

Untersuchungen zum nichtviralen Gentransfer mittels integrierender und  
extrachromosomal-replikationskompetenter Plasmid-DNA in  
hämatopoetische Zellen

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

Christof Maucksch  
aus Fürstfeldbruck

Juni 2008



1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

2. Gutachter: PD Dr. Joseph Rosenecker

Disputation am 16.09.2008

## Danksagung

Ganz besonders möchte ich Dr. Carsten Rudolph danken, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine fortwährende Begeisterung für unsere Arbeit, seine freundschaftliche, hilfsbereite und immerzu motivierende Art hat mich in meinem Vorhaben bestärkt, auch nach dieser Arbeit weiterhin in Forschung und Wissenschaft tätig zu bleiben. Die vielen fruchtbaren und konstruktiven Diskussionen mit Carsten im Labor, nach der Arbeit und auf Dienstreisen haben meine Arbeit entscheidend beeinflusst und gelenkt. Trotzdem hat er mir stets die Freiheit zum selbständigen Forschen und zur Entwicklung eigener Ideen und deren Umsetzung gegeben. Nicht zuletzt die Möglichkeit, an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen, haben die Zeit zum Erstellen dieser Arbeit zu einem ganz besonders schönen Abschnitt meiner Ausbildung gemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rainer H. Müller, für die hervorragende Zusammenarbeit, die Betreuung dieser Dissertation, sowie für die sehr angenehmen, konstruktiven und inspirierenden Treffen in Berlin bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Joseph Rosenecker möchte ich mich herzlich für die hervorragende und freundschaftliche Zusammenarbeit während meiner Arbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken. Außerdem danke ich allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission für ihre Zeit und Mühe.

Weiterhin möchte ich mich insbesondere bei meinen Kollegen, Alex Bohla, Elisabeth Hennen und Florian Hoffmann, für die tolle und lustige Zeit im „Kellerlabor“ bedanken. Auch meinen Kollegen Senta Uezguen, Markus Elfinger, Rabea Imker, Manish Aneja, Marta Illenyi, Michael Kormann, Anne Himmel, Johannes Geiger, Lesina Eugenia, Günther Hasenpusch, Gabriella Nica, Nihal Yüsekdogan und Michaela Rössner danke ich für die freundschaftliche und

inspirierende Zusammenarbeit. Außerdem möchte ich mich bei meinen ehemaligen Arbeitskolleginnen Stephanie Huth, Sabine Weiss und Petra Dames für ihre große Hilfsbereitschaft zu Beginn meiner Arbeit bedanken. Auch den Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen im Kubus Forschungszentrum möchte ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit danken.

Zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden außerhalb des Labors für ihre fortwährende Unterstützung.

1. Einleitung	1
1.1 Gentherapie	1
1.2 Nukleinsäuren in der Gentherapie	6
1.2.1 Plasmid-DNA	6
1.2.2 <i>Small interfering</i> RNA und <i>micro</i> RNA	10
1.3 Gentransfervehikel	11
1.3.1 Virale Vektoren	12
1.3.1.1 Retroviren	12
1.3.1.2 Adenoviren	14
1.3.1.3 Adeno-assoziierte Viren	15
1.3.1.4 Herpes-Simplex-Viren	15
1.3.1.5 Pockenviren	16
1.3.2 Nichtvirale Transfektionsmethoden	17
1.3.2.1 Physikalische Methoden	18
1.3.2.2 Kationische Polymere	19
1.3.2.1 Lipide	23
1.4 Plasmid-DNA Konkatemere	24
1.5 Integration von Plasmid-DNA zum stabilen nichtviralen Gentransfer	26
1.6 Episomale Vektoren zum stabilen nichtviralen Gentransfer	31
1.7 Zielsetzung der Arbeit	35
2. Materialien und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	37
2.1.2 Enzyme	38
2.1.3 Antikörper	39
2.1.4 Kits	39
2.1.5 Medien und Medienzusätze	40

2.1.6 Geräte	40
2.1.7 Oligonukleotide	41
2.1.8 Arzneistoffe	42
2.2 Herstellung von Puffern	42
2.3 Zellkultur	44
2.3.1 Zelllinien und primäre Zellen	44
2.3.2 Kultivierungsbedingungen	44
2.3.3 Isolierung von CD34 <sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut	45
2.4 Plasmid-DNA	46
2.4.1 Klonierung von Plasmid-DNA	46
2.4.2 Amplifizierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA	48
2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Plasmid-DNA	48
2.4.4 Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte	49
2.5 Transfektion	52
2.5.1 Transfektion mittels kationischer Lipide	52
2.5.2 Transfektion mittels Elektroporation	52
2.5.3 Transfektion mittels Nucleofection	53
2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Säugerzellen	53
2.7 Isolierung von RNA und reverse Transkription	54
2.8 Isolierung von Zellkernen	54
2.9 Durchflusszytometrie	54
2.10 Messung von Luciferase- / $\beta$ -Galaktosidase-Expression	55
2.11 Polymerase Ketten Reaktion	55
2.11.1 Standard-PCR	55
2.11.2 Quantitative Real-Time-PCR	56
2.12 Western Blot Analyse	57
2.13 Southern Blot Analyse	58
2.14 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	58
2.15 Untersuchungen im Mausmodell	59
2.15.1 Intravasale Injektion von PEI/pDNA-Komplexen	59
2.15.2 Intranasale Perfusion nackter Plasmid-DNA	60

2.15.3 Organentnahme und weitere Untersuchung des Gewebes	60
2.16 Statistik	61
3. Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA Konkatemeren	62
3.1 Charakterisierung der Plasmid-DNA Konkatemere	62
3.2 Untersuchung der Plasmid-DNA nach Transfektion	64
3.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensität	
TOTO-1-markierter Plasmid-DNA	65
3.4 Transfektion von Monomer und Dimer mit gleicher Anzahl an Genkopien	66
3.5 Zelluläre Verteilung der Plasmid-DNA bei gleicher Anzahl an Genkopien	67
3.6 Transfektion von Monomer und Dimer mit gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen	69
3.7 Zelluläre Verteilung der Plasmid-DNA bei gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen	71
3.8 Zusammenfassende Betrachtung der Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA Konkatemeren	72
4. Aktivität der <i>Streptomyces</i> $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen	77
4.1 Langzeit-Transgenexpression in hämatopoetischen Zelllinien	78
4.2 Expression der $\phi$ C31 Integrase in Jurkat-Zellen	85
4.3 Plasmid-basierte Rekombination mittels $\phi$ C31 Integrase	87
4.4 Quantifizierung der $\phi$ C31 Integrase-vermittelten Rekombinationseffizienz in unterschiedlichen Zelllinien	92
4.5 Zelltypabhängige Gesamtaktivität der Integrase	96
4.6 Expression von zellulärem DAXX-Protein	98
4.7 Zusammenfassende Betrachtung der $\phi$ C31 Integrase Aktivität	99



5. Stabiler Gentransfer mittels episomaler Plasmid-DNA	105
5.1 Evaluierung der optimalen Bedingungen für die Langzeit-Transgenexpression von pEPI1-Luc	107
5.1.1 Selektionsdauer nach Transfektion von pEPI1-Luc	107
5.1.2 Konzentration von G418 nach Transfektion von pEPI1-Luc	109
5.1.3. Trangenexpression nach <i>in vivo</i> Applikation von pEPI1-Luc	110
5.2 Stabile Transgenexpression <i>in vitro</i> durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren	111
5.2.1 Stabile Transgenexpression durch Verwendung des Ubiquitin B-Promotors	111
5.2.2 Stabile Transgenexpression durch Verwendung des Ubiquitin C-Promotors	121
5.3 Zusammenfassende Betrachtung von episomaler Plasmid-DNA zum stabilen Gentransfer	130
6. Zusammenfassung	136
7. Summary	141
8. Referenzen	145
9. Abkürzungsverzeichnis	169
Publikationen	173



## 1. Einleitung

### 1.1 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das gezielte Einbringen genetischen Materials mit geeigneten Übertragungsmethoden oder Vehikeln in Körperzellen mit dem Ziel der Heilung oder Linderung von Krankheiten. Allgemein wird das Einschleusen von DNA in Zellen je nach Übertragungsmethode als Transfektion oder Transduktion bezeichnet. Der Begriff Transfektion wird im Zusammenhang mit nichtviralen Methoden verwendet, während Transduktion das Einschleusen von viralen DNA-Vektoren oder Proteinen bezeichnet. Unterschieden wird die somatische (griech. *soma* = der Körper) Gentherapie von der Keimbahntherapie. Die somatische Gentherapie bezeichnet die Behandlung von Körperzellen (somatische Zellen), so dass die Behandlung auf ein Individuum begrenzt bleibt. Die Keimbahntherapie dagegen bezeichnet die genetische Veränderung von Keimzellen, also Ei- und Samenzellen, sowie deren Vorläuferzellen. Dadurch ist es möglich eine künstlich erzeugte genetische Veränderung auf Nachkommen zu übertragen. In Deutschland ist die Keimbahntherapie beim Menschen bisher durch das Embryonenschutzgesetz von 2002 verboten, das zur Forschung lediglich die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen aus dem Ausland erlaubt, die vor dem Stichtag 1. Januar 2002 generiert wurden. Ganz aktuell wurde dieser Stichtag auf den 1. Mai 2007 verschoben, so dass auch relativ junge Zellen zu Forschungszwecken verwendet werden können. Während die symptomatische Therapie von Krankheiten in der Medizin sehr häufig ist und oftmals die einzige Therapieform darstellt, gibt die Gentherapie durch das Einschleusen funktioneller Gene grundsätzlich die Möglichkeit einer kausalen Behandlung monogenetisch bedingter Erkrankungen. Weiterhin besteht die Option, durch Hoch- oder Herabregulierung von Genen symptomatisch-therapeutisch in einen pathologischen Vorgang im Körper einzugreifen. Die Möglichkeiten dieser relativ neuen Technologien haben in den letzten Jahren weltweit großes Interesse geweckt. Die Gentherapie hat sich daher mittlerweile zu

einem sehr schnell fortschreitenden Gebiet der Grundlagenforschung als auch der klinischen Forschung entwickelt.

Die Gentherapie bietet die Möglichkeit, auf zwei verschiedene Arten Zellen eines Organismus zu behandeln. Bei der *in vivo* Gentherapie werden Genvektoren direkt in den lebenden Organismus appliziert und die körpereigenen Zellen so in ihrer natürlichen Umgebung transfiziert. Bei der *ex vivo* Transfektion werden dem Körper Zellen entnommen, in einem künstlichem Nährmedium kultiviert und außerhalb des Körpers behandelt. Nach erfolgter gentechnischer Veränderung der Zellen werden diese in den Organismus reimplantiert. Die Zellen werden hier als autogenetisches oder autologes („vom selben Individuum stammend“) Transplantat bezeichnet. Eine dritte Möglichkeit in diesem Zusammenhang besteht darin, körperfremde Zellen *ex vivo* gentechnisch zu modifizieren und anschließend zu implantieren. Hierbei sind die Begriffe allogenetisch („von einem Individuum der gleichen Spezies stammend, aber genetisch verschieden“) und xenogenetisch („von einer anderen Spezies stammend“) zu unterscheiden. Die Begriffe autogenetisch, allogenetisch und xenogenetisch sind nicht zwangsläufig mit der gentherapeutischen Behandlung von Zellen und Gewebe assoziiert, sondern spezifizieren sehr häufig auch die Art von Knochenmarkstransplantationen.

Die erste ausführlich dokumentierte klinische gentherapeutische Studie wurde 1990 in den USA an zwei Patienten durchgeführt, die an Adenosindeaminase-Defizienz, einem schweren kombinierten Immundefizienzsyndrom (ADA-SCID), litten (Blaese et al., 1995). Seitdem sind von 1990 bis Juli 2007 insgesamt 1307 dokumentierte klinische Studien durchgeführt oder initiiert worden (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Der überwiegende Teil der Studien wurde in den USA (n=864) und Europa (n=358) durchgeführt. In den ersten Jahren der Forschung an Gentherapie wurde noch angenommen, vor allem bekannte monogenetisch bedingte Erkrankungen könnten durch Einbringen des korrekten Gens behandelt werden (Kay and Woo, 1994). Mittlerweile wurden 66,5

Prozent der klinischen Studien zur Behandlung von Krebserkrankungen und nur 8,3 Prozent der Studien zu monogenetischen Erkrankungen durchgeführt. Zielmoleküle und -strukturen vor allem von Gentherapiestudien zu Krebs waren Antigene, Zytokine, Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren und Suizidgene (n=884). Die überwiegende Zahl der klinischen Studien waren Phase I-Studien (n=801). Virale Vektoren wurden in 67 Prozent aller dokumentierten klinischen Studien verwendet. DNA-Lipid Komplexe und nackte Plasmid-DNA als nichtvirale Gentransfer-Vehikel wurden dagegen in circa 26 Prozent der Studien verwendet.

Während dieser Zeit kam es in mehreren Studien zu außerordentlichen Erfolgen, aber auch Rückschlägen der Gentherapie. Im September 1999 starb ein Patient während einer klinischen Studie zur Sicherheit von gentherapeutisch angewandten Adenoviren an der University of Pennsylvania (Marshall, 1999; Bostanci, 2002; Thomas et al., 2003). Der 18-jährige Jesse Gelsinger litt an Ornithin-Transcarbamylase (OTC)-Defizienz und erhielt zur Transduktion des OTC-Gens eine Dosis von  $3,8 \times 10^{13}$  Adenovirus-Kopien. Vier Tage nach Behandlung verstarb der Patient an multiplem Organversagen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der viralen Gentherapie und dem multiplem Organversagen konnte festgestellt werden. Eine weitere Patientin erhielt eine ähnliche Dosis von  $3,6 \times 10^{13}$  Viruskopien. Hier konnten allerdings keinerlei Nebenwirkungen festgestellt werden, was eventuell mit einer früheren Exposition Gelsingers mit einem Wildtyp-Adenovirus erklärt werden könnte (Bostanci, 2002). Die ersten außerordentlichen Erfolge brachten zwei Studien zur gentherapeutischen Behandlung der X-chromosomalen schweren kombinierten Immundefizienz (engl. X-SCID = *X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease*) in Paris (Cavazzana-Calvo et al., 2000) und London (Gaspar et al., 2004). Mutationen des Interleukinrezeptor-gamma-C-Ketten-Gens ( $\gamma_c$ ) wurde durch Applikation von replikationsdefizienten und für das korrekte  $\gamma_c$ -Gen-kodierenden Retroviren behandelt. Hierzu wurden den Patienten hämatopoetische Stammzellen (HSC) entnommen und *ex vivo* mit den für das  $\gamma_c$ -Gen kodierenden Retroviren

transduziert. Anschließend wurden die  $\gamma$ -korrigierten HSC wieder in die Patienten implantiert. Insgesamt wurden in beiden Studien 17 von 20 Patienten erfolgreich behandelt. Eine partielle oder komplette Rekonstitution von  $\gamma$ -genkorrigierten T- und NK-(Natürliche Killer) Lymphozyten konnte hier erreicht werden (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007). Diese außerordentlichen Erfolge wurden zwei Jahre nach Behandlung der Patienten in Paris durch das Auftreten von Leukämien in mittlerweile fünf von insgesamt 20 Patienten überschattet (Check, 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003; Woods et al., 2006; Cole, 2008). Als Ursache dieser klonalen T-Zell-Proliferationen wurde die Aktivierung des Onkogens *LIM domain only 2* (LMO-2) durch Integration des Retrovirus in der Nähe oder direkt im LMO-2 Gen ermittelt (Nam and Rabbitts, 2006). Aber auch eine onkogene Wirkung des  $\gamma$ -Rezeptors in der Entwicklung von T-Lymphozyten wird diskutiert (Pike-Overzet et al., 2006). Die ersten vier Fälle von Leukämien traten bei Patienten, die in Paris behandelt wurden, auf, während unter den in London behandelten Patienten bis Ende 2007 keine ähnlichen Komplikationen auftraten. Als mögliche Erklärungen wurden Unterschiede im Virustyp und verschiedene Zusammensetzungen an Zytokinen zur Stimulation der HSC diskutiert (Nienhuis et al., 2006). Seit einigen Monaten ist diese Diskussion hinfällig, da der erste Fall einer Leukämie auch bei einem in London behandelten Patienten festgestellt wurde (Cole, 2008). Auch eine Studie zur X-chromosomalen chronischen Granulomatose (engl. *X-CGD X-linked Chronic Granulomatous Disease*) in Deutschland und der Schweiz verlief zunächst sehr erfolgreich (Ott et al., 2006). Auch hier wurden den Patienten HSC entnommen, diese *ex vivo* retroviral transduziert und anschließend wieder implantiert. Der verwendete gammaretrovirale Vektor kodierte für das in der X-CGD häufig mutierte gp<sup>91</sup>phox-Gen (Winkelstein et al., 2000). Bei zwei von drei Patienten der Studie konnte nach der Behandlung eine hohe Anzahl von korrigierten neutrophilen Granulozyten und eine signifikante klinische Verbesserung festgestellt werden. Trotzdem starb einer der drei Patienten zwei Jahre später an den Folgen seiner Erkrankung, obwohl seine Behandlung zunächst zwei Jahre sehr erfolgreich erschien (Alexander et al., 2007).

Zwischenzeitlich befanden sich drei Nukleinsäuretherapeutika weltweit auf dem Markt (Patil et al., 2005; Rätty et al., 2008). *Vitravene* ist ein Antisense-Oligonukleotid gegen die *immediate early region 2* (IE2) des Cytomegalievirus und wurde zur Behandlung der Cytomegalievirus induzierten Retinitis bei AIDS-Patienten eingesetzt. Aus kommerziellen Gründen wurde das Präparat wieder vom Markt genommen. *Gendicine* wurde 2004 in China eingeführt und ist ein replikationsdefizienter, humaner Adenovirus, der für das humane Wildtyp-p53-Tumorsuppressorgen kodiert und mit der Indikation „Tumore des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs“ eingesetzt wird. Ebenfalls zur Therapie von Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs wurde 2006 das onkolytische Adenovirus *Oncorine* in China auf den Markt gebracht. Einige weitere Gentherapeutika befinden sich derzeit in klinischen Studien der Phase III. So ist *Advexin* ebenfalls ein für p53-kodierender Adenovirus mit der gleichen Indikation wie *Gendicine*. *Affinitak*, *Alicaforsen* und *Genasense* sind Antisense-Oligonukleotide in Phase III-Studien mit den jeweiligen Indikationen „nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom“, „Morbus Crohn“ und „malignes Melanom“.

Häufige Zielzellen von gentherapeutischen Ansätzen sind Stammzellen. Eine Stammzelle definiert sich über ihren noch nicht ausdifferenzierten Status. Eine Stammzelle kann durch Teilung sowohl ausdifferenzierte Zellen als auch weitere Stammzellen als Tochterzellen generieren. Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Während aus embryonalen Stammzellen ein gesamter Organismus entstehen kann, differenzieren adulte Stammzellen nur noch gewebsspezifisch aus. Im Genaueren unterscheidet man weiterhin die Begriffe Pluripotenz („zu vielem mächtig“) und Totipotenz („zu allem mächtig“). Unter pluripotenten Stammzellen versteht man Zellen, die die Fähigkeit besitzen, in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) und der Keimbahn auszudifferenzieren, aber im Gegensatz zu totipotenten Zellen nicht die Möglichkeit haben, extraembryonales Gewebe zu bilden. Damit sind sie nicht in der Lage einen ganzen Organismus auszubilden. Als multipotent werden in der Regel adulte Stammzellen bezeichnet, die nur noch die Möglichkeit besitzen,

organ- oder kompartimentspezifisch auszdifferenzieren. Hierzu zählen die oben bereits erwähnten HSC, die sich ausschließlich zu Zellen des Blutsystems differenzieren können. Der Vorteil von stabil gentherapeutisch veränderten Stammzellen ist der theoretisch ewig anhaltende Effekt der Gentherapie durch die Erneuerungsfähigkeit von Stammzellen und ihrer damit annähernd unbegrenzten Lebensdauer im Organismus. Dagegen kann die Transfektion von bereits ausdifferenzierten Zellen durch deren begrenzte Lebensdauer in der Regel keinen nachhaltigen therapeutischen Effekt haben.

### 1.2 Nukleinsäuren in der Gentherapie

Die am häufigsten verwendeten Nukleinsäuren sind Plasmid-DNA und *small interfering* RNA (siRNA). Plasmid-DNA kann theoretisch zum Einschleusen beliebiger Gene mit ihren Promotoren und zusätzlichen Elementen verwendet werden und damit zu entsprechender Expression des Transgens führen. Die Herabregulation oder die komplette Inhibition von Expression dagegen kann durch siRNA erfolgen. Weitere nukleinsäure-basierte Moleküle zum Gentransfer, wie *Yeast Artificial Chromosome* (YAC) DNA, *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) DNA (Monaco and Larin, 1994; Lipps et al., 2003), *Human Artificial Chromosome* (HAC) DNA sowie Minichromosomen (Harrington et al., 1997; Lipps et al., 2003) seien hier erwähnt, werden im Folgenden aber nicht näher behandelt.

