GlutaMAX-I

(Dulbecco's Modified Eagle
Medium mit GlutaMAX-I)
1x flüssig; von Invitrogen
4,5 g/L Glukose
ohne Natriumpyruvat

GlutaMAX-I

Von Invitrogen
= L-Alanyl-L-Glutamin;
Dipeptid, welches nur sehr langsam
L-Glutamin freisetzt, so dass dieses direkt
von den Zellen aufgenommen wird und nicht
im Medium bleibt, wo es zur Freisetzung von
toxischem Ammonium kommen würde.
Zusätzlich erhält die Zelle noch L-Alanyl.

L-Glutamin

200 mM (100x) von Invitrogen

FBS

Fötale Bovines Serum
Mycoplex
von PAA Laboratories

Pen/Strep

=Penicillin und Streptomycin
20 mL von Invitrogen

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitsbank und nach den Regeln der aseptischen Arbeitstechnik von Lindl durchgeführt [30].

Um ein Überwachsen der adhären wachsenden Zellen zu vermeiden ist regelmäßige Kontrolle unter dem Mikroskop und - bei einer gewissen Konfluenz - Verdünnung von Nöten. Bei der Berechnung der Verdünnung sind zellspezifische Vorlieben zur Inokulumdichte zu beachten.

Für die Verdünnung wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und dann zellspezifisch abgelöst. Es wurde die, der Verdünnung entsprechende Menge an Zellen in ein neues Zellkulturgefäß mit vorgelegtem Medium überführt.

2.3.4 Zellzahlbestimmung

Bei der Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer (Optik Labor) verwendet. Diese wurde mit 70% Ethanol gereinigt, bevor das Deckgläschen aufgedrückt wurde. Zu beachten waren dabei die Newton-Ringe, ohne die die Tiefe der Neubauer Kammer nicht richtig eingestellt wäre. 50 μ L der zu bestimmende Zellsuspension wurden mit 50 μ L Trypanblau zur Vitalfärbung vermischt. Die Lösung wurde solange an den Rand des Deckgläschens pipettiert, bis sich die Kammer vollgesogen hatte. Die Auszählung der vitalen Zellen in vier Großquadraten der Zählkammer erfolgte unter dem Mikroskop. Berechnet wurde die Zellzahl auf folgende Weise:

$$\text{Zellzahl / mL} = \text{Mittelwert} \cdot \text{Kammerfaktor} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

wobei: Kammerfaktor = 10^4
 Verdünnungsfaktor = 2 (1:1 Mischung mit Trypanblau)

Trypan-Blau

0,4% Trypan Blau Lösung sterilfiltriert
von Sigma Aldrich

2.3.5 Transfektion

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen nennt man Transfektion.
Dafür wurden verschiedene Verfahren angewendet:

2.3.5.1 Kationische Polymere

Eine Möglichkeit ist die Transfektion durch kationische Polymere. Dabei wird die DNA in eine weit verzweigte Struktur aus Dendrimeren eingelagert. Dieser Komplex bindet dann auf Grund seiner positiven Gesamtladung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und wird endosomal von der Zelle aufgenommen. So wird die DNA in die Zelle geschleust. Die Zellen wurden bei der üblichen Konfluenz von 70-80% transfiziert.

Die Transfektion wurde entweder mit dem TransIT-293 Transfection Reagent (Mirus) durchgeführt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Beispielhaftes Protokoll für Transfektion einer Vertiefung einer Sechs-well Platte mit dem Mirus Reagenz:

- 200 μ L D-MEM ohne FBS
- + 4-8 μ L/ μ g DNA TransIT Reagenz
- Mischen, 5 – 20 min inkubieren bei Raumtemperatur
- + DNA(-Gemisch) 2 μ g
- Mischen und 15 – 30 min bei Raumtemperatur inkubieren

Altes Medium abnehmen und mit 1 mL PBS waschen
1 mL frisches Medium (mit FBS) dazugeben

- Transfektionsgemisch vorsichtig in Mediumspiegel pipettieren
24 – 48 h inkubieren im Brutschrank
- Analyse / Ernte

Das zweite Transfektionsreagenz, das auf kationischen Polymeren beruht ist Polyethylenimin². Es wurde sowohl in linearer (IPEI) als auch verzweigter (= "branched" brPEI) Form verwendet.

Das IPEI (22 kDa) bzw. brPEI (25 kDa) wurde nach einem leicht veränderten Protokoll von Brissault *et al.* [31] von Senta Üzgün synthetisiert und lyophilisiert. Das so lagerfähige Polymer konnte dann nach Bedarf gelöst, dialysiert und – nach Bestimmung der Konzentration mit einem CuSO₄-Assay [32] – für Transfektionen verwendet werden.

Beispielhaftes Transfektionsprotokoll für eine 10 cm-Schale:

- DNA(-Gemisch) 20 - 21 µg ad. 2500 µL 1x HBS
- Berechnete Menge IPEI / brPEI (siehe unten) ad. 2500 µL 1x HBS
- beide Teile schütteln und DNA-haltigen Teil in den PEI-haltigen Teil überführen
- 20 – 25 min bei Raumtemperatur inkubieren
- + 5000 µL vorgewärmtes Medium ohne FBS
- auf Platte pipettieren
- 3 – 4 h im Brutschrank inkubieren
- Mediumwechsel (Medium mit FCS)

Berechnung der benötigten Menge PEI:

$$V(PEI) = \frac{N/P \cdot m(DNA)}{7,67 \cdot c(PEI)}$$

N/P = Quotient aus Stickstoffatomen des PEI und Phosphatgruppen der DNA
7,67 = Einbeziehung der Molekulargewichte von einem Nukleotid (330 g/mol)
und einer Ethylenimin-Grundeinheit (43 g/mol)

² Nur die Monomere weisen die Iminbindung auf. Im Polymer als Aminbindung.

1x HBS

8 g NaCl

0,37 g KCl

0,135 g Na₂HPO₄

1 g Dextrose

5 g HEPES

900 mL Wasser

mit NaOH auf einen pH von 7,05 einstellen

ad. 1000 mL Wasser

2.3.5.2 Calcium-Phosphat-Präzipitation

In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich DNA an das ausfallende Calciumphosphat. Die entstehenden Kristalle sinken auf die adhärenen Zellen und werden von diesen durch Endocytose aufgenommen.

Beispielhafter Ansatz:

- 10 µg DNA(-Gemisch)
- ad. 500 µL 1x HBS
- + 23,1 µL CaCl₂ 2,5 M
- vortexen
- 20 – 25 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Auf das vorhandene Medium tropfen
- Nach 6 – 8 h Mediumwechsel

2.3.6 Analyse von Zellen mit der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

In einem Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension durch einen Hüllstrom und eine sich verengende Probenkammer vereinzelt („hydrodynamische Fokussierung“). So wird jede Zelle, wie in Abbildung 7 gezeigt, einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbei geführt. Die dabei entstehende Lichtstreuung und -beugung wird von Photodioden gemessen und gibt Auskunft über Größe und Beschaffenheit der Zelle. Zusätzlich regt der Laser an oder in der Zelle befindliche Fluoreszenzfarbstoffe an, deren charakteristische Emissionsspektren erfasst werden können. Dies wird z.B.

beim Nachweis von spezifischen Antigenen auf der Zelle genutzt, indem Farbstoff-markierte Antikörper eingesetzt werden.

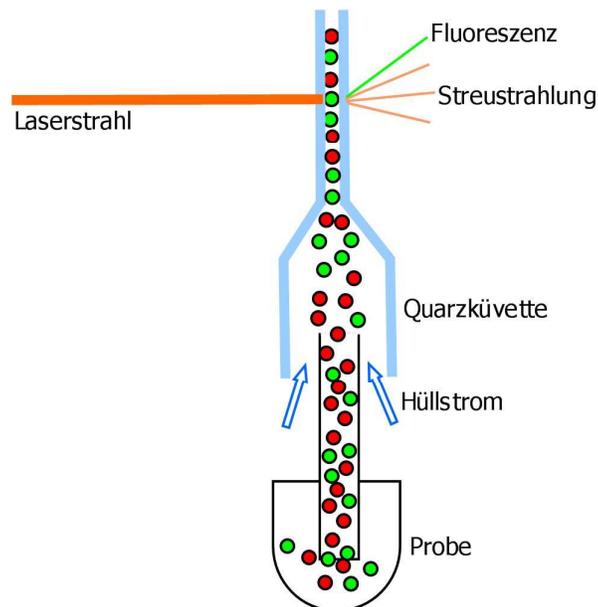


Abbildung 7 Hydrodynamische Fokussierung und Strahlengang eines Durchflusszytometers Die Probe wird eingesaugt und in einen Hüllstrom aus FACSFlow (BD) geleitet. Dies und die Verringerung des Durchmessers führen zu einer perlenschnurartigen Ausrichtung der Zellen. Danach passiert diese Kette zwecks Messung den Laserstrahl.

In dieser Arbeit wurde das Analyse-Durchflusszytometer FACSCalibur benutzt, welches über einen Argon-Laser (488 nm) und einen roten Diodenlaser (633 nm) verfügt. Außerdem können bis zu vier Wellenlängenbereiche (FL-1 bis FL-4) erfasst werden. Für die Experimente waren die Detektion von GFP (FL-1) und Propidiumiodid (FL-3) von besonderer Bedeutung. Mit GFP (Grün fluoreszierendes Protein) als Transgen konnte die Funktionstüchtigkeit der Promotoren und die Entstehung von infektiösen Partikeln (IP) überprüft werden. Propidiumiodid (PI) wurde als Marker für tote Zellen benutzt, denn nur in diese kann es sich einlagern.

Zu messende Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, spezifisch abgelöst und in PBS-EDTA resuspendiert. Die Messung erfolgte in 1 mL der Zellsuspension, die bei Bedarf verdünnt wurde. Zur Anfärbung der toten Zellen wurde 1 µg/mL Propidiumiodid hinzugegeben.

Die Messung am FACSCalibur erfolgte dann mit zellspezifischen Einstellungen für Signalverstärkung, Kompensation und Grenzwerte.

Die gemessenen Signale wurden über einen „Density Dot Plot“ ausgewertet. Abbildung 8 zeigt einen solchen:

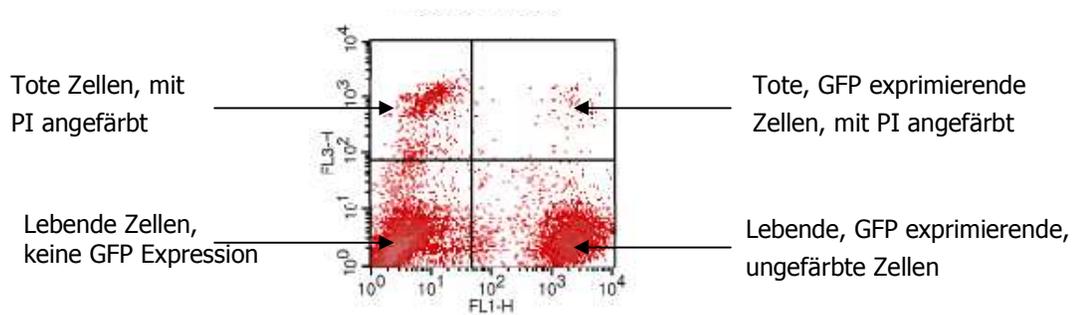


Abbildung 8 Beispiel für eine FACS Auswertung

Jeder Punkt steht für eine gemessene Zelle. Es wurde die Software „Cell Quest Pro“ von BD verwendet. Zur Auswertung gehören auch noch folgende Statistiken:

- % Total: % der Zellen, die in den ausgewählten Bereich fallen
- X Mean: durchschnittliche Fluoreszenz 1 (FL1) in dem ausgewählten Bereich

2.3.6.1 GFP

Grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea* [33]. Dieses Protein hat zwei Anregungsmaxima bei 395 und 475 nm und emittiert bei 509 nm.

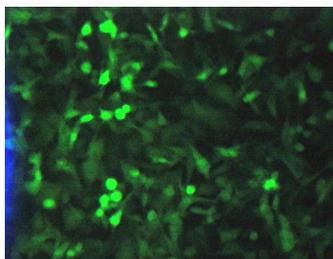


Abbildung 9 GFP-positive Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop

2.3.7 Transiente Virusproduktion

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, werden für die transiente Virusproduktion drei verschiedene Plasmide benötigt: Eines mit gag/pol, eines mit env und ein Transferplasmid, welches die zu verpackende genetische Information enthält. Diese Plasmide mussten nun transfiziert werden. Dafür wurde einen Tag vorher die spezifische Anzahl Zellen ausgesät ($9,5 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$). Unter dem Mikroskop wurde abgeschätzt, ob die Zellen die benötigte Konfluenz (siehe Kapitel 4.2) erreicht hatten. Dann erfolgte eine der verschiedenen Transfektionsmethoden wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben. In welchem Verhältnis zueinander die Plasmide einzusetzen sind, war einer der zu ermittelnden Faktoren. Auch die Gesamtmenge DNA war ein variabler Faktor.

Nach 24 h wurde ein sogenannter „Natriumbutyrat-Boost“ durchgeführt. Das Natriumbutyrat wirkt inhibierend auf Histondeacetylasen, wodurch es zu einer reversiblen Hyperacetylierung der Histone und in dessen Folge zu einer Lockerung der Chromatinstruktur kommt. Durch diese Lockerung kommt es zu einer 6 – 7-fachen Steigerung der Genexpression, was sich auch in einer Zunahme der Transkription und Translation der Plasmide auswirkt [34]. Es wurden 5 mM Natriumbutyrat für 4 – 6 h zum Medium dazugegeben. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, der das entsprechende Erntevolumen festlegte.

Nach weiteren 24 h konnte der virushaltige Medienüberstand geerntet werden. Dazu wurde er mit einer sterilen Spritze aufgesaugt und mit einem $0,45 \mu\text{m}$ Filteraufsatz filtriert. Die Zugabe von $8 \mu\text{g/mL}$ Hexadimethrinbromid (Polybrene), einem kationischen Agens ist für die spätere Infektiosität der Viruspartikel wichtig, denn es erleichtert die Adsorption der negativ geladenen Viruspartikel an die ebenfalls negativ geladenen Bestandteile der Zellmembran [35].

Die Reinigung und Konzentrierung der viralen Überstände war für den Einsatz in Tierversuchen unerlässlich. Dafür wurde nach verschiedenen Tests das „Fast-Trap Lentivirus Purification and Concentration Kit“ von Millipore verwendet. Dabei wird ein nicht näher vom Hersteller spezifizierter Adsorptionsmechanismus eingesetzt, um die Viren in einer Membran zu binden. Nach einem Waschschrift kann dann die Elution erfolgen. Dies ermöglicht die Konzentrierung von ca. 45 mL Kulturüberstand in 3 mL, wobei die Gesamtmenge an Virus nur $2 \cdot 10^8$ betragen kann. Die 3 mL wurden dann

m.H. von Amicon Ultra-15 Filtereinheiten, 100 kDa NMWL (nominal molecular weight limit) von Millipore weiter konzentriert und in PBS umgepuffert. Es wurde nach den Herstellerangaben gearbeitet.

Der aliquotierte Vektor wurde entweder direkt in Tierversuchen eingesetzt oder bei -80°C bis zur Transduktion aufbewahrt. Alle Transporte wurden auf Eis in einer sicher verschlossenen Box durchgeführt.

Die zur Produktion verwendeten Zellen wurden ggf. abgelöst und einer FACS-Analyse auf die Transfektionseffizienz unterworfen. Dies war jedoch nur möglich, wenn der Transfektor GFP enthalten hat (wie z.B. pWPXLmG*), denn dann wird nicht nur verpackbare RNA gebildet. Ein Teil der RNA wird transkribiert und das dabei gebildete GFP gibt Rückschluss darüber, wie viele Zellen transfiziert wurden.

2.3.8 Titration

Über eine Titration des Virusüberstandes kann die Funktionalität der zuvor klonierten Transfektoren überprüft und verglichen werden. Der zu bestimmende Wert ist die Menge an infektiösen Partikeln (IP) pro mL Virusüberstand. Dies erfolgte über zwei Arten:

2.3.8.1 Biologischer Titer

Dafür wurde das Gen für ein Fusionsprotein aus Luciferase und GFP LmG* als Reporter gen eingesetzt. So kann man mit Hilfe der FACS-Analyse feststellen, wie viele der transduzierten Zellen GFP-positiv sind und damit auf den Virustiter schließen.

Mit den Daten aus der FACS-Analyse konnte dann der Titer nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Titer} = \text{IP} / \text{mL} = N \cdot \frac{\% \text{GFP}^+ \text{ lebend}}{100} \cdot f$$

wobei: N = Zellzahl am Tag der Transduktion
 GFP⁺ = GFP positive Zellen
 f = Verdünnungsfaktor

2.3.8.2 DNA Titer

Hierfür wird mit Hilfe einer Real Time PCR die Menge an integrierten Vektoren in den transduzierten Zellen gemessen. Diese Methode wurde angewendet, um auch Überstände quantifizieren zu können, die mit Transfervektoren ohne GFP-Reportergen entstanden sind. Die verwendeten Primer (SP-tv und AP-tv, siehe Anhang 5.5) lagern sich in der 5'-LTR an. Das entstehende Amplifikat ist ca. 800 bp groß.

Verwendung fand der KAPA SYBR® FAST Bio-Rad iCycler Master Mix von Kapa Biosystems. Er basiert auf SYBR Green I, einem asymmetrischen Cyanin-Farbstoff. Bindet SYBR Green I doppelsträngige DNA, resultiert daraus ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, welcher bei $\lambda_{\max}=494$ nm blaues Licht absorbiert und bei $\lambda_{\max}=521$ nm grünes Licht emittiert. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produkts.

Beispielhafter Ansatz:

20 – 30 ng DNA
 0,8 μ L Sense Primer (10 pmol/ μ L)
 0,8 μ L Antisense Primer (10 pmol/ μ L)
 10,0 μ L Kapa SYBR Master Mix
 ad. 20 μ L mit Wasser

Zyklus 1: Denaturierung bei 95°C für 3 min
 Zyklus 2-42: Denaturierung bei 95°C für 20 s
 Anlagerung der Primer bei 68,3°C für 20 s
 Elongation bei 72°C für 20 s
 Zyklus 43: Elongation bei 72°C für 2 min
 Zyklus 44: Denaturierung bei 95°C für 1 min
 Zyklus 45: Kühlen auf 55°C für 30 s
 Zyklus 46-126: Aufnahme der Schmelzkurve durch Erhöhen der Temperatur in 0,5°C Schritten
 Ende: Halten auf 15°C

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Standardgeraden bekannter Molekülkonzentrationen des ursprünglichen Transfervektor-Plasmids.

Die folgenden Abbildungen erläutern das Vorgehen (Abbildung 10) und die Theorie hinter den Ansätzen (Abbildung 11) genauer.

Für die Titrationsen wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

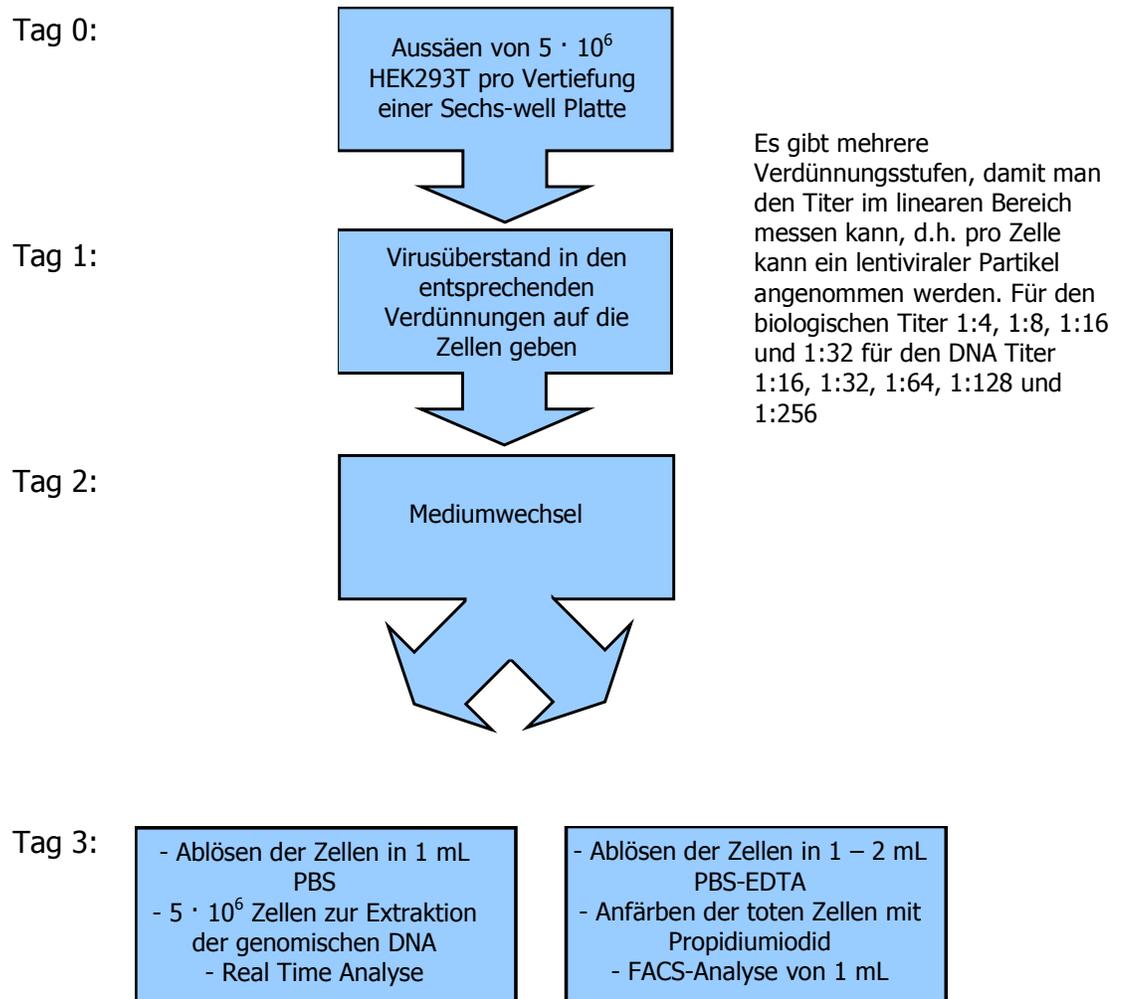


Abbildung 10 Durchführung einer Titration

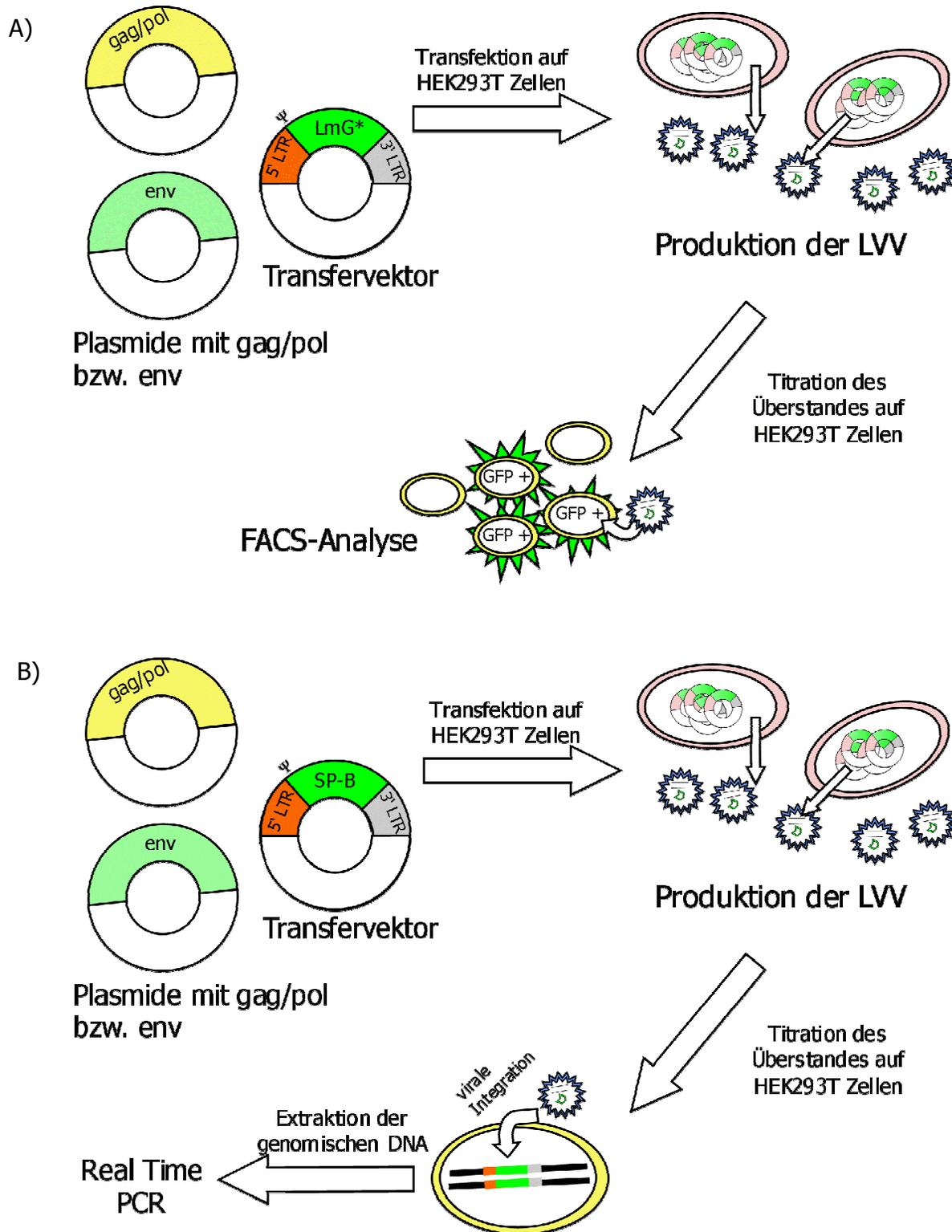


Abbildung 11 Schemata der Titrations mittels A) FACS-Analyse und B) Real-Time PCR

2.3.9 Extraktion genomischer DNA

Um eine Real Time Quantifizierung der transduzierten Zellen durchführen zu können, musste die genomische DNA extrahiert werden. Dazu wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Um einen gleichmäßigen DNA-Gehalt zu erreichen wurden die Lösungen auf 30 ng/ μ L verdünnt. Das gleiche Verfahren wurde auch für die Organdistributionsstudien durchgeführt.

2.3.10 Luciferase-Messung

Für die quantitative Charakterisierung eines Plasmidkonstrukts kann man GFP nur bedingt einsetzen, da die Anzahl der GFP-Moleküle nur in einem sehr niedrigen Bereich proportional mit der zu messenden Fluoreszenz ist. Daher wurde LmG* eingesetzt. Dieses Fusionsprotein ermöglicht eine quantitative Luciferasebestimmung, als auch einen qualitativen Nachweis durch die GFP-Messung.