#### 1.2.1. Plasmid-DNA

Plasmid-DNA fungiert natürlicherweise als Teil der Erbinformation von Bakterien. Verglichen mit eukaryontischen Zellen zeichnet Bakterien ein außerordentlich schnelles Wachstum in geeigneten Nährmedien bei spezifischen Temperaturen aus. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, sehr schnell und einfach Plasmid-DNA, die in wachsenden Bakterien enthalten ist, im Milligramm-Bereich herzustellen. Die hierfür verwendeten Bakterien sind meist geeignete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme. Aus Bakterien isolierte Plasmid-DNA liegt in drei



topologischen Strukturen in unterschiedlichen Konzentrationen vor: i) kovalent-geschlossen-zirkulär (*supercoiled* oder *covalently closed circles (ccc)*), ii) offenkettig-zirkulär (*open-circular*) und iii) linear (Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1

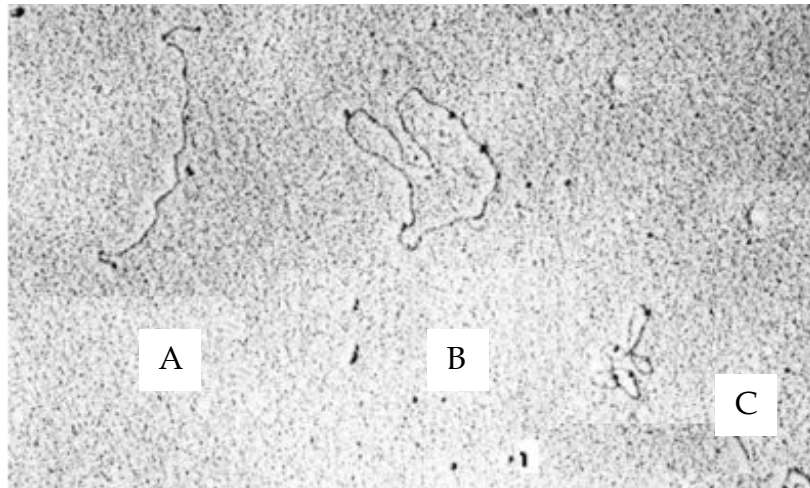


Abbildung 1.1 Topologische Struktur von Plasmid-DNA  
Elektronenmikroskopische Aufnahme von linearer (A), offenkettig-zirkulärer (B) und kovalent-geschlossen-zirkulärer Plasmid-DNA. Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Plasmid>

Die unterschiedlichen topologischen Formen können wiederum in oligomerer Form, das heißt als Dimer, Trimer, etc. vorkommen. Diese Multimere werden auch Konkatemere genannt. Die Verwendung von Konkatemenen zur Verbesserung der Transgenexpression wurde unter anderem in dieser Arbeit untersucht. Plasmid-DNA zur Anwendung in der Gentherapie besteht normalerweise aus einer Expressionskassette (häufig eukaryontischen Ursprungs) und einem bakteriellen Rückgrat (*backbone*). Die am häufigsten verwendeten Promotoren sind starke virale Promotoren, wie z.B. die des CMV- oder Simian 40 (SV40)-Virus. Aber auch eukaryontische und gewebespezifische Promotoren sind ein Feld intensiver Forschungsarbeiten (Pastore et al., 1999). Die Transkription des Transgenes und damit die Effizienz des Gentransfers ist in entscheidendem Maße von Promotor oder Transkriptions-verstärkenden Elementen (*enhancer*) abhängig (Guo et al., 1996; Herweijer et al., 2001; Pringle et al., 2007). Die besondere Rolle des Promotors wird ebenfalls in dieser Arbeit behandelt. Das Transgen selbst

unterliegt kaum Beschränkungen. Für bestimmte virale und nichtvirale Methoden allerdings besteht ein Größenlimit. So ist Plasmid-DNA mit einer Größe ab circa 10.000 Basenpaare (bp) nur noch sehr schwer nichtviral transfizierbar. Auch bei bestimmten Virustypen, die im Folgenden noch eingehend erklärt werden, bestehen auf Grund eines relativ kurzen Wild-typ-Genoms ebenfalls Limitationen in der Größe des Transgens. In oder um die Expressionskassette gelagert finden sich oftmals zusätzliche Elemente. *Long-Terminal-Repeat* (LTR)-Sequenzen beispielsweise flankieren häufig die Expressionskassette und steuern die Integration sowie die Genexpression bei viralem Gentransfer. Auch können regulatorische Sequenzen, wie beispielsweise Introns oder Transkriptionsverstärker zwischen Promotor und Transgen, sowie Polyadenylierungssignale am Ende der Expressionskassette die Transgenexpression verstärken (Xu et al., 2001). Das Rückgrat eines Plasmids enthält üblicherweise einen bakteriellen Replikationsursprung sowie einen bakteriellen Selektionsmarker. Gängige Selektionsmarker, um Plasmid tragende Bakterienklone zu selektieren, sind Ampicillin-, Kanamycin-, Hygromycin- oder Chloramphenicol-Resistenzgene. Zur Selektion von transgenen eukaryontischen Zellen wird häufig eine Neomycin-Geneticin-Resistenzkassette (Neo<sup>R</sup>) zusätzlich zur Transgen-Expressionskassette ins Plasmid eingebracht. Durch Zugabe von zelltypspezifischen Konzentrationen an Geneticin (G418) ins Medium der eukaryontischen Zellen ist es möglich, Selektionsdruck zu erzeugen und damit Neo<sup>R</sup>-Plasmid-tragende Zellen zu isolieren. Je nach Konzentration des G418 kann Wachstumshemmung aber auch die Zerstörung von nicht-transfizierten Zellen bewirkt werden. In den letzten Jahren haben sich die Arbeiten zur Optimierung von Plasmiden in zunehmendem Maße auf das Rückgrat konzentriert. Eine besondere Rolle spielen hier Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG oder CG)-Dinukleotid-Sequenzen. Diese sind in bakteriellen Genomen viermal häufiger zu finden als in eukaryontischen Genomen. Im eukaryontischen Genom kommen CpG-Motive fünfmal weniger häufig vor, als man statistisch erwarten würde (Bird, 1986). Circa 80 Prozent dieser CpG-Sequenzen sind in eukaryontischen Zellen außerdem methyliert, die prokaryontischen CpG-Motive dagegen sind

größtenteils unmethyliert. Dieser Umstand gibt dem Immunsystem der Säuger die Möglichkeit, fremde von eigener Erbinformation zu unterscheiden und eine entsprechende Immunantwort, beispielsweise auf eine bakterielle Infektion, zu geben (Krieg et al., 1995). Daher werden auch CpG-motivhaltige Oligonukleotide zur Stimulation des Immunsystems in der Tumorthherapie beforscht (Jahrsdorfer and Weiner, 2003). CpG-Dinukleotide in Plasmiden haben durch die Immunstimulation und damit ausgelöste Inflammation in der Gentherapie *in vivo* einen nachteiligen Effekt (McMahon et al., 1998). CpG-depletierte oder CpG-freie Plasmide finden daher vermehrt Verwendung in der Gentherapie (Yew et al., 2002). Eine Alternative zu CpG-freien Vektoren stellt die Minicircle-DNA dar. Minicircle-DNA ist eine ccc-Form der therapeutischen Expressionskassette ohne das bakterielle Plasmidrückgrat (Darquet et al., 1999). Zur Herstellung werden Rekombinase-tragende *E. coli*-Bakterien mit dem parenteralen Plasmid für die gewünschte Minicircle-DNA transformiert. Die Expressionskassette im parenteralen Plasmid ist von Rekombinase-spezifischen Erkennungssequenzen flankiert, wodurch es zur Exzision der Expressionskassette und anschließender Rekombination und damit zur Entstehung der Minicircle-DNA und des Miniplasmids kommt (Abbildung 1.2).

Abbildung 1.2

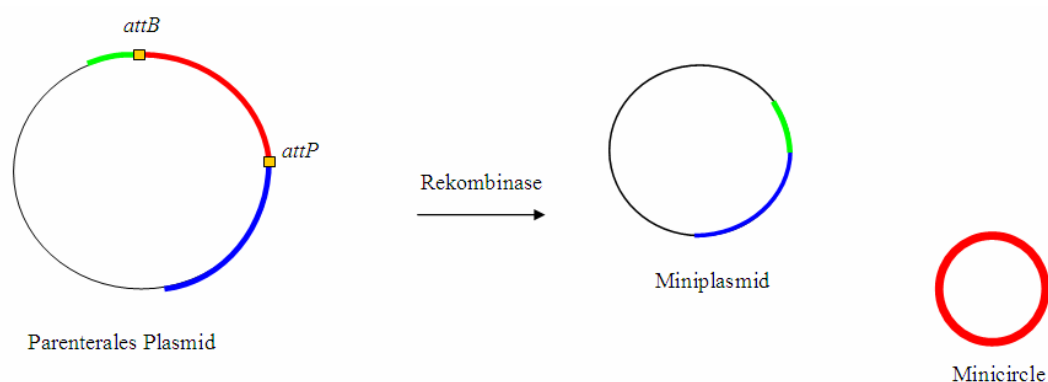


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Herstellung von Minicircle-DNA. Die spezifischen Erkennungssequenzen *attB* und *attP* flankieren die Expressionkassette (rot). Die Rekombinase vermittelt die Exzision der Expressionskassette und die Verknüpfung zur Minicircle-DNA an den Erkennungssequenzen. Als Produkte entsteht neben Minicircle-DNA auch ein Miniplasmid.

Zur Herstellung wurden bisher die Integrase des *Bakteriophagen*  $\lambda$  (Darquet et al., 1997), die  $\phi$ C31 Integrase des *Streptomyces* Bakteriophagen (Chen et al., 2005), als auch die Cre-Rekombinase verwendet (Bigger et al., 2001).

### 1.2.2 *Small interfering* RNA und *micro*-RNA

RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf der spezifischen, post-transkriptionalen Inhibition von Genexpression (*gene silencing*) durch doppelsträngige RNA (dsRNA). Den Mechanismus konnten die US-Wissenschaftlern Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 1998 in *Caenorhabditis elegans* aufklären (Fire et al., 1998). Im Jahre 2006 wurde ihnen für diese Entdeckung der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Mittlerweile wird angenommen, dass *gene silencing* durch dsRNA möglicherweise in allen eukaryontischen Organismen vorkommt (Hannon, 2002). Der Prozess der RNA-Interferenz ist ursprünglich ein natürlicher Abwehrmechanismus der Zelle gegen fremde RNA. Zielerkennende RNA ist entweder *small interfering* RNA (siRNA) oder *micro* RNA (miRNA). Während miRNA im Genom der Zelle auf prä-miRNA Genen codiert ist, wird siRNA aus längeren RNA Molekülen, die meist von infizierenden Viren oder Transposons stammen, zu deren spezifischen Abwehr gebildet. *Small interfering* RNA und *micro*-RNA werden aus dsRNA von Dicer, einer Ribonuklease Typ III, gebildet. Dieses Enzym liegt in der Zelle als Komplex mit Argonaut-Proteinen vor. Der Komplex aus Dicer und Argonaut-Proteinen erkennt spezifisch lange doppelsträngige RNA und spaltet diese in circa 22 Nukleotide (nt)-lange siRNA- oder miRNA Fragmente (Bernstein et al., 2001). Die Ausgangs-RNA kann im Falle von siRNA endogenen oder exogen Ursprungs sein. *Micro*-RNA dagegen wird aus prä-miRNA, circa 70 nt langen Haarnadelstrukturen, abgeleitet. Die kurzen dsRNA Fragmente enthalten eine Phosphatgruppe am 5'-, und eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende mit je 2 nt Überhängen (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Diese kurzen RNA-Duplices werden anschließend in einem Protein-Komplex, den RNA Inducing Silencing Complex (RISC) eingebunden und können dadurch homologe mRNA erkennen und abbauen (Hammond et al., 2000).

RNAi kann gentherapeutisch auf verschiedene Weise für multiple Indikationen genutzt werden (Kim and Rossi, 2007). Als Applikationsformen hierfür kommen sowohl künstliche kurze siRNA-Moleküle, als auch DNA-Plasmide, die für entsprechende RNA-Sequenzen kodieren, in Frage. Diese Expressionsvektoren enthalten typischerweise RNA-Polymerase Typ III Promotoren, wie den humanen U6-Promotor (Miyagishi and Taira, 2002; Paddison et al., 2002; Paul et al., 2002) oder den H1-Promotor (McManus et al., 2002; Yuan et al., 2006). *Short Hairpin* RNA (shRNA) kann hiermit exprimiert werden und wird intrazellulär im natürlichen Mechanismus durch Dicer zu siRNA gespalten (Yu et al., 2002). Es besteht weiterhin die Möglichkeit, über zwei unterschiedliche Expressionskassetten homologe RNA-Einzelstränge zu generieren (Miyagishi and Taira, 2002).

Die möglichen Indikationsgebiete von RNAi sind vielfältig. In Analogie zum natürlichen Mechanismus der RNAi gibt es intensive Bemühungen siRNA und miRNA zur Behandlung von verschiedenen viralen Erkrankungen zu nutzen (Arbuthnot et al., 2007; Scherer et al., 2007). So konnte bereits Replikation und Infektion von HI-Viren *in vitro* durch RNAi unterdrückt werden (Capodici et al., 2002; Surabhi and Gaynor, 2002). Ein weiteres vielversprechendes Anwendungsgebiet für RNA Interferenz ist die Tumorthherapie (Pai et al., 2006). So konnte durch RNAi induzierte Hemmung des *metastasis-associated gene 1* (MTA1) Tumorzellwachstum und Metastasierung im Mausmodell reduziert werden (Qian et al., 2007).

### 1.3. Gentransfervehikel

Es gibt unterschiedliche Methoden und Vektoren, um Nukleinsäuren in die Zelle zu transferieren. Grundsätzlich unterscheidet man virale und nichtvirale Systeme. Als virale Vektoren werden derzeit vor allem Retroviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren verwendet. Aber auch Herpes-Simplex- und Pockenviren als Gentransfervektoren sind bereits in klinischen Studien untersucht worden. Zu den nichtviralen Systemen zählen physikalische Methoden, wie das Einbringen von

nackten Nukleinsäuren z.B. durch Injektion in die Zelle oder direkt in den Zellkern, Elektroporation oder hydrodynamische Transfektion der Leber, sowie Lipofektion oder Polymer-vermittelte Transfektion. Virale und nichtvirale gentherapeutische Anwendungen zeigen jeweils spezifische Vor- und Nachteile.

### 1.3.1 Virale Vektoren

Viren sind die bisher am häufigsten verwendeten Gentransfervehikel. Verglichen mit nichtviralen Methoden haben Viren eine hohe Infektionseffizienz. Viren sind natürlicherweise Mikroorganismen, die Wirtszellen mit ihrer DNA oder RNA infizieren. Sie bestehen in der Regel aus einer Protein-Hülle (Kapsid), die entweder DNA oder RNA einschließt, sowie einer äußeren Lipiddoppelmembran (Hülle) bei bestimmten Virustypen. Die virale Erbinformation kodiert im Wesentlichen für Proteine zur Reproduktion und Replikation des Virus. In der Gentherapie werden genetisch modifizierte, replikationsdefiziente Viren verwendet, in deren Expressionskassette ein therapeutisches Gen (*gene of interest*) kloniert wurde. Da Viren zum Gentransfer keine Proteine zur Replikation mehr exprimieren können, müssen zur Herstellung solcher Viren so genannte Verpackungszelllinien und Helferkonstrukte verwendet werden (Thomas et al., 2003). Dafür wird die Kotransfektion eines Konstrukts, welches die für die Virusreproduktion benötigten Gene trägt, sowie eines Konstrukts des modifizierten replikationsdefizienten Virusgenoms in einer geeigneten Verpackungszelllinie durchgeführt. Die Viren reproduzieren sich in der Verpackungszelllinie und werden in der Regel durch mehrmalige CsCl-Gradientenzentrifugation isoliert.

#### 1.3.1.1 Retroviren

Retroviren sind integrierende, einzelsträngige RNA-enthaltende Viren. Ihr Kapsid ist von einer Hülle umgeben. Das Genom eines Retrovirus ist 7-12 kb groß und ist diploid angelegt. Es enthält drei Gene, die von beiden Seiten von LTRs flankiert

sind. Die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren jeweils für Kernproteine, Reverse Transkriptase und Hüllproteine. Zusätzlich enthalten Retroviren im 5'-Bereich eine regulatorische  $\psi$ -Sequenz, die das Verpacken der RNA in den Viruspartikel steuert. Polypurintrakte am 3'-Ende sind für die reverse Transkription essentiell. Die ersten Vektoren zur Gentherapie waren Molony-Maus-Leukämie-Viren (MLV). Diese Retroviren wurde auch zum ersten Mal durch so genanntes *Pseudotyping* modifiziert (Thomas et al., 2003). Das heißt, bestimmte Abschnitte des retroviralen Genoms werden durch genetische Informationen anderer Virustypen ersetzt. Durch spezifische Rezeptorbindung kommt es zur Fusion von Virusmembran und Zellmembran der Zielzelle und damit zur Infektion durch die Viruspartikel. Durch den Austausch von Genen, die für Rezeptor-Bindungs-Proteine kodieren, erhöht sich die Anzahl möglicher Zielzellen für den Virus (Kasahara et al., 1994; Harris and Lemoine, 1996; Schnierle et al., 1997). Während Retroviren nur in der Lage sind, sich teilende Zellen zu infizieren (Lewis et al., 1992), ist es der Unterklasse der Lentiviren auch möglich, ruhende Zellen durch Penetration der intakten Kernmembran zu transduzieren. Nach Infektion und reverser Transkription der viralen RNA in doppelsträngige DNA in der Wirtszelle wird die retrovirale Erbinformation ins Genom der Wirtszelle integriert. Dieser Umstand ermöglicht es, Zielzellen mit Retroviren stabil zu transduzieren. Allerdings birgt die Integration auch die Gefahr schwerer Nebenwirkungen, wie insertioneller Mutagenese. Als insertionelle Mutagenese wird die Aktivierung eines Protoonkogens oder die Zerstörung eines Tumorsuppressorgens in der Zielzelle durch die Integration der viralen DNA bezeichnet (Akagi et al., 2004). Durch die Kapazität von Retroviren mit circa 8 kb ist dieser Virustyp nur begrenzt anwendbar (Thomas et al., 2003). Wegen der Eigenschaft von Retroviren, sich teilende Zellen zu infizieren, wurden bereits mehrere Gentherapiestudien mittels retroviraler Vehikel zur Behandlung von Tumoren unternommen (Rainov and Ren, 2003). Aber auch in den oben bereits erwähnten X-SCID-Studien wurden Retroviren verwendet (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004).

### 1.3.1.2 Adenoviren

Adenoviren sind lineare, doppelsträngige DNA-enthaltende, hüllenlose Viren. Bisher sind 51 serotypisch unterscheidbare human-pathogene Subtypen bekannt (Wu et al., 2002). Das Genom von Adenoviren ist mit circa 35 kb deutlich größer und komplexer als das der Retroviren (Smith, 1995). Es enthält acht transkriptionelle Einheiten oder Gene, die in frühe (*early E*), mittlere (*intermediate I*) und späte (*late L*) Einheiten eingeteilt sind. Die frühen Einheiten E1 bis E4 kodieren hier für die Proteine zur Replikation. Zur gentherapeutischen Anwendung wurden mittlerweile drei Generationen von Adenoviren entwickelt, um die Immunogenität zu reduzieren. In der ersten Generation wurden die Einheiten E1 und E3 deletiert. Diese Partikel induzierten noch sehr stark immunologische Reaktionen. Die zweite und dritte Generation von Adenoviren, die zusätzliche Deletionen in den Einheiten E2 und/oder E4 enthalten, sind im Tiermodell deutlich weniger immunogen (Lusky et al., 1998; O'Neal et al., 1998; Andrews et al., 2001). Subtypen der Adenoviren unterscheiden sich in ihren onkogenen Eigenschaften. So sind die Subtypen Ad2 und Ad5 sehr wenig onkogen und werden unter anderem aus diesem Grund als häufigste adenovirale Genvehikel verwendet. Adenovirale DNA integriert nicht ins Genom der Wirtszellen, sondern verbleibt episomal, weshalb die Transduktion nur transient ist. Adenoviren können eine Vielzahl an unterschiedlichen proliferierenden, aber auch ruhenden Zielzellen infizieren. Durch die relativ hohe Immunogenität kann es zu inflammatorischen Immunreaktionen kommen. Da die Exposition mit Adenoviren, die für viele harmlose Infektionen der oberen Atemwege verantwortlich sind, sehr hoch ist, bestehen beim Menschen häufig auch bereits Antikörper-Titer. Dadurch sind eine rasche Immunantwort und der schnelle Abbau von Adenoviren in der Gentherapie von Nachteil (Ritter et al., 2002).



### 1.3.1.3 Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) enthalten einzelsträngige DNA. Sie besitzen keine Hülle. AAVs sind nicht human pathogen. Der Name leitet sich von der Abhängigkeit des AAV von einem Helfervirus ab, das gleichzeitig die Wirtszelle befallen muss, damit sich das Adeno-assoziierte Virus replizieren kann. Häufige Helferpartikel sind Adenoviren oder Herpesviren (Muzyczka, 2001). Bei gentherapeutischen Anwendungen ohne Helfervirus haben AAVs die Möglichkeit ihre DNA ins Genom der Wirtszelle zu integrieren (Smith, 1995; Miller et al., 2002). Die Integration findet sehr häufig in einer spezifischen Region des Chromosoms 19 statt (Kotin et al., 1990; Huser and Heilbronn, 2003). Zum Gentransfer werden allerdings meist nicht-integrierende AAVs verwendet. Das Kapsid des AAV wird häufig durch *Pseudotyping* durch das eines anderen Serotypen ausgetauscht. Dadurch kann die Transduktionseffizienz für bestimmten Zielzellen erhöht werden (Burger et al., 2004). Das Genom von AAVs ist sehr einfach aufgebaut und besteht aus zwei Genen, die von *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert sind. Das *rep*-Gen kodiert für Proteine zur Replikation, Expression und Integration, *cap* kodiert für die Kapsidproteine. Diese viralen Gene werden bei AAVs zur Gentherapie durch entsprechende Transgene ersetzt, sind allerdings bei der Herstellung der AAVs in Verpackungszelllinien in Helferplasmiden nötig. Eine Limitation des Einsatzes von AAVs ist ihre sehr geringe Kapazität von maximal 5 kb.

### 1.3.1.4 Herpes-Simplex-Viren

Das Herpes-Simplex-Virus (HSV) ist ein human-pathogenes Virus mit Hülle. Die virale Erbinformation besteht aus linearer doppelsträngiger DNA. Typische Wirtszellen sind Epithelzellen, in denen sich das Virus repliziert und daraufhin ruhende Zellen, wie Neuronen, infiziert. In Neuronen erhält das Virus eine zum Teil lebenslange latente Infektion (Marozin et al., 2004). Während dieser latenten Infektion sind nur circa 6 Prozent des viralen Genoms aktiviert, wobei ein so

genanntes *single latency-associated transcript* (LTA) transkribiert wird (Wagner and Bloom, 1997). Durch endogene und exogene Faktoren, wie leichte Immunsuppression, UV-Licht oder auch Stress kann das Virus in Neuronen reaktiviert werden und zurück in Epithelzellen gelangen, wo es zur Rekrudescenz kommt. Für gentherapeutische Zwecke wird der HSV-1 Subtyp verwendet. Das Genom des HSV-1 umfasst circa 152 kb und beinhaltet mehr als 80 Gene (Marconi et al., 1996). Das Genom besteht aus einer langen und einer kurzen Region (*unique long* U<sub>L</sub> / *short regions* U<sub>S</sub>), die von *terminal repeats* (TR) flankiert sind (Lilley et al., 2001). Circa 50 kb der viralen DNA können durch transgene DNA in Gentransfervektoren ersetzt werden (Glorioso et al., 1995). Aus den Eigenschaften des HSV-1 erhofft man sich in erster Linie gentherapeutische Anwendungsmöglichkeiten bei neuronalen Erkrankungen (Latchman, 2001). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht durch tumorspezifische Infektion und zelllytische Eigenschaften (onkolytisch) konstruierter HSV-1 Mutanten. Tumore neuronalen Ursprungs, wie Gliome, wurden bereits in klinischen Studien mittels onkolytischer HSV-1 Partikel behandelt (Markert et al., 2006).

### 1.3.1.5 Pockenviren

Pockenviren enthalten lineare, doppelsträngige DNA und eine Hülle. Sie gehören mit 20-400 nm zu den größten Partikeln unter den Viren. Pockenviren sind in der Lage, eine Vielzahl von Zelltypen zu infizieren. Ihr Genom umfasst circa 130 bis 400 kb, wovon sich zu gentherapeutischen Zwecken circa 25 kb durch Transgene ersetzen lassen (Carroll and Moss, 1997). Pockenviren haben die unter DNA tragenden Viren einzigartige Eigenschaft, sich zytoplasmatisch replizieren zu können (Bronte, 2001). Ursprünglich vor allem als Expressionsvektoren verwendet (Paoletti et al., 1984), werden Pockenviren durch ihre hohe Immunogenität mittlerweile auch als Werkzeug zur Immuntherapie von Krebserkrankungen (Dasgupta et al., 2003; Menon et al., 2003) oder Infektionskrankheiten (Paoletti, 1996; Zhu et al., 1997) untersucht.

### 1.3.2 Nichtvirale Transfektionsmethoden

Nichtvirale Gentransfersysteme stellen eine Alternative zur viralen Transduktion mit wichtigen Vorteilen dar. Da sich nichtvirale Transfektionsmethoden nicht von ursprünglich infektiösem Material (wie es bei Viren der Fall ist) ableiten, sind sie im Allgemeinen deutlich weniger immunogen und zytotoxisch. Mögliche Immunreaktionen durch kationische Polymere oder Lipide sind mild. Auch unerwünschte, zytotoxische Eigenschaften von Viren, wie Zelllyse, können durch die Verwendung nichtviraler Systeme vermieden werden. Zusätzlich ist die Gefahr der insertionellen Mutagenese nichtviraler Systeme äußerst gering. Nach dem Auftreten von mittlerweile fünf Leukämiefällen in den zunächst sehr erfolgreichen klinischen, retroviralen X-SCID Studien gewann dieser Umstand zusätzlich an Bedeutung. Einzig durch unspezifische, nicht-gesteuerte Integration bei bestimmten nichtviralen Transfektionsmethoden, wie Elektroporation, könnte es theoretisch zufälligerweise zu insertioneller Mutagenese kommen. Dies wurde bisher aber nie berichtet. Echte Nachteile nichtviraler Vektoren sind die relativ geringe Transfektionseffizienz, insbesondere *in vivo*, sowie lediglich transiente Transgenexpression. Es gibt verschiedene Ansätze, um die Effizienz des nichtviralen Gentransfers zu erhöhen, aber auch um langanhaltende Genexpression zu erreichen. Durch die gezielte Einführung von Liganden in Gentransfervehikel kann beispielsweise eine erhöhte Transfektionseffizienz durch rezeptorvermittelte Aufnahme sowie Zellspezifität erreicht werden (Elfinger et al., 2007). Um transiente Transgenexpression zu stabilisieren wird überwiegend versucht, die Eigenschaften von Viren auf nichtvirale Systeme zu übertragen und integrierende oder replizierende Vektoren zu etablieren (Glover et al., 2005). Bei nichtviralen Systemen können physikalische Methoden und Gentransfer mittels kationischen Polymeren oder Lipiden unterschieden werden.

### 1.3.2.1 Physikalische Methoden

Nackte Nukleinsäuren können mittels verschiedener Applikationsarten zum Gentransfer verwendet werden. *Ex vivo* oder *in vitro* ist Elektroporation eine häufige Methode. Hierbei wird durch kontrolliert angelegte, gepulste Spannung das kurze Öffnen von Zellmembranporen bewirkt (Golzio et al., 2002; Phez et al., 2005). Die nackte DNA kann durch die geöffneten Poren ins Zellinnere gelangen. Die Transfektionseffizienz wird durch die Parameter Feldstärke (V/cm), Kapazität ( $\mu\text{F}$ ), Pulsdauer (ms), Volumen der Zellsuspension, Menge an Nukleinsäuren und Anzahl der Zellen bestimmt. Durch speziell entwickelte Elektroden können mittlerweile auch eine Vielzahl von Geweben *in vivo* durch Elektroporation transfiziert werden (Golzio et al., 2004; Golzio et al., 2005). Nucleofection als Modifikation der Elektroporation wird seit 2003 von der Firma Amaxa angeboten (Gresch et al., 2004). Diese Methode kombiniert zellspezifische Einstellungen bezüglich Spannung und Pulsdauer mit zellspezifischen Puffern. Dadurch ist es möglich, schwer zu transfizierende Zellen erfolgreich mit relativ hoher Viabilität zu transfizieren (Martinet et al., 2003). Erfolgreiche *in vivo* Anwendungen der Elektroporation im Tiermodell wurden zur Transfektion von Tumorgewebe, Leber und Muskel etabliert (Andre and Mir, 2004). Die direkte Mikroinjektion in den Zellkern ist eine weitere Applikationsform nackter DNA (Capecchi, 1980). Diese Methode ist auf dem *single-cell-level* sehr effektiv, da sie aber nicht geeignet ist, viele Zellen in kurzer Zeit zu transfizieren wird Mikroinjektion vorwiegend verwendet, um embryonale Stammzellen genetisch zu modifizieren und transgene Organismen zu generieren (Moreadith and Radford, 1997). Eine weitere Methode, um nackte DNA direkt zu transfizieren, besteht für die Anwendung am Muskel *in vivo*. Hierbei wird eine intramuskuläre Injektion von nackter DNA vorgenommen (Wolff et al., 1991). Vor allem in kleineren Tiermodellen, wie Maus und Ratte, ist ein effizienter Gentransfer in den Muskel möglich (Wolff and Budker, 2005). Eine häufig angewandte Methode zur *in vivo*-Transfektion von Hepatozyten besteht in der hydrodynamischen, intravasalen Injektion von nackter DNA (Zhang et al., 1999). Dabei wird in kurzer Zeit ein relativ großes, Nukleinsäure-haltiges

Flüssigkeitsvolumen in die Schwanzvene von beispielsweise Mäusen injiziert. Durch das große Flüssigkeitsvolumen im venösen Gefäßsystem kommt es zu einer vorübergehenden kongestiven Herzinsuffizienz und damit zum Rückstau der Flüssigkeit. Der hohe Druck, der sich dadurch in den Lebergefäßen aufbaut führt zur Aufnahme der Partikel in die Hepatozyten. Im Mausmodell werden typischerweise 20-200 µg DNA in 2-3 ml Flüssigkeitsvolumen innerhalb von 7 Sekunden in die Schwanzvene injiziert, um hohe Transfektionsraten zu erzielen (Zhang et al., 1999). Mittlerweile wurde diese Methode auch zur Anwendung am Schwein modifiziert (Yoshino et al., 2006) und am Menschen untersucht (Khorsandi et al., 2008). Die *gene gun* Methode oder biolistischer Partikeltransfer beinhaltet das „Beschießen“ von Gewebe mit Mikropartikeln, deren Oberfläche mit DNA beladen ist. Diese Methode wurde ursprünglich für die gentechnische Veränderung von Pflanzen entwickelt (Ye et al., 1990; Wells, 2004). Im Tiermodell wird die Anwendung bisher vorwiegend auf oberflächlichem Gewebe eingesetzt. So gibt es einige Arbeiten, die die Haut als Zielorgan mit der *gene gun* Methode erfolgreich transfizieren (Keller et al., 1996; Rakhmievich et al., 1996; Tan et al., 1999).

### 1.3.2.2 Kationische Polymere

Zum Gentransfer verwendete Polymere müssen unter physiologischen Bedingungen Komplexe durch elektrostatische Bindungen mit negativ geladenen Nukleinsäuren bilden. Ihre positive Ladung erhalten diese Polymere durch primäre, sekundäre oder quartäre Aminogruppen. Durch die Komplexierung mit den meisten kationischen Polymeren wird die negative Ladung der Nukleinsäuren im Gesamtkomplex aufgehoben (Kneuer et al., 2006). Dies ist wichtig für die effiziente Transfektion der meisten Zellen. Die insgesamt positiven Partikel adsorbieren an der negativ geladenen Zellmembran durch elektrostatische Bindung und können durch Endozytose über die Membran ins Innere der Zelle gelangen. Die Größe der Komplexe variiert normalerweise zwischen 100-500 nm. Im Vergleich mit DNA-Lipid-Komplexen sind die

Komplexe aus Nukleinsäuren und kationischen Polymeren in der Regel stabiler (De Smedt et al., 2000). Ein weiterer großer Vorteil kationischer Polymere ist deren leichte, günstige und in großem Maßstab mögliche Herstellung. Ein wichtiger Parameter bei der Komplexierung von Polymeren und DNA ist das Verhältnis der beiden Stoffe zueinander. Es wird durch das Verhältnis der Aminogruppen des Polymers und der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren (N/P) ausgedrückt.

Polyethylenimin (PEI) ist Goldstandard unter den kationischen Polymeren zum Gentransfer. Als Gentransfervehikel wurde PEI 1995 zum ersten Mal erfolgreich *in vitro* unter anderem in murinen 3T3-Fibroblasten und *in vivo* in Gehirnen von neugeborenen Mäusen eingesetzt (Boussif et al., 1995). Je nach Verzweigungsgrad kann PEI in lineares (l-PEI) und verzweigtes (*branched*) PEI (br-PEI) eingeteilt werden (Abbildung 1.3).

Abbildung 1.3

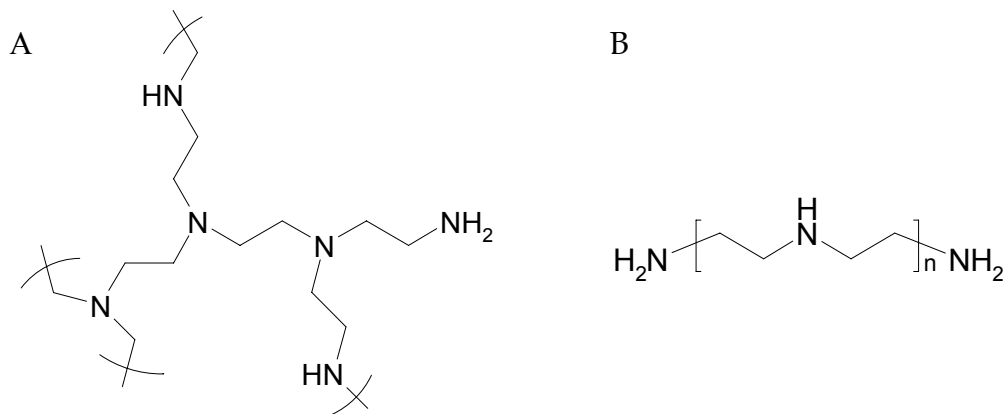


Abbildung 1.3 Chemische Struktur von verzweigten Polyethylenimin (A) und linearem Polyethylenimin (B)

Lineares PEI besteht zum größten Teil aus sekundären Aminogruppen, verbunden durch Ethylenstrukturen, während *branched* PEI sowohl primäre, sekundäre als auch tertiäre Aminogruppen besitzt. Vor allem 25 kDa *branched* und 22 kDa lineares PEI wird zum nichtviralen Gentransfer eingesetzt, aber auch hoch- und niedermolekulares PEI wurden erfolgreich getestet (Choosakoonkriang et al., 2003; Shin et al., 2005). Als Erklärung für die hohe Transfektionseffizienz von

PEI/pDNA-Komplexen wird die gute Pufferungskapazität herangezogen (Boussif et al., 1995; Thomas and Klivanov, 2002). Jedes dritte Stickstoffatom von PEI ist protonierbar. Daraus folgt, dass beim Absinken des pH-Wertes auf 5 im Endosom der Protonierungsgrad der Aminogruppen im Komplex steigt. Damit kommt es zu einem Influx von Chloridanionen und Wasser und folglich zur Erhöhung des osmotischen Drucks und schließlich zu Ruptur des Endosoms und zur Freisetzung der PEI/pDNA-Komplexe ins Zytosol. Diese Eigenschaft der Komplexe wird als „Protonenschwammeffekt“ („*proton sponge effect*“) bezeichnet. Die positive Ladung von Stickstoffatomen bedingt allerdings auch eine gewisse Zytotoxizität von PEI vor allem bei *in vivo* Anwendungen. Es wird angenommen, dass im Allgemeinen mit dem Molekulargewicht sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Toxizität ansteigt (Fischer et al., 1999; Godbey et al., 1999). Typische N/P-Verhältnisse zur effizienten Transfektion variieren je nach Anwendung zwischen vier und zwölf.

Als eines der ersten Polymere wurde Poly-L-Lysin (PLL) zum nichtviralen Gentransfer verwendet. PLL ist ein lineares Polypeptid, das aus einer Reihe der Aminosäure Lysin aufgebaut ist (Abbildung 1.4).

Abbildung 1.4

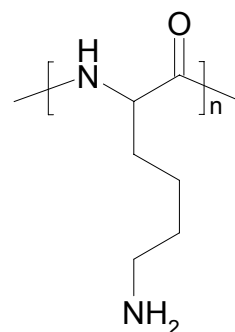


Abbildung 1.4 Chemische Struktur von Poly-L-Lysin

Insbesondere für die Anwendung *in vivo* ist PLL als bioabbaubares Polymer geeignet. Stabile Komplexe aus PLL und DNA können aus unterschiedlichen

Verhältnissen der beiden Stoffe gebildet werden. Transfizierbare Komplexe weisen typischerweise Größen von um 100 nm auf (Wolfert et al., 1999; Merdan et al., 2002a). Obwohl die PLL/pDNA Komplexe ebenso effizient wie PEI/pDNA Komplexe über Endozytose aufgenommen werden, sind die Transfektionsraten deutlich geringer. Dies ist durch die nicht-protonierbaren Aminogruppen des PLL und den damit fehlenden Protonenschwammeffekt erklärbar (Merdan et al., 2002b). Durch den fehlenden Protonenschwammeffekt kommt es in geringerem Maße zur Endosomolyse und damit zur geringeren Freisetzung der Komplexe ins Zytosol. Aus diesem Grund werden bei Transfektionen mit PLL als Genvehikel zusätzliche Reagenzien zur Endosomolyse appliziert. Sowohl Chloroquin (Pouton et al., 1998), als auch fusogene Peptide (Wagner et al., 1992) wurden hierzu erfolgreich angewandt.

Chitosane sind bioabbaubare lineare Polysaccharidstrukturen, bestehend aus  $\beta$ -1-4 verbundenen N-Acetyl-Glukosaminen und Glukosaminen in zufälliger Reihenfolge aus dem natürlichen Biopolymer Chitin. In Abhängigkeit des Molekulargewichts können Chitosane mit DNA relative kleine, stabile Komplexe unter 100 nm bilden (MacLaughlin et al., 1998; Koping-Hoggard et al., 2001). Stabile Komplexe mit DNA können sich erst bilden, wenn mindestens 65 Prozent der Monomereinheiten der Chitosanmoleküle positiv geladen sind. Chitosane mit Molekulargewichten von 30 bis 170 kDa zeigen als Transfektionsreagenzien ähnlich gute Erfolge wie PEI. Untersuchungen von Chitosanen sehr kleiner oder sehr großer Molekulargewichte zeigen nur minimale Transfektionseffizienz (Sato et al., 2001). Wie bei PLL gibt es auch bei Chitosan-vermitteltem Gentransfer die Möglichkeit, durch Endosomolyse-induzierende Peptide die Effizienz zu steigern (MacLaughlin et al., 1998). Dies weist ebenfalls auf einen, natürlicherweise wenig stark ausgeprägten, Freisetzungsprozess der Komplexe aus dem Endosom ins Zytosol hin.

Dendrimere, als eine weitere Art von kationischen Polymeren zum Gentransfer, sind hochverzweigte Moleküle. Die Synthese geht entweder von einem



Kernmolekül in Richtung Peripherie des Moleküls aus (divergente Synthese) oder umgekehrt, der Startpunkt befindet sich in der Peripherie und die Synthese läuft zum Inneren des Moleküls ab (konvergente Synthese) (Tang et al., 1996). Elektrostatische Bindungen zwischen Phosphatgruppen der DNA und Aminogruppen der Dendrimere bilden typischerweise Komplexe mit einer Größe von circa 50 nm (Bielinska et al., 1999). Polyamidoamine (PAMAM) sind die am häufigsten verwendeten Dendrimere zum nichtviralen Gentransfer. Diese Polymere mit einer Ethylendiamin-Grundstruktur sind wenig zytotoxisch und relativ effizient transfizierend (Esfand and Tomalia, 2001).

### 1.3.2.3 Lipide

Die ersten nichtviralen Vektoren waren Komplexe aus kationischen Lipiden und DNA (Lipoplexe) (Felgner et al., 1987). Diese wurden nicht nur *in vitro*, sondern bald auch *in vivo* erfolgreich getestet (Zhu et al., 1993). Durch die Komplexierung von DNA mit kationischen Lipiden entstehen geschlossene Vesikel aus Phospholipid-Doppelschichten mit einem wässrigen Kern. Diese Liposomen haben durch ihre insgesamt positive Ladung die Möglichkeit, an der Zellmembran zu adsorbieren und können durch Endozytose, ebenso wie DNA-Polymerkomplexe, ins Zytoplasma aufgenommen werden (Zhou and Huang, 1994). Aus diesem Grund ist das Verhältnis zwischen negativ geladener DNA und positiv geladenem Lipid essentiell und hat erheblichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Die Freisetzung der Komplexe aus dem Endosom erfolgt durch Wechselwirkungen der kationischen Lipide mit anionischen Bestandteilen der Membran (Wattiaux et al., 1997) oder mit anionischen zytoplasmatischen Lipiden (Xu and Szoka, 1996). Die Entlassung der DNA aus dem Endosom ins Zytoplasma wird häufig durch zugesetzte neutrale Helferlipide forciert. Der Mechanismus des Eintretens der DNA vom Zytoplasma in den Kern ist, wie bei kationischen DNA-Polymer-Komplexen, bisher ungeklärt und umstritten. Zu den am häufigsten verwendeten kationischen Lipiden zum Gentransfer gehören 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP), N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-propyl-

N,N,N-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA), 2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(Spermincarbox-amido)ethyl]-N,N-Dimethyl-1-propanaminium (DOSPA), Di-Octadecylamidoglycilspermin (DOCS) und 3,[N-(N1,N-Dimethylethylendiamin)-carbamoyl]cholesterol (DC-chol). Als häufigstes neutrales Helferlipid wird Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) eingesetzt. Mittlerweile sind mehr als 30 verschiedene Lipide zum Gentransfer in verschiedenen Zusammensetzungen kommerziell erhältlich. Der starke inhibitorische Effekt von Serum auf die Transfektionseffizienz von kationischen Lipiden ist ein großes Problem für die breite Anwendung der Lipofektion (Yang and Huang, 1997). Insbesondere *in vivo* stellt die hohe Zytotoxizität der kationischen Lipide ein großes Problem bei der Verwendung als Gentransfervehikel dar. Die Zytotoxizität ist unter anderem abhängig von dem Verhältnis aus kationischem Lipid und DNA, sowie von der Menge des eingesetzten Lipoplexes (Dass, 2004). Der Grad der Toxizität, aber auch die Transfektionseffizienz ist weiterhin stark vom Zelltyp abhängig. *In vitro* können kationische Lipide und Lipoplexe sowohl Vakuolenbildung im Zytoplasma, reduzierte Mitoseraten, Verkleinerung der Zellen, als auch Hämolyse induzieren (Senior et al., 1991; Lappalainen et al., 1994). Viele *in vivo*-Anwendungen von Lipoplexen induzieren inflammatorische Reaktionen (Nita et al., 1996; Barron et al., 1998; Freimark et al., 1998).

Neben kationischen Lipiden zum nichtviralen Gentransfer wurden auch anionische und neutrale Lipide untersucht (Lakkaraju et al., 2001; Patil et al., 2004). Ein Vorteil von anionischen Lipiden ist ihre relative geringe Toxizität, allerdings ist die Komplexbildung mit Nukleinsäuren nur durch Zusatz von Kationen oder Polykationen effizient (Lee and Huang, 1997).

### 1.4 Plasmid-DNA Konkatemere

Wie bei Proteinen kann auch bei Nukleinsäuren zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur unterschieden werden. Die Primärstruktur stellt die Abfolge der Nukleotide dar, die Sekundärstruktur wird bei genomischen Säugernukleinsäuren als Doppelhelix beschrieben und die Tertiärstruktur gibt die weitere Verdrillung

dieser Doppelhelix an, die schließlich die Form von Chromosomen einnimmt. Wie bereits unter 1.2.1 beschrieben, treten hauptsächlich drei unterscheidbare Strukturen von Plasmid-DNA auf. Dazu gehören kovalent-geschlossen-zirkuläre-, offenkettig-zirkuläre- und lineare Plasmid-DNA. In verschiedenen Studien wurde der Einfluss der Topologie von Plasmid-DNA auf die Transfektionseffizienz untersucht (Weintraub et al., 1986; Xie and Tsong, 1993; Remaut et al., 2006). Wurde Plasmid-DNA in den jeweils drei topologischen Formen in den Kern injiziert, so ergab sich bezüglich der Transkriptionseffizienz kein Unterschied (Remaut et al., 2006). Wurden dagegen DOTAP/DOPE-Lipidpartikel als Vehikel für die Plasmid-DNA verwendet, so konnte ausschließlich mit der kovalent-geschlossen-zirkulären Form Transgenexpression beobachtet werden. Bei direkter Injektion der drei topologischen Formen ins Zytosol konnte im Falle der kovalent-geschlossen-zirkulären DNA ebenfalls signifikant höhere Expression gemessen werden. Dagegen konnten Xie et al (Xie and Tsong, 1993) keinen Unterschied zwischen der kovalent-geschlossen-zirkulären und der offenkettig-zirkulären Form von Plasmid-DNA bezüglich ihrer Transfektionseffizienz mit Elektroporation feststellen. Bei der Herstellung von Plasmid-DNA in *E. coli*-Bakterien treten durch Rekombinationsereignisse häufig oligomere Formen auf (Bedbrook and Ausubel, 1976). Diese so genannten Konkatemere sind im Falle einer Kopf-an-Schwanz Verknüpfung wegen ihres exakt gleichen Schnittmusters in ihrer linearen Form nicht durch Restriktionsverdau zu unterscheiden. *In vivo*-Transfektionen von linearer konkatemerer Plasmid-DNA zeigten höhere Langzeit-Transgenexpression verglichen mit nicht-konkatemerer, kovalent-geschlossen-zirkulärer Plasmid-DNA (Chen et al., 2001). Außerdem konnte Konkatemersierung von linearer-, nicht jedoch von zirkulärer Plasmid-DNA, nach Transfektion *in vivo* gezeigt werden. Untersuchungen zu nicht charakterisierten, unspezifisch gebildeten, linearen Konkatemeren ergaben eine 14-fache Steigerung der Transgenexpression verglichen mit der entsprechenden zirkulären monomeren Plasmid-DNA (Leahy et al., 1997). Eine neue Studie, in der unterschiedlich große *Bacterial Artificial Chromosome* Plasmide zwischen 12 und 172 kb *in vivo* durch hydrodynamische, intravasale Injektion transfiziert wurden,

ergab keinen Einfluss der Größe von Plasmiden auf die Transgenexpression (Hibbitt et al., 2007). Dies unterstreicht den Einfluss der speziellen Anordnung in Konkatemeren auf die Transfektionseffizienz und schließt einen alleinigen Größeneffekt aus. Stabile und exakt definierte Plasmid-DNA-Konkatemere konnten durch die Verwendung der *E. coli*-Stämme K12JM105 und DH5 $\alpha$  produziert werden (Voss et al., 2003). Hierzu wurden unterschiedliche Plasmid-DNA Konkatemere im rekombinationskompetenten *E. coli*-Stamm K12JM105 hergestellt, über Gelelektrophorese aufgereinigt und separiert. Anschließend wurden die verschiedenen oligomeren Formen jeweils durch Transformation in den nahezu rekombinationsdefizienten *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  amplifiziert. Diese genau charakterisierten zirkulären DNA-Konkatemere wurden allerdings bisher noch nie systematisch bezüglich ihrer Transfektionseffizienz untersucht.