Abbildung 12 zeigt welche Reaktion Luciferase katalysiert [36]:

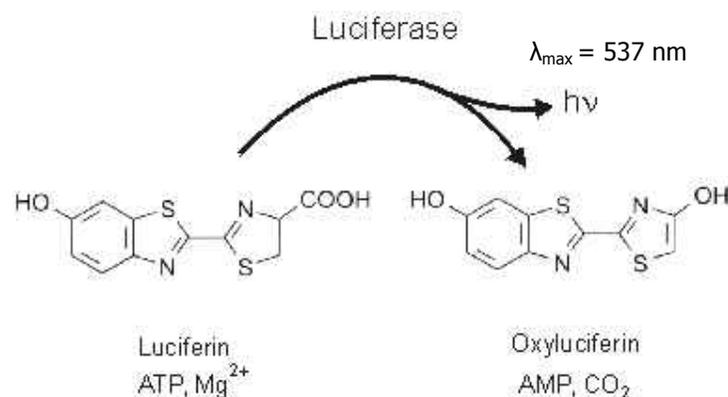


Abbildung 12 Luciferase-Reaktion

Die frei werdende Lumineszenz wurde mit dem Wallac Plate Reader von Perkin Elmer detektiert.

Zu bestimmende Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge Lysepuffer (Bsp.: 200 μL für eine Vertiefung einer 12-well Platte) 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler lysiert. 10 μL dieses Lysats wurden im Bradford-Test eingesetzt. In weiße 96-well Platten wurde jeweils 50 μL pipettiert. Dabei mussten gewisse Abstände eingehalten werden um eine Verfälschung des Messwerts durch Überstrahlung zu vermeiden. Diese Platte wurde dann im Wallac Plate Reader vermessen. Dieser war mit der Luciferin Substratlösung gefüllt. Die Messung erfolgte in CPS (Counts per Second), das sind emittierte Photonen pro Sekunde. Für die Auswertung wurde der Wert RLU (Relative Light Units) herangezogen. Dieser gibt die Menge der tatsächlich emittierten Photonen, also abzüglich des Hintergrunds an. Er wird über eine Dauer von 10 Sekunden angegeben (RLU/10 s). Die Emission wurde dabei auf die verwendete Menge Protein in mg bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte immer parallel zur Luciferase-Messung durch einen Bradford-Test.

Lysepuffer

25 mM Tris-Phosphat
 20 mM DTT (frisch zusetzen!)
 2 mM EDTA
 5% Glycerin
 1% TritonX 100

Substratlösung

30 μM Luciferin
 60 mM DTT
 10 mM Mg_2SO_4
 10 mM ATP
 in 25 mM Glycyl-Glycin Puffer pH 7,8

2.3.11 Bradford-Test

Mit dem Bradford-Test ist eine photometrische Proteinquantifizierung möglich. Er beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bei der Komplexbildung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Die Kalibrierung des Tests erfolgte über eine Standardgerade mit BSA (Bovines Serum Albumin).

Beispielhaftes Vorgehen:

- Pipettierung der Standardgeraden als Doppelbestimmung in 2 Reihen einer durchsichtigen 96-well Platte
- Proben 1:10 verdünnen und 10 μL in die Platte pipettieren

- 200 μL 1:5 verdünntes Bradford-Reagenz von BioRad in alle zu messenden Vertiefungen
- Bestimmung der Absorption im Wallac Plate Reader

2.3.12 Western Blotting

Um *in vitro* die Funktionalität des SPB-Transfervektors zu überprüfen wurde ein Antikörper-basierter Nachweis des gebildeten SPB benötigt. Dafür wurde entweder das Proteinlysate (hergestellt mit RIPA-Puffer von Millipore) transduzierter Zellen oder der Überstand von solchen Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die nach Größe separierten Proteine wurden dann in einem Tank-Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Auf dieser Membran sind die Proteine stabil immobilisiert und können immunologisch detektiert werden. Das Prinzip eines solchen Western Blots zeigt Abbildung 13:

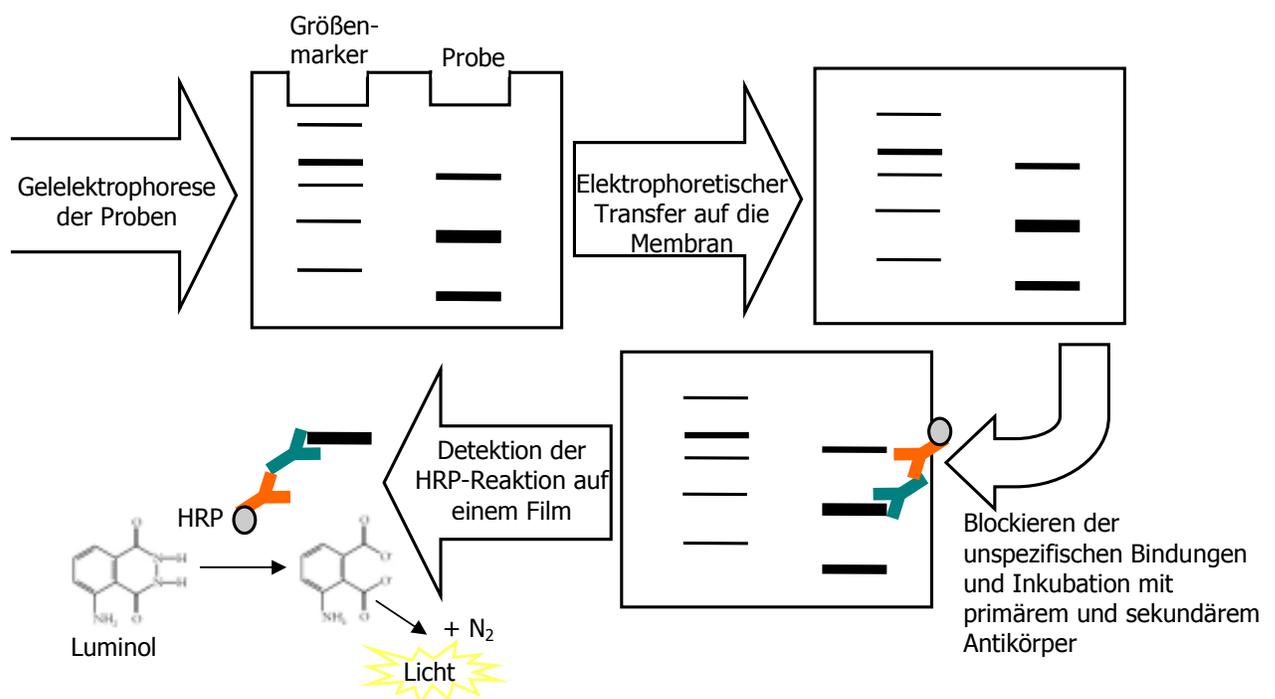


Abbildung 13 Prinzip des verwendeten Western Blots

Die immunologische Detektion erfolgte mit Hilfe eines Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten, sekundären Antikörper. Die HRP ist eine Peroxidase, welche in der Lage ist die Chemilumineszenzreaktion von Luminol zu

katalysieren (siehe Abbildung 13). Dabei wird ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums emittiert. Diese Emissionen können auf einem Autoradiographie-Film, der sensitiv für blaues Licht ist, sicht- und haltbar gemacht werden.

Beispielhaftes Vorgehen:

- Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben m.H. des Bradford-Tests
- Aliquotieren von 20 – 30 µg auf Eis
- Mit 4x Ladepuffer versetzen (Bio-Rad)
- 10 min bei 95°C → wieder auf Eis
- Vorbereitung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) laut Herstellerangaben der Mini-PROTEAN Precast Gels (10%, 9,5 x 7 cm) von Bio-Rad
- Tankpuffer einfüllen
- Proben und Größenmarker (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard, Bio-Rad, siehe Abbildung 14) laden
- Elektrophorese für 1 h bei 110 V
- Passend geschnittene Membran 30 s in Methanol → in Transferpuffer
- Korrekter Zusammenbau der Blot-Kassette in der die Membran auf das Gel gelegt wird
- Blot-Vorgang in Transferpuffer (eisgekühlt, mit Rührfisch) bei 200 mA für 1 – 1,5 h
- Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen („Blocken“) durch 5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h auf dem Schüttler
- 2 x Waschpufferwechsel
- Inkubation mit primärem Antikörper (1:500 – 1:1.000 verdünnt je nach Antikörper) in TBS-T über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler
- 2 x Waschpufferwechsel
- Waschen mit >4 ml/cm² TBS-T für 15 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler
- 3 x 5 min waschen
- Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:10.000) in TBS-T für 1 h auf dem Schüttler
- 2 x Waschpufferwechsel
- Waschen mit >4 ml/cm² TBS-T für 15 min bei RT auf dem Schüttler
- 3 x 5 min waschen

- Detektion nach Herstellerangaben „Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system“ von GE Healthcare

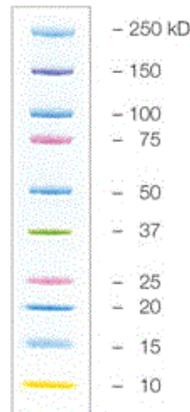


Abbildung 14 Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard, Bio-Rad

TBS-T / Waschpuffer

Tris-gepufferte Saline
8 g NaCl
20 mL 1 M Tris HCl
700 mL Wasser
pH 7,6 einstellen
ad. 1 L Wasser
0,1% Tween 20

4 x Tank Puffer

48 g Trizma Base
230,4 g Glycine
16 g SDS
ad. 4 L Wasser
pH 8,5 einstellen

Transferpuffer

3 g Trizma Base
14,1 g Glycine
1 g SDS
500 mL Wasser
200 mL Methanol
ad. 1 L Wasser

2.4 Tierversuche

Alle *in vivo* Versuche wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) der Chirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Nussbaumstraße 20, München durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere und die Arbeiten wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren von der Regierung Oberbayern genehmigt.

Im Folgenden ist mit „Mäuse“ immer folgender Mausstamm gemeint:

2.4.1 Konditionale SP-B knockout Mäuse

Die konditionalen Surfactant Protein B (SP-B) knockout Mäuse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Melton *et al.* 2003 generiert. Wie in der Publikation [37] beschrieben, wurden transgene Mäuse erzeugt, in denen SP-B in ATII Zellen kontrolliert exprimiert werden kann. Die Kontrolle erfolgt durch einen reversen Tetracyclin abhängigen Transaktivator, welcher in Anwesenheit von Doxycyclin (ein Tetracyclin-Analogen) einen Minimalpromoter induziert.

Die murine SP-B cDNA wurde isoliert, kloniert und unter die Kontrolle des Minimalpromoters gesetzt. Diese Genkassette wurde am Cincinnati Children's Hospital in fertilisierte FVB/N Oozyten injiziert. Potentielle Träger wurden durch PCR mit transgenspezifischen Primern identifiziert. Die Bestätigung erfolgte durch Southern Blot Analyse. Diese Mäuse wurden mit transgenen Mäusen, welche den reversen Transaktivator exprimieren gekreuzt. Trägermäuse von Transaktivator und SP-B wurden wieder durch PCR mit transgenspezifischen Mäusen identifiziert. Außerdem wurde die SP-B Transgenexpression nach 72 h Gabe von Doxycycline (0,5 mg/mL im Trinkwasser) durch RT-PCR quantifiziert. Durch weitere Kreuzungen entstanden 4 transgene Linien von SP-B knockout Mäusen, welche bei Gabe von Doxycycline überlebensfähig sind.

Diese Mäuse wurden von Prof. Jeffrey A. Whitsett, Division of Pulmonary Biology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229-3039, USA zur Verfügung gestellt.

Die Haltung erfolgte im spezifisch pathogen freien Tierstall der ZVH, in individuell belüfteten Käfigen in Gruppen von max. 5 Tieren. Futter und Doxycycline-haltiges Trinkwasser waren ad libidum immer verfügbar. Die Lichtverhältnisse in der Tierhaltung entsprachen der circadianen Rhythmik. Für die Versuche wurden weibliche Tiere bis zu einem Alter von 6 Monaten eingesetzt.

Doxycycline-haltiges Trinkwasser

20 g Zucker

200 mg Doxycycline

Gelöst in 1 L Wasser

Sterilfiltriert

2.4.2 Narkose

Für mehrere Behandlungen der Tiere war eine Narkotisierung von Nöten. Diese wurde durch eine intraperitoneale Injektion von Medetomidin (11,5 µg/kg KGW), Midazolam (115 µg/kg KGW) und Fentanyl (1,15 µg/kg KGW)

herbeigeführt. Nach dem Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums konnte mit dem jeweiligen Versuch begonnen werden. Um ein Austrocknen der Netzhaut zu verhindern, da die Mäuse unter Narkose die Augen nicht verschließen, wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe von Bayer aufgetragen.

Die Narkose wurde mit einer subkutanen Injektion von Atipamezol, Flumazenil und Naloxon antagonisiert (ca. 100 µL pro Maus).

2.4.3 Nasale Instillation

Als Applikationsmethode für die Vektoren in die Mauslunge wurde die nasale Instillation gewählt. Dazu wurden die Mäuse wie in 2.4.2 beschrieben in eine Vollnarkose gelegt. Da Mäuse Nasenatmer sind, werden auf die Nase aufgetropfte Flüssigkeiten automatisch instilliert. Das verwendete Volumen hat dabei nie 100 µL überschritten. Die Narkose wurde wie beschrieben beendet.

2.4.4 In vivo Imaging

Die bei der Luciferase-Reaktion (siehe Abbildung 12) freiwerdende Lumineszenz kann auch durch eine besonders sensitive Kamera detektiert werden. Dies kann dazu genutzt werden den Gentransfer *in vivo* zu messen. Hier wurde das IVIS 100 In vivo Imaging System von Xenogen verwendet. Die Kamera verfügt dabei über einen speziellen³ hochempfindlichen CCD-Chip (Charge-coupled Device). Die minimal detektierbare Strahlung liegt bei 100 Photonen/s/sr/cm².

³ „Back-side“ Beleuchtung: Vor allem kurzwelliges Licht wird bei der herkömmlichen „Front-side“ Beleuchtung teilweise schon absorbiert. Diese Verluste treten bei back-side-illuminated-CCDs nicht auf, da das Siliziumplättchen rückseitig bis auf eine Dicke von 10 bis 20 µm abgeschliffen und abgeätzt und mit der lichtempfindlichen „Rückseite“ nach oben eingebaut wurde.

Dazu wurden die transfizierten Mäuse wie beschrieben in Vollnarkose gelegt. Dann wurde ihnen intraperitoneal D-Luciferin (3 mg in 100 μ l PBS, pH = 7,4) als Substrat verabreicht. Nach 10 min Inkubation wurden die Mäuse paarweise auf dem Rücken liegend in die beheizte Messkammer gelegt. Die Messkammer wurde lichtdicht verschlossen. Der Abstand zwischen Kamera und Bühne auf der die Mäuse lagen wurde kleinstmöglich gewählt. Die Messzeit betrug 5 min. Die während dieser Messzeit detektierte Lumineszenz wurde dann über eine belichtete Fotografie der Versuchstiere gelegt. Siehe Abbildung 15.

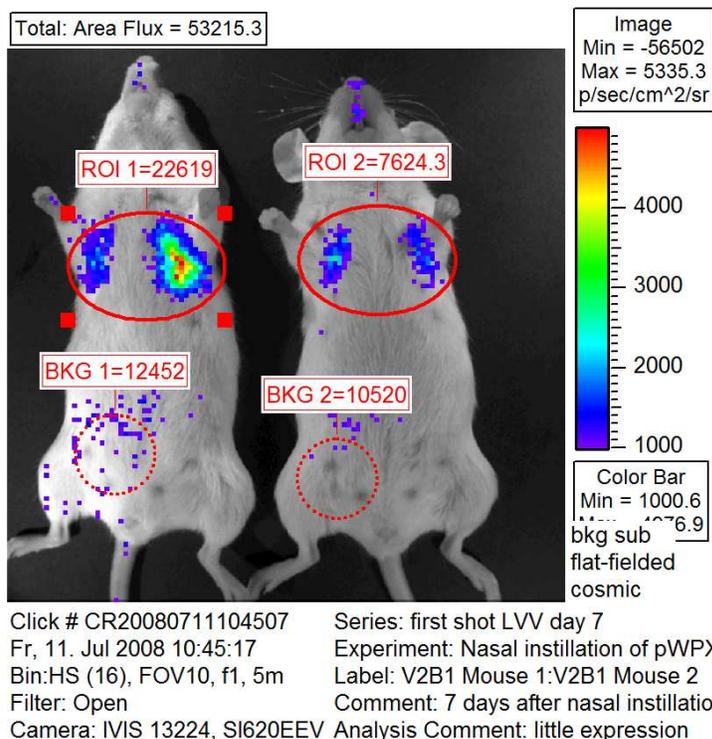
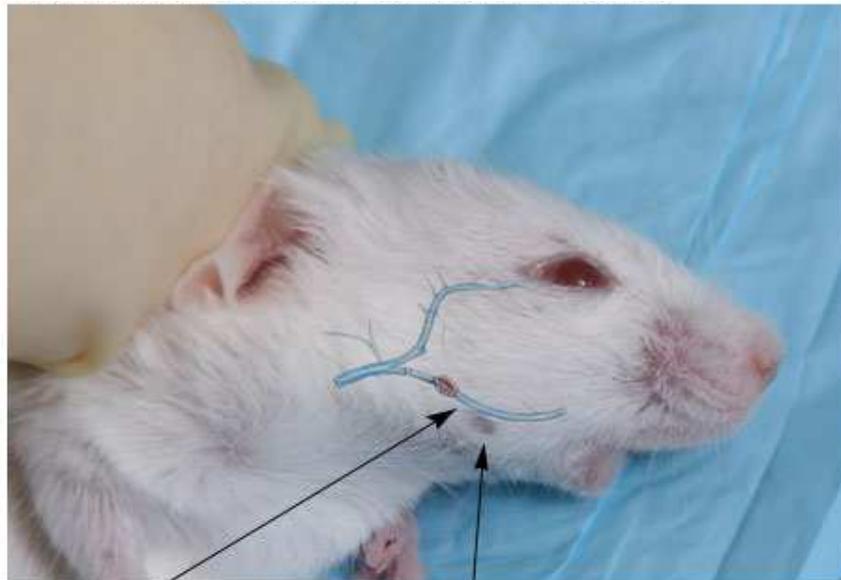


Abbildung 15 Beispiel des Ergebnisses einer *In vivo* Bildgebung. Die Region of Interest (ROI) wurde dabei auf den Thorax gelegt. Der Hintergrund (BKG) wurde ungefähr auf die Höhe der Harnblase gelegt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Living Image 2.50 bzw. IgorPro von WaveMetrics. Die Quantifizierung erfolgte in „Total Flux“ (Lichtemission in Photonen/s).

2.4.5 Blutentnahme

Für Untersuchungen zur Immunogenität des Vektors wurde den Mäusen regelmäßig Blut entnommen und auf auffällige Veränderungen der Blutzusammensetzung überprüft (Anzahl weißer Blutkörperchen). Die benötigte Menge Blut wurde durch die Punktierung der Gesichtsvene gewonnen. Diese Methode ist sehr viel schonender als die retrobulbäre Punktion und kann ohne Narkose durchgeführt werden. Allerdings beträgt die abnehmbare Menge Blutes nur ca. 100 – 200 μL . Um den Stress der Versuchstiere zu vermindern wurde aber eine leichte Isofluran-Narkose in einer Begasungskammer vorgenommen. Die Abbildung 16 zeigt den Ort an dem die Punktierung stattfinden muss [38].



Das Ziel-Blutgefäß: die Gesichtsvene. Direkt am Ende des Kiefers.

Kleiner Fleck, der sowohl bei weißen als auch braunen Mäusen gut sichtbar ist

Abbildung 16 Lage der Gesichtsvene Achtung! Der gezeigte Nackengriff ist nicht ideal. Die Augen sollten leicht hervorquellen.

Die Punktierung erfolgte mit einer Lanzette. Das Blut wurde in einem serologischen Gefäß aufgefangen und mit dem automatischen Haematologie-System *KX-21* untersucht.

2.4.6 Organentnahme

Für die histologischen Untersuchungen des Lungengewebes musste behandelten Mäusen die Lunge entnommen werden. Dafür erfolgte die Öffnung der Brust- und Bauchhöhle nach der schmerzlosen Tötung durch zervikale Dislokation. Es wurde eine Perfusion des Lungengewebes zur Reinigung von Blutrückständen mit 5 mL PBS-Lösung durchgeführt. Dafür wurde die linke *Arteria renalis* durchtrennt und die rechte Herzkammer mit einer 20 G Kanüle punktiert. Danach wurde stumpf die Trachea frei präpariert und mit einem 6/0er Vicryl-Faden unterbunden und mit einer 20 G Braunüle (Vasofix, Braun, Melsungen) punktiert. Der Schlauch der Braunüle wurde bis zur Höhe der Gabelung der Luftröhre eingeführt. Das weitere Vorgehen hing von der Art der gewünschten Schnitte ab:

2.4.6.1 Kryo-Schnitte

Zur Untersuchung von Lungen die mit dem Transfervektor pWPXLmG* transduziert wurden eignet sich die Kryo-Schnitttechnik, weil dabei die Funktionalität der Enzyme weitestgehend erhalten bleibt. Für diese Technik wurde jetzt der Vicryl-Faden um die Trachea mit einem chirurgischen Knoten so gezogen, dass die Braunüle mit befestigt war. Danach wurde der Spitzenteil der Braunüle entfernt, die Trachea am Kehlkopf durchtrennt und die Lunge heraus präpariert. Danach wurde ein 1:1 Gemisch aus TissueTek (OCT Compound, Sakura, Finetek Europe) und 0,9% NaCl-Lösung eingespritzt (ca. 1,5 – 2 mL), bis es zur Re-Expansion der Lunge kam. Danach wurden mit einem Skalpell vorsichtig aber zügig die Lungenflügel abgetrennt und in kleine zylindrische Formen aus Alufolie gelegt. Sie wurden mit TissueTek bedeckt und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Entfernung der Alufolie konnten sie bei -20°C gelagert werden. Die Schnitte selber wurden dann in einem Kryotom (Betriebstemperatur -20°C) angefertigt. Die Schnitte (5 – 10 µm) wurden vorsichtig auf einen Superfrost Ultra Plus Objektträger von Thermo Scientific übertragen. Die Fixierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 2 x waschen in PBS-T
- 2 min in 4% gepuffertem Formalin
- 2 x waschen in Tris-Puffer pH 7,6
- Entweder trocknen und unter dem Mikroskop nach GFP-positiven Zellen begutachten oder immunologischer Nachweis von GFP durch:

-
- 20 min mit 5% BSA in PBS-T blocken
 - Inkubation des Primärantikörpers (1:50) in 5% BSA in PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur
 - 2 x waschen in Tris-Puffer
 - Inkubation des Sekundärantikörpers (1:500) 30 min bei Raumtemperatur
 - 2 x waschen in Tris-Puffer
 - Konservieren des Schnittes mit VectaShield von VectorLabs
 - Fixieren mit Nagellack

PBS-T

1 x PBS von Invitrogen
0,1% Tween 20

Tris-Puffer 0,5 M Stammlsg.

60,5 g Trizma-Base
700 mL Wasser
pH 7,6 mit rauchender Salzsäure einstellen
ad. 1 L mit Wasser
pH kontrollieren
+ 90 g NaCl

Gepufferte Formalinlg.

100 mL 37% Formalin
6,5 g Natriumphosphat
4,0 g Natriumdihydrogenphosphat
700 mL Wasser
pH 7,4 einstellen
ad. 1 L Wasser

2.4.6.2 Formalinschnitte

Für die Untersuchung der mit pWPXLacZ transduzierten Lungen wurden Formalinschnitte verwendet. Dieser Vektor enthält als Transgen LacZ, welches für das Enzym β -Galaktosidase codiert. Normalerweise ist die β -Galaktosidase für die Spaltung von Lactose in Galaktose und Glucose verantwortlich. Sie ist aber auch in der Lage X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in Galaktose und einen blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff zu hydrolisieren. Dieser Farbstoff kann dann unter dem Lichtmikroskop in den transduzierten Zellen detektiert werden. Für die Formalinschnitte wurde die Lunge samt festgebundener Braunüle heraus präpariert und mit 2% PFA / 0,2% Glutaraldehyd re-expanded. Dann wurde sie für 30 – 90 min in dieser Lösung belassen. Danach wurde das Fixativ entfernt und die Lunge 1 x mit

PBS und 1 x mit X-Gal Lösung gespült. Danach wurden ca. 5 mL X-Gal Lösung in die Lunge infusioniert. Diese wurde 4 h bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde die X-Gal Lösung entfernt, die Lunge 2 x mit PBS gespült und mit 10% Formalin befüllt. In dieser Lösung fand auch die Lagerung statt. Die so behandelten Lungen wurden anschließend entwässert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Der Entzug des Wassers erfolgte durch eine aufsteigende alkoholische Reihe. Dabei wird die verbliebene Flüssigkeit durch Xylol ersetzt, so dass die Einbettung der Organe in Paraffin erfolgen kann.

X-Gal Lösung

25 mg X-Gal (gelöst in DMF)

25 µL MgCl₂ 1 M

250 µL K-Ferricyanide 5 mM

250 µL K-Ferrocyanide 5mM

2,5 mL 10 x PBS

Ad. 25 mL Wasser

Diese X-Gal Lösung wurde auch für die *in vitro* Färbung von LacZ-positiven Zellen verwendet. Dazu wurden sie nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS über Nacht bei 37°C mit der Lösung inkubiert.

2.5 Liste der verwendeten Geräte:

Tabelle 3 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Thermocycler Robocycler Gradient96	Stratagene
Gelelektrophoresekammern Agal Mini- und Midi-Weite	blomed. Analytik
Schüttler Thermomixer compact	eppendorf
Brutschrank WTB	Binder
Unihood 650 mit Schüttler	GFL
Sterilwerkbank	CleanAir
Gel Dokumentation	Phase Lübeck
Tischzentrifuge UEC Micro 14/B	UniEquip
Heizplatte mit Rührer 375	VWR
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
UV/Vis Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Pipettensatz	Socorex
Sicherheitswerkbank	CleanAir
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Mikroskop DM IRB + Kamera CF 1514 MCC	Leica / Kappa
Zentrifuge CR 422	Jouan
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten eppendorf research	eppendorf
Autoklav 6-6-9	Sauter, Fa. Steri-Tech
Victor ² Multilabel Counter 1420 Wallac	Berthold
Brutschränke BBD 6220	Heraeus instruments
Kühl-, Gefrierkombination	Liebherr
Tank für Western-Blot	Bio-Rad
IVIS-100 In vivo Imager	Xenogen
KX-21 Haematologie-System	Sysmex

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der Transfervektoren

Für die Produktion eines LVV werden drei Plasmide in HEK293T Zellen transfiziert: ein Transfervektor, der für die virale RNA codiert, ein Verpackungsplasmid, welches für gag und pol codiert und ein Plasmid mit der genetischen Information für die virale Hülle (env).

Ein Transfervektor enthält je nach Anwendung ein Transgen. Dieses kann entweder ein Reportergen oder ein therapeutisches Gen sein. Die Expression dieses Genes hängt sehr stark von der Wahl des internen Promotors ab. Um einen geeigneten internen Promotor zu ermitteln, mussten verschiedene Transfervektoren (TV) kloniert und getestet werden.

Als Ausgangsbasis wurde der TV pWPXL verwendet. Dieser wurde von Didier Trono über die Firma Addgene zur Verfügung gestellt. pWPXL enthält als Transgen eGFP, welches in einem ersten Klonierungsschritt gegen ein Gen für ein Fusionsprotein aus GFP und Luciferase (LmG*) ausgetauscht wurde. Mit diesem Fusionsprotein war eine spätere Quantifizierung der Promotoraktivität möglich. Abbildung 17 zeigt den Kontrollverdau von pWPXLmG* (Vektorkarte siehe 5.4). LmG* wurde von Rainer Löw von der EUFETS GmbH zur Verfügung gestellt.

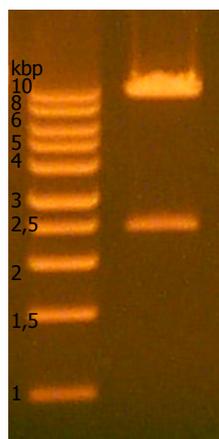


Abbildung 17 Kontrollverdau von pWPXLmG* mit BamHI
Sollbanden 9726 und 2437 bp

Anschließend mussten fünf verschiedene Promotoren in diesen Ausgangsvektor kloniert werden. Es wurde darauf geachtet, die Promotoren nach verschiedenen Gesichtspunkten auszuwählen. In der folgenden Tabelle sind die ausgewählten Elemente aufgelistet:

Tabelle 4 Verwendete Promotoren

Abk.	Beschreibung	Name Vektor
EF1 α + Intron	Humaner Elongationsfaktor 1 α ; ein starker, konstitutiver Promoter, bekannt für Langzeitexpression	pWPXLmG*
UbC	Ubiquitin C [39]; ein starker, konstitutiver Promotor, bekannt für Langzeitexpression	pWUCLmG*
UbB	Ubiquitin B [39, 40]; ein starker, konstitutiver Promotor, bekannt für Langzeitexpression	pWUBLmG*
SPB	Surfactant Protein B; gewebespezifisch	pWSBLmG*
CMV	Cytomegalovirus [41]; „Goldstandard“, bekannter starker viraler Promotor	pWCMLmG*

Es wurden drei Promotoren ausgewählt, die für eine starke, konstitutive Expression bekannt sind: EF1 α samt Intron, denn gesplittede RNA wird bevorzugt aus dem Zellkern geschleust, UbC und UbB. Eine Langzeitexpression ist für SP-B wünschenswert, weil dadurch eine einmalige Behandlung zu einer Heilung führen würde. Ein gewebespezifischer Promotor (SPB) wurde ausgesucht, da bei der Transduktion der Lunge auch andere Zelltypen erreicht werden. Dadurch kann eine überflüssige Expression von SP-B in anderen Zellen als alveolaren Typ II Zellen vermieden werden. Als ein Vergleichspromotor wurde CMV getestet. Dieser ist ein bekannter, viel verwendeter Promotor, der für seine hohe Anfangsexpression bekannt ist. Allerdings findet bei ihm auch ein sogenanntes „Silencing“ statt. D.h. der Promotor wird durch Methylierungen herunter reguliert. Er eignet sich also als Kontrolle für diesen Effekt.

Alle Klonierungen wurden mit den in Kapitel 2.2 beschriebenen molekularbiologischen Methoden durchgeführt. Die korrekten Kontrollen über einen Verdau sind in Abbildung 18 zu sehen.

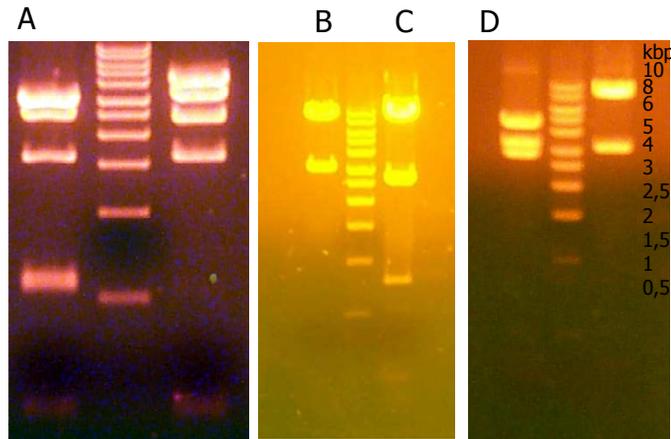


Abbildung 18 Elektrophoretische Auftrennung der Kontrollverdaue der vier Transfervektoren mit unterschiedlichen Promotoren; A) pWUCLmG* links: XhoI + HindIII Sollbanden: 3375, 3234, 2606, 1584, 584, 556 und 163 bp; rechts: BglII Sollbanden: 4535, 3412, 2428, 1565 und 162 bp **B)** pWUBLmG* SalI + PstI Sollbanden: 8217 und 3019 bp **C)** pWSBLmG* SalI + PstI Sollbanden: 8217, 2679, 715, 176 und 151 bp **D)** pWCMLmG* links: NcoI Sollbanden: 4561, 3263, 2882, 429 und 316 bp; rechts: SnaBI + PmeI Sollbanden: 7932, 3100 und 419 bp

3.2 Ermittlung der optimalen Produktionsbedingungen

Bevor die fertig klonierten Konstrukte in Langzeitstudien verglichen werden konnten, musste ein optimales Protokoll für die Vektorproduktion etabliert werden. Dabei waren die folgenden Kriterien ausschlaggebend: Höhe der Titer, Reproduzierbarkeit und Kosten.

Als Erstes musste ein geeignetes Transfektionsreagenz festgelegt werden. Dazu wurden folgende Kandidaten miteinander auf HEK293T Zellen verglichen:

- IPEI
- brPEI
- Calcium-Phosphat-Copräzipitation (CaPO)
- TransIT 293T von Mirus

Es wurden 3 µg SKLmG* pro Vertiefung einer six-well Platte transfiziert (n=6). Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 2.3.5 beschrieben. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der GFP-positiven Zellen im FACS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Dabei erreichen die Kandidaten IPEI und TransIT vergleichbar hohe Transfektionseffizienzen. Auch

mit der CaPO Methode konnten solche Werte erzielt werden, jedoch nicht verlässlich. Eine sehr geringe Transfektionseffizienz wies brPEI auf.

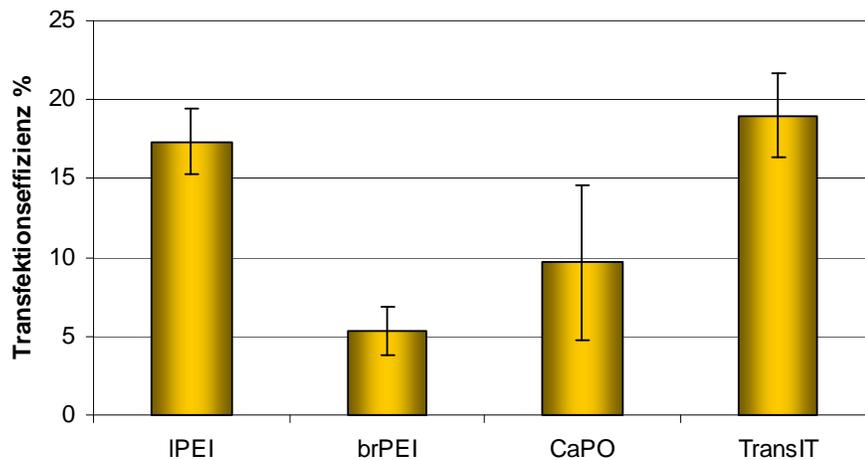


Abbildung 19 Vergleich der möglichen Transfektionsreagenzien Die Balken geben die Transfektionseffizienz in % wieder. Diese wurde mit Hilfe der FACS-Analyse der GFP-positiven Zellen ermittelt.

Die zweite Hürde war das Finden der Menge und des bestmöglichen Konzentrationsverhältnis von:

psPAX2	:	pMD2.G	:	pWPXLmG*
(Verpackungsplasmid mit gag/pol; siehe Anhang XY)		(Plasmid für das Glykoprotein der viralen Hülle; hier: VSV-G)		

Dabei wurden drei verschiedene Werte für das molare Verhältnis verglichen und in drei verschiedenen Mengen pro Vertiefung einer six-well Platte appliziert (n=12). Die Auswertung erfolgte über eine Titration und die Bestimmung der GFP-positiven Zellen im FACS. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die ideale DNA Menge erwies sich hierbei als 4 µg, wobei beim Plasmidverhältnis von 3:1:4 der höchste Titer erreicht werden konnte.

Tabelle 5 Ergebnis des Vergleichs unterschiedlicher Plasmidverhältnisse und –mengen Die Zahlenwerte beziehen sich auf Infektiöse Partikel / mL. Ermittelt durch eine FACS Analyse.

Verhältnis Menge DNA	1:1:2	3:1:4	6:1:3
1 µg	$1,6 \cdot 10^4$ (±226)	$2,94 \cdot 10^4$ (±883)	$1,15 \cdot 10^4$ (±523)
4 µg	$2,16 \cdot 10^4$ (±358)	$6,14 \cdot 10^4$ (±462)	$1,92 \cdot 10^4$ (±321)
8 µg	$0,87 \cdot 10^4$ (±62)	$2,31 \cdot 10^4$ (±490)	$1,12 \cdot 10^4$ (±92)

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde als Transfektionsreagenz IPEI gewählt, die Plasmide wurden im Verhältnis 3:1:4 eingesetzt und es wurde eine Menge von ca. 0,4 µg DNA / cm² Saatfläche verwendet. Ein wichtiger Faktor der Transfektionseffizienz von IPEI ist das gewählte N/P Verhältnis [42]. N/P ist der Quotient aus Stickstoffatomen des PEI und Phosphatgruppen der DNA und beeinflusst den Grad der Komplexbildung der DNA sowie die Oberflächenladung und Größe des entstehenden Partikels. Es wurden sechs verschiedene N/P Verhältnisse ausgetestet. Die Auswertung erfolgte erneut über die GFP-positiven Zellen der Titration. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 20. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den N/P Verhältnissen festgestellt werden, jedoch wurde für die weiteren Transfektionen ein N/P von 15 gewählt, aufgrund des tendenziell höchsten Titers.

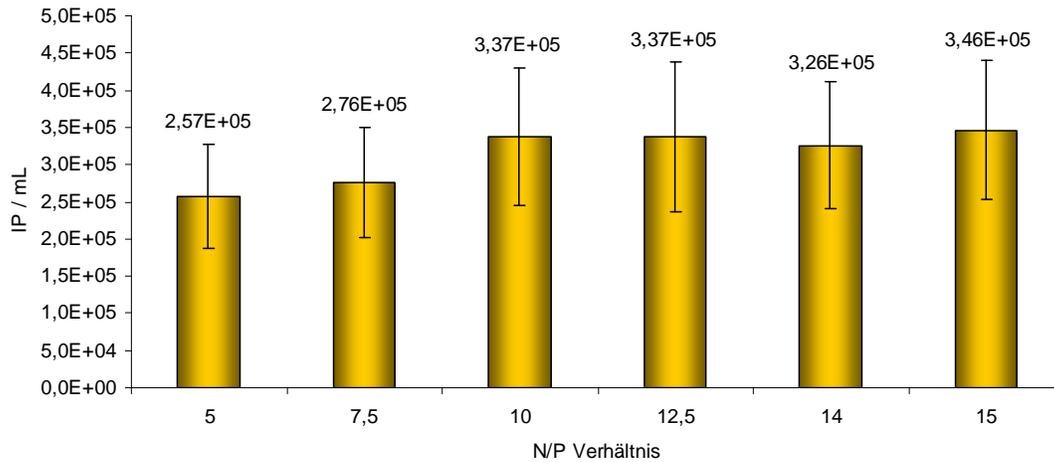


Abbildung 20 Ermittlung des besten N/P Verhältnisses Dafür wurden sechs verschiedene Vektorproduktionen angesetzt und über eine Titration mit anschließender FACS-Analyse ausgewertet.

Ein weiterer entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Vektorproduktion ist die Qualität und Dichte der transfizierten Zellen. Auch hier wurden verschiedene Versuche zur Ermittlung der optimalen Anzahl an HEK293T Zellen, die einen Tag vor der Transfektion ausgesät werden, unternommen. Die Ergebnisse wurden diesmal direkt auf den 10-cm Schalen generiert, die in der späteren Produktion eingesetzt werden sollten ($n=3$). Die Auswertung erfolgte über eine FACS Analyse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Tabelle zeigt, dass die höchste getestete Aussaatzahl von $7,5 \cdot 10^6$ Zellen einen Vorteil bei der Vektorproduktion erzielt.

Tabelle 6 Vergleich der unterschiedlichen Aussaatdichten Die Zelldichte bezieht sich auf die Zahl der Zellen, die am Tag vor der Transfektion ausgesät wurden auf 10 cm Schalen. Der Titer ist angegeben in Infektiöse Partikel pro mL Vektorüberstand und wurde mit einer FACS-Analyse ermittelt. Die Transfektionseffizienz ist in % angegeben und wurde nach der Abnahme des Vektorüberstandes durch eine FACS-Analyse der transfizierten Zellen ermittelt.

Zelldichte	Titer IP/mL	Transfektionseffizienz %
1,00E+06	1,22E+05 (±421)	24,2 (±2)
5,00E+06	2,27E+05 (±762)	30,4 (±6)
7,50E+06	2,32E+05 (±889)	37,8 (±4)

Bei dieser hohen Anfangszellichte liegen die Zellen schon am Tag der Transfektion komplett konfluent vor. Dies ist insbesondere bei HEK293T Zellen bedenklich, weil diese nicht stark an die Oberfläche des Zellkulturmaterials adhären. Somit ist der Umgang mit diesen Zellen sehr aufwendig, da sie sich bei der kleinsten Bewegung oder Temperaturschwankung des Mediums (v.a. beim Waschen mit kaltem PBS) als „Matte“ ablösen. Um eine stärkere Adhäsion zu erreichen wurde die Beschichtung des Zellkulturmaterials mit Poly-D-Lysin (PDL) getestet. PDL ist ein synthetisches Protein, welches sich an das negativ geladene Polystyrol der Zellkulturgefäße anlagert. Dadurch entsteht eine positiv geladene Oberfläche, an die sich die Zellen stärker anlagern können. Diese Beschichtung kann zum Einen selbst durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.3.1) oder zum Anderen käuflich erworben werden (hier: BD Biosciences). Der Vergleich dieser beiden Arten ist in Abbildung 21 dargestellt. Dabei war kein Unterschied zwischen gekauften und selbsthergestellten Platten sichtbar, so dass aus Kostengründen die eigene PDL-Beschichtung fortgeführt wurde.

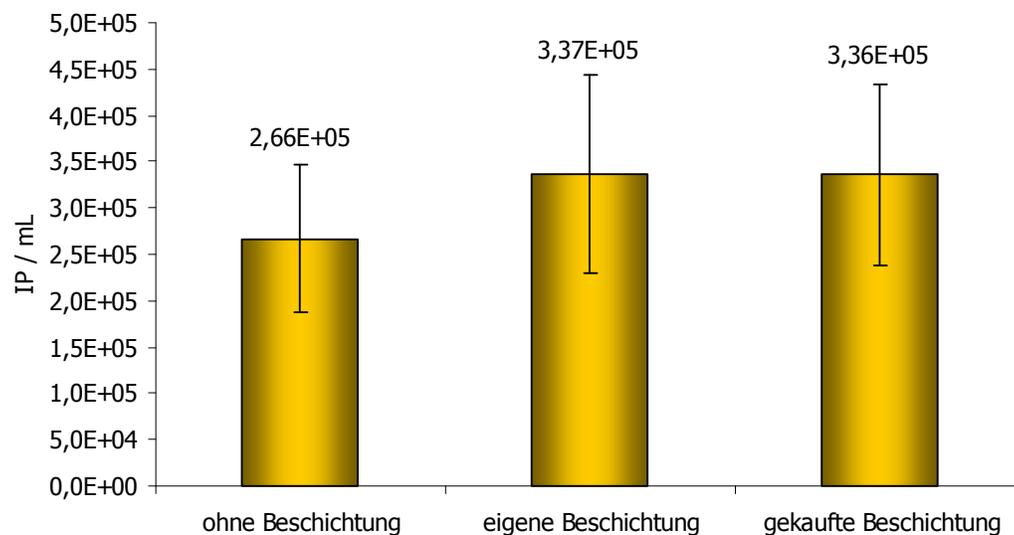


Abbildung 21 Vergleich der Oberflächenbeschichtung Die Säulen zeigen den erreichten Titer, bei Vektorproduktionen auf 10 cm Schalen ohne PDL-Beschichtung, mit einer eigenen Beschichtung und Platten, die fertig beschichtet erworben wurden.

Mit Hilfe dieser optimierten Produktionsbedingungen, zusammengefasst in Tabelle 7, konnten reproduzierbar Titer im Bereich von $2 - 4 \cdot 10^6$ IP / mL erreicht werden. Diese Menge an Vektoren liegt im Zellkulturüberstand vor (üblicherweise 5 mL / 10 cm Schale), welcher für die weitere Verwendung gereinigt und aufkonzentriert werden musste. Welche Maßnahmen zur Ermittlung der besten Reinigungs- und Konzentrierungsbedingungen ergriffen wurden, beschreibt das nächste Kapitel.

Tabelle 7 Übersicht Produktions- und Transduktionsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren.

DNA Menge	0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Verhältnis gag/pol : env : Transfervektor	3 : 1 : 4
Transfektionsreagenz	IPEI N/P=15
Aussaatdichte zur Transfektion	$7,5 \cdot 10^6$ HEK293T Zellen einen Tag vor Transfektion auf PDL beschichteten 10 cm Schalen
Natriumbutyrat „Boost“	5 mM; 6h
Transduktion mit Polybrene (nur <i>in vitro</i>)	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.3 Ermittlung der optimalen Reinigungs- und Konzentrierungsbedingungen

Um die Vektoren *in vivo* applizieren zu können, d.h. um sie intranasal in die Mäuse einzuführen, müssen sie in einer bestimmten Form vorliegen. Die Verwendung des Zellkulturüberstands direkt ist nicht empfehlenswert, da

- A) das Medium viele Komponenten enthält, die eine Immunreaktion in der Mäuselunge hervorrufen könnten und
- B) die maximal applizierbare Menge 100 μL Flüssigkeit ist und somit die Konzentration so hoch wie möglich sein muss.

Für die Reinigung gibt es ein kommerzielles System von Millipore: Fast-Trap Lentivirus Concentration and Purification Kit. Dabei wird der Zellkulturüberstand über eine Säule gereinigt. In dieser Säule befindet sich eine Membran, an der die Vektorpartikel adsorbiert werden. Das genaue Funktionsprinzip wird aber von der Firma nicht genannt. Nach einem Waschschrift können die Partikel eluiert werden. Durch diesen Vorgang werden fast alle Mediumsbestandteile entfernt. Außerdem werden ca. 45 mL Zellkulturüberstand auf 6 mL eingengt, was einer erstmaligen 7,5-fachen Konzentrierung entspricht. Für die weiteren Konzentrierungsschritte wird normalerweise eine Ultrazentrifugation eingesetzt, welche aber in diesem Labor aufgrund mangelnder Gerätschaften nicht durchführbar war. Deshalb wurden die Konzentrierungen mit Hilfe der Ultrafiltration untersucht. Das Trennprinzip bei einer Ultrafiltration ist die molekulare Größe. Es können Partikel in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 3 bis 100 kDa retardiert werden, je nach Wahl der Membranporengröße. Da ein lentiviraler Partikel in einem Größenbereich von ca. 170 MDa rangiert [43], kann problemlos auf eine Ultrazentrifugationsmembran mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa zurückgegriffen werden. Alle anderen – evtl. noch vorhandenen – Mediumbestandteile, wie z.B. Bovines Serumalbumin (67 kDa) aus dem FBS liegen unterhalb dieser Grenze und werden so aus der Vektorlösung eliminiert.

Dazu wurden Ultrazentrifugationseinheiten von zwei verschiedenen Herstellern verglichen. Es handelte sich um Amicon 15 Gefäße von Millipore und Vivaspin 20 Gefäße von Sartorius. Beide haben eine nominale Molekulargewichtsgrenze von 100 kDa, bestehen jedoch aus unterschiedlichen Materialien. Die Membran in den Amicon-Gefäßen ist aus regenerierter Zellulose („Ultracel“) und die Membran in den Vivaspin-Gefäßen aus Polyethersulfon. Mit diesen Gefäßen wurde eine 20-fache Konzentrierung in einer Schwing-Rotor-Zentrifuge bei 1.500 U/min durchgeführt. Anschließend wurden zwei weitere Waschschrift mit PBS durchgeführt. Die Ergebnisse der Titration dieses Vergleichs sind in Abbildung 22 gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass die Millipore Gefäße eine knapp dreifach bessere Konzentrierungsleistung erbringen, als die Sartorius Gefäße. Wenn man die Verluste nach dem Waschen mit einbezieht, dann ergibt sich eine 20-mal höhere Ausbeute bei der Nutzung von Amicon 15.

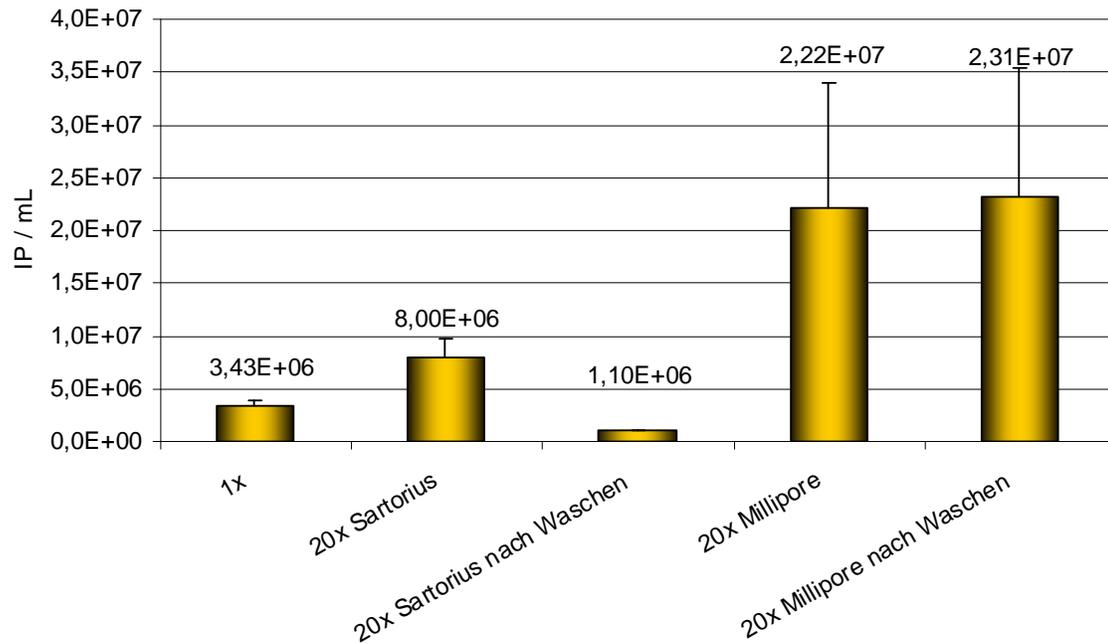


Abbildung 22 Vergleich verschiedener Ultrafiltrationseinheiten Die Säulen geben die Höhe der Titer wieder, die mit unterschiedlich konzentrierten Vektorüberständen erreicht wurden. Die Konzentrierung erfolgte mit Ultrafiltrationseinheiten zweier Firmen (Sartorius und Millipore). Sie wiesen die gleiche Molekulargewichtsgrenze von 100 kDa auf, bestanden jedoch aus unterschiedlichen Materialien. Der Waschvorgang war die zweimalige Zugabe von 14 mL PBS mit anschließender Zentrifugation auf 1 mL.

Um den Reinigungsverlauf verfolgen zu können, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen und auf einer SDS-PAGE die FBS Bande überprüft. Das Gel zeigt Abbildung 23. Nach dem zweiten Waschschritt war nur noch eine marginale Menge FBS detektierbar.

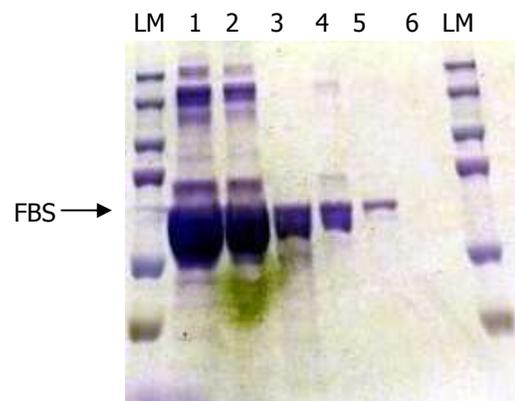


Abbildung 23 Reinigungsverlauf anhand der FBS-Menge auf einer SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung. Bande 1 = normales DMEM mit 10% FBS von untransfizierten Zellen; 2 = Vektorüberstand; 3 = nach Filtration mit 0,45 µm Filteraufsatz; 4 = nach Elution von der Fast-Trap Membran; 5 = nach 1. Waschschritt im Amicon 15-Gefäß; 6 = nach 2. Waschschritt = Endvolumen; LM = Längenmarker

Mit Hilfe der erworbenen Erfahrung bei Produktion, Reinigung und Konzentrierung konnten Vektorlösungen mit ca. $2 \cdot 10^8$ IP/mL erzeugt werden. Diese wurden entweder direkt auf Eis transportiert und instilliert oder mussten gelagert werden. Für die Ermittlung der besten Lagerbedingungen wurden verschiedene Optionen miteinander verglichen. Dabei wurde der Unterschied zwischen der Lagerung im -20°C , -80°C und 4°C untersucht, sowie unterschiedliche Einfrierbedingungen mit einer Schockfrostung auf Trockeneis oder schonendem Einfrieren in einem sogenannten „Mr. Frosty“ (Nalgene). Dieses mit Isopropanol gefüllte Gefäß erlaubt ein kontrolliertes Einfrieren in 1°C -Schritten bis zur Umgebungstemperatur der Kühleinheit. Dieses Gefäß wird normalerweise für das schonende Einfrieren von Zellen verwendet, die dann später in einem Stickstofftank gelagert werden sollen. Weiterhin wurde noch untersucht, ob der Einsatz von PBS mit 1% BSA einen Vorteil erbringt. Es wurden Aliquots der Vektorlösung erstellt. Ein Teil wurde direkt titriert, die anderen wurden drei Tage lang unter den genannten Bedingungen gelagert. Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln wurden diese Aliquots nach den drei Tagen auch in einer Titration eingesetzt und die Ergebnisse am FACS ermittelt ($n=3$). Abbildung 24 zeigt diese Ergebnisse, aus denen ersichtlich war, dass die Lagerung bei allen Temperaturen mit Wiederfindungsraten von 50 – 60% sehr verlustreich ist. Diese Verluste konnten aber durch den Einsatz der schonenden Einfrieremethode mit „Mr. Frosty“ und dem Einsatz von PBS BSA (1%) als Waschmittel bei der Konzentrierung auf weniger als 20% gesenkt werden.