### 1.5 Integration von Plasmid-DNA zum stabilen nichtviralen Gentransfer

Neben der geringeren Transfektionseffizienz ist die lediglich transiente Transgenexpression ein großer Nachteil des nichtviralen Gentransfers verglichen mit viralen Genvektoren. Nach dem Auftreten klonaler T-Zell-Proliferationen in fünf Fällen und dem Tod eines der Patienten einer retroviralen Gentherapie zur Behandlung des X-SCID in Folge insertioneller Mutagenese ist die Etablierung eines sicheren, effizienten und stabilen nichtviralen Gentransfersystems bedeutungsvoller geworden. Neben der Entwicklung episomal replizierender Vektoren (Conese et al., 2004) sind unterschiedliche nichtvirale, rekombinierende und integrierende Systeme Fokus intensiver Forschungsarbeiten. Durch die Verwendung der „Sleeping Beauty“ Transposase ist die dauerhafte Integration von Plasmid-DNA ins Genom möglich (Ivics et al., 1997; Izsvak and Ivics, 2004). Allerdings findet die Integration hier zufällig und unspezifisch statt. Im Unterschied zu integrierenden Viren findet die Integration mittels Transposase nicht vorzugsweise in transkriptionsaktiven Bereichen des Genoms statt. Trotzdem birgt auch die zufällige Integration theoretisch die Gefahr insertioneller Mutagenese. Spezifisch integrierende Rekombinasen (*SSRs* = *site-specific*

*recombinases*) haben den großen Vorteil, Integration in ganz bestimmte Sequenzen des Genoms zu steuern. Zu den am häufigsten verwendeten SSRs gehören die aus der  $\lambda$ -Integrasenfamilie stammenden *Cre*- und FLP-Rekombinasen (Sauer and Henderson, 1988; Golic and Lindquist, 1989). Die aus dem P1-Bakteriophagen stammende *Cre*-Rekombinase vermittelt die Rekombination zwischen 34 bp langen loxP-Erkennungssequenzen. Je nach Orientierung der Erkennungssequenzen kann sowohl Integration als auch Exzision von DNA-Sequenzen erreicht werden. Unter Verwendung des *Cre*-Enzyms war es möglich, transgene Mäuse mit induzierbarer Genexpression zu generieren (Sauer, 1998). Ebenfalls häufige Verwendung zur genetischen Manipulation findet die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al., 1991). Die FLP vermittelt ebenfalls Rekombination zwischen 34 bp langen FLR-Erkennungssequenzen. Auch durch Rekombination mittels FLP konnten erfolgreich transgene Mäuse erzeugt werden (Takeuchi et al., 2002). Beide Rekombinasen haben allerdings auch Nachteile. Da sowohl für Integration als auch für Exzision die gleichen Erkennungssequenzen verwendet werden, ist die jeweilige Reaktion reversibel. Die Integration genetischen Materials durch beide Enzyme ist daher nicht zwangsläufig stabil. Ein weiterer Nachteil ist das Fehlen von Erkennungssequenzen beider Enzyme im Säugergenom. Dies bedeutet, dass zur Integration von DNA-Sequenzen das vorherige Einbringen der jeweiligen loxP- oder FTR-Sequenzen nötig ist.

Die Integrase aus dem  $\phi$ C31 *Streptomyces* Bakteriophagen vermittelt natürlicherweise die Integration des Phagengenoms ins Bakteriengenom. Die  $\phi$ C31 Integrase ist ein aus 605 Aminosäuren bestehendes Protein, das zur Umsetzung seiner spezifischen Rekombinationsreaktion keine zusätzlichen Kofaktoren benötigt (Thorpe and Smith, 1998). Spezifische chromosomale *attachment* Sequenzen im Phagengenom (*attP*) und im Bakteriengenom (*attB*), mit einer Größe zwischen 30 und 40 bp, dienen als Erkennungssequenzen für die  $\phi$ C31 Integrase. Bei der Rekombination kommt es zum Auftrennen der DNA-Stränge an den jeweiligen *attB*- und *attP*-Sequenzen. Anschließend wird die Phagen-DNA

unter Bildung von flankierenden so genannten *attL*- und *attR*-Sequenzen ins bakterielle Genom integriert (Abbildung 1.5).

Abbildung 1.5

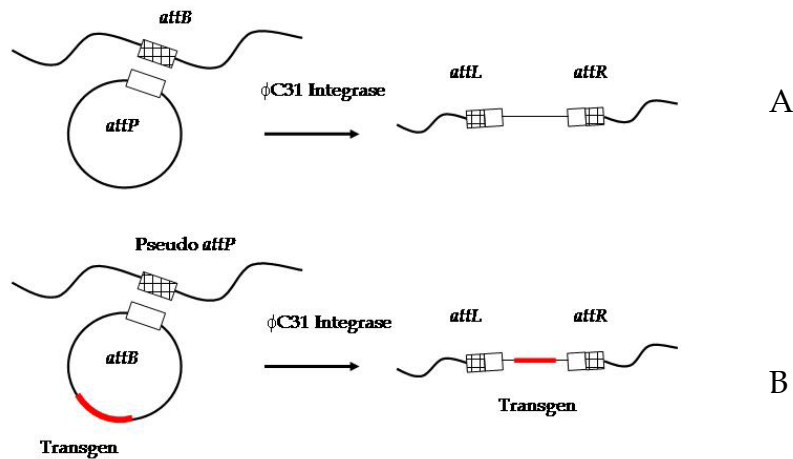


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Integration mittels  $\phi$ C31 Integrase.

Die  $\phi$ C31 Integrase vermittelt natürlicherweise die Integration des Phagenoms ins bakterielle Genom zwischen *attB*- und *attP*-Sequenzen (A). Eine Anwendung zum Gentransfer stellt die stabile Integration von Plasmid-DNA ins Säuger-Genom durch Rekombination zwischen *attB*-Sequenzen im Plasmid und Pseudo-*attP*-Sequenzen im Säuger-Genom dar (B).

Groth et al. (Groth et al., 2000) konnten zeigen, dass das  $\phi$ C31 Integrase Enzym auch in Säugerzellen funktionell ist. Dazu wurde eine episomale Plasmid-basierte Versuchsanordnung verwendet. Nach Kotransfektion des pBCPB+ Plasmids, das sowohl die *attB*- als auch die *attP*-Sequenzen enthält, zusammen mit einem für die Integrase kodierenden Vektor wurde die unidirektionale intramolekulare Rekombination des pBCPB+ nachgewiesen. Die Rekombinationseffizienz in Säugerzellen betrug 52 Prozent, während die Effizienz in Integrase tragenden *E. coli*-Bakterien 100 Prozent entsprach. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die minimalen Größen der Erkennungssequenzen, die noch volle Rekombinationseffizienz zeigten, 34 bp für die *attB* und 39 bp für die *attP* betragen. Thyagarajan et al. (Thyagarajan et al., 2001) konnten weiterhin zeigen, dass die  $\phi$ C31 Integrase auch die Integration von Plasmid-DNA ins Genom von Säugerzellen vermitteln kann (Abbildung 1.5). Das Genom von Säugern enthält Sequenzen, die ebenfalls von der  $\phi$ C31 Integrase erkannt werden können. Diese

werden in Analogie zu den *attP*-Erkennungssequenzen im Phagengenom als Pseudo *attP*-Sequenzen bezeichnet. Die Charakterisierung der Pseudo *attP*-Sequenzen ergab eine Übereinstimmung zur Wildtyp-*attP*- Sequenz von 20 bis 60 Prozent. Eine essentielle Triplet-TTG-Kernsequenz wurde allerdings für alle Pseudo *attP*-Sequenzen festgestellt. Durch die  $\phi$ C31 Integrase vermittelte Integration eines Reporter-gen-tragenden Plasmids konnte weiterhin Transgenexpression über mehrere Wochen erreicht werden. Seit der Etablierung der Integrase in Säugerzellen wurden zahlreiche Studien zur Anwendbarkeit für gentherapeutische Zwecke *in vitro* und *in vivo* unternommen. Transgene Mäuse konnten durch die stabile Integration des humanen antihämophilen Faktor IX mittels  $\phi$ C31 Integrase erzeugt werden (Olivares et al., 2002). Mittels hydrodynamischer Injektion in die Schwanzvenen von C57Bl/6-Mäusen wurde die Kotransfektion der Leber mit einem Faktor IX plus *attB*-Sequenz enthaltenden Vektor zusammen mit einem für die Integrase kodierenden Plasmid durchgeführt. Innerhalb von zwei Wochen stabilisierte sich die Transgenexpression auf einem 12-fach höheren Niveau als im Falle der Negativkontrolle, bei der statt des Integrase-Plasmids ein leerer Vektor appliziert wurde. Neben der Integrase war weiterhin die *attB*-Sequenz im Transgenvektor essentiell für eine erhöhte stabile Faktor IX-Expression. Die Untersuchung zweier bekannter Pseudo *attP*-Sequenzen ergab eine deutliche Präferenz für die „mpsL1“- verglichen zur „mpsL2“ Integrationsstelle. Die erfolgreiche Anwendung des Integrasesystems gelang 2002 auch an menschlichen primären epidermalen Progenitorzellen (Ortiz-Urda et al., 2002). Zellen aus vier nicht verwandten Epidermolysis Bullosa-Patienten wurden *ex vivo* mittels Integrase mit der korrekten COL7A1 cDNA stabil transfiziert. Dadurch gelang die Korrektur von zentralen phänotypischen Krankheitsbildern in diesen Zellen. Das morphologische und histologische Erscheinungsbild dieser Zellen *in vitro* und von transplantiertem Gewebe im SCID-Mausmodell normalisierte sich durch die Expression von Typ VII-Kollagen, der Kohäsion von Dermis und Epidermis sowie durch die Bildung von verankernden Fibrillen. Weiterhin konnten myogene Vorläuferzellen *ex vivo* mit einem Fusionsgen aus Grün-Fluoreszierendem-Protein (GFP) und dem kompletten Dystrophingen stabil

transfiziert werden (Quenneville et al., 2004). Auch hier wurde die  $\phi$ C31-spezifische Integration in einer bekannten Pseudo *attP*-Sequenz gezeigt. Integrase vermittelte, stabile Transfektion von murinen und humanen Alveolar Typ II-Zellen *in vitro* und von Lungengewebe im Mausmodell *in vivo* konnte ebenfalls kürzlich erreicht werden (Aneja et al., 2007). Die Lunge als Zielorgan bietet hier insbesondere durch Anwendung der Aerosolapplikation von Plasmid-DNA die Möglichkeit, eine Vielzahl von Erkrankungen wie Zystische Fibrose, Asthma oder Lungenkarzinome langfristig zu behandeln. Verschiedene weitere Zelltypen, Gewebe und Organismen, wie murine embryonale Stammzellen (Belteki et al., 2003), die Retina von Ratten (Chalberg et al., 2005) oder *Drosophila* (Bateman et al., 2006) wurden ebenfalls in den letzten Jahren stabil mittels  $\phi$ C31 Integrase genetisch modifiziert. Mittlerweile wurden allerdings in den unterschiedlichen Zelltypen auch bereits mehr als 350  $\phi$ C31-spezifische Integrationsstellen identifiziert (Chalberg et al., 2006). Einige davon wurden in fast allen Zelltypen gefunden, während andere offensichtlich zelltypspezifisch sind. Diese Untersuchungen zur Spezifität der  $\phi$ C31 Integrase konnten in verschiedenen anderen Studien bestätigt werden (Ehrhardt et al., 2006; Aneja et al., 2007). Mögliche schwere Nebenwirkungen der Integrase wurden erstmals diskutiert, als 2006 die Gruppe um Jensen (Liu et al., 2006) chromosomale Translokationen in primären Fibroblasten feststellte, die stabil mit der  $\phi$ C31 Integrase transfiziert waren. Im gleichen Jahr konnten chromosomale Translokationen, sowie Deletionen und Insertionen in unterschiedlichen Zelllinien, die nur transient mit der Integrase transfiziert waren, beobachtet werden (Ehrhardt et al., 2006). Bisher konnten solche Rearrangements von genomischer DNA allerdings nur *in vitro* gezeigt werden. Soweit solche oder ähnliche Phänomene nicht *in vivo* festgestellt werden, kann die  $\phi$ C31 Integrase weiterhin als sichere Alternative zur integrierenden Viren in der Gentherapie angesehen werden. Insbesondere die Leukämiefälle bei fünf Patienten nach retroviraler X-SCID Gentherapie in Paris und London verdeutlichen die Notwendigkeit sicherer gentherapeutischer Alternativen. Die grundsätzliche Anwendbarkeit der  $\phi$ C31 Integrase auf Zellen des hämatopoetischen Systems wurde bisher explizit in nur einer Studie



untersucht. Ishikawa et al. (Ishikawa et al., 2006) konnten Integration von Plasmid-DNA in zum Teil bekannte Integrationsstellen im Genom von Jurkat T-Zellen zeigen. Dies gelang allerdings nur unter Anwendung von G418-Selektionsdruck. Weiterhin wurde eine erhöhte Transgenexpression durch die Koapplikation der Integrase festgestellt. Die Werte sanken jedoch trotz G418-Selektionsdruck innerhalb von neun Tagen auf einen relativen Wert von < 1 Prozent bezogen auf die Transgenexpression drei Tage nach Transfektion ab. Der letzte Wert wurde an Tag 12 angegeben, so dass lediglich stabile Transgenexpression in einem Zeitraum von drei Tagen gezeigt wurde. Die Werte der Transgenexpression nach Tag 12 wurden nicht angegeben. Dies zeigt die spezifische Integration durch die  $\phi$ C31 Integrase in Zellen des hämatopoetischen Systems unter Selektionsdruck, gibt aber keine Auskunft darüber, inwieweit die Integration zu Langzeit-Transgenexpression insbesondere auch ohne Selektionsdruck führt. Vor allem für genetische *ex vivo* Modifikationen von primären hämatopoetischen Stammzellen mit anschließender Reimplantation nach zwei bis drei Tagen, wie es auch bei den retroviralen X-SCID-Studien in Paris und London durchgeführt wurde, ist ein Selektionsdruck mit G418 nicht anwendbar.

### 1.6 Episomale Vektoren zum stabilen nichtviralen Gentransfer

Eine Alternative zur Integration von Transgenen ins Genom der Zielzellen durch Transposasen und Integrasen ist die stabile extrachromosomale Verankerung von Plasmid-DNA im Zellkern. In ruhenden, sich nicht teilenden Zellen verbleibt ein Plasmid, das durch Transfektion in den Zellkern gelangt ist, normalerweise für einige Zeit dort bestehen. Anders ist dies in sich teilenden Zellen der Fall, wo extrachromosomale Plasmid-DNA bei jedem Teilungsschritt „ausverdünnt“ wird. Sich teilende Zellen können mit extrachromosomal verbleibenden Vektoren nur dann stabil transfiziert werden, wenn sich der Vektor selbst repliziert. Einige Viren, wie beispielsweise Adenoviren, haben dazu die Möglichkeit. Eine Kombination aus viralen und nichtviralen Elementen zur stabilen Transfektion mit selbstreplizierenden Vektoren sind die Epstein-Barr Virus (EBV)-basierten

episomalen Vektoren (Yates et al., 1985; Yates and Guan, 1991). Dies sind Plasmid-DNA Moleküle, die neben den nichtviralen Elementen zusätzlich den Replikationsursprung (*origin of replication* - kurz: *ori*) *oriP* des EBV Genoms, sowie die Sequenz des EBV Nukleären Antigens 1 (EBNA1) tragen. Das nukleäre Phosphoprotein EBNA-1, das C-terminal eine DNA-bindende und eine Dimerisierungs-Domäne enthält, bindet an die *oriP* und vermittelt die Replikation der Plasmid-DNA synchron zur chromosomalen Replikation (Mazda, 2002; Stoll and Calos, 2002). Auch eine höhere Transgenexpression und bessere Transfektionsraten konnten für EBV basierte episomale Vektoren festgestellt werden (Mazda et al., 1997). Da der Epstein-Barr-Virus als Erreger der Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) und potentiell onkogener Virus gilt, muss die Sicherheit von EBV-basierten episomalen Vektoren in der Gentherapie gewährleistet sein. Allerdings konnte bereits eine höhere Inzidenz von B-Zell-Lymphomen in EBNA-1 transgenen Mäusen festgestellt werden (Tsimbouri et al., 2002).

Untersuchungen zur Identifizierung von chromosomalen Replikationsursprüngen ergaben, dass der bidirektionale Replikationsursprung am 5'-Ende des CMYC-Gens auch zur Replikation von Plasmid-DNA dienen kann. Ein CMYC-*ori* tragendes Plasmid konnte *in vitro* über mehr als 300 Zellgenerationen stabil als Episom erhalten bleiben (McWhinney and Leffak, 1990). Dies konnte auch *in vivo* durch die Injektion eines CMYC-*ori*-tragenden Plasmids in befruchtete murine Eizellen und die Generierung der entsprechenden transgenen Maus bestätigt werden (Sudo et al., 1990). In allen untersuchten Geweben konnte Plasmid-DNA über mehrere Generationen detektiert werden. Allerdings wurde in den Untersuchungen zum CMYC-Replikationsursprung keine Expression von Reporter- oder therapeutischen Transgenen untersucht. Daher bleibt unklar, inwieweit dieses System zum effizienten Gentransfer angewendet werden kann.

Weitere selbstreplizierende Vektoren, die keinerlei virale Elemente benötigen, sind *Scaffold Matrix Attachment Region* (S/MAR)-enthaltende Plasmide (Jenke et al., 2004). S/MAR-enthaltende Plasmide wurden schon 1999 in Kombination mit dem Simian Virus 40 (SV40) Replikationsursprung entwickelt (Piechaczek et al., 1999).

Der SV40-Replikationsursprung wurde allerdings nicht für die Replikation des Plasmids benötigt (Jenke et al., 2004). S/MAR-Elemente sind bezüglich ihrer DNA-Sequenz heterogen und weisen keine Konsensussequenz auf. Allerdings weisen S/MARs typischerweise A/T-reiche Sequenzen auf und spielen in der Organisation des Chromatins eine entscheidende Rolle (Luderus et al., 1994; Goetze et al., 2003). So befinden sich S/MAR-Elemente häufig zwischen transkriptionsaktiven Regionen und trennen diese in unabhängige Bereiche. Diese Insulatorfunktion von S/MARs konnte zur Stabilisierung von Transgenexpression *in vivo* genutzt werden (Namciu et al., 1998). Weiterhin entstehen häufig Strangtrennungen an S/MAR-Elementen, wodurch höchstwahrscheinlich eine Bindung zur Kernmatrix etabliert wird (Bode et al., 1986; Bode et al., 1992). Weiterhin kann bei stabiler Integration von S/MAR-Elementen Transkription und damit Transgenexpression aktiviert oder verstärkt werden (Klehr et al., 1992; Bode et al., 1995). S/MARs konnten in vielen eukaryontischen Organismen identifiziert werden (Gasser and Laemmli, 1986; Loc and Stratling, 1988; Amati and Gasser, 1990). Neben der Anwendung zur Gentherapie wurden S/MARs enthaltende Vektoren auch zur verbesserten rekombinanten Expression von Proteinen in Säugierzellen verwendet (Kim et al., 2004). Das humane  $\beta$ -Interferon-Gen enthält am 5'-Ende circa 1,7 kb der kodierenden Region entfernt eine circa 2000 bp umfassende S/MAR (Bode and Maass, 1988), die in den meisten Untersuchungen zur gentherapeutischen Anwendung von S/MAR-tragenden Plasmiden verwendet wurde (Piechaczek et al., 1999; Lipps et al., 2003; Schaarschmidt et al., 2004). Für die humane  $\beta$ -Interferon S/MAR wurde eine hohe Bindungsaffinität zum nukleären Matrixprotein *Scaffold Attachment Factor-A* (SAF-A) festgestellt, was die stabile Verankerung eines S/MAR-enthaltenden Plasmids ermöglicht (Jenke et al., 2002). Für die Replikation von S/MAR-enthaltenden Vektoren ist die Lokalisation des S/MAR-Elements am 3'-Ende des Transgens und somit die teilweise Assoziation aktiver Transkription mit dem S/MAR-Element essentiell (Stehle et al., 2003; Jenke et al., 2004). Eine große Hürde zur klinischen Anwendung von S/MAR enthaltenden Vektoren ist die Notwendigkeit eines initialen G418-Selektionsdruck mit einer Dauer zwischen zwei bis drei Wochen.

Nach dieser initialen Selektion ist es möglich, die Zellen ohne den Verlust des episomal replizierenden Plasmids zu kultivieren. Allerdings ist ein anfänglicher Selektionsdruck *in vivo* nicht praktikabel und kann, wie oben bereits erwähnt, auch bei *ex vivo* Transfektion mit anschließend geplanter Reimplantation nicht angewendet werden. Erste Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen zeigten, dass sowohl in hämatopoetischen Zelllinien, als auch in humanen hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen der episomale Status eines S/MAR-Vektors über mehrere Wochen erhalten bleibt (Papapetrou et al., 2006). Allerdings führt hier ein initialer Selektionsdruck nach vier Wochen nur zu circa einem Prozent transgener Zellen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die erfolgreichen klinischen Studien zur Behandlung des X-chromosomalen schweren kombinierten Immundefizienz-Syndroms X-SCID in Paris und London haben die Gentherapie als eine anwendbare, hocheffiziente, kausale Therapieform bestätigt. Nach dem Auftreten von Leukämien durch insertionelle Mutagenese der replikationsdefizienten, retroviralen Vektoren bei fünf Patienten müssen allerdings Alternativen zum Einbringen von Transgenen mittels replikationsdefizienter Viren evaluiert werden. Nichtvirale Methoden könnten hierzu eine sichere Alternative bieten. Bisher sind allerdings die geringe Transfektionseffizienz und die lediglich transiente Transgenexpression limitierend für die Anwendung nichtviraler Methoden in der Gentherapie. In dieser Arbeit sollte ein nichtviraler gentherapeutischer Ansatz zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen erarbeitet werden. Im ersten Teil der Arbeit sollte die Möglichkeit einer Steigerung der Transfektionseffizienz durch die Anwendung von Plasmid-DNA Konkatemeren in hämatopoetischen Zellen untersucht werden. Dazu wurde ein systematischer Vergleich zwischen einem EGFP-Reportergen-tragenden Plasmid-DNA Monomer und dem entsprechenden Dimer bezüglich Anzahl der transfizierten Zellen und der EGFP-Expression pro Zelle im Zusammenhang mit der jeweiligen Menge an intrazellulärer Plasmid-DNA angestellt. Dieser Zusammenhang gibt Auskunft über die jeweiligen Transfektionseffizienzen der verschiedenen Konstrukte bezüglich ihrer Aufnahme in die Zelle, als auch die resultierende Transgenexpression pro Plasmid-DNA Molekül. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, stabile Transfektion von hämatopoetischen Zellen mittels  $\phi$ C31 Integrase ohne die Anwendung von Selektion zu erreichen. Hierzu sollten unterschiedliche hämatopoetische Zellen transfiziert und die Transgenexpression durch stabile Integration überprüft werden. In der Arbeitsgruppe wurde die  $\phi$ C31 Integrase bereits erfolgreich in Lungenzellen verwendet, so dass ein direkter Vergleich zwischen dem hämatopoetischen System und der Lunge angestellt werden sollte und die jeweilige Aktivität der Integrase festgestellt werden sollte. Als

Alternative hierzu sollte ein nicht-integrierender, nichtviraler Vektor auf Basis der humanen  $\beta$ -Interferon S/MAR in Kombination mit starken Promotoren etabliert werden. Auch hier sollte untersucht werden, inwieweit stabile Transgenexpression ohne Selektionsdruck erreicht werden kann. Insbesondere sollten hier der Ubiquitin B- und der Ubiquitin C-Promotor untersucht werden, da für diese Promotoren teilweise vielversprechende Daten bezüglich der vermittelten Langzeit-Transgenexpression ohne Gen-*silencing* vorliegen. Weiterhin sollten die Konstrukte auch auf die Möglichkeit, durch direkte *in vivo* Applikation stabile Transgenexpression zu vermitteln, getestet werden. Die Untersuchungen zur Transgenexpression in hämatopoetischen Zelllinien sollten eine Grundlage für die nichtvirale Gentherapie zur Behandlung von X-SCID schaffen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Im Folgenden sind sämtliche Reagenzien, Chemikalien, Enzyme, Kits, Medien und Medienzusätze sowie Geräte gelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Folgende Reagenzien und Chemikalien wurden für diese Arbeit verwendet.