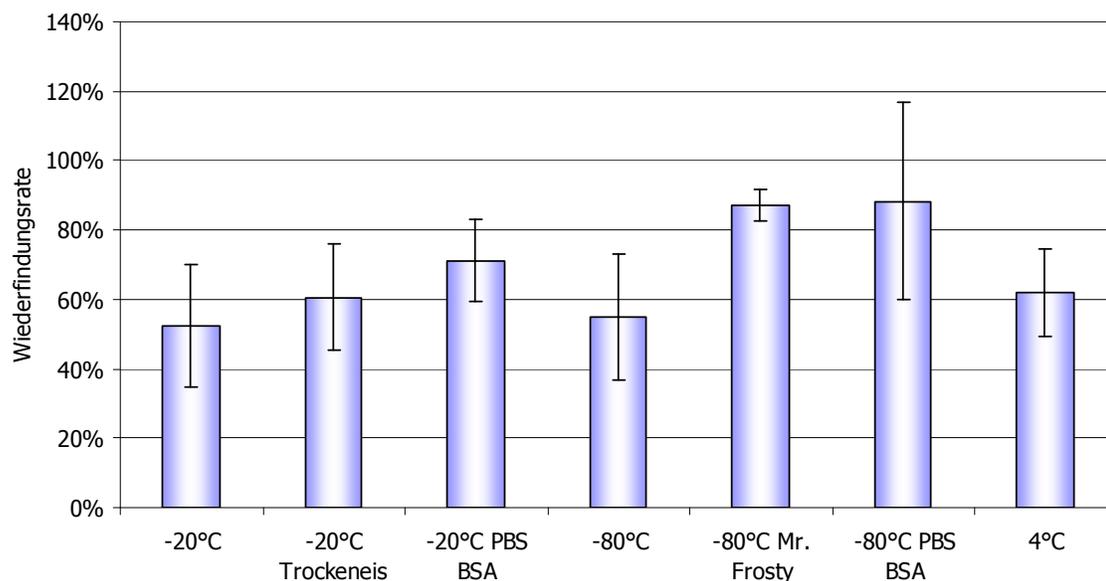


Abbildung 24 Vergleich der unterschiedlichen Lagermethoden. Die Säulen geben die Wiederfindungsrate der Titrations nach dem jeweiligen Lagervorgang an. Dabei wird mit dem Wert der Titration vor dem Lagervorgang verglichen. Die jeweiligen Lagermethoden von links nach rechts sind: -20°C = Einfaches Einlagern im -20°C Kühlschrank; -20°C = Einlagern im -20°C mit vorheriger Schockfrostung auf Trockeneis; -20°C PBS BSA = Einfaches Einlagern im -20°C Kühlschrank mit 1% BSA im PBS Waschlösung; -80°C = Einfaches Einlagern im -80°C Kühlschrank; -80°C Mr. Frosty = Einlagern im -80°C Kühlschrank mit schonendem Einfrieren durch „Mr. Frosty“ Gefäß; -80°C PBS BSA = Einfaches Einlagern im -80°C Kühlschrank mit 1% BSA im PBS Waschlösung; 4°C = Einfaches Einlagern im 4°C Kühlschrank. Der Lagerzeitraum lag bei drei Tagen.

3.4 In vitro Vergleich der lentiviralen Vektoren

Nach Ermittlung der besten Produktionsbedingungen konnten nun die unterschiedlichen Transfervektoren *in vitro* getestet werden, um einen geeigneten internen Promotor zu ermitteln. Dafür wurde zuerst der Effekt der Promotoren auf die Höhe der biologischen Titer untersucht. Die Frage war also, gibt es Schwankungen in der Höhe der Titer je nach verwendetem Promotor?

Dazu wurden die fünf unterschiedlichen Vektorkonstrukte unter gleichen Bedingungen auf HEK293T Zellen produziert. Die Titration fand auf HEK293T und MLE12 Zellen statt. Zur Ermittlung der biologischen Titer wurden 72 h nach der Transduktion die GFP-positiven Zellen mit einer FACS-Messung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zu sehen. In HEK293T Zellen waren die Titer für EF1 α - und CMV Promotor vergleichbar, verringerten sich aber mehr als 3-fach für die beiden Ubiquitin Promotoren. Auf MLE12 Zellen

andererseits waren alle Promotoren vergleichbar, bis auf den zelltypspezifischen SP-B Promotor, der einen ungefähr 10-fach niedrigeren Titer ergab.

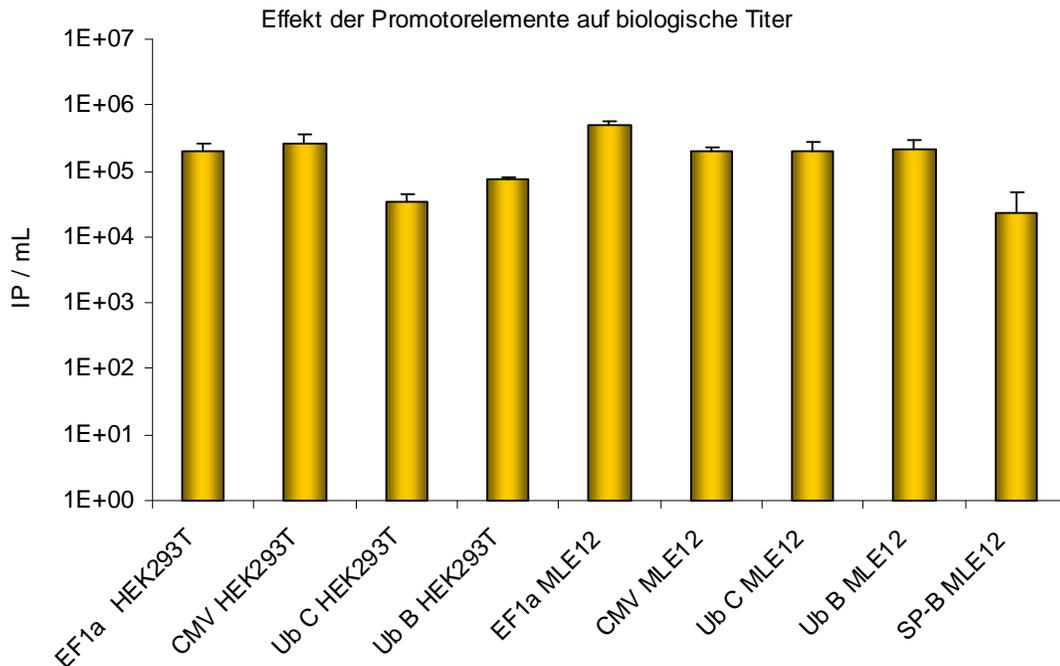
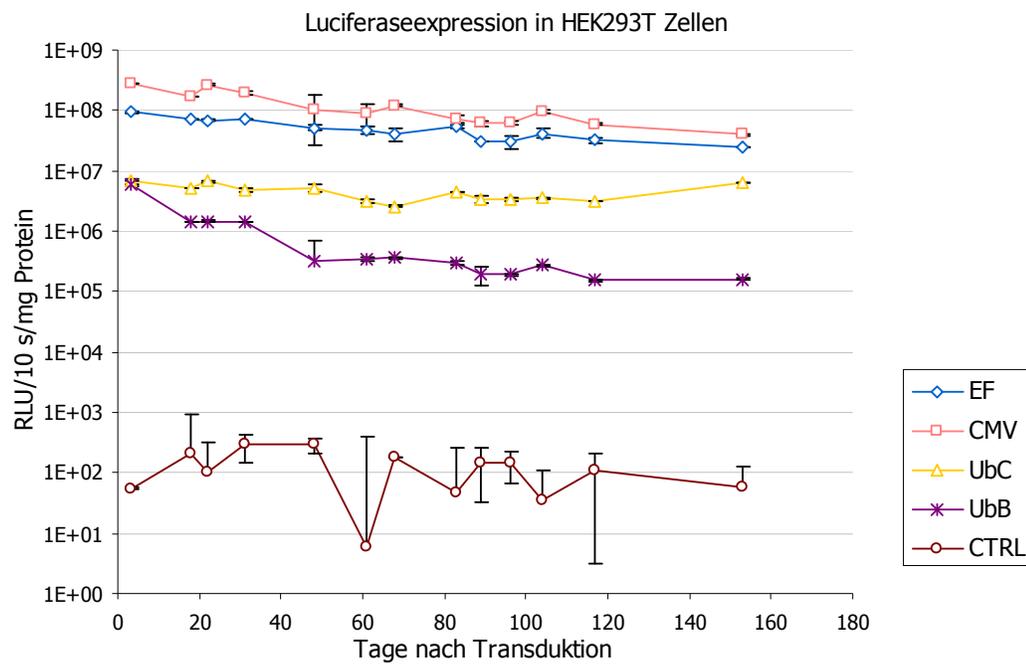


Abbildung 25 Effekt der Promotorelemente auf die biologischen Titer Die Grafik zeigt die Titer, die mit den unterschiedlichen Promotoren, bei gleichen Produktionsbedingungen ermittelt wurden. Der SP-B Promotor konnte nicht auf HEK293T Zellen getestet werden, da er zelltypspezifisch für Alveolarepithelzellen ist. Die Abkürzungen geben an, woher der verwendete Promotor stammt: EF1a= humaner Elongationsfaktor 1 a; CMV= Cytomegalovirus; Ub C= Ubiquitin C; SP-B= Surfactant Protein B; Ub B= Ubiquitin B

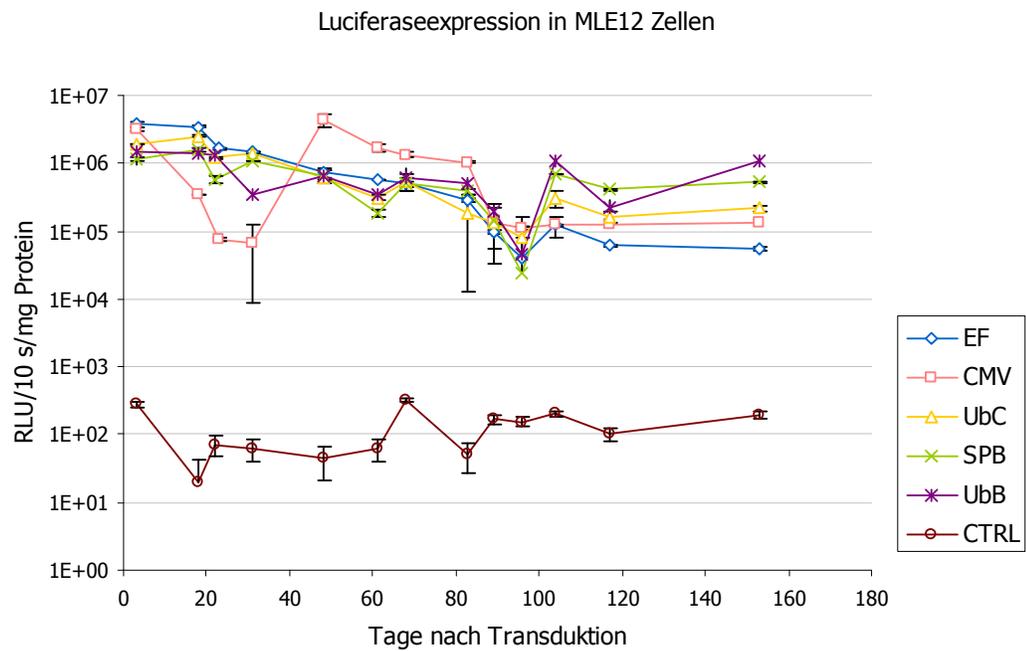
Diese fünf Promotorelemente wurden nun einer Langzeitstudie unterzogen. Die Fragestellung lautete: Wie lange exprimiert welcher Promotor stabil? Dazu wurden alle fünf Promotorkonstrukte erneut produziert, titriert und dann in identischen Vektormengen (MOI = Multiplicity of Infection = Anzahl der Vektoren pro Zelle) auf drei Zelllinien getestet: HEK293T, MLE12 und A549 (siehe Kapitel 2.3). Als Reportergen diente Luciferase. Eine wöchentliche Luciferase-Messung (siehe Kapitel 2.3.10) wurde nach einem identischen Protokoll (Tag 1: Aussäen von $5 \cdot 10^5$ Zellen / Vertiefung einer 6-well Platte; Tag 2: Messung) über einen Zeitraum von gut 150 Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 26. In HEK293T Zellen ergaben die Vektoren, die EF1 α und CMV Promotoren enthielten tlw. sogar 100 (UbC)- bis 1000-fach (UbB) höhere Langzeitexpressionswerte, verglichen mit den Ubiquitin Promotoren. Sowohl in MLE12 als auch in A549 konnte wiederum kein Effekt

irgendeines Promotors auf die Langzeitexpression festgestellt werden, wobei die Lumineszenzwerte ca. 10- bis 20-fach unter dem Niveau der HEK293T Zellen lagen. In den MLE12 Zellen lag am Tag der letzten Messung das Niveau des UbB Promotors sogar ca. 10-fach über dem von EF1 α und CMV.

A



B



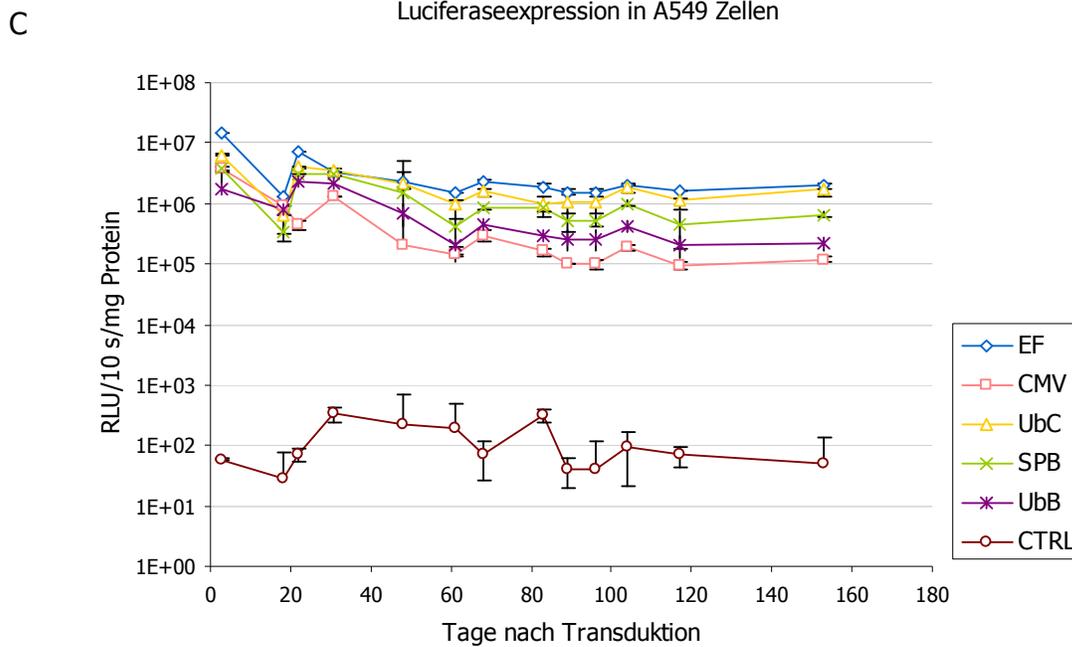


Abbildung 26 Langzeit *in vitro* Vergleich der verschiedenen Promotorkonstrukte in **A)** HEK293T Zellen in **B)** MLE12 Zellen und in **C)** A549 Zellen. Die Quantifizierung erfolgt in RLU = Relative Light Units, womit die Photonen gemeint sind, die abzüglich des Hintergrundes über 10 s emittiert worden sind. Die Abkürzungen geben an, woher der verwendete Promotor stammt: EF= humaner Elongationsfaktor 1 α ; CMV= Cytomegalovirus; UbC= Ubiquitin C; SPB= Surfactant Protein B; UbB= Ubiquitin B

3.5 *In vivo* Charakterisierung des lentiviralen Vektor pWPXLmG*

In einem ersten *in vivo* Versuch sollte nun die Langzeitexpression in der Mauslunge überprüft werden. Dafür wurde der Vektor pWPXLmG* ausgewählt, welcher den EF1 α Promotor enthält. Dieser wurde wie beschrieben produziert und gereinigt. Da dieser Versuch zeitgleich mit der Optimierung der Produktionsbedingungen durchgeführt wurde, konnte noch nicht die maximale Vektorkonzentration erreicht werden. Deshalb erhielt jede der fünf Mäuse im Alter von 2 – 3 Monaten nur eine Dosis von $1 \cdot 10^4$ IP. Die Applikation erfolgte durch intranasale Instillation. Erst wöchentlich und im Anschluss monatlich wurde die Expression im *In vivo* Imager gemessen (siehe Kapitel 2.4.4). Abbildung 27 zeigt die Luciferaseexpression in der Lunge vom Anfang bis zum Ende des Messzeitraumes von ca. einem Jahr. Dabei kann nur eine geringfügige Abnahme der Expression beobachtet werden.

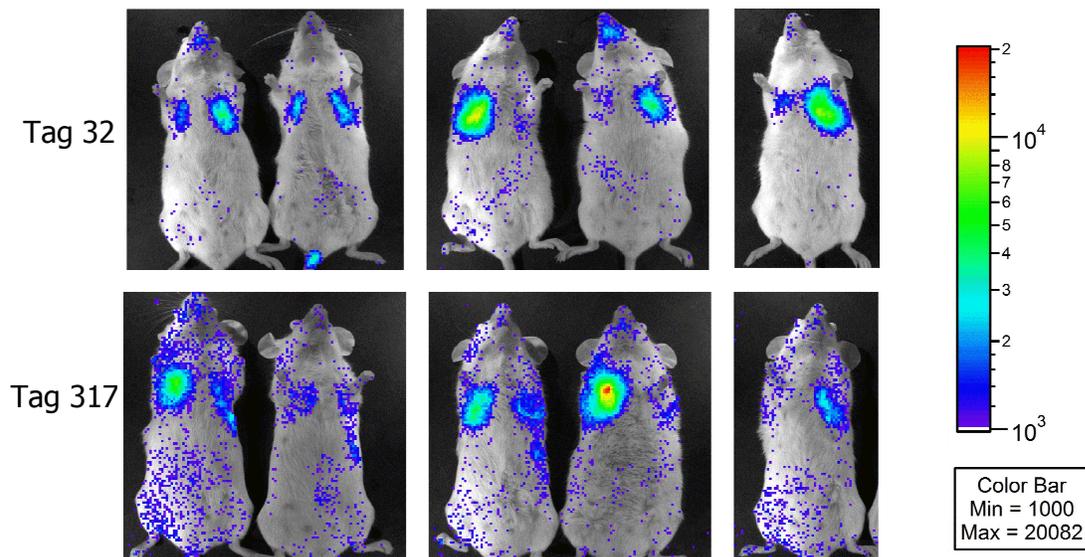


Abbildung 27 Vergleich der Expression am Tag 32 (oben) und am Tag 317 (unten)

Direkter Vergleich der *In vivo* Imager Bilder am Anfang und Ende des Untersuchungszeitraumes. Die fünf Mäuse erhielten eine nasale Instillation mit 10.000 IP des lentiviralen Vektors pWPXLmG*. Dieser besitzt den EF1a Promotor und das Transgen codiert für ein Fusionsprotein aus Luciferase und GFP.

Die Expressionswerte aller fünf Mäuse wurden mit Hilfe der Software Living Image 2.50 bzw. IgorPro von WaveMetrics ermittelt. Diese Quantifizierung erfolgte in „Total Flux“ (Lichtemission in Photonen/s). Eine Auftragung des Durchschnittswertes der fünf Mäuse über die Zeit zeigt Abbildung 28. Die Expression bleibt dabei über den ganzen Zeitraum weitestgehend stabil.

Eine weitere wichtige Fragestellung war, ob sich im Blut der Mäuse eine Immunreaktion auf die Verabreichung der Vektoren nachweisen ließe. Dazu wurde den behandelten Tieren in regelmäßigen Abständen (alle zwei Messungen, anfangs alle zwei Wochen, danach alle zwei Monate) Blut aus der *Vena facialis* entnommen und im automatischen Haematologie-System *KX-21* untersucht. Dabei konnte keine signifikante Abweichung der Weißen Blutkörperchen zum Ausgangswert zwei Tage vor der Instillation festgestellt werden. Siehe dazu Abbildung 29.

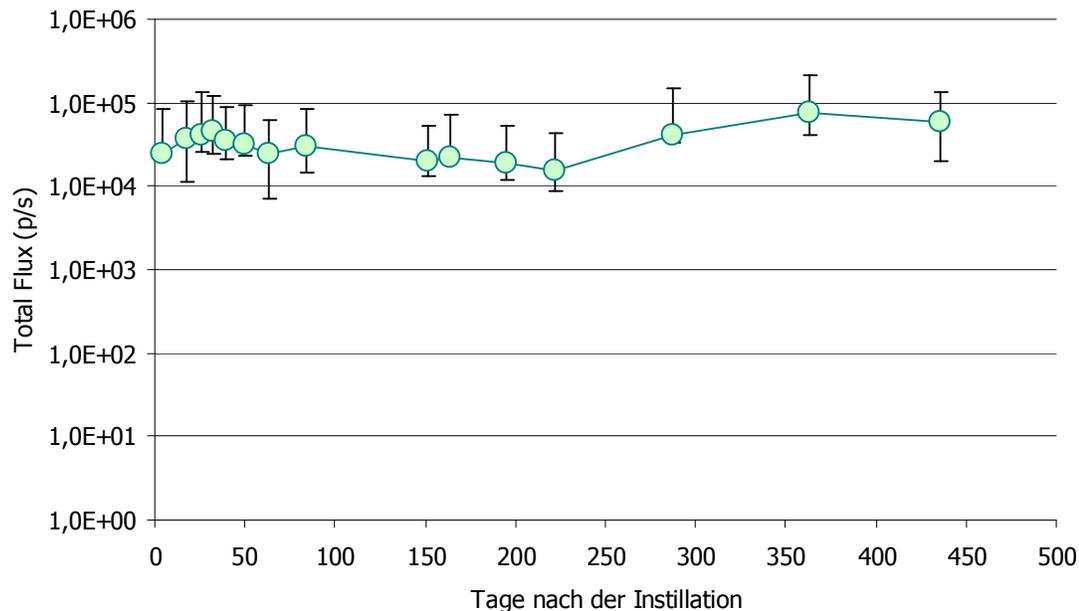


Abbildung 28 Langzeitexpression von pWPXLmG* *in vivo*. Durchschnittswert der Lichtemission in Photonen/s der fünf behandelten Mäuse über die Zeit. Die Mäuse erhielten eine nasale Instillation mit 10.000 IP des lentiviralen Vektors pWPXLmG*. Dieser besitzt den EF1a Promotor und als Transgen, ein Fusionsprotein aus Luciferase und GFP, welches diese Art der Quantifizierung erlaubte.

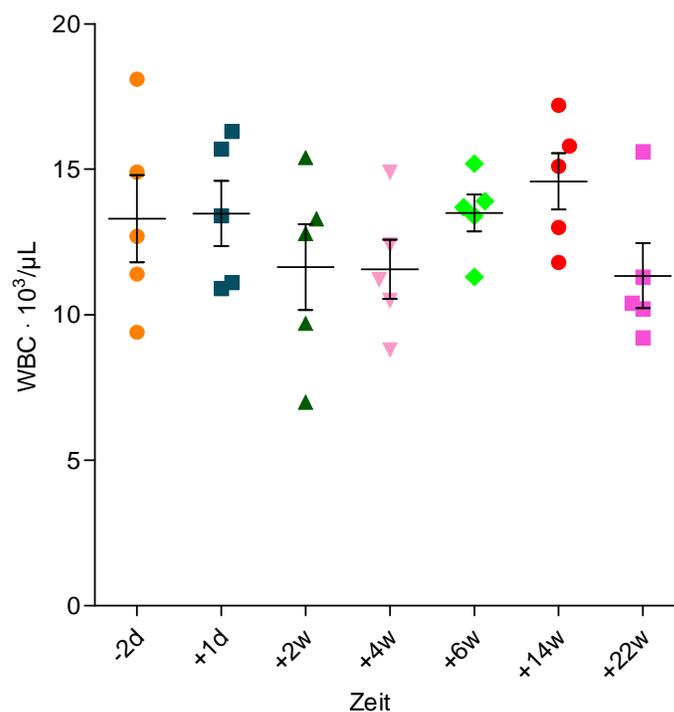


Abbildung 29 Quantitative Langzeitüberprüfung der Leukozyten (WBC = White Blood Cells) von 5 Mäusen. Jedes eingetragene Symbol steht dabei für die Leukozytenzahl eines Individuums. Als Kontrolle wurde das Blut der adulten Tiere zwei Tage (-2d) vor der nasalen Instillation von 100 µL pWPXLmG* gemessen. Diese wurden mit den Werten einen Tag (+1d), zwei Wochen (+2w) usw. nach der nasalen Instillation verglichen.

Als abschließende Untersuchung des *in vivo* Verhaltens der Vektoren wurde eine Organdistributionsstudie durchgeführt. Dafür wurden die fünf Mäuse, an denen die Langzeitexpression der Luciferase gemessen worden war, nach Abschluss der Messung an Tag 436 euthanasiert und die folgenden Organe entnommen:

Lunge
Leber
Herz
Milz
Gonaden

Nach Entnahme wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem eisgekühlten Mörser zerkleinert. Von jedem Gewebe wurden 100 mg abgewogen und die genomische DNA extrahiert (siehe Kapitel 2.3.9). Diese DNA wurde dann auf Integrate untersucht. Dies geschah mit Hilfe der Real Time PCR: haben sich Vektoren in das Genom integriert, können sich die spezifischen Primer anlagern und ein quantifizierbares Amplifikat entsteht. Eine genaue Anleitung befindet sich in Kapitel 2.3.8.2. Der Ct Wert⁴ (Cycle Treshold) konnte dann in die Angabe, wie viele Integrate vorhanden waren, umgerechnet werden. Dazu wurde eine Standardgerade ermittelt, die aus den Ct Werten von Lösungen bekannter Molekülkonzentration bestand ($5 \cdot 10^9$ – $5 \cdot 10^2$ Moleküle). Mit der Real Time PCR Analyse konnte keine Distribution der Vektoren auf andere Organe als das Zielorgan Lunge festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 30.

⁴ Zyklus Schwellenwert = Zyklus, in dem die Fluoreszenz das erste Mal signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt

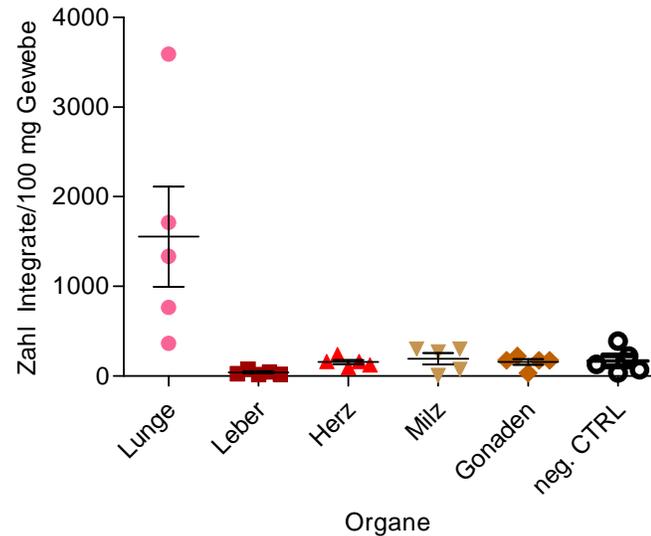


Abbildung 30 Organdistribution des Vektors pWPXLmG* nach intranasaler Instillation von 10.000 IP vor über 400 Tagen. In keinem anderen Organ als dem Zielorgan Lunge war eine Integration detektierbar. Jedes eingetragene Symbol steht für das Ergebnis der Real Time PCR, nämlich die Zahl der Integrate in 100 mg Gewebe des jeweiligen Organs.

3.6 *In vitro* Testung von pWPX-SPB

Bei pWPX-SPB handelt es sich um den Transfervektor, mit dem der lentivirale Vektor erzeugt wird, welcher SP-B als Transgen unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors besitzt (siehe Abbildung 31).

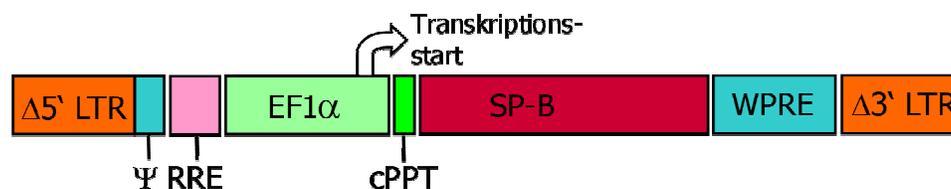


Abbildung 31 Schema von pWPX-SPB in seiner proviralen Form Enthält als Transgen Surfactant Protein B unter des Kontrolle des internen EF1 α -Promotors. Bei korrekter Integration und Expression sollte mit diesem Vektor die substitutive Versorgung mit SP-B möglich sein.

Vor Einsatz *in vivo* musste der Vektor auf Funktionalität, sprich SP-B Produktion *in vitro* getestet werden. Dafür wurde eine Großproduktion (40 mL Überstand) angesetzt. Dieser Überstand wurde dann mit den beschriebenen Methoden gereinigt und konzentriert (siehe Kapitel 2.3.7). Eine Titration mit anschließender Real-Time PCR Analyse ergab einen Titer von $2,36 \cdot 10^8$ Integrate/mL. Mit zwei Verdünnungen dieser Vektorlösung wurden dann drei verschiedene Zelllinien transduziert: MLE12, HEK293T und A549 (MLE12 = murine, alveolare Epithelzellen, HEK293T = humane, embryonale Nierenzellen, A549 = humane, alveolare Epithelzellen). In einem ersten Schritt wurde das Proteinlysat in einem Western Blot untersucht. Zum spezifischen Nachweis wurde SP-B Antikörper (AB3430, rabbit polyclonal) in einer Verdünnung 1:5.000 verwendet.

In Abbildung 32, A ist dieser Western Blot zu sehen. Die Belichtungszeit betrug 10 s. Dort ist die spezifische Bande für das monomere Preproprotein von SP-B bei 42 kDa (nach intrazellulärer Prozessierung ist SP-B 18 kDa groß) [44] zu erkennen, allerdings nur in den A549 Zellen. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Überstände der drei transduzierten Zelllinien gesammelt und untersucht, denn es handelt sich bei SP-B um ein sekretorisches Protein. Für alle drei Zelllinien konnte auf diesem neuen Western Blot (siehe Abbildung 32, B) die Vorstufe von SP-B detektiert werden.

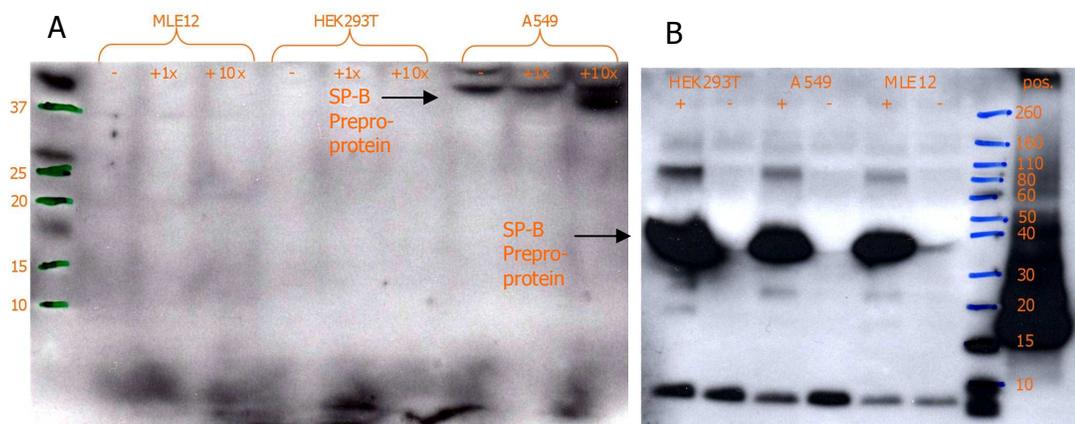


Abbildung 32 Western Blots des *in vitro* getesteten SP-B Proteins aus Zellen, die mit pWPX-SPB transduziert wurden. A) Lysierte Zellen die entweder gar nicht (-), mit 1-fach konzentriertem Überstand (+ 1x) oder 10-fach konzentriertem Überstand (+ 10x) transduzierten MLE12, HEK293T oder A549 Zellen B) Überstand der transduzierten (+) und nicht transduzierten (-) Zellen; pos. = Positivkontrolle prozessiertes SP-B bei 18 kDa

3.7 In vivo Versuch pWPX-SPB

Nach Abschluss der *in vitro* Versuche wurde mit den *in vivo* Versuchen begonnen. Dazu wurde der gereinigte Vektor pWPX-SPB in die konditionalen SP-B knock-out Mäuse instilliert. Nach einer Woche war von einer maximalen Expression auszugehen, wie die Ergebnisse aus den *in vivo* Versuchen mit dem Luciferase-Vektor gezeigt hatten (siehe Kapitel 3.5). Daher wurde zu diesem Zeitpunkt die Supplementierung des Trinkwassers mit Doxycyclin abgesetzt. In der Theorie sollte nun das Ausschalten des zelleigenen SP-B durch das integrierte SP-B Gen kompensiert werden. Als Mess-Skala galt das Überleben der Mäuse im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die keinen SP-B-haltigen Vektor erhalten hatte. Es wurden drei Gruppen (n=5) eingerichtet. Alle drei Gruppen erhielten die erste Dosis von $1,4 \cdot 10^7$ IP / Tier (in 100 μ L nasal instilliert). Eine Woche später wurde bei der ersten Gruppe das Doxycyclin abgesetzt. Die zwei verbliebenen Gruppen erhielten eine zweite Dosis von $4,7 \cdot 10^7$ IP / Tier. Wieder eine Woche später wurde bei der zweiten Gruppe die Supplementierung beendet und die dritte Gruppe erhielt eine dritte Dosis über $3,1 \cdot 10^8$ IP / Tier. Auch bei der dritten Gruppe, die drei Dosen erhalten hatte wurde nach einer Woche die Doxycyclin-Gabe abgebrochen. Leider konnte bei keiner einzigen der Gruppen ein Überlebensvorteil der behandelten Mäuse zu der nicht behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Um festzustellen, woran der Fehler liegen könnte wurde ein *in vivo* Versuch mit einem Vektor gemacht, der für das Transgen LacZ codiert (siehe Kapitel 2.4.6.2).

3.8 In vivo Versuch pWPXLacZ

Es wurden histologische Untersuchungen von Mauslungen, die mit pWPXLmG* behandelt waren, durchgeführt. Dabei war keine der Kombinationen von Kryoschnitt- bzw. Paraffinschnittverfahren mit der direkten Fluoreszenz des GFP bzw. der indirekten Immunfluoreszenz des Antikörpers gegen Luciferase auswertbar. Deswegen wurde ein neues Transgen in den bestehenden Vektor inkloniert: ein LacZ-Gen mit NLS (=Nukleare Lokalisationssequenz). Dieser neue Vektor wurde nach dem bestehenden Produktionsprotokoll hergestellt und *in vitro* auf Funktionalität getestet. Dafür wurden HEK293T, MLE12 und A549 Zellen in jeweils zwei Vertiefungen einer 6-well Platte ausgesät

($1 \cdot 10^6$ Zellen/well). Nach 24 h erfolgte für die eine Hälfte der Zellen die Transduktion mit pWPXLacZ ($1 \cdot 10^7$ IP). Wieder 24 h später wurden alle Zellen mit der X-Gal-Lösung inkubiert. Die Auswertung erfolgte am dritten Tag optisch und eine volle Funktionalität des Vektors konnte festgestellt werden. Die 6-well Platte ist in Abbildung 33 gezeigt:



Abbildung 33 *In vitro* Funktionalität von pWPXLacZ auf HEK293T, MLE12 und A549 Zellen. Die Transduktion erfolgte mit $1 \cdot 10^7$ IP. Die Inkubation mit der X-Gal-Lösung fand für 24 h im Brutschrank bei 37°C statt.

Für den *in vivo* Einsatz wurde eine Gruppe von $n=4$ Mäusen mit drei Dosen Vektor in einem siebentägigen Abstand behandelt. Dabei wurden ähnlich hohe Titer verwendet wie für die Mausgruppe, die den SP-B Vektor erhalten hatte (siehe 3.7). Eine Woche nach der letzten Dosis wurden die Tiere euthanasiert und die Lungen analog der Beschreibung in Kapitel 2.4.6.2 behandelt. Die fertigen Paraffinschnitte wurden dem Pathologen Dr. med. Kai Wagner vom Pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät der LMU München zur Begutachtung vorgelegt.

In den untersuchten Schnitten wurden folgende Zelltypen als eindeutig LacZ-positiv beurteilt:

- alveolare Makrophagen
- einzelne Alveolardeckepithelien
- respiratorisches Epithel in den Bronchiolen
- histozytäre Zellen in lymphatischen Aggregaten

Die dazugehörigen Aufnahmen befinden sich in Abbildung 34:

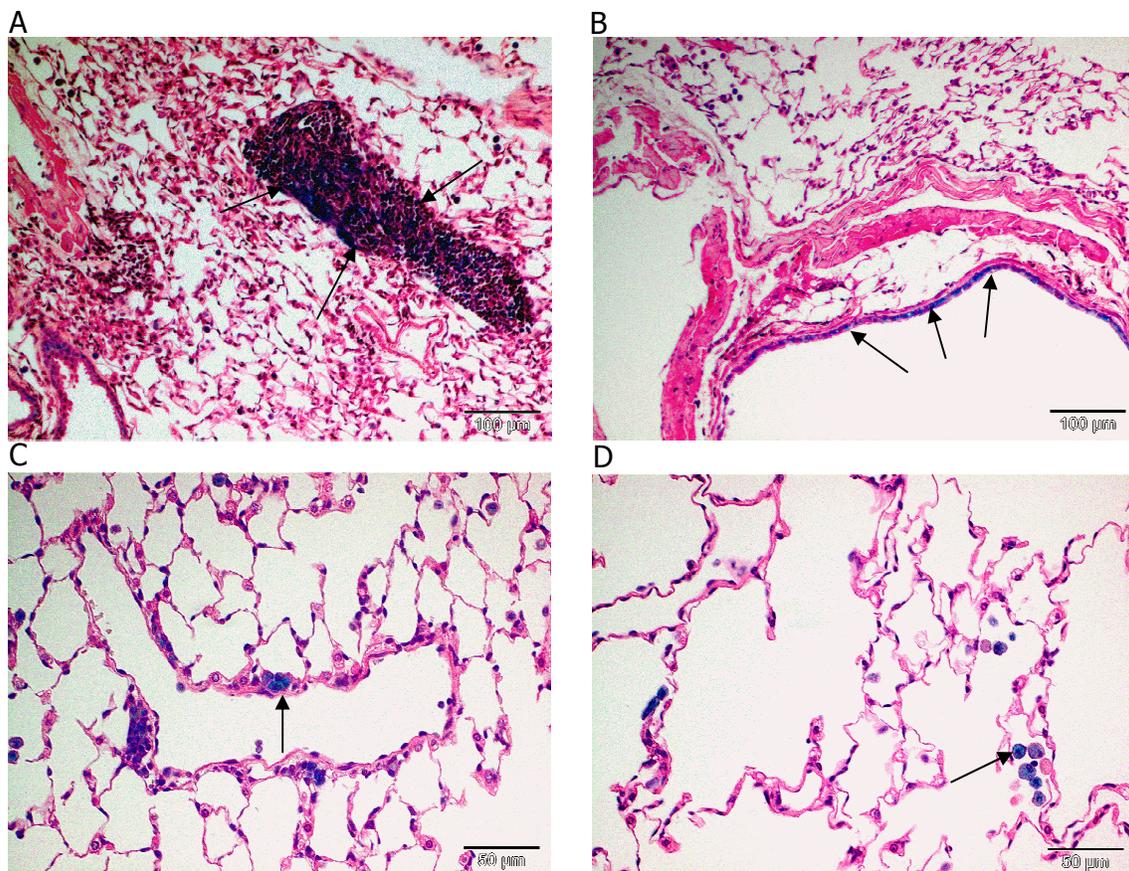


Abbildung 34 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Lungenschnitte. Paraffinschnitte mit HE-Färbung. Die Lungen wurden vor dem Schneiden mit X-Gal Lösung inkubiert. Positive Zellen erscheinen blau, diese wurden mit dem Vektor pWPXLacZ transduziert. Von einem erfahrenen Pathologen wurden dabei die folgenden positiven Zelltypen bestätigt (mit Pfeil gekennzeichnet): A) histozytäre Zellen in lymphatischen Aggregaten; B) respiratorisches Epithel in den Bronchiolen; C) einzelne Alveolardeckepithelien; D) alveolare Makrophagen

4 Diskussion

Die derzeit einzige Therapieoption für den tödlich verlaufenden Surfactant Protein B Mangel ist eine Lungentransplantation. Dies ist nicht nur ein sehr riskanter Eingriff, auch die Verfügbarkeit von Spenderlungen ist sehr gering. Die erfolgreiche Durchführung einer Gentherapie könnte am zugrunde liegenden, biologischen Mechanismus – den Genen – wirken. Dabei würde in das Genom der Zielzellen (in diesem Fall alveolare Pneumozyten des Typs II), die aufgrund einer Mutation kein funktionstüchtiges SP-B Gen besitzen, eine korrekte Variante des Gens integriert werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Integration mit lentiviralen Vektoren erfolgreich durchgeführt werden kann.

4.1 Klonierung der Transfervektoren

Die Planung und Konstruktion der beiden Expressionskonstrukte für gag/pol und env verhindert mit großer Wahrscheinlichkeit die Entstehung eines replikationskompetenten Virus. Dies ist ein entscheidendes Sicherheitsmerkmal für die potentielle Anwendung als Therapeutikum. Es soll verhindern, dass ein replikationskompetenter Lentivirus durch homologe Rekombination mit den Plasmiden für gag/pol und env und dem Transfervektor entsteht und damit unkontrollierbar wird. Dadurch würde sich ein permanenter Infektionsherd bilden.

Dieses Sicherheitsmerkmal wird durch die folgenden Schritte sichergestellt:

- Einsatz von zwei Plasmiden für gag/pol und env
- Verwendung eines gag/pol Plasmids mit möglichst wenigen homologen Sequenzen durch die Deletion verschiedener akzessorischer Gene, wie z.B. vpr, vif, vpu und nef
- Verwendung eines Gens für den viralen Envelope, der nicht aus dem HIV-1 stammt, sondern aus dem VSV

Diese Maßnahmen zusammen bieten einen sehr hohen Schutz vor einem unerwünschten Rekombinationsereignis [45-47]. Nichtsdestotrotz ist für die klinische Verwendung eine Überprüfung auf replikationskompetente Viren ein

Muss. Dies könnte z.B. mit einer PCR oder durch ein Co-Kultivierung mit einer permissiven Zelllinie erfolgen [48-50].

Nach der erfolgreichen Klonierung aller benötigten Konstrukte musste eine optimale Produktionsstrategie ermittelt werden.

4.2 Ermittlung der optimalen Produktionsbedingungen

Die drei wichtigsten Kriterien für die optimalen Produktionsbedingungen lauteten: Höhe der Titer, Reproduzierbarkeit und Kosten.

Bei der Überprüfung möglicher Transfektionsreagenzien lieferten zwei Kandidaten eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz: IPEI und TransIT. Da sich auch beide in der Reproduzierbarkeit nicht unterschieden, entschied in diesem Fall der Kostenfaktor. Die benötigte Menge Transfektionsreagenz bei einer 10 cm Schale kostet mit TransIT ca. 17,60 €. Stellt man das IPEI aus Poly(2-ethyl-2-oxazoline) und 30% Schwefelsäure selber her, so kommt man auf einen Kostenbetrag von rund 1 €. Dies ist natürlich abhängig von der Ausbeute nach Reaktion und Reinigung (oft 20 – 30%). Trotz des einmalig hohen Arbeitsaufwandes der Herstellung, lag der Kostenvorteil eindeutig auf der Seite des IPEI, so dass es für die weiteren Experimente verwendet wurde.

Das molare Verhältnis der Plasmide untereinander spielt auch eine wichtige Rolle bei der Effektivität des gesamten Systems. Dabei müssen die Verhältnisse so gewählt werden, dass möglichst kein Genprodukt eines Plasmids limitierend ist. Ein guter Ausgangspunkt dabei ist zu wissen, dass eine zu große Menge des env-Plasmides toxisch wirkt [51]. Es wird davon ausgegangen, dass die hohe Menge an Virusprotein, welches in die Zellmembran eingelagert wird, zu einer Destabilisierung derselben führt. Wie die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigten, ist ein dreifacher Überschuss des gag/pol Genprodukts und ein vierfacher Überschuss des Transfervektors im Vergleich zum env-Plasmid bei allen drei DNA-Konzentrationen ein Produktionsvorteil. Eine weitere Erhöhung des Überschusses an gag/pol und Transfervektorplasmid brachte keine weitere Erhöhung des Titers, sondern führte tlw. zu einer Senkung. Dieser Effekt ist mglw. darauf zurückzuführen, dass die Überexpression der viralen Gene eine zu starke Belastung für den Grundstoffwechsel der Zellen darstellt. Dies ist auch eine mögliche Erklärung dafür, warum eine Erhöhung der DNA Menge von 4 µg/6-well auf 8 µg keine

Erhöhung des Titers mit sich brachte. Eine Erhöhung der DNA Menge ist aber nicht allein toxisch, auch die damit einhergehende Erhöhung der IPEI Konzentration ist beteiligt, denn dadurch wird die Stabilität der Zellmembran kritisch gesenkt. Ein anderer Grund für die Verschlechterung des Titers bei der Transfektion mit 8 µg DNA könnte auch in der Reinheit der verwendeten DNA liegen. Die verwendeten Plasmide wurden mit einem kommerziellen Kit für die Maxi Plasmidpräparation gewonnen. Dabei besteht immer die Möglichkeit, dass bakterielle Lipopolysacchararide zurückbleiben und mit der DNA in die Zellen gelangen.

Ein weiterer anpassbarer Faktor bei der Transfektion mit IPEI ist das N/P Verhältnis, also das molare Verhältnis von Stickstoffatomen des IPEI zu den Phosphatgruppen der DNA. Zwar ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den sechs verschiedenen, ausgetesteten N/P Verhältnissen feststellen (siehe Abbildung 20), der Trend zeigte jedoch, dass mit zunehmendem N/P Verhältnis die Titer ansteigen. Das N/P zwischen 10 und 15 scheint ein Verhältnis zu sein, bei dem entweder Oberflächenladung des Partikels oder Komplexierung der DNA für eine besonders gute Interaktion mit der Oberfläche der HEK293T Zellen sorgen. Von höheren IPEI Konzentrationen ist abzuraten, da dann der Effekt durch die wachsende Toxizität aufgehoben wird.

Der größte Sprung in der Verbesserung der Titer wurde bei der Optimierung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Transfektion gemacht. Gängige Transfektionsprotokolle und –empfehlungen gehen in der Regel von einer Konfluenz von 80 – 90% aus (siehe z.B. Mirus TransIT 293T Packungsbeilage). Eine Konfluenz von 80 – 90% erreicht man durch das Aussäen von $1 \cdot 10^6$ Zellen am Vortag der Transfektion. Sät man $5 \cdot 10^6$ Zellen aus, so liegt die Konfluenz einen Tag später bei 90 – 100%. Bei der Verwendung von $7,5 \cdot 10^6$ Zellen zur Aussaat, ist die Konfluenz nach 24 h deutlich über dem sonst üblichen Maximum. Die Zellen bilden eine komplett geschlossene Oberfläche und sind tlw. schon komprimiert. Dies ist normalerweise kein wünschenswerter Zustand der Zellen, weil es dadurch zu einer Einstellung der Zellteilung (Kontaktinhibition) kommt und die Zellen in einen anderen Stoffwechselzustand geraten. Dies bewirkt, dass die Zellen beim nächsten Splitvorgang erst sehr langsam anwachsen, bis sie wieder in die exponentielle Wachstumsphase gelangen. Bei der Vektorproduktion hingegen werden die Zellen später nicht mehr benötigt, so dass diese

Überlegung hinfällig ist. Es hat den Anschein, dass sich dieser Zustand zur Transfektion und zur Vektorproduktion besonders gut eignet. Ein Grund könnte darin liegen, dass der Stoffwechsel der Zellen nur noch ein Erhaltungs- und kein Wachstumsstoffwechsel mehr ist. Dadurch sind höhere Kapazitäten für die virale Proteinproduktion gegeben. Aber auch im ersten Schritt - der Transfektion - könnte der Grund für den Vorteil der hohen Aussaatdichte liegen. Teilen sich die transfizierten Zellen, so werden die intrazellulär vorliegenden Plasmide nicht repliziert und gehen so nach und nach verloren. Neu entstehende Zellen sind dann möglicherweise keine produzierenden Zellen mehr. Findet aber keine Zellteilung mehr statt und ist die Transfektionseffizienz besonders hoch, so kann eine maximale Anzahl von Zellen erfolgreich zu produzierenden Zellen werden. Um diese Vorteile ausnutzen zu können musste vorher noch eine Eigenschaft von HEK293T Zellen umgangen werden. Diese Zellen sind empfindlich gegen mechanische und temperaturbedingte Belastungen. Gerade in dem hochkonfluenten Stadium kann es daher dazu kommen, dass sie sich als Rasen ablösen und bei dem nächsten Mediumwechsel abgesaugt werden. Es lag daher nahe ein Verfahren anzuwenden, welches die Adhärenz der Zellen an die Zellkulturoberfläche verbessert. Eine Möglichkeit dazu lag in der Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin. Mit diesen Optimierungen und einer gewissen Erfahrung im Umgang mit den Zellen und dem Transfektionssystem konnten Titer im Bereich von $2 - 4 \cdot 10^6$ IP/mL und höher erreicht werden. Dies liegt im guten Durchschnitt zu verschiedenen Literaturwerten für vergleichbare Systeme [52, 53]. Allerdings ist nie eine absolute Vergleichbarkeit gegeben, was an den von Labor zu Labor verschiedenen Methoden liegt, die Titer zu ermitteln.

Die unaufgearbeiteten Vektorüberstände konnten nicht gut in den *in vitro* Versuchen eingesetzt werden und auf gar keinen Fall in den *in vivo* Experimenten. Der Einsatz in den Tieren kam nicht in Frage, weil zum Einen Zell- und Mediumbestandteile gefährliche Immunreaktionen in der Lunge hervorrufen können und zum Anderen die Vektorkonzentration viel zu gering wäre. Für die Zellkulturversuche lag das Problem darin, dass MLE12 und A549 Zellen in MEM (Minimal Essential Medium Eagle) wachsen und bei einer Veränderung dieses Mediums durch größere Mengen Vektoren, welche in DMEM vorliegen, das Wachstum einstellen oder sich von der Zellkulturschale ablösen. Daher musste ein, für die spezifischen Gegebenheiten des verfügbaren Labors, passendes Protokoll erarbeitet werden. Größte

Problematik war in diesem Fall, dass keine geeignete Ultrazentrifuge im S2 Bereich zur Verfügung stand. Deswegen konnte nicht auf die sonst übliche Reinigung und Konzentrierung über eine Ultrazentrifugation zurückgegriffen werden [54]. Die Reinigung der Vektorpartikel aus dem Überstand erfolgte mit dem Millipore Fast-Trap Lentivirus Concentration and Purification Kit. Dieses kommerzielle System, basierend auf der Adsorption an einer Membran, war vom Preis-Leistungsverhältnis, der Reproduzierbarkeit und einfachen Anwendung die erste Wahl. Es wurde noch das Konkurrenzprodukt Vivasure LentiSELECT von Sartorius Stedim Biotech getestet (Daten nicht gezeigt), welches aber trotz eines günstigeren Preises in der Anwendung und in der Ausbeute nicht überzeugen konnte.

Auch bei der weiteren Konzentrierung mittels Ultrafiltration, erwies sich das Produkt von Sartorius dem von Millipore unterlegen. Beides sind Zentrifugenröhrchen mit einer Membran, die die Vektoren aufgrund ihres Molekulargewichtes retardieren. Sie besitzen beide die gleiche Molekulargewichtsgrenze von 100 kDa, unterscheiden sich dabei aber im verwendeten Material und in der aktiven Membranoberfläche: Die Amicon 15 Röhrchen von Millipore bestehen aus regenerierter Cellulose („Ultracef“) und einer aktiven Membranoberfläche von 7,6 cm². Die Membranen in den Vivaspin 15 Gefäßen von Sartorius bestehen aus Polyethersulfon und haben eine aktive Oberfläche von 4 cm². Da beide Produkte die gleiche Molekulargewichtsgrenze aufwiesen, ist es wenig wahrscheinlich, dass die schlechte Leistung der Sartoriusmembranen auf einer höheren Durchlässigkeit für die viralen Partikel beruht. Die Retardierungsleistung sollte also die gleiche sein. Die schlechteren Titer sind also höchstwahrscheinlich auf eine Verringerung der Vektorzahl während der Zentrifugation zurückzuführen. Dies kann z.B. durch eine Aggregation der Vektoren im Retentat hervorgerufen werden. Eine solche Aggregation kann nun in den Sartorius Röhrchen stattgefunden haben, z.B. aufgrund der erhöhten Zentrifugationszeit durch die geringe Membranoberfläche oder durch Wechselwirkungen mit dem Polyethersulfonmaterial.