Reagenzien	Bezugsquelle
100 bp DNA Ladder	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland
100 bp DNA Ladder <i>PLUS</i>	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland
1Kbp DNA Ladder	PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
CD34 Multisort MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
CDP-Star solution	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Complete protease inhibitors	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
D-(+)Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dichlordiphenyltrichloroethan (DDT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DIG Easy Hyb Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
D-Luciferin 99%	Synchem OHG, Deutschland
DPBS 1x	Gibco-BRL, Grossbritannien
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethanol 96% p.a.	Merck KGaA, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad laboratories GmbH, Deutschland
FcR Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Ficoll - LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Österreich
FuGene	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Glucose 5%	Delta-Pharma, Deutschland
Gluthation	Merck KGaA, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Isotonische Kochsalz-Lösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Deutschland
Kanamycin-SO <sub>4</sub>	Gibco-BRL, Grossbritannien
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen Inc., Grossbritannien
MACS Multisort Stop Reagent	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland

### Fortsetzung Reagenzien & Chemikalien

Metafectene Pro	Biontex Laboratories GmbH, Deutschland
MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Nonidet P-40	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Phenol	Merck KGaA, Deutschland
Polyethylenimin, linear	S. Uezguen <sup>1</sup> nach Ogris und Wagner
Polyethylenimin, verzweigt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Propidiumiodid	Molecular Probes, Niederlande
Protein Assay Staining Dye	Bio-Rad laboratories GmbH, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Spermin Tetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
SYBR Green I	Cambrex Bio Science Inc., USA
TAE 50x buffer	Gibco-BRL, Grossbritannien
TOTO-1	Molecular Probes, Niederlande
Tris	VWR International GmbH, Österreich
Tris Natrium Citrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris-HCl	VWR International GmbH, Österreich
Triton-X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco-BRL, Grossbritannien

<sup>1</sup> Abteilung Molekulare Pneumologie, Dr. von Haunersches Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Synthese nach Ogris et al. (Ogris and Wagner, 2006)

### 2.1.2 Enzyme

Folgende Enzyme wurden für diese Arbeit verwendet.

Name	Bezugsquelle
Accu Prime Polymerase	Invitrogen Inc., Grossbritannien
AgeI	Fermentas GmbH, Deutschland
ApaI	Fermentas GmbH, Deutschland
BamHI	Fermentas GmbH, Deutschland
BamHI	New England Biolabs Inc., USA
BglIII	Fermentas GmbH, Deutschland
BspEI	New England Biolabs Inc., USA
EcoRI	Fermentas GmbH, Deutschland
EcoRI	New England Biolabs Inc., USA
Hind III	Fermentas GmbH, Deutschland
Ligase T4	Fermentas GmbH, Deutschland



## Fortsetzung Enzyme

NheI	Fermantas GmbH, Deutschland
Plasmid-Safe ATP-dependent DNase	Epicentre Biotechnologies, USA
PmeI	Fermantas GmbH, Deutschland
Polymerase T4	Fermantas GmbH, Deutschland
SacI	Fermantas GmbH, Deutschland
SAP	Fermantas GmbH, Deutschland
Taq Polymerase	New England Biolabs Inc., USA
XbaI	Fermantas GmbH, Deutschland

## 2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet.

Name	Bezugsquelle
anti-huCD34 FITC konjugiert	BD Bioscience Inc., USA
Kaninchen-anti-C31 Integrase polyklonal	M. Smith <sup>1</sup>
Maus-anti-huDAXX monoklonal	Biozol Diagnostica GmbH, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Ziege-anti-Maus HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

<sup>1</sup> Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Foresterhill,  
Aberdeen AB25 2ZD, United Kingdom

## 2.1.4 Kits

Folgende Kits wurden für diese Arbeit verwendet.

Name	Bezugsquelle
BetaGal Reportergene Assay Kit	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
CD34 Multi Sort Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DNeasy Tissue Kit	Qiagen AG, Deutschland
ECL chemiluminescence system	Amershan Bioscience, USA
NucleoBond PC 2000 EF	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
NucleoSpin extract II	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
NucleoSpin plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
NucleoSpin RNA II	MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland
PCR Probe DIG Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen AG, Deutschland
Super script first strand	Invitrogen Inc., Grossbritannien

### 2.1.5 Medien und Medienzusätze

Folgende Medien und Medienzusätze wurden für diese Arbeit verwendet.

Name	Bezugsquelle
DMEM Medium mit Glutamax	Gibco-BRL, Grossbritannien
FBS	PPA Laboratories, Österreich
FCS	PPA Laboratories, Österreich
Flt3-ligand	Pepto Tech Inc. USA
Geneticinsulfat (G418-SO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Gentamycin	Gibco-BRL, Grossbritannien
MEM Medium mit Glutamax	Gibco-BRL, Grossbritannien
Pencillin - Streptomycin	Gibco-BRL, Grossbritannien
RPMI 1640 Medium mit Glutamax	Gibco-BRL, Grossbritannien
SCF	Pepto Tech Inc. USA
TPO	Pepto Tech Inc. USA

### 2.1.6 Geräte

Folgende Geräte wurden für diese Arbeit verwendet.

Name	Bezugsquelle
Aladin Perfusor	WPI Ltd., Grossbritannien
BioRad GenPulser II Gerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Digital Sonifier 250	Branson Inc., USA
Elektrophorese Analyse Sys Kodak EDAS 290	Kodak GmbH, Deutschland
FACScan	BD GmbH, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer Horizon 11.14	Gibco-BRL, Grossbritannien
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Heizplatte Tempcontrol-37	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
iCycler iQ	Eppendorf AG, Deutschland
Inkubator CO2 Series	Sheldon Mfg Inc., USA
Inkubator-Shaker Excella E24	New Brunswick Scientific Inc., USA
IVIS 100 imaging system	Xenogen Inc., USA
Kühlschrank FKS 1800	Liebherr GmbH, Deutschland
Luminometer Lumat LB9507	EG&C Berthold AG, Deutschland
Magnet midiMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Magnet miniMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Magnethalter MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf AG, Deutschland

Fortsetzung Geräte

NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Nucleofector II (Amaxa, Deutschland)	Amaxa GmbH, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Sterilbank Uniflow KR130	Uniequip GmbH, Deutschland
Tiefkühler Premium	Liebherr GmbH, Deutschland
Tischwaage Precision standard	Ohaus GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland
Vortexer MS2 Minishaker	Ika GmbH & Co. KG, Deutschland
Wallac Victor2/1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Inc., USA
Wasserbad GFL	Unitec GmbH, Deutschland
Zentrifuge Rotomata 460R	Hettrich GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge J2-21 Centrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Deutschland
90 Plus Partikelgrößenmessgerät	BIC Brookhaven Inst. Corp., USA

2.1.7 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für diese Arbeit verwendet. Die Synthese der aufgeführten Oligonukleotide wurde von der Firma biomers.net GmbH durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
FP DAXX	gga ccc cac aaa tgc tga aaa cac tgc
RP DAXX	agg gga tgc gct gct cta tga cac g
FP Luciferase	tca aag agg cga act gtg tg
RP Luciferase	ggg gtt gga gca aga tgg at
FP pC31-Intopt	atc acc ggc ctg tgt aag ag
RP pC31-Intopt	cgt cgg gct tct tct tgt ag
FP pCMV-Int	aca aga tat cgt gac cgg ggt gga c
RP pCMV-Int	tcc tcg agc gcc gct acg tc
FP puro	gca agg gtc tgg gca gcg
RP puro	ttg ccg atg tcg agc ccg

### 2.1.8 Arzneistoffe

Folgende Arzneistoffe zur Anwendung im Mausmodell wurden für diese Arbeit verwendet.

Arzneistoffe	Bezugsquelle
Atipamezol 5mg/ml	Orion Pharma, Finnland
Dexamethason 4mg/ml	ratiopharm GmbH, Deutschland
Fentanyl 0,1mg/ml	Janssen Cilag GmbH, Deutschland
Flumazenil 0,1mg/ml	Deltaselect GmbH, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH, Deutschland
Medetomidin 1mg/ml	Orion Pharma, Finnland
Midazolam 15mg/3ml	ratiopharm GmbH, Deutschland
Naloxon 0,4mg/ml	hameln pharma plus GmbH, Deutschland

### 2.2 Herstellung und Zusammensetzungen von Puffern

Für die Arbeit wurden Puffer mit folgenden Zusammensetzungen hergestellt. Die Puffer wurden mit *Aqua ad injectabilia* hergestellt.

HIRT Puffer:

10 mM EDTA, 0,6% SDS; 1 M Natriumchlorid; pH 7,5

Zellkernisolationspuffer:

3,5 mM Natriumcitrat, 0,1% Nonidet P-40, 1,5 mM Spermin  
Tetrahydrochlorid, 0,5 mM Tris

Depurinierungspuffer (Southern Blot):

250 mM HCl

Denaturierungspuffer (Southern Blot):

0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer (Southern Blot):

0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH 7,5

SSC 20x (Southern Blot)

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0

Nucleofectionspuffer

0,42mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5,36 mM KCl, 0,41 mM MgSO<sub>4</sub>, 103 mM NaCl, 23,8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,64 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11,1 mM D-(+)Glucose, 3,25µM Gluthation, 20mM HEPES; pH 7,3

Zelllysepuffer (Luciferase-Messung / Bradford-Bestimmung)

250 mM Tris, 0,1 % Triton X-100; pH 7,8

Luciferase-Assay-Puffer

470 µM D-Luciferin, 270 µM Coenzym A, 33,3 mM DTT, 530 µM ATP, 1,07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg<sub>2</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA

Elektrophorese-Auftragungspuffer

50% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau

Zelllysepuffer (Western Blot / Luciferase-Messung von Gewebe)

0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM Tri-HCl, 1 M DTT, Complete™ protease inhibitors (Roche, Indianapolis, IN); pH 7.4

### 2.3 Zellkultur

#### 2.3.1 Zelllinien und primäre Zellen

Folgende Zelllinien und primäre Zellen wurden für diese Arbeit verwendet

Name und Zelltyp	Bezugsquelle
A549 humane Alveolar Typ II Zelllinie	DSMZ Nr. ACC 107
BEAS-2B humane Bronchialepithel Zelllinie	ATCC Nr. CRL-9609
ED-7R humane $\gamma$ c <sup>+</sup> T-Lymphozyten Zelllinie	Saturo Kumaki <sup>1</sup>
HeLa humane Zervixepithel Zelllinie	DSMZ Nr. ACC 57
CD34 <sup>+</sup> humane hämatopoetische Stammzellen, primär	Bayerische Stammzellbank <sup>2</sup>
HepG2 humane Hepatozyten Zelllinie	DSMZ Nr. ACC 180
Jurkat humane T-Lymphozyten Zelllinie	DSMZ Nr. ACC 282
humane mesenchymale Stammzellen, primär	Marissa Karow <sup>3</sup>
humane T-Lymphozyten CD3 <sup>+</sup> , primär	Thomas Magg <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University  
Graduate School of Medicine, Sendai 980-8575, Japan

<sup>2</sup> Bayrische Stammzellbank GmbH, Gauting, Deutschland

<sup>3</sup> Abteilung für Klinische Chemie und klinische Biochemie, Chirurgie,  
Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

<sup>4</sup> Abteilung pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Dr. von Haunersches  
Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

#### 2.3.2 Kultivierungsbedingungen

Die Zelllinien A549, BEAS-2B, HeLa und HepG2 wurden in „Minimum Essential Medium“ (MEM) kultiviert. Jurkat-, ED-7R- und primäre T Lymphozyten wurden in RPMI 1640 kultiviert. Beide Medien wurden jeweils mit 10 Prozent fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Primäre, humane mesenchymale Stammzellen

wurden in „Dulbecco's Modified Eagle-Medium“ (DMEM) mit 10 Prozent fötalem Rinderserum (FBS) kultiviert. Zur Kultivierung von primären, humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen wurde das Medium X-VIVO mit den zugesetzten Zytokinen Stem Cell Factor (SCF; 20ng/ml), Thrombopoietin (TPO; 50ng/ml) und Flt-3 Ligand (50ng/ml) verwendet. Primäre T-Lymphozyten und primäre Stammzellen wurden maximal drei Tage bis zur Verwendung kultiviert und entsprechend nicht passagiert. Die adhärenenten Zelllinien A549, BEAS-2B, HeLa und HepG2 wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen mit Phosphatgepufferter Saline (PBS) frei von Calcium- und Magnesiumionen gewaschen und anschließend mit Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Ein Teil der gelösten Zellen wurde entnommen und frisches Medium zugefügt. Die Passagierung erfolgte maximal 18 Mal, um die Transfizierbarkeit der Zellen zu erhalten. Die Suspensionszellen Jurkat und ED-7R wurden ebenfalls alle 3-4 Tage passagiert und maximal bis zu 18 Passagen kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen resuspendiert, ein Teil der Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium ersetzt. ED-7R Zellen wurden bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle anderen Zellen wurden unter gleichen Bedingungen, allerdings bei 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Transfektionen wurden die Zellen in den jeweiligen Medien mit Antibiotikazusatz (Penicillin/ Streptomycin 10U/ml; Gentamycin 50µg/ml) kultiviert.

### 2.3.3 Isolierung von CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut

Das von der Bayerischen Stammzellbank bereitgestellte Nabelschnurblut wurde innerhalb von 36 Stunden nach Entbindung zur Isolierung der CD34<sup>+</sup> Zellen verwendet. Die Gewinnung von mononukleären Zellen (MNZ) aus Nabelschnurblut wurde mittels Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das heparinisierte Nabelschurblut 1:3 mit PBS zu insgesamt 39 ml Volumen verdünnt und 13 ml Ficoll-Hypaque vorsichtig unterschichtet. Nach Zentrifugation mit 612 g für 30 Minuten wurden die MNZ

aus der Phase zwischen Ficoll-Lösung und Plasma aspiriert. Die Zellen wurden weiterhin zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und anschließend mittels magnetischer Zellseparation (*Magnetic Cell Sorting* MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) die CD34<sup>+</sup> Zellen nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dazu wurden zunächst je nach Anzahl der Zellen MS<sup>+</sup>- oder LS<sup>+</sup>-Säulen mit autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) äquilibriert und am Magnet befestigt. Die MNZ wurden in autoMACS Running Buffer aufgenommen und mit FcR Blocking Reagenz (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) versetzt, um unspezifischen Bindung der CD34 Multisort MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) zu verhindern. Anschließend wurden CD34 Multisort MicroBeads zur Zellsuspension gegeben und bei 6-12°C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf die vorbereiteten Säulen am Magnet gegeben und nicht markierte Zellen dreimal mit autoMACS Running Buffer von der Säule gewaschen. Anschließend wurde die Säule vom Magneten entfernt und durch erneutes Waschen der Säule mit autoMACS Running Buffer die CD34-markierte Zellpopulation aus der Säule gewonnen und die CD34<sup>+</sup> Zellen im entsprechenden Medium kultiviert. Für die Überprüfung der Reinheit der Zellen wurden bei einem Teil der Zellen die CD34 Multisort MicroBeads durch Zugabe von MACS Multisort Stop Reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) entfernt und anschließend die Zellen mit FITC-konjugiertem anti-human CD34-Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

## 2.4 Plasmid-DNA

### 2.4.1 Klonierung von Plasmid-DNA

Zur Klonierung der Konstrukte pVAX1-Int, p $\Delta$ elCpG-Int, pVAX1-Luc, p $\Delta$ elCpG-Luc, p $\Delta$ elCpG-Luc $\Delta$ ttB, pCUBIBLuc, pEPICUBIBLuc, pUbCLuc und pEPIUbCLuc wurden die im Folgenden beschriebenen Standardmethoden verwendet. Durch enzymatischen Verdau von Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Zielstrukturen (Rückgrat und Insert)



generiert. Hierbei wurden jeweils die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur, Konzentration und Puffer angewendet. Anschließend wurden die DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt. Dazu wurden zwischen 0,8 und 2 Gramm Agarose in 100 ml kochendem TAE-Puffer gelöst und das damit erhaltenen 0,8%- bis 2%-ige Gel vor dem Erstarren mit 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Nach dem Erkalten und Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Referenz wurde zusätzlich stets ein entsprechender Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V und circa 200 mA. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mittels NucleoSpin extract II Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers. Bei der Mehrzahl der Restriktionsendonukleasen entstehen beim Trennen der DNA kohäsive (*sticky*) 5'-Enden. Bei bestimmten Klonierungsstrategien ist es nötig, glatte (*blunt*) Enden zu erhalten, weshalb die überstehenden 5'-Enden durch eine enzymatische Reaktion aufgefüllt wurden. Hierfür wurde eine T4-Polymerase (Fermentas GmbH, Deutschland) mit einem Mix an dNTPs (Fermentas GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Um die Zirkularisierung (*self-ligation*) des Plasmid-DNA-Rückgrats zu verhindern und die Klonierung des gewünschten DNA-Fragments zu ermöglichen, wurden ebenfalls in einer enzymatischen Reaktion die Phosphatgruppen von den Enden des DNA-Rückgrats entfernt. Hierfür wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP; Fermentas GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Anschließend wurden die DNA-Zielstrukturen Insert und Rückgrat in einem molaren Verhältnis von 5:1 mittels T4-Ligase (Fermentas GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers miteinander verknüpft (*ligation*). Aus diesem 20 µl *ligation* Reaktionsansatz wurde 1 µl zur Transformation in DH10B *E. coli*-Bakterien verwendet. Die transformierten Bakterien wurden bis zur Ausbildung der

entsprechenden Antibiotika (AB)-Resistenz für eine Stunde in AB-freiem LB Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf AB-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten für 12 Stunden bei 37°C wurden einzelne Klone amplifiziert und die Plasmid-DNA wie unter 2.4.2 beschrieben aufgereinigt. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch entsprechenden Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt.

### 2.4.2 Amplifizierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die jeweiligen Plasmid-DNA-tragenden *E. coli*-Klone gepickt und in 5 ml („Mini-Präp“) oder in 300 ml LB-Medium („Maxi-Präp“) mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde aus den resultierenden *E. coli*-Kulturen unter Verwendung der Kits NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland) oder NucleoBond PC 2000 EF (MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde die erhaltene Plasmid-DNA in 50µl oder 300µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) bestimmt. Im Falle der Konstrukte pEGFP-N1 und pEGFP-N1 Dimer wurden die in *E. coli* amplifizierte und aufreiniigte Plasmid-DNA von PlasmidFactory (PlasmidFactory GmbH, Deutschland) bezogen.

### 2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Plasmid-DNA

Zur Detektion und Quantifizierung intrazellulärer Plasmid-DNA mittels Durchflusszytometrie wurde Plasmid-DNA mit dem interkalierenden Fluorochrom TOTO-1 markiert. Pro 10 µg DNA wurden 0,75 µl TOTO-1-Stocklösung zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Dies führt im Mittel zur Markierung jeder 20. DNA-Base mit einem TOTO-1-Molekül. Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Plasmid-

DNA mittels Wallac Victor<sup>2</sup>/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Deutschland) wurde die Markierung bestätigt.

#### 2.4.4 Verwendete Plasmid-DNA Konstrukte

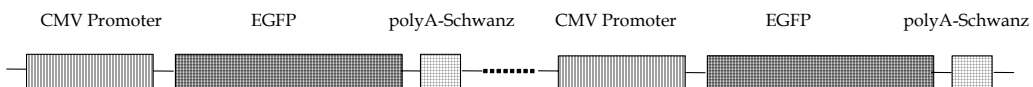
Im Folgenden sind schematisch die Expressionskassetten sowie wichtige spezifische Elemente der verwendeten Plasmid-DNA Konstrukte dargestellt. Die jeweiligen Plasmid-Rückgrate bestehen aus den Elementen i) bakterieller Replikationsursprung, ii) Selektionsmarker mit Promotor und iii) polyA-Schwanz, sind aber im Folgenden nicht näher dargestellt.

Für die Arbeit zu „3. Plasmid Konkatemere“ wurden folgende Plasmid-DNA Konstrukte verwendet:

##### pEGFP-N1 Monomer

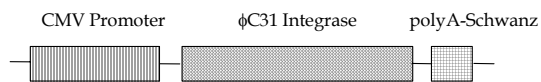


##### pEGFP-N1 Dimer

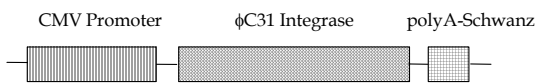


Für die Arbeit zu „4. Integration von Plasmid-DNA“ wurden folgende Plasmid-DNA Konstrukte verwendet:

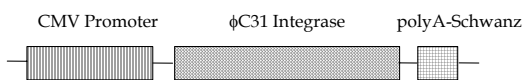
### pCMV-Int



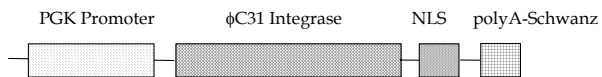
### pdelCpG-Int (CpG-reduziertes Rückgrat)



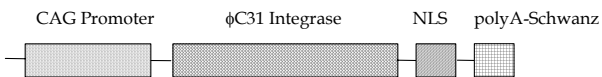
### pVAX-Int



### pPGKC31-Int



### pCAGC31-Int



### pC31-Intopt



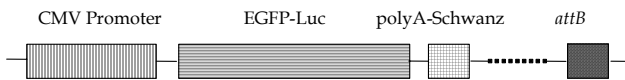
pEGFPLuc



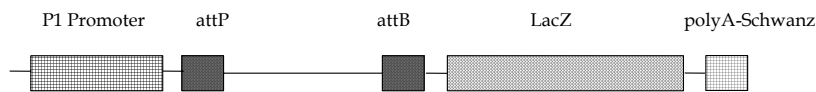
pEGFPLucattB



pdelCpGLucattB



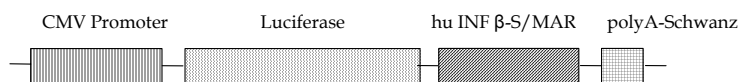
pSVpaxattP50attB53



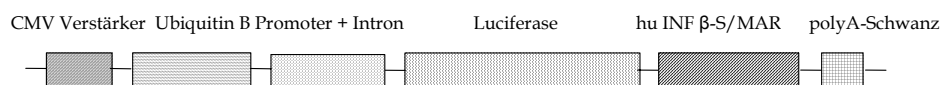
Die zur Kontrolle verwendeten Plasmide pUC21 und pdelCpG enthalten keine Expressionskassette und bestehen nur aus dem bakteriellen Rückgrat.

Für die Arbeit zu „5. Episomale Plasmid-DNA“ wurden folgende Plasmid-DNA Konstrukte verwendet:

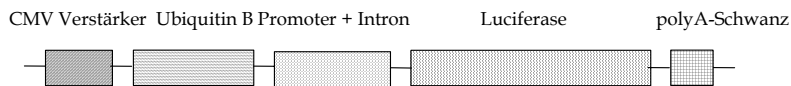
pEPI1-Luc



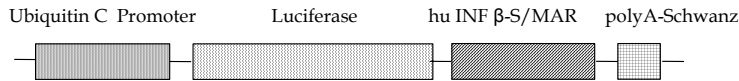
pEPICUBIBLuc



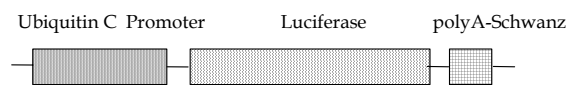
### pCUBIBLuc



### pEPIUbCLuc



### pUbCLuc



## 2.5 Transfektion

### 2.5.1 Transfektion mittels kationischen Lipiden

Für die Transfektion mit kationischen Lipiden wurden die kommerziell erhältlichen Reagenzien FuGene (Roche Diagnostics, Deutschland), Lipofectamin 2000 (Invitrogen Inc., Grossbritannien) und Metafectene Pro (Biontex Laboratories GmbH, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden jeweils entsprechende Plasmid-DNA zu Lipid-Verhältnisse (m/v) von 3:2, 2:1 und 4:1 und die Komplexe in entsprechenden Volumina von 25  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und 60  $\mu$ l zur Transfektion generiert. Die DNA-Lipid Komplexe wurden in FCS-freiem Medium durch Inkubation für 20 Minuten gebildet. Anschließend wurden die Komplexe auf die Zellen in FCS-freiem Medium gegeben. Nach vier Stunden wurden die Komplexe durch Waschen entfernt und FCS- und AB-haltiges Medium zugegeben.

### 2.5.2 Transfektion mittels Elektroporation

Zur Transfektion mittels Elektroporation wurde das BioRad GenPulser II Gerät verwendet. Die Elektroporation wurde in 400 $\mu$ l Medium ohne FCS mit 5  $\mu$ g oder

10 µg Plasmid-DNA und  $7,5 \times 10^5$  Jurkat-Zellen in 4 mm Küvetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden die spezifischen Einstellungen 200V, 1600µF und  $\Omega \rightarrow \infty$  gewählt. Nach Elektroporation wurden die Zellen für fünf Minuten auf Eis gelagert und anschließend in vorgewärmtes FCS- und AB-haltiges Medium gegeben.

### 2.5.3 Transfektion mittels Nucleofection

Transfektionen mittels Nucleofection wurden mit dem Gerät Nucleofector II (Amaxa GmbH, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden zwischen 1 und  $5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl Nucleofectionsbuffer mit 5 µg Plasmid suspendiert. Die Nucleofection wurde mit den jeweiligen zellspezifischen Programmen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes FCS-haltiges und AB-haltiges Medium gegeben.

### 2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Säugerzellen

Plasmid-DNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion nach der Methode von Hirt aus Zellen isoliert (Hirt, 1967). Dazu wurden zwischen  $3 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde über Nacht bei 4°C in HIRT-Puffer inkubiert. Anschließend wurden ebenfalls bei 4°C die genomische DNA und die Proteinfraction durch Zentrifugation bei 12.650 g für 30 Minuten abgetrennt und die im Überstand verbleibende niedermolekulare Plasmid-DNA durch Inkubation mit eiskaltem Ethanol 96% und Natriumacetat bei -20°C für eine Stunde gefällt. Die präzipitierte niedermolekulare DNA wurde weiterhin mit Ethanol 70% gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in H<sub>2</sub>O gelöst. Die resultierende gesamte niedermolekulare DNA enthält unter anderem Plasmid-DNA und wurde zur Southern Blot Analyse (2.12) oder zur Detektion mittels PCR (2.11) weiterverwendet.

### 2.7 Isolierung von RNA und Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Bestimmung und Quantifizierung von DAXX- und  $\phi$ C31 Integrase-RNA wurde mittels NucleoSpin RNA II Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Deutschland) Gesamt-RNA nach Protokoll des Herstellers isoliert. Weiterhin wurde durch enzymatische reverse Transkription cDNA synthetisiert. Dazu wurde das Super Script First Strand Kit (Invitrogen Inc., Grossbritannien) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die erzeugte cDNA wurde weiterhin zur quantitativen Analyse mittels qRT-PCR (2.11.2) verwendet.

### 2.8 Isolierung von Zellkernen

Zur intranukleären Quantifizierung von TOTO-1-markierter Plasmid-DNA wurden die Zellkerne aus Jurkat-Zellen von Zellmembran und Zytoplasma getrennt und isoliert. Dazu wurden Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert und anschließend das Zellpellet 10 Minuten in Zellkernisolierungspuffer (James and Giorgio, 2000) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die isolierten Zellkerne durchflusszytometrisch wie unter 2.9 beschrieben analysiert.

### 2.9 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein FACScan Gerät (BD GmbH, Deutschland) mit 488nm luftgekühltem Argon Ionenlaser verwendet. Die Analysen wurden zur Detektion von EGFP-, TOTO-1- und FITC-Fluoreszenz-Signalen durchgeführt. Mit der Bestimmung von EGFP- und TOTO-1 Fluoreszenz wurden Transfektionseffizienz und intrazelluläre Verteilung von Plasmid-DNA bestimmt. Die Detektion von FITC wurde zum Zwecke der Überprüfung der Reinheit von CD34<sup>+</sup> Zellpopulationen durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit PBS gewaschen und für die Messungen in 400  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die unterschiedlichen Zellpopulationen oder Zellkerne wurden jeweils durch die Parameter Vorwärtstreulicht FSC (*Forward Angle Light Scatter*) für die Größe und



Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Angle Light Scatter*) für die Granularität bestimmt. Die Fluoreszenz-Emission von EGFP und FITC wurden bei  $530 \pm 15$  nm detektiert. Pro Replikat wurden mindestens 5000 Zellen analysiert. Für die Auswertung wurde die CellQuest 3.1 Software (BD GmbH, Deutschland) verwendet.

## 2.10 Messung von Luciferase- / $\beta$ -Galaktosidase-Expression

Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Expression wurden 24 und 72 Stunden nach der Transfektion gemessen. Im Falle von Langzeitversuchen wurde die Luciferase Expression zu verschiedenen Zeitpunkten über mehrere Wochen nach Transfektion bestimmt. Für die Messungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l Lysepuffer zugegeben und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden jeweils 50  $\mu$ l des Lysats für die Luciferase- oder  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsbestimmung und 10  $\mu$ l für die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Die Bestimmungen wurden in einem Wallac Victor<sup>2</sup>/1420 Multilabel Counter durchgeführt. Im Falle der Luciferase Bestimmung wurden pro Replikat automatisch 100  $\mu$ l Luciferase-Assay-Puffer (Surovoy et al., 1998) zugegeben und die daraus resultierende Lichtemission fünf Sekunden lang vermessen. Für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression wurde das  $\beta$ -Gal-Reportergen Assay Kit (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) verwendet. Alle Messwerte wurden stets auf den Proteingehalt des Replikats normalisiert.

## 2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.11.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde zu analytischen Zwecken, wie auch zur Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden zur Southern Blot Analyse (2.13) verwendet. Zur Bestimmung der Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase wurden die DNA-Rekombinationsprodukte mit den spezifischen Primern FP puro und RP puro

detektiert (4.4). Weiterhin wurde Plasmid-DNA in Zellkulturmaterial und Mausgewebe mit den spezifischen Primern FP Luciferase und RP Luciferase detektiert (5.2.1 und 5.2.2). Zur Amplifizierung der DNA wurde das Gerät „MasterCycler“ (Eppendorf AG, Deutschland) verwendet. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils DNA-Matrize (*template*), NEB Standard *Taq* Polymerase (New England Biolabs Inc., USA), spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer, dNTP Mix (Fermentas GmbH, Deutschland), Reaktionspuffer (New England Biolabs Inc., USA) und H<sub>2</sub>O in den vorher für jede PCR ermittelten optimalen Volumina. Die PCR-Reaktionen wurden mit einer initialen Denaturierung des *templates* bei 94°C für 2 Minuten gestartet. Darauf folgten je nach gewünschter Menge und Reinheit an PCR-Produkt 25 - 40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die zyklische Denaturierung wurde ebenfalls bei 94°C für 30 Sekunden durchgeführt. Das Annealing der Primer verlief bei den jeweiligen vorher ermittelten spezifischen Schmelztemperaturen zwischen 55°C - 65°C über 20 Sekunden. Der Elongationsschritt erfolgte bei 72°C. Die Zeit der Elongation richtet sich nach der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des PCR Produktes und wurde jeweils mit einer Minute pro 1000 bp berechnet.

Die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden zur Analyse mittels Southern Blot wurde mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden die spezifischen Primer FP Luciferase und RP Luciferase zur Amplifizierung der 230-bp Luciferase-Sonde verwendet.

### 2.11.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die direkte Quantifizierung von DNA und indirekte Quantifizierung von mRNA wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Zur Quantifizierung der Integrase-mRNA-Expression wurden jeweils die Primerpaare FP pCMV-Int und RP pCMV-Int sowie FP pC31-Intopt und pC31-Intopt verwendet (4.2). Für die Quantifizierung von DAXX-mRNA wurden die Primer FP DAXX und RP DAXX verwendet (4.6). Extrachromosomale Plasmid-DNA (5.3) wurde mit den spezifischen Primern FP

Luciferase und RP Luciferase quantifiziert. Die Untersuchungen wurden mit dem Gerät „iCycler iQ“ durchgeführt. Die Reaktionsansätze entsprachen prinzipiell den bereits unter 2.8.1 beschriebenen, wobei zusätzlich zur Fluoreszenzmarkierung der entstehenden PCR-Produkte SYBR Green I zugesetzt wurde. Auch die Reaktionsbedingungen bezüglich Zeit und Temperatur entsprachen den unter 2.8.1 bereits beschriebenen. Zur Auswertung wurde die *iQ5 Optical System Software* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) und *Relative Expression Software Tool* (Corbett Research Pty. Ltd., USA) verwendet.

## 2.12 Western-Blot-Analyse

Die Proteine DAXX und  $\phi$ C31 Integrase wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden Jurkat- und A549-Zellen entweder mit pCMV-Int oder pC31-Intopt, wie unter 2.5 beschrieben, transfiziert. Die Zellen wurden jeweils aufgeteilt und 24 und 72 Stunden nach Transfektion untersucht. Jurkat-Zellen wurden dazu einmal mit PBS gewaschen und bei 300 g für fünf Minuten zentrifugiert. Adhärente A549-Zellen wurden ebenfalls mit PBS gewaschen, durch die Zugabe von 200  $\mu$ l Trypsin-EDTA (Gibco-BRL, Grossbritannien) von der Wellplatte gelöst und mit 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Jurkat- und A549-Zellen wurden durch die Zugabe von 50  $\mu$ l Lysepuffer und 15 Minuten Inkubation auf Eis lysiert und durch Ultraschallbehandlung mit einem Digital Sonifier 250 (Branson, USA) weiter aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellysate durch Zentrifugation bei 19000 g bei 4°C von ungelöstem Zellmaterial getrennt. Gleiche Mengen an Gesamtprotein wurden mittels Elektrophorese auf einem 7,5%-igem Tris-HCl Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) getrennt und über Nacht auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Millipore, USA) übertragen. Die Membranen wurden entweder mit einem polyklonalen Kaninchen-anti- $\phi$ C31 Integrase Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 oder einem monoklonalen Maus-anti-huDAXX Antikörper (Biozol Diagnostica GmbH, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Zur Detektion wurden die entsprechenden sekundären Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen- und

Ziege-anti-Maus-Antikörper (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) verwendet. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mittels ECL-Chemilumineszenz (Amersham Bioscience, USA).

### 2.13 Southern-Blot-Analyse

Zur Bestimmung des Status und des Arrangements von Plasmid-DNA nach Transfektion wurde die nach Hirt isolierte Plasmid-DNA (2.10) mittels Southern-Blot analysiert. Dazu wurde zwischen 0,1 µg und 0,5 µg isolierte DNA durch Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter leichtem Schwenken fünf Minuten in Depurinierungspuffer, zweimal 15 Minuten in Denaturierungspuffer und zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer inkubiert und anschließend 10 Minuten in 20 x SSC Puffer äquilibriert. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) mittels Kapillarblot (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Deutschland) in 20 x SSC erfolgte über Nacht. Die Hybridisierung der Sonden mit der Plasmid-DNA erfolgte anschließend in DIG Easy Hyb Buffer (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) bei 41°C ebenfalls über Nacht. Die Detektion der Chemilumineszenz auf der Membran erfolgte unter Verwendung des DIG Wash and Block Buffer Set, anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments und CDP-Star solution (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers.

### 2.14 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die hydrodynamischen Durchmesser des pEGFP-N1 Monomers und des pEGFP-N1 Dimers und deren jeweilige Polydispersitätsindizes wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, dessen Messprinzip auf der Korrelation zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln im Medium und ihrer Größe basiert (Müller and R Schuhmann, 1996). Für die Untersuchungen wurde

das Gerät „90 Plus Partikelgrößenmessgerät“ (BIC Brookhaven Inst. Corp., USA) verwendet. Dazu wurden jeweils 200 µg Plasmid DNA in 1 ml PBS gelöst und in einer Halb-Mikro-Küvette vermessen. Jede Probe wurde bei einer Messdauer von einer Minute zehn Mal vermessen. Die folgenden Einstellungen wurden verwendet: Viskosität von PBS 1,14 cP, Temperatur 25°C, Ref-Index 1,330.

## 2.15 Untersuchungen im Mausmodell

Sechs bis acht Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse (Elevage Janvier, Frankreich) wurden für die Versuche verwendet und unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gehalten. Vor sämtlichen Versuchen wurden die Mäuse entweder mittels Inhalationsnarkose durch Isofluran (Abbott GmbH, Deutschland) oder i.p.-Injektion einer Tripelkombination aus Medetomidin (0,5mg/kg), Midazolam (5mg/kg) und Fentanyl (50µg/kg) anästhesiert. Im Falle der Injektionsnarkose wurde die Anästhesie im Anschluss an den jeweiligen Versuch durch die entsprechenden Antagonisten Atipamezol (2,5mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Naloxon (1,2 mg/kg) ausgeleitet.

### 2.15.1 Intravasale Injektion von PEI/pDNA Komplexen zur Transfektion des Lungengewebes

Vier Stunden vor Applikation der Plasmid-DNA wurden die Mäuse zur Unterdrückung von inflammatorischen Reaktionen mittels i.p.-Injektion von 4 mg Dexamethason behandelt. Zur Injektion wurden jeweils 22 kDa lineares Polyethylenimin und Plasmid-DNA im Verhältnis N/P= 10 in 400 µl Glucose 5% gemischt und zur Komplexbildung 20 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose anästhesiert und in ein Rückhaltesystem (*Restrainer*) (Braintree Scientific Inc., USA) platziert. Nach Bildung der Komplexe wurden diese in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden die Mäuse durch Injektionsnarkose betäubt und 3 mg D-Luciferin (Synchem OHG, Germany) in 100 µl *Aqua ad injectabilia* (pH

7,4) i.p injiziert. Während der Verteilung des Luciferin im Körper wurden die Mäuse für zehn Minuten bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Biolumineszenz mittels IVIS 100 Imaging System (Xenogen Inc., USA) bestimmt. Die Ausleitung der Narkose wurde durch i.p.-Injektion der Antagonisten durchgeführt. Für die Auswertung der Daten wurde die *Living Image Software version 2.50* (Xenogen Inc., USA) verwendet.

### 2.15.2 Intranasale Perfusion nackter Plasmid-DNA zur Transfektion des Nasenepithels

Zur nasalen Perfusion wurden die Mäuse mittels Injektionsnarkose betäubt und die Körpertemperatur während des gesamten Perfusionsvorgangs durch eine Wärmeplatte (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) bei 37°C gehalten. Die nackte Plasmid-DNA wurde in *Aqua ad injectabilia* in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Maus mittels eines Aladin 1000 Perfusor (WPI Ltd., Grossbritannien) durch eine PE-Kanüle mit einem Durchmesser von 0,5 mm mit einer Geschwindigkeit von 7,4 µl/Minute circa 2,5 mm ins rechte Nasenloch appliziert. Anschließend wurde die Anästhesie durch i.p. Gabe der Antagonisten ausgeleitet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach nasaler Perfusion wurde die Biolumineszenz, wie bereits unter 2.15.1 beschrieben, bestimmt.

### 2.15.3 Organentnahme und weitere Untersuchungen des Gewebes

Sechs Monate nach Transfektion wurde den Mäusen Lunge und Leber entnommen. Dazu wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose anästhesiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Durch Injektion isotonischer Kochsalzlösung in die Vena cava inferior wurde das Gefäßsystem perfundiert, um verbliebenes Blut aus den Organen zu entfernen. Lunge und Leber wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mechanisch mittels Mörser homogenisiert und bis zur Lumineszenzbestimmung und Isolierung der DNA bei -80°C gelagert.

Die Gesamt-DNA wurde mit den DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen AG, Deutschland) laut Protokoll des Herstellers aus Lunge und Lebergewebe isoliert und zur weiteren Analyse mittels PCR und qRT-PCR (2.11) verwendet.

Für die Luciferaseaktivitätsbestimmung wurden circa 140 mg homogenisiertes Gewebe in 400 µl Lysepuffer 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zehn Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes für die Luciferasebestimmung verwendet. Nach Zugabe von 100 µl Luciferase-Assay Puffer wurde die Lumineszenz in einem Lumat LB9507 (EG&C Berthold AG, Deutschland) bestimmt.

## 2.16 Statistik

Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt. Die Untersuchungen wurden, falls nicht anders angegeben, in fünf Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen.

### 3. Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA Konkatemeren

Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine mögliche Erhöhung der Transfektionseffizienz und der Transgenexpression bei Verwendung zirkulärer Plasmid-DNA Konkatemeren zur Transfektion hämatopoetischer Zellen zu erreichen. Als hämatopoetische Modellzellen wurde die Jurkat T-Lymphozyten-Zelllinie verwendet. Diese Zellen haben den Vorteil eines stabilen, schnellen Wachstums in Suspension und lassen sich ohne erhebliche Beeinträchtigung der Viabilität effizient durch Elektroporation transfizieren.

#### 3.1 Charakterisierung der Plasmid-DNA Konkatemere

Für die Untersuchungen wurden i) ein pEGFP-N1 Monomer und ii) ein pEGFP-N1 Dimer, das zwei monomere Einheiten des pEGFP-N1 mit einer Kopf-Schwanz Verbindung enthält, verwendet (Abbildung 3.1).

Abbildung 3.1

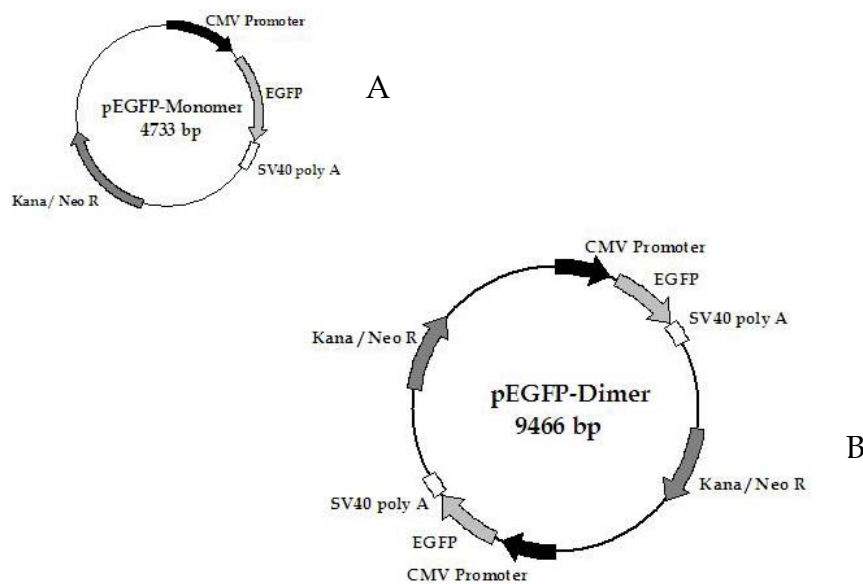


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des pEGFP-N1 Monomers (A) und des pEGFP-N1 Dimers (B).



Für die Charakterisierung der beiden Konstrukte war ein Restriktionsverdau nicht möglich, da sämtliche Restriktionsschnittstellen im Dimer zweimal vorhanden sind und bei einem entsprechenden Restriktionsverdau keine Unterscheidung zwischen der monomeren und der dimeren Form des pEGFP-N1 mehr möglich wäre. Daher wurden die unterschiedlichen Größen der Plasmid-DNA unverdaut durch Gelelektrophorese charakterisiert (Abbildung 3.2).