Die folgenden Kriterien machen deutlich, dass die gewählten Reinigungs- und Konzentrierungsbedingungen eine erfolgreiche Prozessierung des vektorhaltigen Zellkulturüberstandes ermöglichen. Das sind zum Einen die erreichten Titer von $2 \cdot 10^8$ IP/mL. Zum Anderen sind es die Reinheit und Unbedenklichkeit, erwiesen durch die Ergebnisse der SDS-PAGE (siehe

Abbildung 23) zur Überprüfung des FBS-Gehaltes und die geringe Immunogenität der Vektoren *in vivo* (siehe Abbildung 29).

Im Anschluss waren noch Untersuchungen zur optimalen Lagerung der lentiviralen Vektoren nötig. Dabei ist das Hauptkriterium eine hohe Wiederfindungsrate. Also ein möglichst geringer Verlust durch den Einfriervorgang. Bei den Ergebnissen (siehe Abbildung 24) war vor allem erstaunlich, dass eine kurzfristige Lagerung (< 3 Tage) bei 4°C problemlos möglich war. Die Wiederfindungsrate von 60% unterschied sich nicht zu der Rate, die für die sonst übliche Lagerung bei -80°C für LVV [55] ermittelt wurde. Eine weitere Überraschung war, dass sich die Wiederfindungsraten auf über 80% steigern ließen, durch die Senkung der Abkühlgeschwindigkeit auf 1°C/min oder durch die Verwendung von BSA. Das Senken der Abkühlgeschwindigkeit wurde überprüft, weil es auch das gängige Verfahren ist, um Zellkulturzellen erfolgreich einzufrieren. Dabei wird als Hauptvorteil genannt, dass aufgrund eines osmotischen Gefälles den Zellen Wasser entzogen wird und sich so intrazellulär keine Eiskristalle bilden, welche Zellstrukturen schädigen könnten [56]. Die Verwendung von BSA wurde überprüft, weil es in der Molekularbiologie ein gängiges Mittel ist um enzymatische Reaktionen zu stabilisieren, z.B. in dem es Wechselwirkungen mit dem Reaktionsgefäß oder an der Grenze zwischen Flüssigkeit und Luft vermindert [57]. In der Zellkultur werden normalerweise DMSO (Dimethylsulfoxid) oder Glycerol als kryoprotektive Additive verwendet, aber deren Anwesenheit in den weiteren Versuchen war nicht erwünscht, so dass die Wirkung von BSA überprüft wurde. Da aber durch das schonende Einfrierverfahren schon ausreichend hohe Wiederfindungsraten erreicht wurden, wurde auf den zusätzlichen Einsatz von BSA verzichtet, um sämtliche weiteren Versuche so unbelastet wie möglich durchführen zu können. Diese weiteren Versuche beschäftigten sich mit den Effekten der unterschiedlichen Promotoren auf die Produzierbarkeit und die Wirkung der Vektoren *in vitro*.

4.3 In vitro Vergleich der lentiviralen Vektoren

Welchen Einfluss die unterschiedlichen Promotoren auf die Produzierbarkeit der Vektoren haben, wurde dadurch untersucht, dass die Höhen der jeweils erreichten Titer, miteinander verglichen wurden (siehe Abbildung 25). Dabei stellte sich heraus, dass keiner der Promotoren einen gravierenden Einfluss ausübte. Lediglich der SP-B Promotor zeigte eine relevante Absenkung der

Titer um den Faktor 10. Tendenziell ließen sich zwar die beiden Promotoren am erfolgreichsten produzieren, die für ihre starke Expression bekannt sind (EF1 α und CMV), aber falls der starke interne Promotor einen Effekt auf die Bildung oder den Transport der viralen RNA innerhalb der Produzentenzelle hat, so ist dieser sehr schwach und lässt sich nicht als Produktionsvorteil ausnutzen.

Der wichtigste *in vitro* Versuch war der Vergleich der Langzeitexpressionen der Vektorkonstrukte in den drei relevanten Zelllinien: HEK293T, da sie die Standardzelllinie für die Titration darstellt und A549 und MLE12 Zellen, als *in vitro* Simulation der Zielzellen, sowohl in Mensch als auch Maus. Dazu wurden gleiche Zellmengen dieser drei Zelllinien mit gleichen Mengen Vektor transduziert und über einen Zeitraum von ca. 21 Wochen gemessen (siehe Abbildung 26). Die Überwachung erfolgte mit Hilfe des LmG*-Reportergens, wobei in diesem Fall nicht wie bei der Titeranalyse das GFP benötigt wurde, sondern die Luciferase. Eine erste diskussionswürdige Beobachtung dieses Experimentes war das Fehlen des bekannten Silencing-Effektes des CMV Promotors in HEK293T, A549 und MLE12 Zellen [58]. Dieser tritt im Allgemeinen in einem Zeitraum von sieben Tagen ein und wird mit einer Methylierung der Promotorregion begründet. In den drei Zelllinien konnte lediglich ein allgemeiner Verlust der Expressionsstärke aller Promotorkonstrukte festgestellt werden. Dieser allgemeine Verlust lässt sich wahrscheinlich durch eine Abnahme der Zellvitalität und damit auch der Proteinexpression über diesen langen Zeitraum erklären. Immerhin belief sich die Passagenzahl auf über 28. Bei einer so hohen Passagenzahl kann es nicht nur zu einer geringeren Zellvitalität kommen, sondern auch zu einem Verlust der genetischen Stabilität. Zu so etwas kommt es aufgrund einer genetischen Drift, wenn immer kleinere und kleinere Teile der Population selektiert werden. Dieser Effekt könnte auch die zum Teil sehr starken Schwankungen in den Ergebnissen mit den MLE12 Zellen erklären.

Warum bei diesen *in vitro* Ergebnissen kein Silencing des CMV-Promotors festgestellt werden konnte, könnte an der Wahl der Zelllinien liegen [59]. Möglicherweise ist keine der drei Zelllinien zu einer Methylierung von viralen Promotorsequenzen in der Lage. Zu einer Abklärung, ob die Stärke des CMV-Promotors in der Lungentherapie nutzbar ist, müsste z.B. ein *in vivo* Versuch stattfinden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass dieses spezielle Promotorkonstrukt auf eine Art und Weise im Vektor vorliegt, bei der die Methylierungssequenzen nicht zugänglich sind für die zellulären Mechanismen.

Geht man aber davon aus, dass das Fehlen des Silencing-Effektes nur ein methodisches Problem war, so liefert der EF1 α -Promotor die erfolgversprechendsten Ergebnisse. Der EF1 α -Promotor gehört zu einem Gen, das für ein sehr essentielles Protein codiert: eine Untereinheit des Elongationsfaktors 1. Dieser ist, zusammen mit EF2 ein sehr wichtiger Bestandteil der Proteinbiosynthese einer jeden Zelle. Es handelt sich also um einen sehr starken, konstitutiven Promotor, da dieses wichtige Protein immer in der Zelle benötigt wird. Die Stärke sollte daher auch kaum zelltypabhängig sein, da die Proteinbiosynthese in allen Zellen ähnlich abläuft. Dies bestätigen auch Experimente, die in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden [59]. Eine starke Expression ist jedoch nicht immer wünschenswert und Versuche mit regulierbaren Promotoren (z.B. tetP) *in vivo* sind ein sinnvoller Schritt für die Optimierung der SP-B Expressionsstärke. Noch ist nicht bekannt, in wie fern die Zielzellen (für die *in vivo* Versuche), murine alveolare Deckepithelzellen auf die starke Expression von SP-B ansprechen. Vergleicht man aber die Expressionswerte von Luciferase in A549 oder MLE12, so wird kein eklatanter Unterschied zwischen den Niveaus des EF1 α - und des SP-B Promotors sichtbar. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen, aufgrund der besseren Produzierbarkeit, auf den EF1 α -Promotor zurückgegriffen.

Die nächste Untersuchung galt dem Langzeitexpressionsverhalten *in vivo*.

4.4 *In vivo* Charakterisierung des lentiviralen Vektor pWPXLmG*

Für die Charakterisierung des *in vivo* Verhaltens des lentiviralen Vektors pWPXLmG* wurden fünf Mäuse mit einer Dosis von $1 \cdot 10^4$ IP in einer Gesamtmenge von 100 μ L behandelt. Da dieser erste Versuch parallel zu der Produktionsoptimierung statt fand, musste mit dieser geringen Menge gearbeitet werden. Nichtsdestotrotz konnte eine stabile, lebenslange Luciferase-Expression in der Lunge mit dem In vivo Imager detektiert werden. Eine am Ende der Versuche erschienene Publikation von Stocker *et al.* [60] bestätigte die Resultate. Dort konnte auch mit einer einzigen Dosis LVV eine ebenso erfolgreiche Langzeitexpression von LacZ in der Lunge ermittelt werden. Allerdings war dort erst eine Vorbehandlung der Lungen mit 0,03 – 2% LPC (Lysophosphatidylcholin) nötig. Auch die dort verwendeten Vektormengen (ca. $2 \cdot 10^7$ TU; TU = transducing units) unterschieden sich von dem in dieser Arbeit gewählten Protokoll. Das LPC wird laut Kremer *et al.* benötigt, da LVV mit einer VSV-G Pseudotypisierung nicht von der apikalen

Seite in die Lungenzelle eindringen können. Es unterbricht die „tight junctions“ zwischen den Zellen, so dass die Vektoren auf die basolaterale Seite wechseln können [61]. Wie die Ergebnisse mit den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren zeigen, ist die Vorbehandlung mit LPC kein Muss. Allerdings sollte für eine evtl. Verbesserung des Gentransfers diese Methode mit in Betracht gezogen werden.

Die erfolgreiche, lebenslange Genexpression in Lungenzellen durch eine einzige Dosis LVV ist in der Tat bemerkenswert, denn bei diesen Zellen handelt es sich größtenteils um ausdifferenziertes Gewebe. Bei der Frage, ob die stabile Expression darauf zurückzuführen ist, ob bspw. teilungsfähige Progenitorzellen transduziert wurden, muss man den „turnover“ von Lungenzellen berücksichtigen. Leider gibt es allein für die Lebensdauer von murinem Bronchialepithel unterschiedliche Publikationen, die die Lebensdauer zwischen 2 und 267 Tagen angeben [62, 63]. Eine mit modernen, gentechnischen Methoden durchgeführte Untersuchung von Rawlins und Hogan gibt die Halbwertszeit dieser Zellen mit ca. 17 Monaten für die Lunge an [64]. Für andere Zelltypen in der Lunge gibt es weder aus humanen oder murinen Studien verlässliche Daten. Aus den derzeit verfügbaren Publikationen deutet sich an, dass die adulte Lunge ein sehr komplexes und vitales Organ ist, dessen Zellen aber einen sehr langsamen „turnover“ haben. Trotzdem ist die Lebensdauer der Epithelzellen in einer normalen Lunge durch die ständige Einwirkung von toxischen Stoffen und Pathogenen aus der Umwelt begrenzt. Für diesen Fall werden effektive und schnelle Reparaturmechanismen benötigt. Diese Reparaturmechanismen unterscheiden sich je nach Lungenregion und basieren nicht nur auf der sonst üblichen Stammzellentheorie⁵, sondern auch auf fakultativen Stammzellen und Transdifferentiation [65, 66]. Ob nun die in dieser und anderen Arbeiten beobachtete, lebenslange Transgenexpression nach Behandlung mit LVV auf eine Transduktion einer dieser teilungsfähigen Zellpopulationen zurückzuführen ist oder ob das Lungenepithel bei Labormäusen (pathogenfreie Haltung, individuell belüftete Käfige) vor jeglichen schädlichen Einflüssen geschützt ist und die positiven Zellen nicht sterben, muss dringend in weiteren Versuchen überprüft werden.

⁵ Sich konstant erneuernde Organe (Blut, Darm, Haarfollikel) beinhalten adulte Stammzellen, die morphologisch unspezialisiert sind, eine relativ geringe Teilungsrate haben und nur in sehr spezifischen Regionen („Nischen“) lokalisiert sind, wo ihr Verhalten streng reguliert wird. Sie teilen sich nicht nur selbst, sondern produzieren während dieser Teilungsvorgänge auch eine Zwischengeneration von Tochterzellen, welche sich nach ein paar Teilungen ausdifferenzieren.

In Einklang mit anderen Veröffentlichungen stand das Ergebnis, dass keine gravierende Immunreaktion auf die Applikation der LVV auftrat [67]. Auch bei der späteren Untersuchung durch einen Pathologen, wurde keine ausgeprägte Immunreaktion in den Lungen bestätigt. Die Anzahl der Makrophagen war jedoch leicht erhöht. Dieses Ergebnis ist sehr positiv für die weitere Entwicklung einer Gentherapie, die auf LVV beruht. Auf Fragen der Re-applizierbarkeit wird im Kapitel 4.6 noch näher eingegangen.

Ein weiterer wichtiger Sicherheitsaspekt wurde mit der Organ-distributionsstudie untersucht. Dass sich keine Integrate in anderen Organen nachweisen ließen, ist wahrscheinlich der geringen Vektorzahl von $1 \cdot 10^4$ und der intranasalen Applikationsroute zu verdanken. Bei Untersuchungen mit VSV-G pseudotypisierten LVV konnte v.a. eine starke Affinität zu Milzzellen nachgewiesen werden [68]. Es gibt derzeit keine Veröffentlichungen, die ein Überwechseln der LVV in den Blutstrom bei intranasaler Anwendung untersuchen, so dass in diesem Bereich noch weitergehende Experimente mit höheren Vektordosen gemacht werden müssen.

4.5 In vitro Testung von pWPX-SPB

Zur Untersuchung der Funktionalität des Vektors mit dem therapeutischen Gen Surfactant Protein B wurden die drei verschiedenen Zelllinien HEK293T, MLE12 und A549 mit pWPX-SPB transduziert und auf Proteinexpression hin untersucht. Dabei konnte beim Western Blot der intrazellulären Proteinmenge (Abbildung 32, A) nur in den A549 Zellen abhängig von der Vektormenge eine SP-B Produktion nachgewiesen werden. Detektiert wurde dabei aber lediglich die Vorstufe des entsprechenden Proteins. Da es sich bei SP-B aber um ein sekretorisches Protein handelt, ist es möglich, dass es intrazellulär nicht mehr nachweisbar ist. Daher wurde der zweite Western Blot angefertigt, auf den die Zellkulturüberstände aufgetragen wurden. Dabei konnte für alle drei Zelllinien ein eindeutig positives SP-B Signal bei ca. 42 kDa nachgewiesen werden. Allerdings ist diese Bande wiederum nur das Preproprotein und nicht das fertig prozessierte SP-B. Das ist bei den HEK293T Zellen nicht verwunderlich, denn diese sollten gar nicht in der Lage sein SP-B korrekt zu prozessieren und zu exprimieren. Allerdings sollten MLE12 und A549 Zellen dazu in der Lage sein, da es sich bei ihnen um murines bzw. humanes Alveolarepithel des Typs II (siehe Kapitel 2.3) handelt. In der Tat aber konnten Wunderlich *et al.* mit PCR-Analysen nachweisen, dass A549 Zellen nicht alle Marker exprimieren, die für ATII-Zellen typisch sind [69]. Möglicherweise haben diese

Adenokarzinomzellen in der Zellkultur die nötigen stoffwechselphysiologischen Eigenschaften verloren. In der gleichen Studie wurde aber ganz klar nachgewiesen, dass MLE12 Zellen alle diese Marker noch besitzen. Warum sie hier trotzdem keine korrekte Prozessierung zeigen, liegt möglicherweise an der Art der Kultivierung. Es ist z.B. von Hepatozyten bekannt, dass sie bestimmte lebertypische Proteine nicht mehr exprimieren, sobald sie ihre natürliche Morphologie verlieren. Dies könnte auch auf MLE12 Zellen zutreffen, welche ja normalerweise z.B. an eine Gasschicht angrenzen. Von diesen Vermutungen ausgehend wurde der Vektor in einer Großproduktion hergestellt, gereinigt, konzentriert und *in vivo* appliziert.

4.6 *In vivo* Versuch pWPX-SPB

Neben dem negativen Ausgang dieser *in vivo* Versuche, der gleich im Anschluss ausführlich diskutiert wird, ist ein positiver Aspekt festzuhalten. Die Vektoren ließen sich ohne Immunreaktion innerhalb von drei Wochen dreimal applizieren. Diese wiederholte Möglichkeit eine Behandlung durchzuführen, ist v.a. in Hinblick auf die Klinik sehr wichtig um z.B. die Prozentzahl transduzierter Zellen zu erhöhen, um auch noch in anderen Lungenregionen Transduktionen vorzunehmen und um ggf. eine nachlassende Expression wieder zu steigern. Es wäre daher sehr ungünstig, wenn der Patient eine Immunantwort gegen die viralen Proteine entwickeln würde, die eine erneute Behandlung nicht nur uneffektiv werden ließe, sondern evtl. noch zu gefährlichen Entzündungsreaktionen führen könnte. Bekannt ist z.B. die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen die meisten der derzeit benutzten Capside von Adeno-assoziierten Viren (AAV) oder bereits bestehende Immunität gegen verschiedene adenovirale Serotypen [70]. Auch andere Publikationen, z.B. von Sinn *et al.* berichten davon, dass die pulmonale Re-applikation von LVV möglich ist und die Prozentzahl der transduzierten Zellen kontinuierlich steigt [67].

Zum Scheitern der *in vivo* Versuche, also dem Sterben der Mäuse an Surfactant Protein B Mangel, gibt es zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

- 1) Die Zahl transduzierter ATII Zellen war nicht ausreichend.
- 2) Die verwendete humane SP-B cDNA wird nicht erfolgreich in Mauszellen prozessiert.

Zu 2) Die *in vitro* Versuche mit pWPX-SPB zeigten nur die Produktion des SP-B Vorläuferproteins in MLE12 Zellen. Es wäre möglich, dass dies nicht nur ein methodisches Problem war, durch die Verwendung von morphologisch veränderten ATII-Zellen, sondern das Problem an der im Vektor verwendeten cDNA lag. Bei dieser cDNA handelt es sich um die humane Variante, die mglw. nicht korrekt in murinen ATII-Zellen prozessiert werden kann. Andererseits wurde die gleiche cDNA von einem Kollegen erfolgreich in mRNA Form dazu verwendet, SP-B Mangel nach Aerosolapplikation zu behandeln [71]. Zumindest in dieser Form können murine ATII Zellen die humane Variante also verarbeiten. Daher fand eine genauere Überprüfung von Theorie 1 statt. Um weitere Anhaltspunkte für das Versagen der Therapie zu finden, wurde ein Transfervektor mit LacZ als Reportergen kloniert. Dieses Konstrukt war *in vitro* hervorragend dazu in der Lage alle drei Kontrollzelllinien zu transduzieren (siehe Abbildung 33). Mit Hilfe von pWPXLacZ konnte nun die Transduktionsverteilung innerhalb der Lunge histologisch nach verfolgt werden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte dabei analog zu der *in vivo* Studie von pWPX-SPB. Nach Begutachtung durch einen Pathologen ergaben sich folgende LacZ-positiven Zelltypen (siehe Abbildung):

- alveolare Makrophagen
- einzelne Alveolardeckepithelien
- respiratorisches Epithel in den Bronchiolen
- histozytäre Zellen in lymphatischen Aggregaten

Weiterhin konnte der Pathologe kein verstärktes Auftreten von alveolaren Makrophagen feststellen, was wiederum für die mehrfache Applizierbarkeit der LVV spricht. Der Vektorverlust durch die Transduktion von histozytären Zellen in den lymphatischen Aggregaten (eine Einrichtung des Immunsystems, die bei Säuglingen und Kindern auftritt, aber nur selten bei Erwachsenen [72]) ist wahrscheinlich unvermeidlich und muss in Kauf genommen werden.

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung bestätigt Theorie 1, dass nicht genug Zielzellen transduziert wurden. Es konnten nur vereinzelte, positive Alveolardeckepithelien gefunden werden. Das Alveolardeckepithel besteht aus zwei Zellarten: den flachen Pneumozyten Typ I, welche, obwohl sie nur ca. 40% der Zellmenge der Alveolen ausmachen, eine Oberfläche von 92 – 95% einnehmen und den kubischen Pneumozyten Typ II, welche zwar 60% der

vorhandenen Zellen ausmachen, aber aufgrund der Form nur ca. 5 – 8% der Oberfläche bilden [73]. Um eine erfolgreiche Gentherapie für SP-B Mangel durchführen zu können, ist es vernünftig davon auszugehen mehr als 20% der ATII Zellen transduzieren zu müssen. Denn Melton *et al.* haben einen Schwellenwert von ca. 25% des Wildtyp-SPB Levels für ein Überleben der konditionalen Knockout Mäuse ermittelt [37]. Da aber nur vereinzelte Alveolardeckepithelien positiv waren und von diesen Zellen nur ca. 5 – 8% ATII Zellen sind, ist es unwahrscheinlich diesen hohen Transduktionsgrad erreicht zu haben. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten LVV die ATII Zellen *in vivo* und *in vitro* transduzieren können, aber nicht in ausreichender Menge im Zielbereich ankommen. Dies liegt in erster Linie an der umfangreichen Transduzierbarkeit des respiratorischen Epithels in den Bronchiolen. Ausgehend von der Publikation von Buckley *et al.* [25], welche berichtete, dass die intranasale Applikation bei adulten Tieren von VSV-G pseudotypisierten LVV zu einer starken, fast ausschließlichen Transduktion der Alveoli und alveolaren Makrophagen führt, wurde das VSV-G Envelope ausgewählt. Dieses führt aber anscheinend zumindest in den hier verwendeten, konditionalen SP-B knockout Mäusen nicht zu der mehrheitlichen Transduktion des gewünschten Bereichs.

Für die Lösung dieses Problems sind mindestens zwei verschiedene Strategien in Betracht zu ziehen: Zum Einen sollten andere Applikationsmethoden, wie z.B. intratracheale Instillation, intratracheale Sprühapplikation oder Aerosolvernebelung ausgetestet werden. Möglicherweise ist bei einer dieser Varianten der rein physikalische Zugang zu den Alveoli besser. Zum Anderen ist die Neuentwicklung von anderen Pseudotypisierungen ein lohnender Ansatz. Ein zielgerichteter LVV könnte die benötigte Anzahl von ATII Zellen erreichen. Derzeit ist allerdings kein geeigneter Kandidat, der speziell Alveolarepithel anspricht, in Sicht.

Eine Option, um zumindest die Expression auf die Zielzellen zu beschränken bietet die Verwendung des zellspezifischen Promotors SP-B. Für diese konnte *ex vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden, nur in den Zielzellen zu exprimieren [69, 74]. Der *in vitro* Versuch dieser Arbeit konnte eine erfolgreiche Langzeitexpression in A549 und MLE12 Zellen nachweisen. Dank der wiederholten Applizierbarkeit könnte so möglicherweise irgendwann eine ausreichend hohe Anzahl transduzierter Zielzellen erreicht werden. Bis zum Finden eines spezifischeren Envelope-Proteins, ist die Verbesserung des

Zugangs zu den Alveoli aber ein vielversprechenderer Ansatz. Es ist dabei auch wichtig zu bedenken, dass die Applikation in eine humane Lunge anders von statten gehen wird, als durch intranasale Instillation. Hier ist z.B. die Verwendung eines Bronchioskops und die Einleitung der Vektoren über eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) denkbar. Dieses Verfahren könnte nur sehr schwer in den Mauslungen überprüft werden, wegen der geringen Größe. Aber höchstwahrscheinlich wäre ein Rattenmodell für diese Überprüfung geeignet.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass lentivirale Vektoren mit einer VSV-G Pseudotypisierung in der Lage sind alveolare Epithelzellen vom Typ II zu transduzieren. Einer erfolgreichen SP-B Gentherapie stand aber im Wege, dass keine ausreichende Transduktion stattfand. Das hatte zwei Gründe. Zum Einen sind die ATII Zellen innerhalb der Alveolen sehr schwer zugänglich, da sie aufgrund ihrer Form nur maximal 8% des alveolaren Deckepithels ausmachen. Zum Anderen war durch die Applikation via nasale Instillation eine massive Transduktion des Bronchialepithels möglich, da sich dort die Vektoren eher und wahrscheinlich auch länger befinden und nur ein Bruchteil bis in die Alveolen gelangt. Die beste Lösung wäre das Finden einer Pseudotypisierung die die ausschließliche Transduktion von alveolarem Deckepithel ermöglichen würde. Derzeit gibt es jedoch keine aussichtsreichen Kandidaten dafür. Daher wäre der nächste mögliche Schritt für die Etablierung einer HIV-1 basierten Gentherapie für SP-B Mangel eine Verbesserung der Applikationsmethode. Würden mehr LVV in den Alveolen ankommen, könnte, nicht zuletzt auch wegen der Reapplizierbarkeit, eine ausreichend hohe Transduktionsrate erreicht werden. Eine vorstellbare Methode, wie eine Applikation an Neugeborenen aussehen könnte, ist die Technik der bronchoalveolären Lavage. Naheliegend ist deswegen die Erprobung dieser Technik und der damit erreichbaren Transduktionsraten im Zielbereich im Tiermodell. Derzeit gibt es keine verfügbaren Methoden, um eine BAL an lebenden Mäusen durchzuführen. Neben der Neuentwicklung einer solchen Methode, wäre auch der Wechsel auf ein Rattentiermodell denkbar. Zusätzlich zu der Einleitungsmethode über eine BAL sollten allerdings auch andere verfügbare Applikationswege überprüft werden. Dazu gehören intratracheale Instillation, intratracheale Sprühapplikation oder Aerosolvernebelung. Gerade bei einer intratrachealen

Sprühapplikation könnte der Zugang zu den Alveolen verbessert sein, durch die geringe Größe der Tröpfchen.

Eine weitere wichtige, zu beantwortende Frage ist, inwiefern die hier beobachtete Langzeitexpression im Mausmodell von den strengen hygienischen Haltungsbedingungen abhängt. Würde die Expression unter normalen Umwelteinflüssen, welche das Lungengewebe schädigen und eine Reparatur nötig machen, abnehmen? Dazu wäre es denkbar eine mit pWPXLmG* behandelte Gruppe im Tierversuch schädigenden Substanzen auszusetzen. Um eine Pathogenbelastung zu simulieren, könnten Lipopolysaccharide instilliert werden. Eine Toxinbelastung könnte bspw. mit Schwefelsäuredämpfen nachgeahmt werden. Die Langzeit-Luciferaseexpression dieser Gruppe/n müssten dann mit denen einer ungeschädigten Gruppe verglichen werden. Sollte es keine Unterschiede geben, so kann von der Transduktion einer teilungsfähigen Zellpopulation ausgegangen werden, was für die Möglichkeit einer einmaligen Behandlung und damit Heilung sprechen würde.