Abbildung 3.2

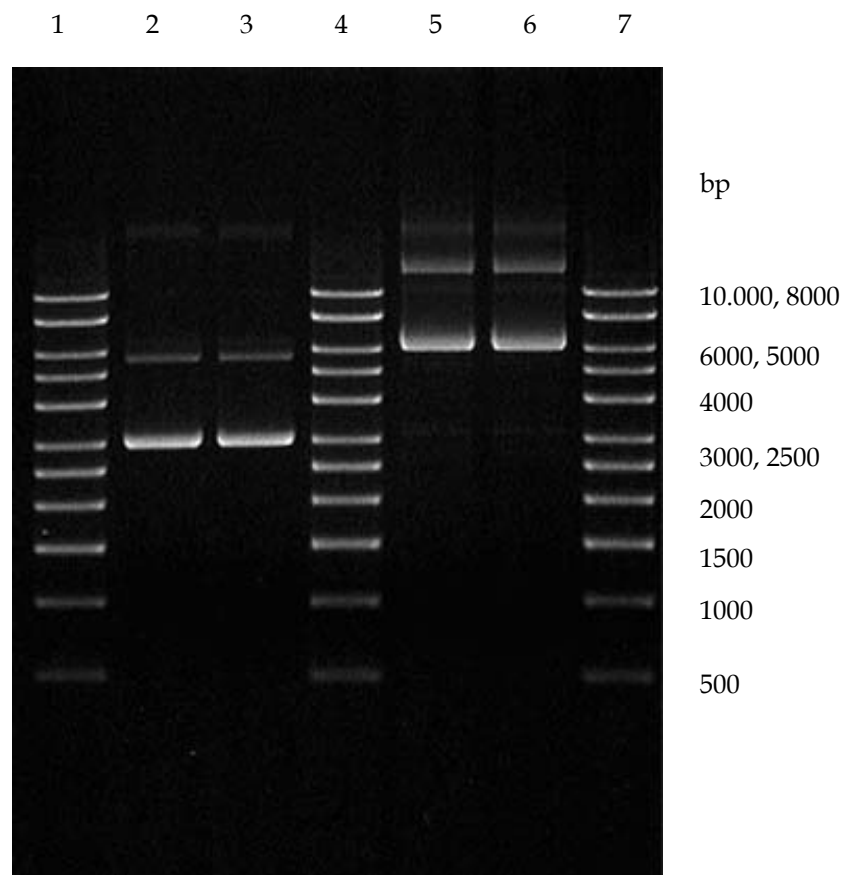


Abbildung 3.2 Gelelektrophorese des pEGFP-N1 Monomers und des pEGFP-N1 Dimers. Die Spuren 2 und 3 zeigen jeweils 250 ng des pEGFP-N1 Monomers, Spuren 3 und 4 jeweils 250 ng des pEGFP-N1 Dimers. Die DNA wurde mit 0,5 g/l Ethidiumbromid markiert. In den Spuren 1, 4, 7 ist die lineare 1 kbp DNA-Leiter (PlasmidFactory) aufgetragen.

Die unteren starken Banden stellen jeweils die *supercoiled* ccc Konformationen der beiden Plasmide dar. Die jeweils darüber liegenden Banden zeigen die oc-Form der Konstrukte. Dies stellt das typische Muster unverdauter Plasmid-DNA dar. Auch die Verhältnisse des Monomers und des Dimers stimmen mit den zu

erwartenden Mustern überein. Die oc-Form des Monomers liegt typischerweise auf der Höhe der ccc-Form des Dimers. Zusätzliche qualitative Charakterisierungen der Plasmide wurden von der PlasmidFactory GmbH in Bielefeld mittels Kapillargelelektrophorese durchgeführt und bestätigten die jeweilige Konformation der Konstrukte. Weiterhin wurde eine Größencharakterisierung der beiden Plasmid-DNA-Moleküle mittels Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide jeweils in Konzentrationen von 200 µg/ml in PBS verdünnt und der hydrodynamische Durchmesser bestimmt. Außerdem wurde die Polydispersität der Partikel bestimmt. Das EGFP-N1 Monomer zeigte einen mittleren Durchmesser von  $81 \pm 4$  nm, während das entsprechende Dimer mit  $148 \pm 9$  nm erwartungsgemäß knapp den doppelten Durchmesser aufwies (Tabelle 3.1). Die Polydispersität des Monomers betrug  $0.292 \pm 0.017$ , die des Dimers  $0.325 \pm 0.013$ . Dies weist jeweils auf die Mischung der beiden Plasmid-DNA-Konformationen, der ccc- und der oc-Form, hin.

Tabelle 3.1

Konkatemer	Durchmesser [nm]	PI
Monomer	$81 \pm 4$	$0.292 \pm 0.017$
Dimer	$148 \pm 9$	$0.325 \pm 0.013$

Tabelle 3.1: Größe und Polydispersität von pEGFP-N1 Monomer und -Dimer. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser und die Polydispersität (PI) des pEGFP-N1 Monomers und des pEGFP-N1 Dimers wurden mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

### 3.2 Untersuchung der Plasmid-DNA nach Transfektion

Um bestimmen zu können, inwieweit die monomere und dimere Plasmid-DNA nach Elektroporation, Einschleusung in den Zellkern und Transkription noch als solche vorliegt, wurde 24 Stunden nach Transfektion aus den Zellen Plasmid-DNA isoliert und mittels Southern-Blot-Analyse das Arrangement der Plasmide

untersucht. Die Southern-Blot-Analyse zeigte, dass beide Konstrukte noch in ihrer ursprünglichen Form als entsprechendes Monomer oder Dimer vorlagen (Abbildung 3.3).

Abbildung 3.3

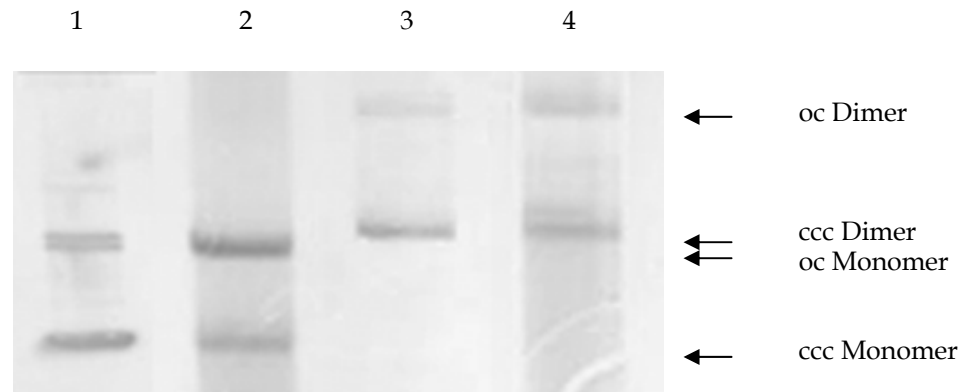


Abbildung 3.3 Southern-Blot-Analyse monomerer und dimerer Plasmid-DNA.

10µg pEGFP-N1 Monomer und 10µg pEGFP-N1 Dimer wurden mittels Elektroporation transfiziert. Nach 24 h wurde Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert, jeweils 0,2µg durch Gelelektrophorese getrennt und mittels Southern Blot Analyse detektiert. Spur 1 zeigt die pEGFP-N1 Monomer-Kontrolle (20ng), Spur 2 das pEGFP-N1 Monomer nach Transfektion. Spur 3 repräsentiert die pEGFP-N1 Dimer-Kontrolle (20ng), Spur 4 das pEGFP-N1 Dimer nach Transfektion.

Während vor Transfektion der größte Teil der Plasmid-DNA in kovalent-geschlossener Topologie vorlag, wurde 24 Stunden nach Transfektion eine leichte Verschiebung zur offenkettig geschlossenen Form detektiert. Durch diese Untersuchungen mittels Southern-Blot konnte sichergestellt werden, dass im Folgenden tatsächlich die Transfektionseffizienz der monomeren und dimeren Plasmidanordnungen verglichen wurde.

### 3.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensität TOTO-1 markierter Plasmid-DNA

Zur intrazellulären und intranukleären Quantifizierung der Plasmid-DNA wurde im Folgenden der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff TOTO-1 verwendet. Daher wurde der Einfluss der unterschiedlichen Größen und Arrangements der beiden Konstrukte auf die TOTO-1-Fluoreszenzemission untersucht. Jeweils 10 µg

Monomer und 10 µg Dimer wurden mit TOTO-1 markiert und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Beide Konstrukte zeigten gleiche Fluoreszenz, so dass bei der Quantifizierung durch Fluoreszenzbestimmung im Folgenden keinerlei Korrekturfaktor eingerechnet werden musste.

### 3.4 Transfektion von Monomer und Dimer mit gleicher Anzahl an Genkopien

Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Jurkat-Zellen mit entweder 10 µg des pEGFP-N1 Monomers oder mit 10 µg des pEGFP-N1 Dimers transfiziert. Dies entspricht im Falle des Monomers und des Dimers jeweils  $1,94 \times 10^{12}$  EGFP-Transgenkopien. Betrachtet man die Anzahl der Plasmide, so ergibt sich für das Monomer  $1,94 \times 10^{12}$  Moleküle, während die Anzahl der dimeren Plasmid-DNA Moleküle  $9,7 \times 10^{11}$  beträgt. Im Folgenden wurde nicht nur die Transfektionseffizienz bezüglich der Anzahl der EGFP positiven Zellen, der mittleren Fluoreszenzintensität pro Zelle, sondern auch die Plasmid-DNA Menge, die jeweils mit der Zellmembran assoziiert war, sich im Zytoplasma befand und in den Zellkern transportiert wurde, untersucht. Daher war die Unterscheidung zwischen Anzahl der transfizierten Genkopien und Anzahl der transfizierten Plasmid-Moleküle von großer Bedeutung, um eine genaue Charakterisierung der beiden Moleküle vorzunehmen. Die durchflusszytometrische Analyse der Transfektion wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Von den Zellen, die mit pEGFP-N1 Monomer transfiziert wurden, zeigten  $12,3 \pm 1,2$  Prozent EGFP-Expression, während  $8,0 \pm 1,6$  Prozent der mit dem Dimer transfizierten Zellen EGFP-positiv waren (Abbildung 3.4). Die mittlere EGFP-Fluoreszenzintensität (MFI), als Maß der EGFP-Expression pro Zelle, betrug für die mit dem Monomer transfizierten Zellen  $1233 \pm 101$  und  $1347 \pm 210$  im Falle der Dimer transfizierten Zellen. Daraus ergab sich eine signifikant 1,54-fach höhere Anzahl an EGFP-positiven Zellen für das Monomer verglichen mit dem Dimer, während bezüglich der mittleren EGFP-Fluoreszenzintensität kein signifikanter Unterschied bestand. Bei gleicher Anzahl an transfizierten Genkopien hatte also die konkatemere Form des Plasmids einen Einfluss auf die Anzahl der transfizierten Zellen.

Abbildung 3.4

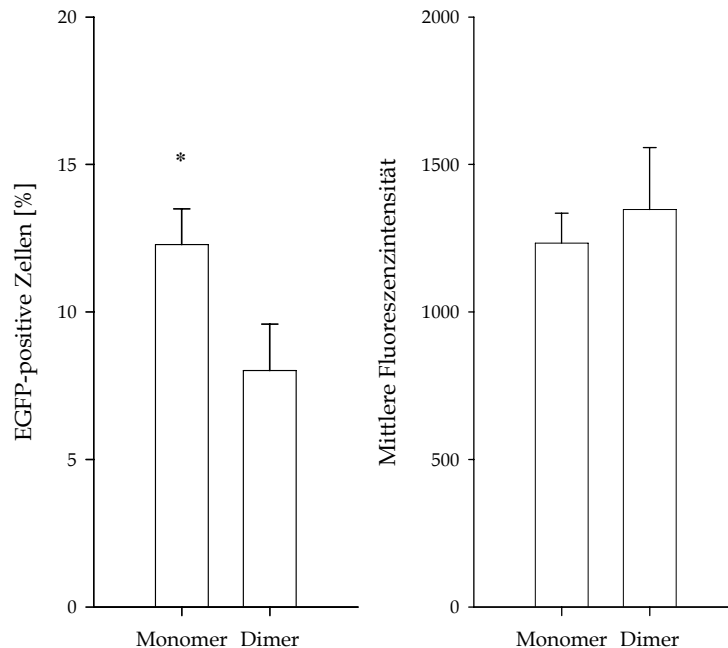


Abbildung 3.4 FACS-Analyse nach Transfektion **gleicher Anzahl an Genkopien**.

Jeweils 10  $\mu\text{g}$  Monomer oder Dimer wurden mittels Elektroporation transfiziert. Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität nach Transfektion wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Signifikant mehr EGFP-positiv Zellen konnten nach Transfektion des pEGFP Monomers detektiert werden (\* $p \leq 0,05$ ).

### 3.5 Zelluläre Verteilung der Plasmid-DNA bei Transfektion gleicher Anzahl an Genkopien

Um feststellen zu können, inwieweit die Transfektionsergebnisse aus 3.4 mit der Menge an jeweiliger Plasmid-DNA pro Zelle insgesamt und insbesondere im Zellkern korrelierten, wurde die Transfektion unter 3.4 mit TOTO-1-markierter DNA wiederholt. Hierzu wurde der interkalierende Cyanin-Farbstoff TOTO-1 mit Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:20 (TOTO-1 Moleküle zu DNA-Basen) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Transfektion durchgeführt. Eine Stunde nach Transfektion wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde jeweils die Anzahl der Zellen bestimmt, die mit Plasmid-DNA assoziiert waren,

die Plasmid-DNA ins Zytoplasma und in den Zellkern aufgenommen hatten. Außerdem wurde die mittlere TOTO-Fluoreszenz als Maß für die Menge an Plasmid-DNA in den jeweiligen Zellkompartimenten bestimmt.

Aus der Analyse der transfizierten Zellen ohne sonstige Behandlung ergab sich, wie viele Zellen insgesamt mit Plasmid-DNA assoziiert waren. Nach dem Waschen der Zellen, um die an der Oberfläche gebundene Plasmid-DNA zu entfernen, wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die intrazellulär Plasmid-DNA enthielten. Nach der weiteren Isolierung der Kerne wurde die Anzahl der Zellen mit Plasmid-DNA im Kern bestimmt. Die Differenz aus der Anzahl der Zellen mit gesamt intrazellulärer Plasmid-DNA und der Zellzahl mit Plasmid-DNA im Kern ergab die Anzahl der Zellen, die nur im Zytoplasma Plasmid-DNA enthielten. Zu jedem dieser Werte wurde jeweils auch die mittlere TOTO-1-Fluoreszenzintensität bestimmt. Diese Werte gaben Auskunft, welche Mengen an Plasmid-Konkatemeren jeweils in den Zellkompartimenten vorhanden waren. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl für das pEGFP-N1 Monomer, als auch für das Dimer, annähernd alle Zellen mit Plasmid-DNA assoziiert waren. In beiden Fällen zeigten mehr als 96 Prozent der Zellen TOTO-1-Fluoreszenz (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2

	Monomer		Dimer	
	% positive Z.	MFI	% positive Z.	MFI
zell-assoziiert	97.2±0.2	3515±237	96.6±0.9	2127±518
Zytoplasma	53.7±4.4	796±251	42.0±5.3	522±169
Zellkern	16.6±5.3	293±58	12.5±1.8	207±65

Tabelle 3.2 Verteilung der Plasmid-DNA nach Transfektion **gleicher Anzahl an Genkopien**. Jeweils 10 µg TOTO-1-markierte monomere oder dimere Plasmid-DNA wurden durch Elektroporation transfiziert. Anschließend wurden mittels Durchflusszytometrie sowohl TOTO-1-positive Zellen, als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Zellkompartimente i) Gesamtzelle ii) Zytoplasma und iii) Zellkern bestimmt.

Signifikant mehr Zellen hatten pEGFP-N1 Monomer als -Dimer ins Zytoplasma und in den Kern aufgenommen. So zeigten 54 Prozent der Zellen monomere Plasmid-DNA im Zytoplasma und 17 Prozent der Zellen im Kern, während nur 42 Prozent der Zellen dimere Plasmid-DNA im Zytoplasma und 13 Prozent im Kern zeigten. Die Auswertung der mittleren TOTO-1-Fluoreszenz als Maß für die pro Zelle-aufgenommene Plasmid-DNA ergab 1,52-fach höhere Werte für das Monomer als für das Dimer im Zytoplasma. In den Kern wurde 1,41-fach mehr Monomer als Dimer aufgenommen. Um ein Verhältnis zwischen der Transfektionseffizienz und der ermittelten Mengen an Plasmid in der Zelle herzustellen, wurde zunächst die Effizienz  $E_{\text{Gen}}$  ermittelt. Der Wert  $E_{\text{Gen}}$  ergibt sich aus der Division der mittleren EGFP-Fluoreszenz pro Zelle durch die TOTO-1-Fluoreszenz pro Zellkern und bezeichnet die EGFP-Expressionseffizienz pro Genkopie. Hierfür ergaben sich für das Monomer ein Wert von  $E_{\text{Gen}} = 4,2$  und für das Dimer ein Wert von  $E_{\text{Gen}} = 6,5$ . Weiterhin wurde die EGFP-Expressionseffizienz pro Plasmid-Molekül  $E_{\text{Plasmid}}$  berechnet. Hierfür wurde zunächst die mittlere TOTO-1-Fluoreszenz pro Zelle auf die Anzahl der Plasmid-Moleküle bezogen. Die Effizienz pro Plasmid-Molekül  $E_{\text{Plasmid}}$  wiederum ergab sich dann aus der Division der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle durch diesen Wert. Für das Monomer ergab sich hier ein Wert von  $E_{\text{Plasmid}} = 4,2$ , während der Wert für das Dimer  $E_{\text{Plasmid}} = 13$  betrug.

Zusammenfassend ergab sich aus diesen Untersuchungen, dass nach Transfektion des pEGFP Monomers eine höhere Anzahl an Zellen Transgenexpression zeigten. Dagegen war die Effizienz des Monomers, betreffend  $E_{\text{Gen}}$  und  $E_{\text{Plasmid}}$  signifikant geringer, als die des Dimers.

### 3.6 Transfektion von Monomer und Dimer mit gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen

Um mögliche Effekte durch die Transfektion unterschiedlicher Anzahl an Plasmid Molekülen ausschließen zu können, wurde das Experiment, wie unter 3.4 beschrieben, analog, allerdings mit gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen

wiederholt. Hierfür wurden wiederum jeweils  $3 \times 10^5$  Jurkat-Zellen entweder mit  $5 \mu\text{g}$  pEGFP-N1 Monomer oder mit  $10 \mu\text{g}$  pEGFP-N1 Dimer transfiziert. Im Falle des Monomers wurden also  $9,7 \times 10^{11}$  Plasmid-DNA Molekülen und die gleiche Anzahl an EGFP-Transgenkopien transfiziert. Dagegen entsprach dies im Falle des Dimers zwar ebenfalls  $9,7 \times 10^{11}$  Plasmid-DNA Molekülen, allerdings  $1,94 \times 10^{12}$  EGFP-Genkopien. Sowohl die Anzahl der EGFP-positiven Zellen, als auch die mittlere EGFP Fluoreszenzintensität wurden 24 Stunden nach Transfektion jeweils gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen untersucht. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl transfizierter Zellen. So zeigten 9,6 Prozent der Zellen, die mit dem Monomer transfiziert wurden, und 8,0 Prozent der Dimer-transfizierten Zellen EGFP-Expression (Abbildung 3.5).

Abbildung 3.5

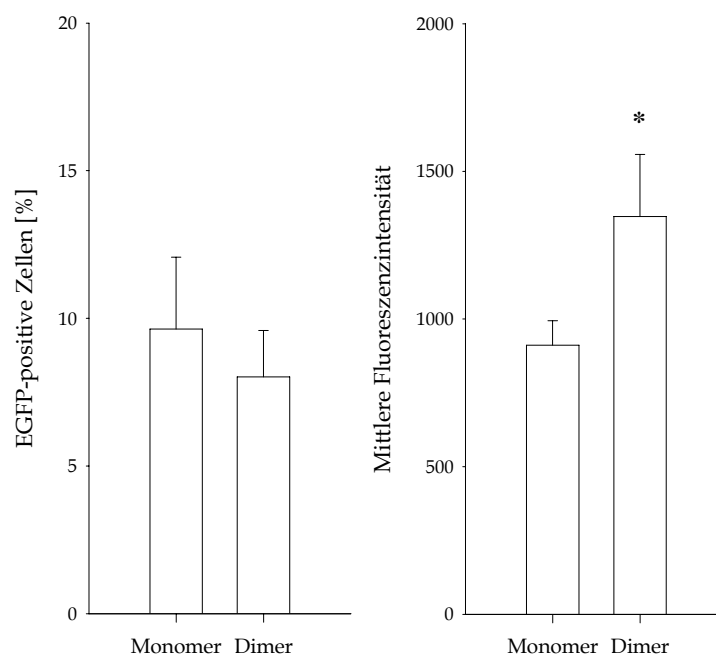


Abbildung 3.5 FACS Analyse nach Transfektion **gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen**.  $5 \mu\text{g}$  Monomer oder  $10 \mu\text{g}$  Dimer wurden mittels Elektroporation transfiziert. Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität nach Transfektion wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die MFI der Dimer-transfizierten Zellen war signifikant höher als die MFI der Zellen, die mit dem pEGFP-N1 Monomer transfiziert wurden (\* $p \leq 0,05$ ).



Allerdings ergab sich bezüglich der mittleren EGFP Expression pro transfizierter Zelle ein signifikanter Unterschied. Die Zellen, die mit dem dimeren pEGFP-N1 transfiziert wurden, zeigten eine mittlere EGFP-Fluoreszenzintensität von  $1347 \pm 210$ , während die Monomer-transfizierten Zellen nur  $911 \pm 83$  an mittlerer Fluoreszenzintensität aufwiesen. Die Transgenexpression des Dimers war hier also 1,48-fach höher als die des Monomers.

### 3.7 Zelluläre Verteilung der Plasmid-DNA bei Transfektion bei gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen

Um auch hier einen Zusammenhang zwischen Anzahl EGFP-positiver Zellen und der mittleren EGFP-Expression pro transfizierter Zelle mit tatsächlich nach Transfektion vorhandener Plasmid-DNA in den unterschiedlichen Zellkompartimenten herzustellen, wurde die Transfektion erneut mit jeweils  $9,7 \times 10^{11}$  TOTO-1 markierten Plasmid-DNA Molekülen wiederholt. Die Anzahl der Zellen, die mit monomerer oder dimerer Plasmid-DNA insgesamt assoziiert waren, Plasmid-DNA ins Zytoplasma oder in den Zellkern aufgenommen hatten, war hier nicht signifikant unterschiedlich. In beiden Fällen waren mehr als 95 Prozent der Zellen mit Plasmid-DNA assoziiert (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3

	Monomer		Dimer	
	% positive Z.	MFI	% positive Z.	MFI
zell-assoziiert	$95.1 \pm 1.4$	$1371 \pm 321$	$96.6 \pm 0,9$	$2127 \pm 518$
Zytoplasma	$40.0 \pm 10.8$	$330 \pm 159$	$42.0 \pm 5.3$	$522 \pm 169$
Zellkern	$15.03 \pm 2.0$	$223 \pm 57$	$12.5 \pm 1.8$	$207 \pm 65$

Tabelle 3.3 Verteilung der Plasmid-DNA nach Transfektion **gleicher Anzahl an Plasmid-DNA Molekülen**.