5 Anhang

5.1 Zusammenfassung

Surfactant Protein B Mangel ist ein angeborener Gendefekt, der dazu führt, dass der Surfactant der Lunge die Oberflächenspannung in den Alveolen nicht ausreichend herabsetzen kann. Infolgedessen kann die Lunge bei Neugeborenen mit dieser Mutation nicht arbeiten. Es kommt zu Atemversagen und die einzige derzeitig verfügbare Therapie ist eine Lungentransplantation. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich lentivirale Vektoren für eine Gentherapie von Alveolaren Epithelzellen des Typs II (ATII) zur Behandlung von Surfactant Protein B Mangel einsetzen lassen. Eine vorhergehende Veröffentlichung hatte gezeigt, dass VSV-G pseudotypisierte LVV Alveolarepithel und alveolare Makrophagen bevorzugt infizieren. Um LVV für solche Studien herstellen zu können, wurde eine umfangreiche Produktionsoptimierung durchgeführt, an deren Ende Titer im Bereich von $2 \cdot 10^8$ IP/mL erreicht wurden. Die Besonderheiten der Optimierung lagen zum Einen in der Verwendung von PDL beschichteten Zellkulturplatten. Durch dieses Vorgehen konnten problemlos $7,5 \cdot 10^6$ Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät werden, so dass am Tag der Transfektion mit IPEI eine 100% Konfluenz der Zellen vorlag. Die andere Besonderheit war die Verwendung einer Ultrafiltration anstelle einer Ultrazentrifugation zur Reinigung und Konzentrierung der lentiviralen Partikel. Im Anschluss wurde ein geeigneter interner Promotor für den Transfervektor gesucht. Diese Promotoren wurden verglichen: humaner Elongationsfaktor 1 α , Ubiquitin B & C, Cytomegalovirus und Surfactant Protein B. Die Wahl fiel auf den EF1 α Promotor, da er eine stabile Langzeitexpression über 150 Tage *in vitro* und eine gute Produzierbarkeit aufwies. Diese stabile Langzeitexpression eines Luciferase-Reportergens konnte auch *in vivo* auf Lebenszeit der Mäuse nachgewiesen werden. Dafür wurden 10.000 IP intranasal instilliert, ohne eine sonst übliche Vorbehandlung durch bspw. Lysophosphatidylcholin. Eine *in vitro* Überprüfung des Transfervektors mit dem therapeutischen SP-B Gen ergab in HEK293T, A549 und MLE12 Zellen die Sekretion einer SP-B Vorstufe. Die *in vivo* Überprüfung dieses LVV war nicht erfolgreich. Selbst konditionale SP-B Knock out Mäuse, die eine dreimalige Dosis erhalten hatten, waren nicht überlebensfähig. Zur Überprüfung wurde ein Transfervektor mit LacZ Reporter gen kloniert und wie der SP-B enthaltende LVV appliziert. Die

Begutachtung durch einen Pathologen ergab zwar die erfolgreiche Transduktion der Zielzellen, wie auch schon in den *in vivo* Versuchen. Allerdings war die Transduktionseffizienz im alveolaren Deckepithel so gering, dass kein positiver Effekt in Erscheinung trat. Grund dafür war eine umfangreiche Transduktion des Bronchialepithels, so dass nicht mehr ausreichend Vektoren in die Alveolarregionen vordringen konnten. Für eine erfolgreiche SP-B Gentherapie muss die Applikationsroute entscheidend verbessert werden – was z.B. durch eine bronchoalveoläre Lavage oder eine Aerosolapplikation geschehen könnte.

5.2 Summary

Surfactant Protein B deficiency is an inherited genetic disorder, causing the malfunction of pulmonary surfactant. The lung of newborn with this disorders cannot work correctly, leading to respiratory distress which can only be treated by a lung transplantation in the moment. Therefore, this work deals with the possible use of lentiviral vectors as a gene therapy vehicle to Alveolar Type II cells in order to treat SP-B deficiency. A previous publication showed that VSV-G pseudotyped LVV are predominantly transducing alveolar epithelium and macrophages.

To be able to produce suitable amounts of LVV for doing these studies, an extensive production optimization took place, with final titers around $2 \cdot 10^8$ IP/mL. Special in the chosen production process were on the one hand the usage of PDL coated cell culture surfaces, which allowed a very good handling and high transfection efficiencies. On the other hand, it was special to replace the usual ultracentrifugation by an ultrafiltration for purification and concentration of the vector containing supernatants.

Subsequently, a suitable internal promoter for the transfer vector was determined. The following elements were compared: human Elongation Factor 1 α , Ubiquitin B & C, Cytomegalovirus and Surfactant Protein B. The favored promoter was EF1 α , due to its stable long term expression over 150 days *in vitro* and its good producibility. The stable long term expression of a Luciferase reporter gene could also be observed *in vivo*, for the whole life time of the mice. This life time expression is very promising, because it was achieved with only 10.000 IP, which were instilled nasally, without any pretreatment with i.e. Lysophosphatidylcholin. An *in vitro* testing of the transfer vector containing the therapeutic SP-B Gene showed a successful secretion of a SP-B preproprotein in HEK293T, A549 and MLE12 cells. But nethertheless, an *in vivo* study was not successful. Even conditional SP-B knock out mice, which received three doses of $1 \cdot 10^8$ IP on average, were not able to survive. As a control a transfer vector with a LacZ reporter gene was cloned and applied according to the protocol used for the SP-B *in vivo* study. The expert opinion of a pathologist made clear that there was successful transduction of the target cells, but on a far too low level. This was most possibly due to the extensive transduction of bronchial epithelium, sparing not enough vector to reach high transduction in alveolar region. According to this result VSV-G pseudotype is – at least in the used mouse model – not

predominantly targeting alveolar cells. For a successful SP-B gene therapy it is vital to improve the application route. Possible would be i.e. a bronchoalveolar lavage or an application as an aerosol.

5.3 Referenzen

1. Cichutek, K., *Gentherapie: Gut' Ding will Weile haben*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2001. **44**(11): p. 1029-1030.
2. Cichutek, K., et al., *Regulatorische Aspekte der Anwendung von Gentransfer-Arzneimitteln in der Humanmedizin*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2001. **44**(11): p. 1083-1089.
3. Friedmann, T., *The future for gene therapy--a reevaluation*. Ann N Y Acad Sci, 1976. **265**: p. 141-52.
4. Friedmann, T. and R. Roblin, *Gene therapy for human genetic disease?* Science, 1972. **175**(25): p. 949-55.
5. Brenner, M.K., et al., *Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients*. Lancet, 1993. **342**(8880): p. 1134-7.
6. *The ADA human gene therapy clinical protocol*. Hum Gene Ther, 1990. **1**(3): p. 327-62.
7. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
8. Gaspar, H.B., et al., *Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector*. Lancet, 2004. **364**(9452): p. 2181-7.
9. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 255-6.
10. Ryser, M.F., et al., *Gene therapy for chronic granulomatous disease*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(12): p. 1799-809.
11. Jones, I.M. and Y. Morikawa, *The molecular basis of HIV capsid assembly*. Rev Med Virol, 1998. **8**(2): p. 87-95.
12. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
13. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
14. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
15. Klein, R., et al., *WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific*. Gene, 2006. **372**: p. 153-61.
16. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11382-8.
17. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
18. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
19. Nogee, L.M., et al., *Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis*. N Engl J Med, 1993. **328**(6): p. 406-10.

-
20. Noguee, L.M., et al., *A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1860-3.
 21. Moulton, S.L., et al., *Congenital pulmonary alveolar proteinosis: failure of treatment with extracorporeal life support*. J Pediatr, 1992. **120**(2 Pt 1): p. 297-302.
 22. Hamvas, A., et al., *Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency*. J Pediatr, 1997. **130**(2): p. 231-9.
 23. Salzwedel, K. and E.A. Berger, *Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12794-9.
 24. Zavada, J., *The pseudotypic paradox*. J Gen Virol, 1982. **63** (Pt 1): p. 15-24.
 25. Buckley, S.M., et al., *Lentiviral transduction of the murine lung provides efficient pseudotype and developmental stage-dependent cell-specific transgene expression*. Gene Ther, 2008. **15**(16): p. 1167-75.
 26. Cormack, R.S. and I.E. Somssich, *Ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction (UFX)*. Technical Tips Online, 1997. **2**(1): p. 151-152.
 27. ATCC. *Product Catalogue CRL-11268*. [cited; Available from: <https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-11268&Template=cellBiology>].
 28. Foster, K.A., et al., *Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism*. Exp Cell Res, 1998. **243**(2): p. 359-66.
 29. Wikenheiser, K.A., et al., *Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11029-33.
 30. Lindl, T. and G. Gstraunthaler, *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*. Vol. 6. Auflage. 2008: Spektrum Akademischer Verlag.
 31. Brissault, B., et al., *Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection*. Bioconj Chem, 2003. **14**(3): p. 581-7.
 32. Ungaro, F., et al., *Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations*. J Pharm Biomed Anal, 2003. **31**(1): p. 143-9.
 33. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
 34. de Poorter, J.J., et al., *Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs)*. J Gene Med, 2007. **9**(8): p. 639-48.
 35. Coelen, R.J., D.G. Jose, and J.T. May, *The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV*. Arch Virol, 1983. **75**(4): p. 307-11.
 36. Jülich, F. [cited; Available from: <http://www.zoologie-skript.de/methoden/screen/reportl.htm>].
 37. Melton, K.R., et al., *SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(3): p. L543-9.

-
38. Resources, R.A. [cited; Available from: http://www.ahc.umn.edu/rar/facial_vein.html.
 39. Schorpp, M., et al., *The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(9): p. 1787-8.
 40. Yew, N.S., et al., *High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter*. Mol Ther, 2001. **4**(1): p. 75-82.
 41. Xia, W., et al., *High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines*. Protein Expr Purif, 2006. **45**(1): p. 115-24.
 42. Zhao, Q.Q., et al., *N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(4): p. 706-10.
 43. Briggs, J.A., et al., *The stoichiometry of Gag protein in HIV-1*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(7): p. 672-5.
 44. Hawgood, S., M. Derrick, and F. Poulain, *Structure and properties of surfactant protein B*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1408**(2-3): p. 150-60.
 45. Rigg, R.J., et al., *A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety*. Virology, 1996. **218**(1): p. 290-5.
 46. Merten, O.W., *State-of-the-art of the production of retroviral vectors*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S105-24.
 47. Forestell, S.P., et al., *Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer*. Gene Ther, 1997. **4**(6): p. 600-10.
 48. Printz, M., et al., *Recombinant retroviral vector interferes with the detection of amphotropic replication competent retrovirus in standard culture assays*. Gene Ther, 1995. **2**(2): p. 143-50.
 49. Martineau, D., et al., *Evaluation of PCR and ELISA assays for screening clinical trial subjects for replication-competent retrovirus*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(10): p. 1231-41.
 50. Claudio, P.P. *Method for quantification of recombinant viruses*. 2004 [cited; Available from: <http://www.freepatentsonline.com/y2009/0061414.html>.
 51. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
 52. Marino, M.P., M.J. Luce, and J. Reiser, *Small- to large-scale production of lentivirus vectors*. Methods Mol Biol, 2003. **229**: p. 43-55.
 53. Mochizuki, H., et al., *High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8873-83.
 54. Salmon, P. and D. Trono, *Production and titration of lentiviral vectors*. Curr Protoc Neurosci, 2006. **Chapter 4**: p. Unit 4 21.
 55. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Production and purification of lentiviral vectors*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 241-5.

-
56. Mazur, P., S.P. Leibo, and E.H. Chu, *A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.* Exp Cell Res, 1972. **71**(2): p. 345-55.
 57. PromegaCorporation. *BSA and Restriction Enzyme Digestions.* 1996 [cited; Available from: http://www.promega.com/pnotes/59/5644h/5644h_core.pdf.
 58. Brooks, A.R., et al., *Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle.* J Gene Med, 2004. **6**(4): p. 395-404.
 59. Qin, J.Y., et al., *Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter.* PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10611.
 60. Stocker, A.G., et al., *Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression.* J Gene Med, 2009. **11**(10): p. 861-7.
 61. Kremer, K.L., et al., *Gene delivery to airway epithelial cells in vivo: a direct comparison of apical and basolateral transduction strategies using pseudotyped lentivirus vectors.* J Gene Med, 2007. **9**(5): p. 362-8.
 62. Blenkinsopp, W.K., *Proliferation of respiratory tract epithelium in the rat.* Exp Cell Res, 1967. **46**(1): p. 144-54.
 63. Bowden, D.H., *Cell turnover in the lung.* Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(2 Pt 2): p. S46-8.
 64. Rawlins, E.L. and B.L. Hogan, *Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(1): p. L231-4.
 65. Rawlins, E.L. and B.L. Hogan, *Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?* Development, 2006. **133**(13): p. 2455-65.
 66. Rock, J.R., et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12771-5.
 67. Sinn, P.L., et al., *Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses.* J Virol, 2008. **82**(21): p. 10684-92.
 68. Kimura, T., et al., *Lentiviral vectors with CMV or MHCII promoters administered in vivo: immune reactivity versus persistence of expression.* Mol Ther, 2007. **15**(7): p. 1390-9.
 69. Wunderlich, S., et al., *Type II pneumocyte-restricted green fluorescent protein expression after lentiviral transduction of lung epithelial cells.* Hum Gene Ther, 2008. **19**(1): p. 39-52.
 70. Sinn, P.L., E.R. Burnight, and P.B. McCray, Jr., *Progress and prospects: prospects of repeated pulmonary administration of viral vectors.* Gene Ther, 2009. **16**(9): p. 1059-65.
 71. Kormann, M.S., et al., *Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice.* Nat Biotechnol. **29**(2): p. 154-7.
 72. Chiavolini, D., et al., *Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and survival in a vaccine mouse model of tularemia.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11156.
 73. Encyclopædia Britannica. *Type I pneumocyte.* 17.02.2011 [cited; Available from: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/611619/type-I-pneumocyte>.
 74. Strayer, M.S., S.H. Guttentag, and P.L. Ballard, *Targeting type II and Clara cells for adenovirus-mediated gene transfer using the surfactant protein B promoter.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(1): p. 1-11.

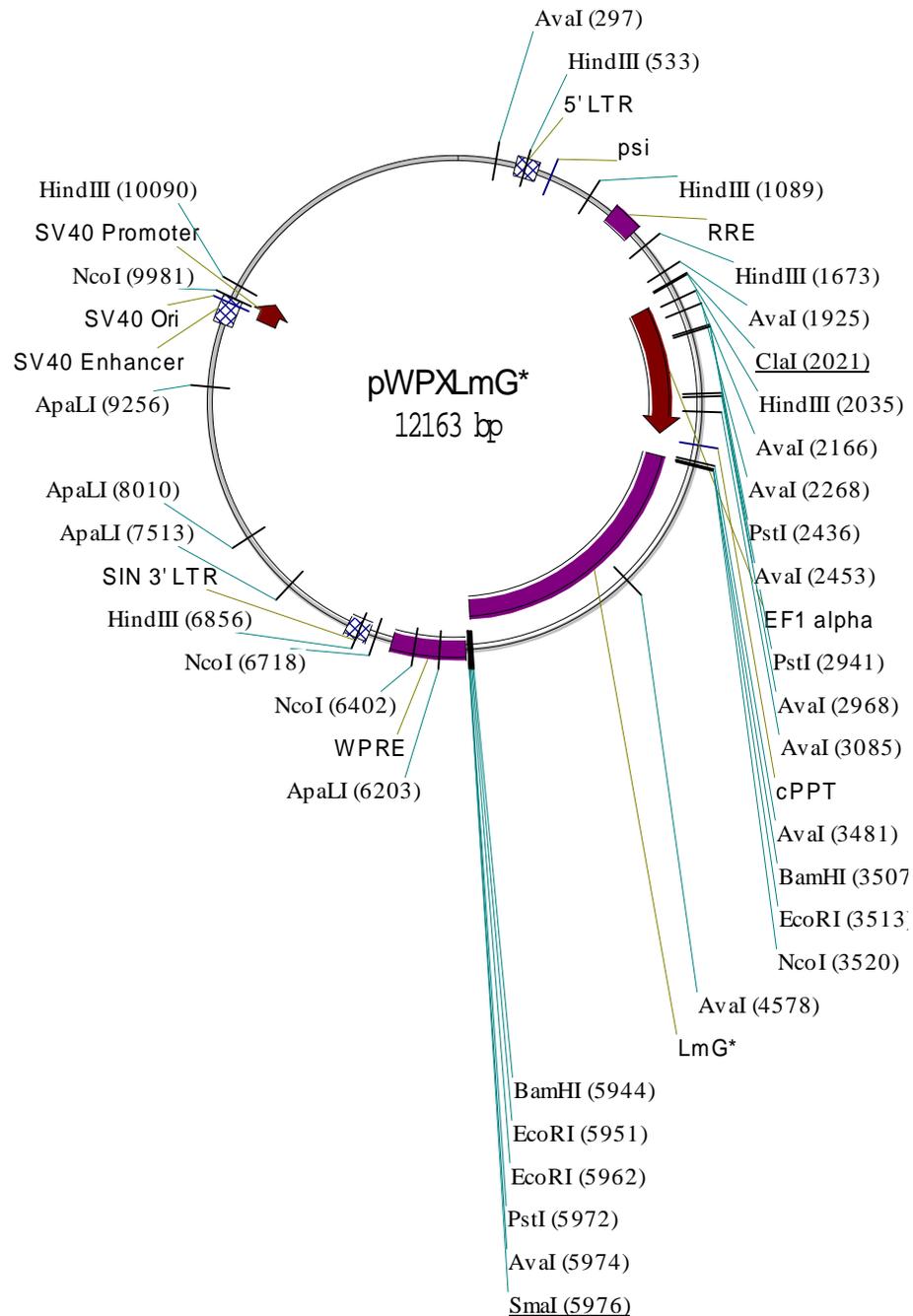
5.4 Vektorkarten

Abbildung 35 Vektorkarte pWPXLmG*

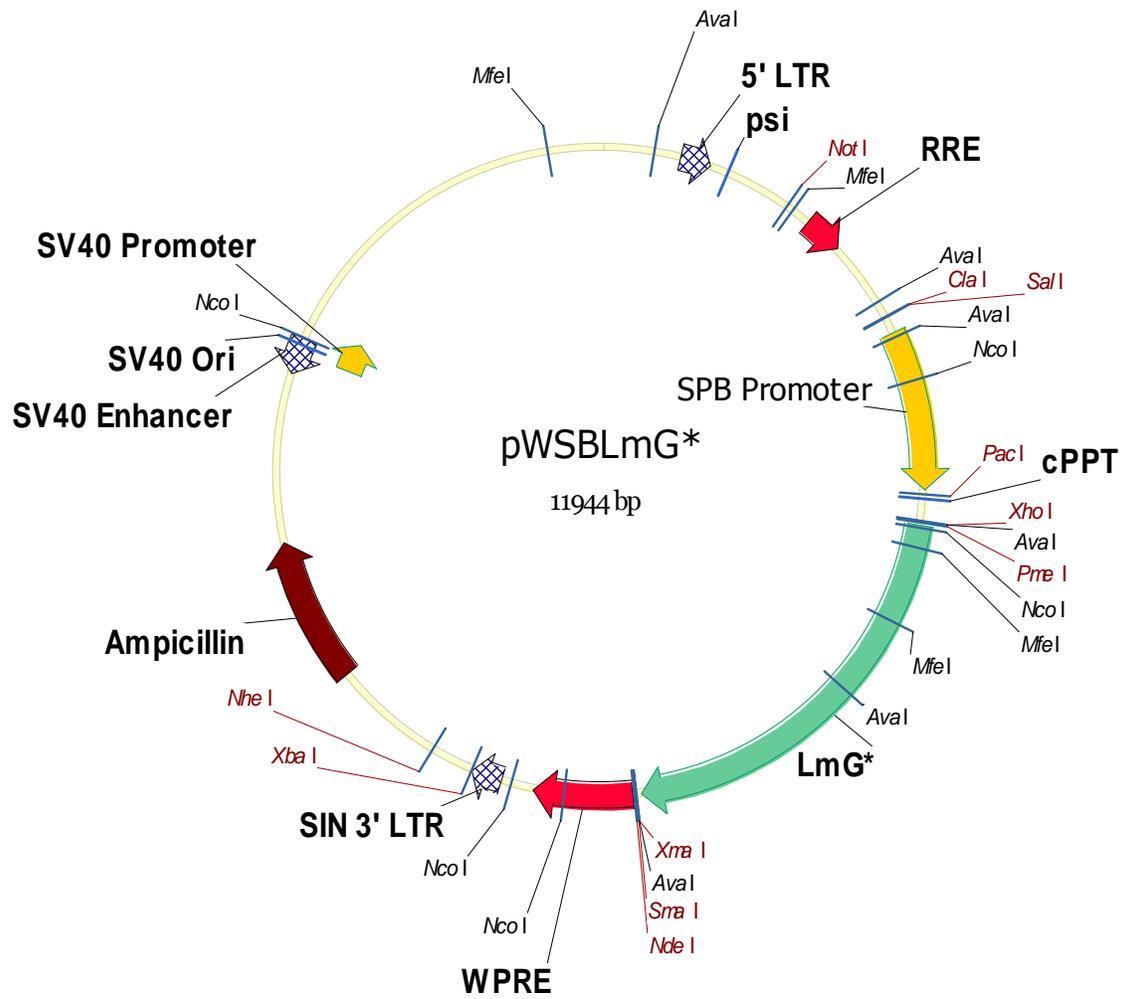


Abbildung 36 Vektorkarte pWSBLmG*

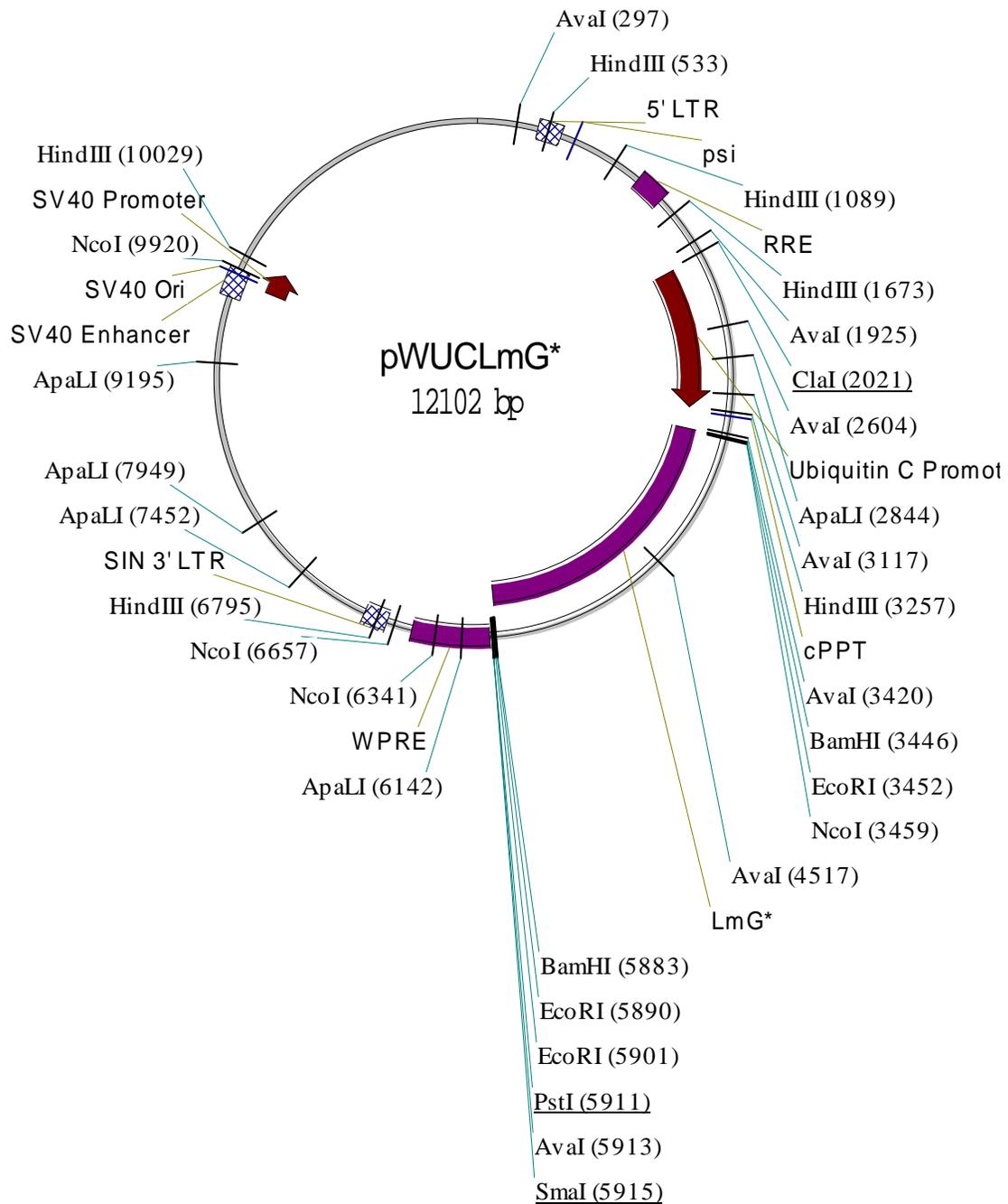


Abbildung 37 Vektorkarte pWUCLmG*

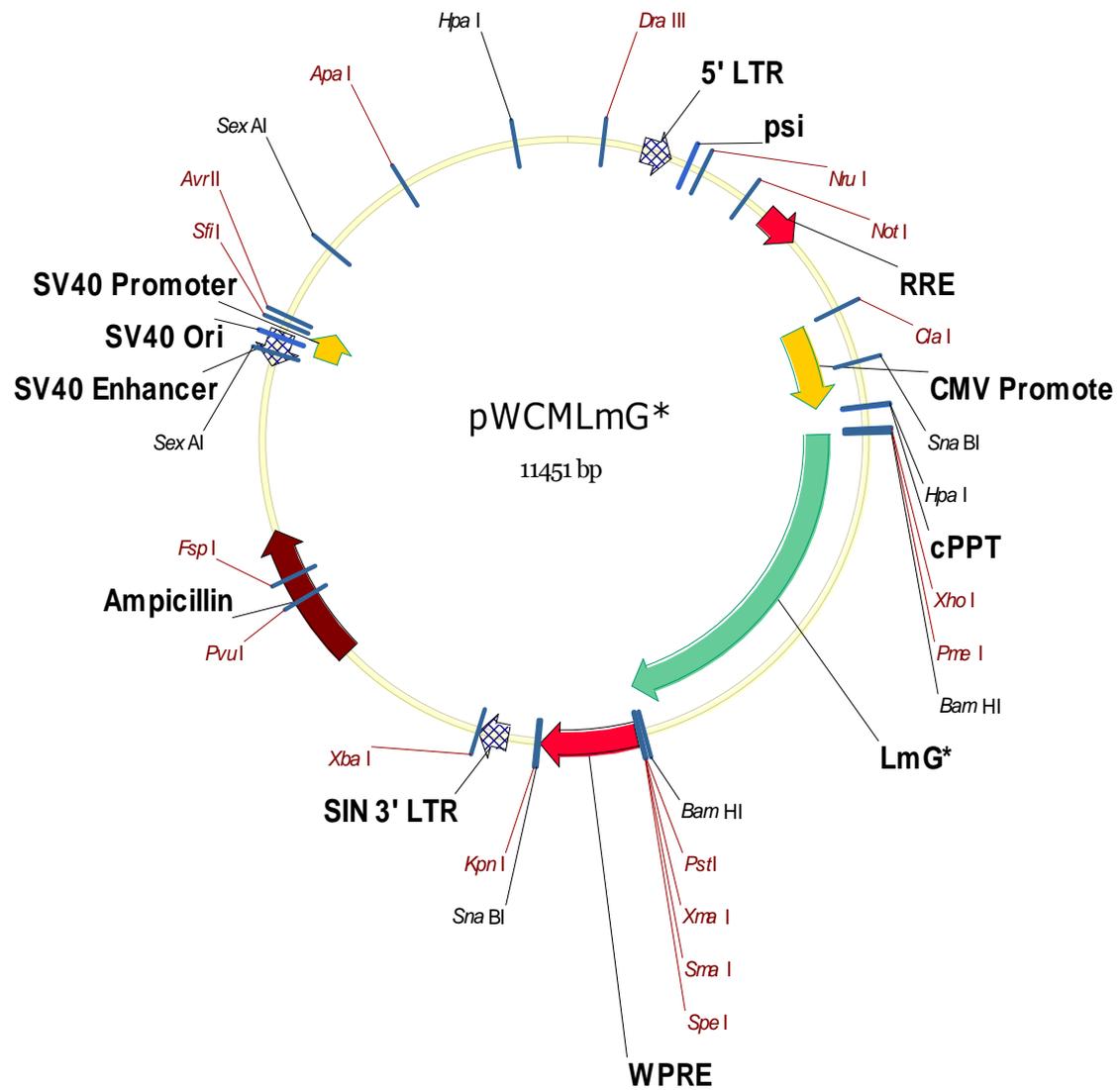


Abbildung 38 Vektorkarte pWCMLmG*

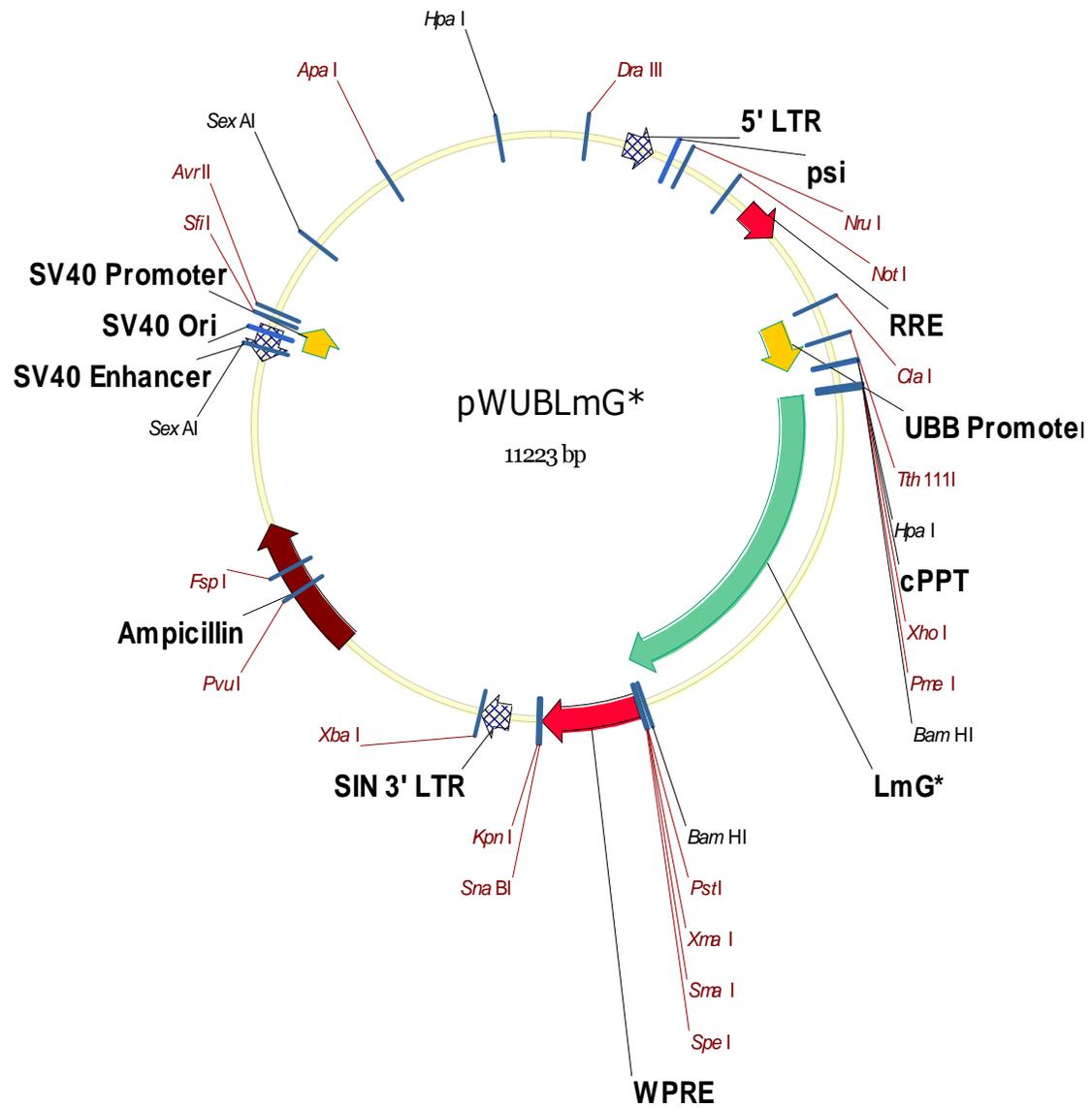


Abbildung 39 Vektorkarte pWUBLmG*

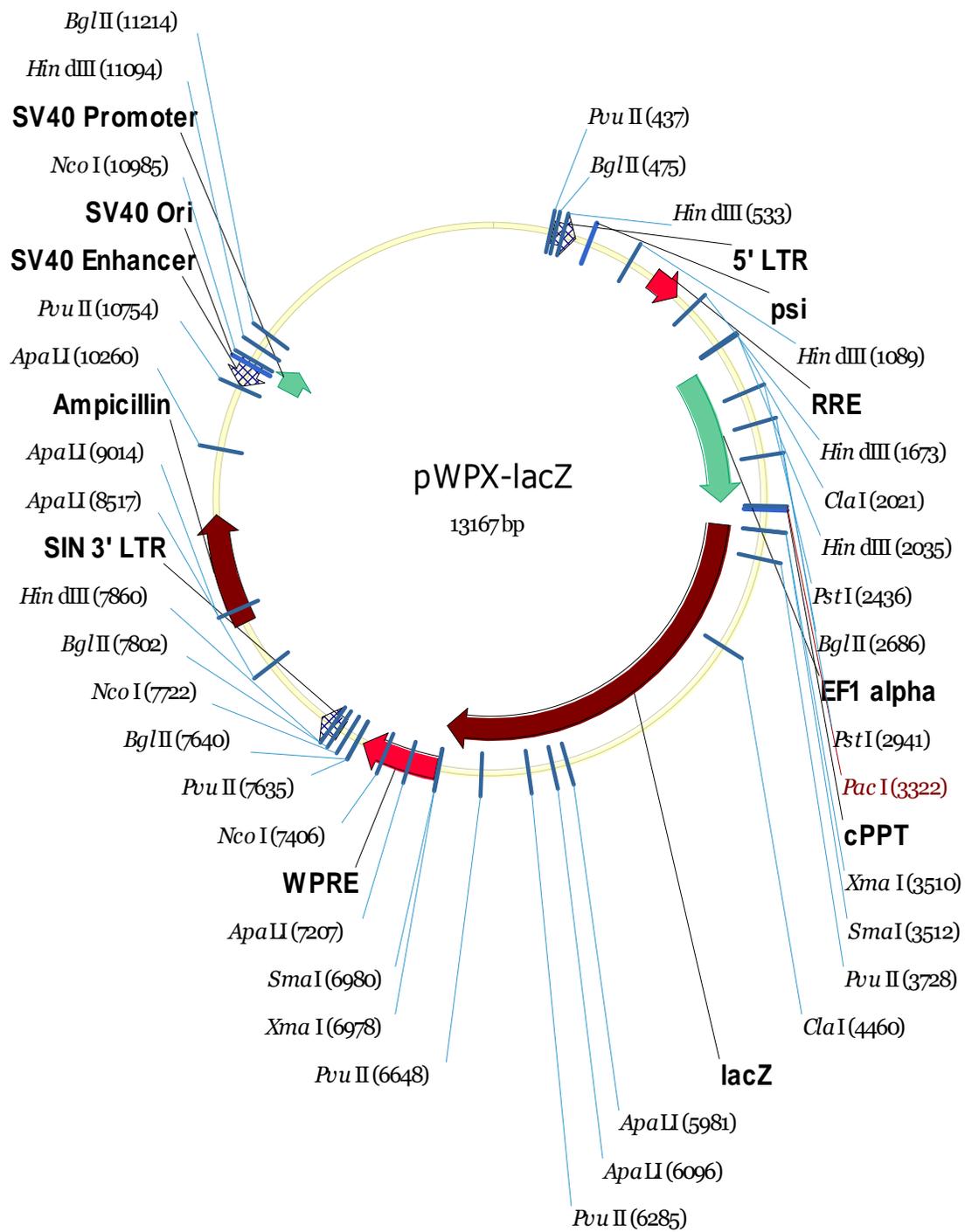


Abbildung 36 Vektorkarte pWPXLacZ

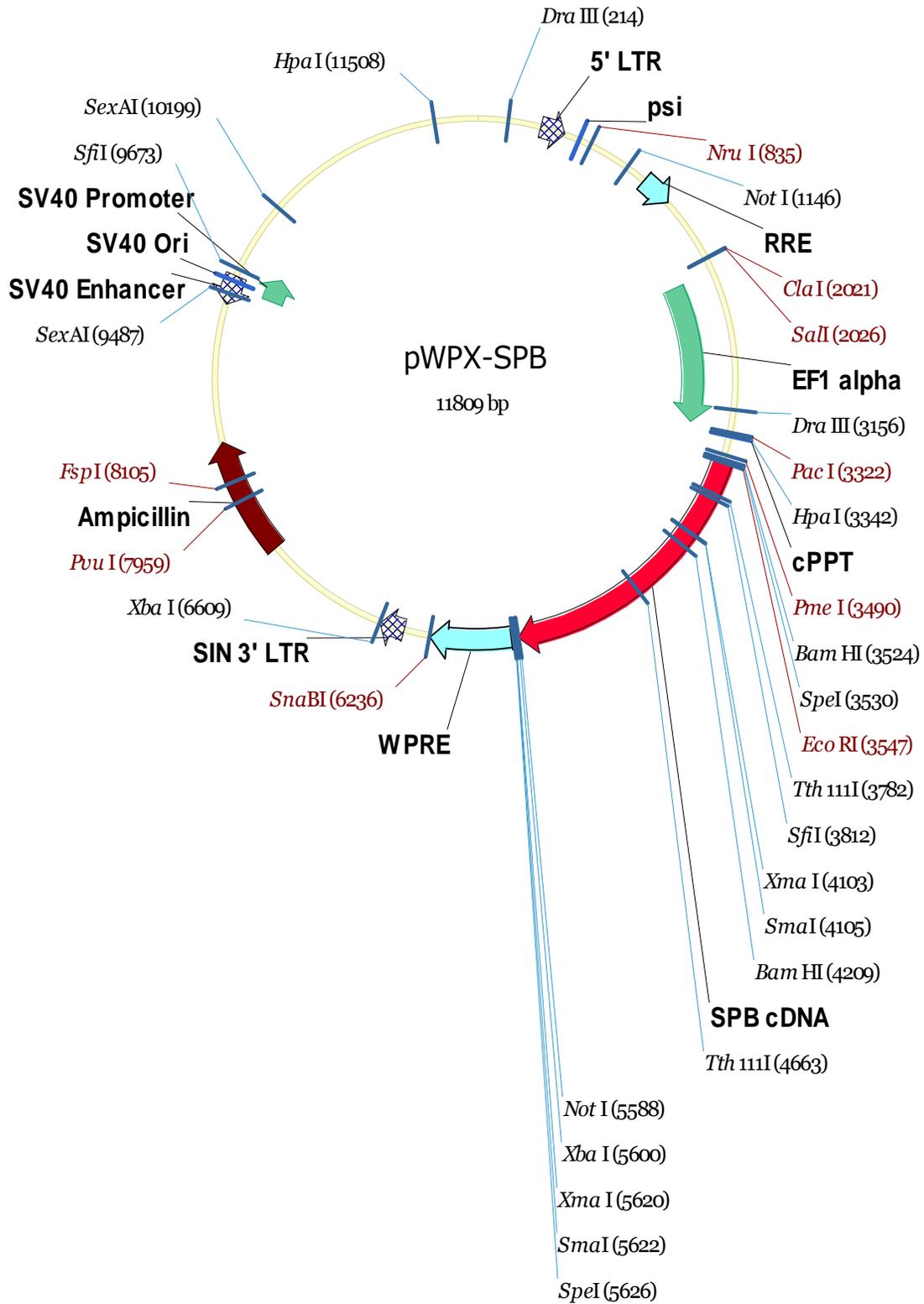


Abbildung 37 Vektorkarte pWPX-SPB

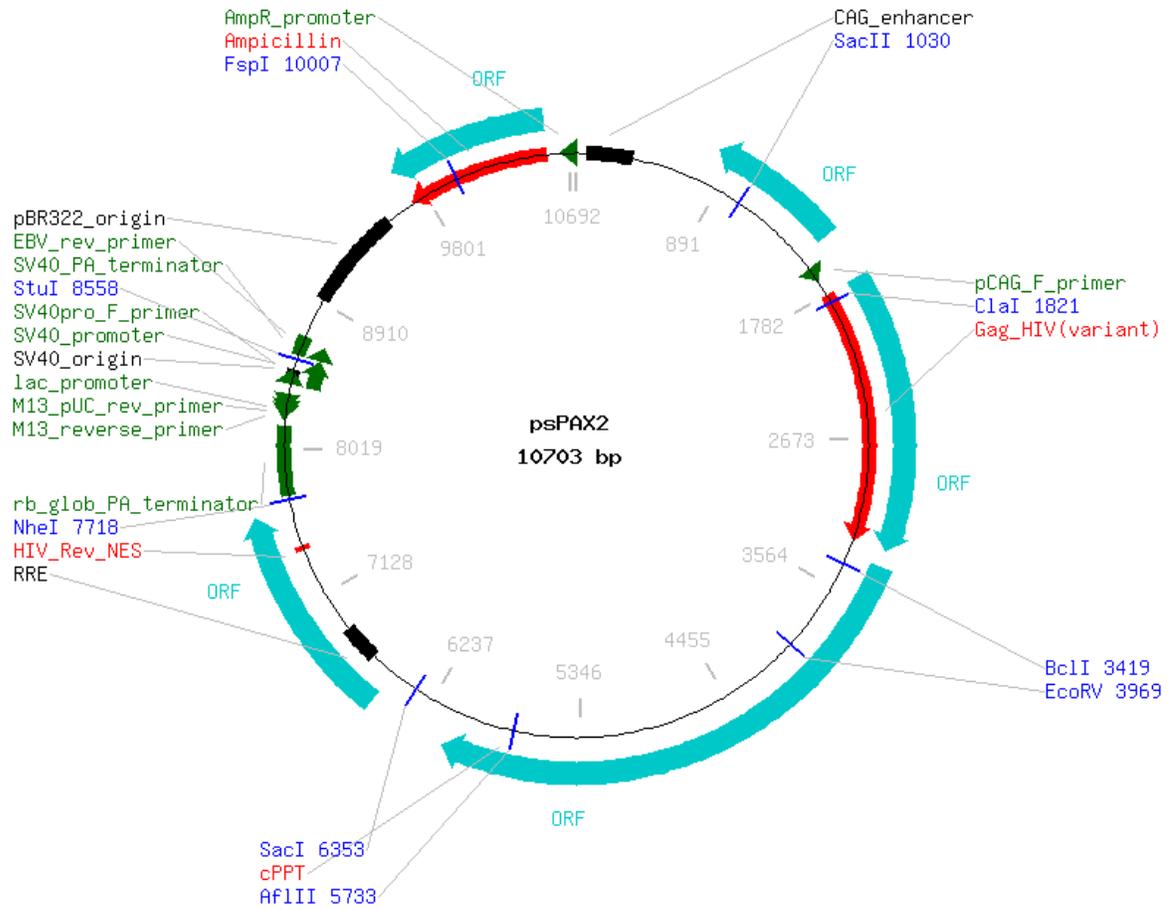


Abbildung 38 Vektorkarte psPAX2 Verpackungsplasmid mit gag und pol

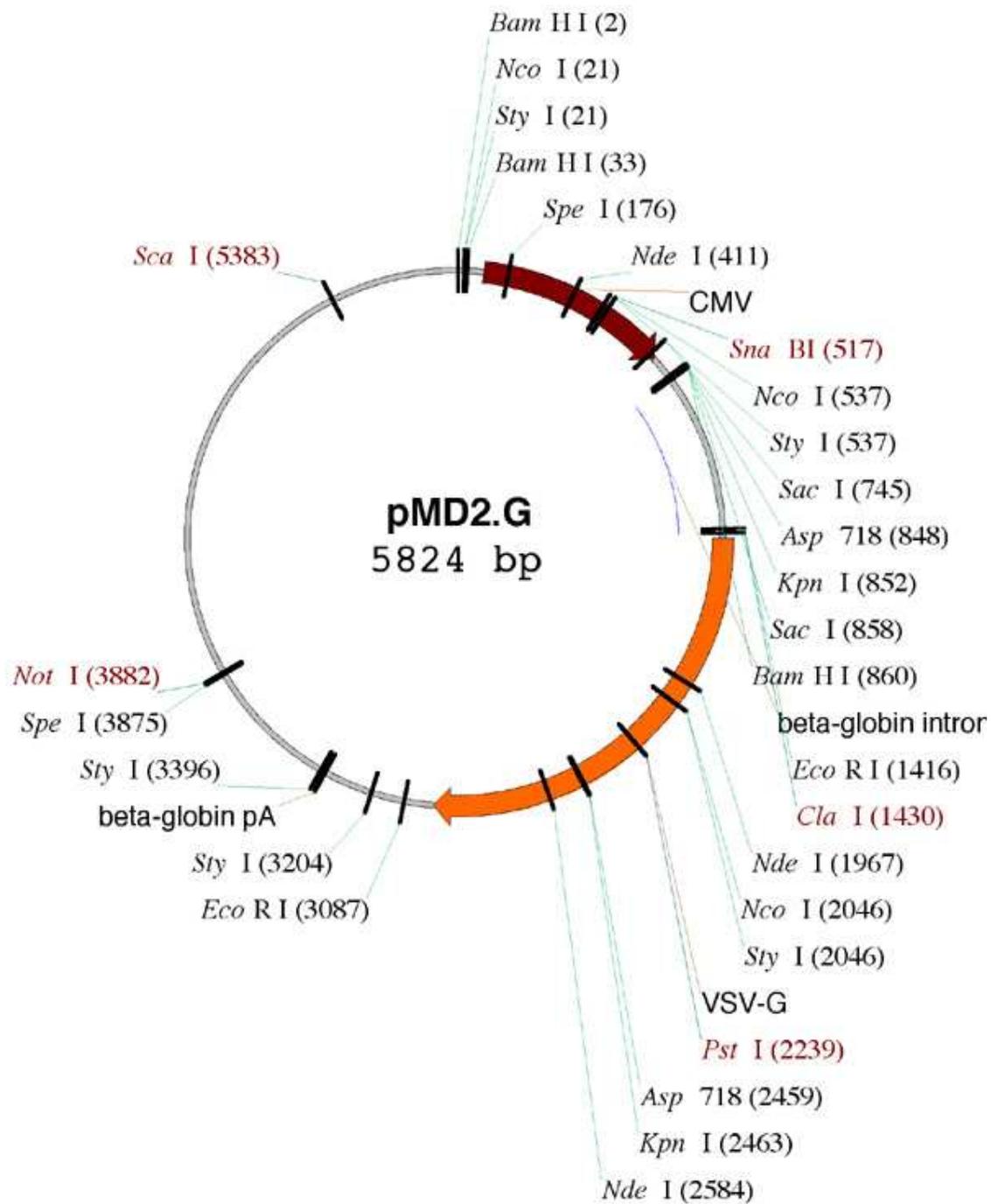


Abbildung 39 Vektorkarte pMD2.G Verpackungsplasmid mit env

5.5 Primer

Tabelle 8 Verwendete Primer

Oligoname	Sequenz 5' zu 3'
SP-UB-SalI	CCCGTCGACACCTAGGTCGAGGAGGGGTTTC
AP-UB-PacI	CCTTAATTAACCTGCCAATCACCAACCACGTC
SP-SPB-SalI	CCCGTCGACCGAGTATAGAGGCCTGTGAGC
AP-SPB-PacI	CCTTAATTAACCACTGCAGCAGGTGTGACTCAGCCAGGGC
SP-SPC-SalI	CCCCGTCGACGCCTAGAGGGAAGCTAAAGC
AP-SPC-PacI	CCTTAATTAATCTCGACGGTCCACTCTCC
SP-tv	CGCACGGCAAGAGGC
AP-tv	GCATTCCAAGGCACAGCAG
SP-LacZ	GCCTCGACTCTAGGCGGCCGCGGGGATC
AP-LacZ	CGGATCCTAGAGTCGAGGC

5.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau HIV-1	5
Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines lentiviralen Vektors	7
Abbildung 3 Schema einer transienten Vektorproduktion	8
Abbildung 4 1 kb DNA Ladder von PlasmidFactory	14
Abbildung 5 Primerdesign zur Einführung neuer Schnittstellen	20
Abbildung 6 HEK293T Zellen unter dem Mikroskop	22
Abbildung 7 Hydrodynamische Fokussierung und Strahlengang eines Durchflusszytometers.	28
Abbildung 8 Beispiel für eine FACS Auswertung.....	29
Abbildung 9 GFP-positive Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.....	29
Abbildung 10 Durchführung einer Titration	33

Abbildung 11 Schemata der Titrationsen mittels A) FACS-Analyse und B) Real-Time PCR.....	34
Abbildung 12 Luciferase-Reaktion.....	35
Abbildung 13 Prinzip des verwendeten Western Blots	37
Abbildung 14 Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard, Bio-Rad	39
Abbildung 15 Beispiel des Ergebnisses einer <i>In vivo</i> Bildgebung.	42
Abbildung 16 Lage der Gesichtsvene	43
Abbildung 17 Kontrollverdau von pWPXLmG*.....	48
Abbildung 18 Elektrophoretische Auftrennung der Kontrollverdaue	50
Abbildung 19 Vergleich der möglichen Transfektionsreagenzien.	51
Abbildung 20 Ermittlung des besten N/P Verhältnisses.....	53
Abbildung 21 Vergleich der Oberflächenbeschichtung.	54
Abbildung 22 Vergleich verschiedener Ultrafiltrationseinheiten.	57
Abbildung 23 Reinigungsverlauf anhand der FBS-Menge auf einer SDS-PAGE	57
Abbildung 24 Vergleich der unterschiedlichen Lagermethoden.....	59
Abbildung 25 Effekt der Promotorelemente auf die biologischen Titer	60
Abbildung 26 Langzeit <i>in vitro</i> Vergleich der verschiedenen Promotorkonstrukte	62
Abbildung 27 Vergleich der Expression am Tag 32 (oben) und am Tag 317.	63
Abbildung 28 Langzeitexpression von pWPXLmG* <i>in vivo</i>	64
Abbildung 29 Quantitative Langzeitüberprüfung der Leukozyten.....	64
Abbildung 30 Organdistribution des Vektors pWPXLmG*.....	66
Abbildung 31 Schema von pWPX-SPB in seiner proviralen Form.	66
Abbildung 32 Western Blots des <i>in vitro</i> getesteten SP-B Proteins	67
Abbildung 33 <i>In vitro</i> Funktionalität von pWPXLacZ.	69
Abbildung 34 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Lungenschnitte.	70
Abbildung 35 Vektorkarte pWPXLmG*	94
Abbildung 36 Vektorkarte pWSBLmG*	95
Abbildung 37 Vektorkarte pWUCLmG*	96
Abbildung 38 Vektorkarte pWCMLmG*.....	97
Abbildung 39 Vektorkarte pWUBLmG*	98
Abbildung 40 Vektorkarte pWPXLacZ	99
Abbildung 41 Vektorkarte pWPX-SPB.....	100

Abbildung 42 Vektorkarte psPAX2 Verpackungsplasmid mit gag und pol	101
Abbildung 43 Vektorkarte pMD2.G Verpackungsplasmid mit env.....	102

5.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Bestandteile des HIV-1 Genoms und ihre Funktion.....	6
Tabelle 2 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	17
Tabelle 3 Liste der verwendeten Geräte.....	47
Tabelle 4 Verwendete Promotoren.....	49
Tabelle 5 Ergebnis des Vergleichs unterschiedlicher Plasmidverhältnisse und – mengen.	52
Tabelle 6 Vergleich der unterschiedlichen Aussaatdichten	53
Tabelle 7 Übersicht Produktions- und Transduktionsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren.....	55
Tabelle 8 Verwendete Primer	103

5.8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ad.	addieren; auffüllen auf ... mit
Bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
cPPT	zentraler Polypurintrakt
D-MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1a	Elongationsfaktor 1 alpha
EMA	European Medicines Evaluation Agency
Env	Envelope = Virushülle aus Glykoproteinen
EUFETS	Europäisches Institut für Forschung und Entwicklung von Transplantationsstrategien
FACS	Floureszenz-aktivierte Sortierung von Zellen
FBS	Fötales bovines Serum
Gag	group specific antigen = Capsid- und Matrixproteine
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBS	Hepes buffered Saline
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IP	Infektiöser Partikel
IHRES	Interne ribosomale Einstiegssequenz
Kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Broth
LmG*	Fusionsprotein aus Luciferase und GFP
LTR	long terminal repeats (Lange terminale Wiederholungen)
LVV	Lentiviraler Vektor
MLV	Murines Leukämie Virus
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

Abkürzung	Bedeutung
nef	negative factor
pA	Polyadenylierungsstelle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pol	Polymerase = Integrase, RT und Protease
PP	Polypropylen
rev	Regulator of Virion
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev Response Element
RT	Reverse Transkriptase
SCID	Severe combined Immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPB	Surfactant Protein B
SV	Simian Virus
tat	Trans-Activator of Transcription
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetracyclin abhängiger-Transaktivator
U/min	Umdrehungen pro Minute
UbB	Ubiquitin B
UbC	Ubiquitin C
vif	virion infectivity factor
vpr	Viral protein R
vpu	Viral protein U
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
WPRE	Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element
X-SCID	X-linked SCID

5.9 Lebenslauf Anne Himmel

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der Online-Version nicht verfügbar.

5.9 Lebenslauf Anne Himmel

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der Online-Version nicht verfügbar.