5 µg TOTO-1-markierte monomere oder 10 µg TOTO-1 markierte dimere Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation transfiziert. Anschließend wurden mittels Durchflusszytometrie sowohl TOTO-1-positive Zellen, als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Zellkompartimente i) Gesamtzelle ii) Zytoplasma und iii) Zellkern bestimmt.

Weiterhin zeigten 40 Prozent der Zellen monomere Plasmid-DNA im Zytoplasma und 15 Prozent im Kern. Jeweils 42 Prozent und 13 Prozent der Zellen, die mit dem Dimer transfiziert wurden, wiesen entsprechend Plasmid-DNA im Zytoplasma und im Kern auf. Bezüglich der Menge an aufgenommener Plasmid-DNA unterschieden sich die Zellen ebenfalls nicht. So zeigten die Zellen, die mit dem Monomer behandelt wurden mittlere TOTO-Fluoreszenz von  $330 \pm 159$  im Zytoplasma und  $224 \pm 59$  im Zellkern. Für die Dimer-transfizierten Zellen lagen die entsprechenden Werte bei  $522 \pm 170$  und  $208 \pm 65$ . Lediglich die Plasmid-DNA, die mit den Zellen insgesamt assoziiert war unterschied sich signifikant mit  $1371 \pm 321$  für das pEGFP-N1 Monomer und  $2127 \pm 518$  für das pEGFP-N1 Dimer. Auf der Grundlage dieser Werte wurden wiederum die Werte  $E_{\text{Gen}}$  und  $E_{\text{Plasmid}}$  berechnet. Auch hier ergaben sich annähernd die gleichen Werte von  $E_{\text{Gen}}=4,1$  und  $E_{\text{Plasmid}}=4,1$  für das Monomer und  $E_{\text{Gen}}=6,5$  und  $E_{\text{Plasmid}}=13$  für das Dimer, wie bei Transfektion gleicher Anzahl an Genkopien.

### 3.8 Zusammenfassende Betrachtung der Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA Konkatemeren

Die systematische Untersuchung des dimeren Konkatemers im Vergleich zu dem entsprechenden pEGFP-N1 Monomer gab Auskunft über den Effekt unterschiedlicher intramolekularer Anordnungen von Plasmid-DNA auf die Transfektionseffizienz. Die exakte dimere Form des Plasmids ermöglichte weiterhin die Untersuchung von Größeneffekten auf die Verteilung der Plasmid-DNA in der Zelle nach Transfektion, aber auch die spezifischen Effekte einer Kopf-an-Schwanz Anordnung zweier Plasmid-DNA-Sequenzen auf die Expression. Um diese Effekte möglichst genau zu charakterisieren wurde insbesondere jeweils die Menge an Plasmid-DNA im Kern, die Anzahl der eingesetzten Genkopien, die Anzahl der eingesetzten Plasmid Moleküle und der hydrodynamische Durchmesser der Plasmide in Zusammenhang mit der jeweils resultierenden Transgenexpression betrachtet.

Das dimere pEGFP-N1 Konkatemer wurde in dem rekombinationsdefizienten *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  amplifiziert und anschließend chromatographisch isoliert. Aus diesem Herstellungsprozess ergab sich die hochreine *supercoiled* Form des dimeren Konkatemers des pEGFP-N1 Plasmids in großer Ausbeute. Die genaue Topologie, der Grad der Konkatemerisierung und die Reinheit wurden mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Diese Arbeiten wurden von PlasmidFactory GmbH in Bielefeld durchgeführt, so dass ein genau definiertes pEGFP-N1 Dimer in hochreiner *supercoiled* Form für diese Arbeit zur Verfügung gestellt werden konnte.

Bisher gab es keinerlei Untersuchungen zum Einfluss der Transfektion mittels Elektroporation auf die Topologie oder den Konkatemerisierungsgrad von Plasmid-DNA. Auch der intrazelluläre Transport, sowie die Transkription könnten theoretisch Einfluss auf Konkatemerisierungsgrad und die Topologie der Plasmid-DNA haben. Daher wurde 24 Stunden nach Transfektion Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert und mittels Southern Blot analysiert. Während sowohl Monomer als auch Dimer intrazellulär ihren Konkatemerisierungsgrad beibehielten, konnten leichte Veränderungen bezüglich der Topologie der Konstrukte festgestellt werden. So kam es zu einem leichten Anstieg der offenkettig-zirkulären Form bei beiden Konstrukten. Dies könnte eine Folge der Elektroporation oder des Transportes der Plasmid-DNA in der Zelle sein. Auch Enzyme der Transkriptionsmaschinerie könnten durch kurzzeitiges Auftrennen des DNA Stranges Einfluss auf die Topologie von Plasmid-DNA haben.

Um die Jurkat-Zellen effizient mit nackter Plasmid-DNA zu transfizieren, wurde Elektroporation als Methode gewählt. Die Verwendung von nackter Plasmid-DNA hatte den großen Vorteil für diese Untersuchung, dass der Transfektionsprozess deutlich definierter ist, als beispielsweise bei der Verwendung von Transfektionsreagenzien, wie kationischen Polymeren oder Lipiden. Durch Anlegen einer gepulsten Spannung an die Zellsuspension über eine Dauer von circa 120 ms kommt es zur reversiblen Öffnung von Zellmembranporen, durch die ein Influx von Plasmid-DNA stattfindet. Damit ist der Prozess der Plasmid-Aufnahme in die Zelle beendet. Die Transfektion mittels

Transfektionsreagenzien wäre zeitlich weniger exakt definiert, da die Aufnahme durch Endozytose mehrer Stunden dauert und die endgültige Beendigung der Aufnahme nicht feststeht. Ein weiterer Nachteil von Transfektionsreagenzien für diese Untersuchungen sind so genannte „Quenching“-Effekte. Dabei wird die Emission von Verbindungen aus Fluoreszenzfarbstoffen und DNA durch das Komplexieren mit beispielsweise Transfektionsreagenzien gemindert. Hinzu kommt, dass umstritten ist zu welchem Zeitpunkt und in welches intrazelluläre Kompartiment die DNA aus dem Transfektionsreagenz-Komplex entlassen wird. Daher wurde Elektroporation von nackter Plasmid-DNA als die ideale Transfektionsmethode für die folgenden Untersuchungen gewählt. Die Genexpression der unterschiedlichen Plasmide wurde nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie für jede einzelne Zelle ermittelt. Sowohl die Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen, als auch das Ausmaß an EGFP-Expression pro Zelle wurden hier berücksichtigt. Mit der Entwicklung eines weiteren Durchflusszytometrie-basierten Versuchsaufbaus konnte die Assoziation von TOTO-1-markierter Plasmid-DNA mit der Zelle, als auch die relative Verteilung innerhalb der Zelle quantifiziert werden. Die Verknüpfung der Daten aus den beiden Versuchsanordnungen gab Auskunft über die exakte Expressionseffizienz der jeweiligen Konstrukte. So war die relative Transgenexpression des Dimers 1,6-fach höher als die des Monomers. Dies ergab sich aus der Division des Wertes  $E_{\text{Gen}} = 4,2$  für das Monomer durch den Wert  $E_{\text{Gen}} = 6,5$  für das Dimer bei Transfektion gleicher Anzahl von Genkopien. Interessanterweise ist dies unabhängig von der Anzahl der transfizierten Plasmid-Moleküle. Hier ergab sich bei Transfektion der Hälfte der Plasmid-Moleküle ebenfalls ein sehr ähnlicher Wert von  $E_{\text{Gen}} = 4,1$  für das Monomer. Dies zeigt die Unabhängigkeit der Untersuchungen von der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge und bestätigt die Validität der ermittelten Werte. Bezogen auf die Transgenexpression pro Plasmid-Molekül ergibt sich eine 3,5-fach höhere Effizienz für das Dimer, verglichen mit dem Monomer. Durch die zweifache Anordnung des EGFP-Gens im Dimer wäre eine zweifach höhere Effizienz zu erwarten gewesen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Transgenexpression auf eine bessere Effizienz bei der

Transkription eines dimeren Plasmids zurückzuführen ist. Die Aneinanderreihung von Plasmidsequenzen in einem Molekül könnte hier durch die entstehende räumliche Nähe der Expressionskassetten zueinander zu verbesserter Transkriptionseffizienz führen. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass ein „Durchlaufen“ der Transkriptionsmaschinerie zu erhöhten Transkriptionsaktivität führt. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der EGFP-exprimierenden Zellen im Falle des Monomers verglichen zum Dimer um 1,54-fach höher, wenn gleiche Anzahl an Genkopien eingesetzt wurden. Dies kann naheliegend mit den unterschiedlichen Größen der beiden Konstrukte erklärt werden. Das dimere pEGFP-N1 mit einem hydrodynamischen Durchmesser von circa 150 nm ist möglicherweise zu groß, um in großer Anzahl durch die reversibel gebildeten Membranporen ins Zellinnere zu gelangen. Das circa halb so große Monomer mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 80 nm gelangt offensichtlich effizienter durch die Poren. Für einen Größeneffekt spricht auch, dass 1,3-fach mehr Monomer- als Dimer-Moleküle im Zytoplasma nach Transfektion gleicher Anzahl von Plasmiden zu finden waren. Dieses Verhältnis war im Kern sogar stärker ausgeprägt, wo die doppelte Anzahl an Monomermolekülen zu finden war. Diese Verhältnisse ergeben sich jeweils aus den mittleren TOTO-1-Fluoreszenzintensitäten in den jeweiligen Zellkompartimenten. In diesen Berechnungen wurde berücksichtigt, dass gleiche Fluoreszenzintensität für Monomer und Dimer die doppelte Zahl an monomeren Plasmid Molekülen impliziert. Die Untersuchungen bestätigen, dass sowohl die Zytoplasmamembran, als auch die Zellkernmembran grundlegende Barrieren für den nichtviralen Gentransfer darstellen (James and Giorgio, 2000; Lechardeur et al., 2005). Obwohl die Untersuchungen zeigten, dass nach Elektroporation annähernd 100 Prozent der Zellen mit Plasmid-DNA assoziiert sind, konnte in nur circa 40 bis 55 Prozent der Zellen Plasmid-DNA im Zytoplasma detektiert werden. Die Überwindung der Zellkernmembran als zweite Hürde wurde offensichtlich, da nur zwischen 12 und 16 Prozent der Zellen schließlich Plasmid-DNA in den Kern aufnahmen. Die weitere Auswertung der Plasmid-DNA Mengen ergab, dass

nur circa 22 Prozent der Plasmid-DNA, die mit der Zelle assoziiert war, ins Zytoplasma gelangte. Nur circa 8 Prozent gelangten in den Zellkern.

Die Daten zeigen, dass die Verwendung von Plasmid-DNA Konkatemeren die Möglichkeit bietet, hohe Expressionseffizienz zu erzielen. Ein dimeres Plasmid im Zellkern bewirkte 3,5-mal höhere Transgenexpression als das entsprechende Monomer. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass im Falle der Transfektion mit dem Dimer insgesamt weniger Zellen das Transgen exprimieren. Die Anwendung von konkatemerer Plasmid-DNA ist also von Vorteil, wenn vor allem hohe Transgenexpression von Bedeutung ist und die Anzahl der transfizierten Zellen eher nebensächlich ist. Ist dagegen eine möglichst hohe Anzahl an transfizierten Zellen wünschenswert, so sollte ein möglichst kleines Plasmid-DNA-Konstrukt verwendet werden. Schlussfolgernd wäre das ideale Plasmid zum Zwecke hoher Transgenexpression von vielen Zellen ein möglichst kleines Plasmid-DNA Konkatemere.

#### 4. Aktivität der *Streptomyces* $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen

Eine Herausforderung bei der Behandlung mit gentherapeutischen Ansätzen ist häufig das stabile Einbringen von DNA in den Zellkern zur Korrektur der Erbinformation. Eine Vielzahl von Erkrankungen beruhen auf genetischen Defekten, die die Zellen des Blutsystems betreffen und daher Ziel gentherapeutischer Behandlungen sind (Williams and Smith, 2000). Um entsprechende genetische Defekte effizient und stabil zu korrigieren, wurden für die meisten Untersuchungen bisher virale Vektoren verwendet (Scherr and Eder, 2002; Persons, 2003; Charrier et al., 2007). Nichtvirale Genvektoren haben seit dem Auftreten von Leukämien in fünf Fällen nach retroviraler Behandlung von X-SCID Patienten in Paris (Check, 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003; Woods et al., 2006; Cole, 2008) als sichere Alternative zum viralen Gentransfer stark an Bedeutung gewonnen. Erste Untersuchungen zur stabilen genetischen Modifikation von hämatopoetischen Zellen mittels episomal-replizierender Plasmid-DNA (Papapetrou et al., 2006), oder durch Verwendung integrierender Systeme wie der *Sleeping Beauty*-Transposase (Hollis et al., 2006) wurden bereits unternommen. Eine Möglichkeit der gezielten Integration von Plasmid-DNA ins menschliche Genom stellt die Anwendung der *Streptomyces*  $\phi$ C31 Integrase dar. So konnte bereits Integration von Plasmid-DNA mittels  $\phi$ C31 Integrase ins Genom von Leberzellen (Olivares et al., 2002), Hautzellen (Ortiz-Urda et al., 2002) oder embryonalen Stammzellen (Belteki et al., 2003) gezeigt werden. Weiterhin gibt es erste Untersuchungen zur Anwendbarkeit in hämatopoetischen Zellen (Ishikawa et al., 2006). Nach Kotransfektion des zu integrierenden Reporter-gen-Plasmids und eines für die Integrase kodierenden Plasmids konnten mehrere bereits bekannte, aber auch neue Integrationsstellen gefunden werden. Die Untersuchungen zur Identifikation der Integrationsstellen wurden nach dreiwöchiger Selektion der transfizierten Zellen durchgeführt. Ebenfalls unter G418-Selektionsdruck wurde erhöhte Expression in den mit Integrase transfizierten Zellen, verglichen mit der Kontrolle über 12 Tage, festgestellt. Diese Untersuchungen lassen noch keine Aussage über mögliche Langzeitexpression

des Transgens zu. Zusätzlich hatte die Verwendung des Neomycin-Selektionsmarkers hier den Effekt, dass der größte Teil der Zellen, in denen keine stabile Integration stattfindet, durch den Selektionsdruck eliminiert wurden. Nur ein ursprünglich kleiner Teil an stabil transfizierten Zellen führt nach Selektion zu diesen Ergebnissen. Um die Übertragbarkeit auf *in vivo* Untersuchungen zu gewährleisten, muss auf den Selektionsdruck verzichtet werden, der ausschließlich in Zellkulturuntersuchungen anwendbar ist. Auch die Anwendung von Selektionsdruck auf *ex vivo*-Zellkulturen mit anschließender Reimplantation in den Organismus ist durch die multiplen Effekte von G418 auf die Zellen kritisch zu betrachten (Coggan et al., 1994; Kung et al., 1997). Hinzu kommt, dass für die Selektion von *ex vivo*-kultivierten Zellen ein Zeitraum von einigen Wochen nötig ist. Allerdings ist eine *ex vivo*-Kultivierung beispielsweise von humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen über längere Zeit bezüglich ihres Potenzials zur Reimplantation ebenfalls kritisch (Williams, 1993; Dorrell et al., 2000; Dunbar et al., 2001). Zwei Gründe wurden für das schlechte Einwachsen (*engraftment*) von hämatopoetischen Stammzellen nach *ex vivo* Kultivierung gezeigt. Der Verlust des ursprünglichen Zellzustandes durch Aktivierung des Zellzyklus (Orschell-Traycoff et al., 2000; Szilvassy et al., 2000; Berrios et al., 2001), als auch eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (Berrios et al., 2001; Szilvassy et al., 2001; McManus et al., 2002) vermindern das *engraftment* der Zellen nach Reimplantation. Die Untersuchung des Potentials der  $\phi$ C31 Integrase, Langzeitexpression in hämatopoetischen Zellen zu vermitteln, ohne Selektionsdruck anzuwenden und die damit verbundene längere *ex vivo*-Kultivierung zu vermeiden, ist aus diesen Gründen von großem Interesse.

### 4.1 Langzeit-Transgenexpression in hämatopoetischen Zelllinien

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Integrase-vermittelte Integration eines Reporterplasmids zu Langzeit-Transgenexpression in murinen MLE-12- und humanen A549-Lungenzelllinien führt (Aneja et al., 2007). Diese Untersuchungen wurden ohne Selektionsdruck durchgeführt.



Um das Potential der  $\phi$ C31 Integrase zu untersuchen, Langzeit-Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen zu vermitteln, wurden Transfektionen und anschließende Messungen der Transgenexpression über längere Zeiträume durchgeführt. Jurkat T-Zellen wurden mit pEGFPLucattB und pCMV-Int in einem Verhältnis 1:4 (m/m) kotransfiziert und die Luciferase-Expression wurde über mindestens vier Wochen bestimmt. Als Kontrolle wurde der leere Vektor p $\Delta$ elCpG anstelle des pCMV-Int Plasmids kotransfiziert. Als Transfektionsmethoden wurden jeweils entweder Elektroporation (Abbildung 4.1) oder Nucleofection (Abbildung 4.2) verwendet.

Abbildung 4.1

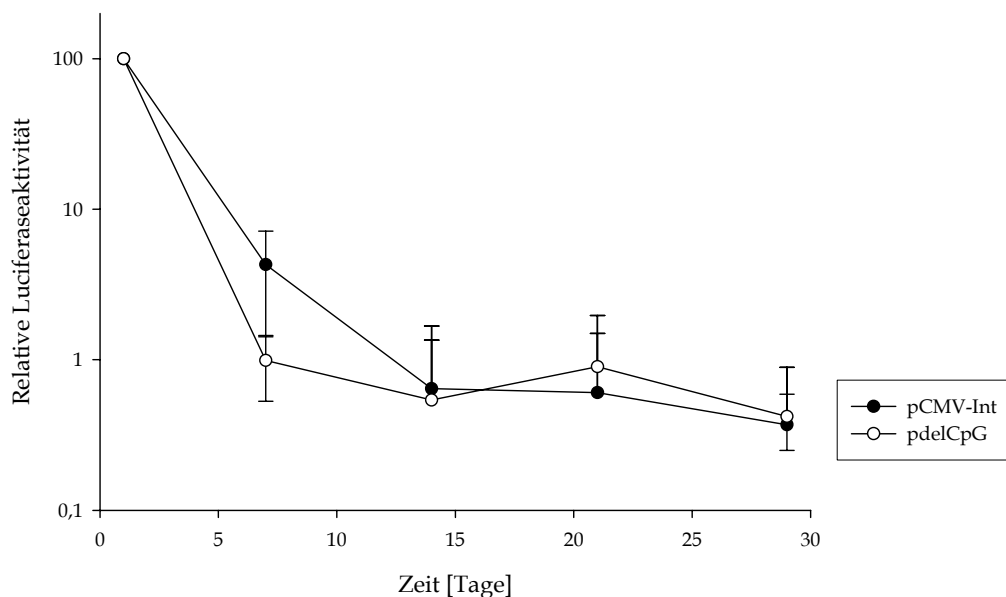


Abbildung 4.1 Transgenexpression nach Elektroporation von pCMV-Int. Kotransfektionen von 1  $\mu$ g pEGFPLucattB und 4  $\mu$ g pCMV-Int oder p $\Delta$ elCpG (Kontrolle) wurden mittels **Elektroporation** in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase-Expression zu Tag 1 nach Transfektion von pCMV-Int war zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die p $\Delta$ elCpG-Kontrolle.

Abbildung 4.2

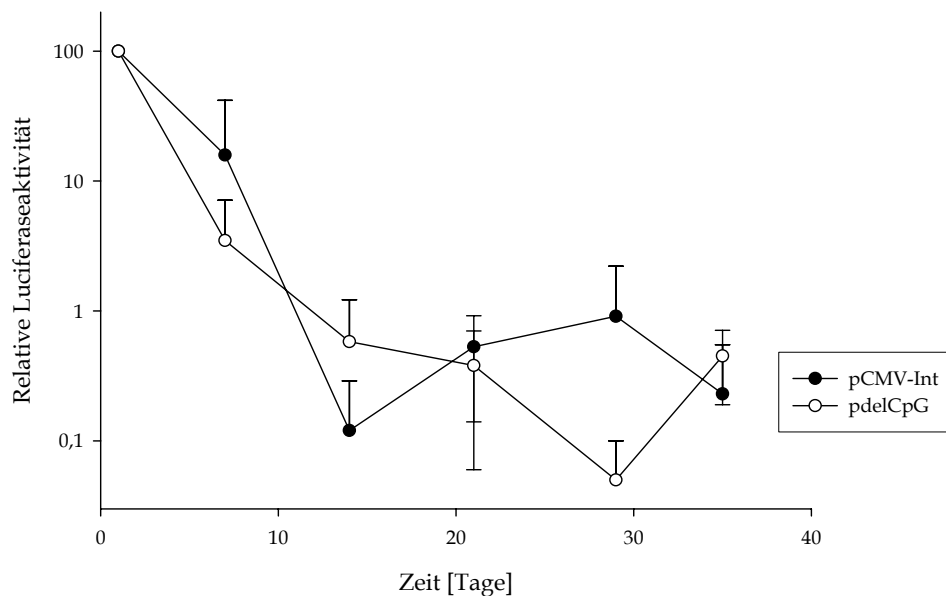


Abbildung 4.2 Transgenexpression nach Nucleofektion von pCMV-Int. Kotransfektionen von 1  $\mu\text{g}$  pEGFP*LucattB* und 4  $\mu\text{g}$  pCMV-Int oder pdelCpG (Kontrolle) wurden mittels **Nucleofektion** in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase-Expression zu Tag 1 nach Transfektion von pCMV-Int war auch hier zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die pdelCpG-Kontrolle.

Mit beiden Transfektionsmethoden kann eine Expression von circa 1 Prozent der initialen Expression über mehrere Wochen erreicht werden. Allerdings kann diese Luciferase-Expression nicht auf die Kotransfektion des Integrasekonstrukts pCMV-Int zurückgeführt werden, da zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle pdelCpG besteht. Im transfizierten pEGFP*LucattB* Konstrukt ist die *attB* Sequenz direkt am 3'-Ende der Expressionskassette lokalisiert. Damit würde bei Integration des Plasmids die Expressionskassette am Rande der Integrationsstelle liegen und die Transkription möglicherweise durch den dort stattfindenden Rekombinationsprozess inhibiert werden. Um dies auszuschließen, wurde in einem weiteren Experiment der Vektor pdelCpG*LucattB* verwendet. In diesem Konstrukt befindet sich die *attB*-Sequenz in einem Abstand von 1,1 kb vom Luciferasegen. Zusätzlich wurden neben pCMV-Int die folgenden Integrase-Konstrukte verwendet: pdelCpG-Int, pVAX1-Int, pPGK-Int und pCAG-Int. pdelCpG-Int stellt ein Konstrukt mit reduziertem CpG-Gehalt dar. pVAX1-Int

enthielt ein von der FDA geprüftes Plasmid-DNA Rückgrat (Müller and R Schuhmann, 1996). Die Plasmide pCAG-Int und pPGK-Int enthielten entweder eine Kombination des *chicken-beta-actin*-Promotor und des Cytomegalovirus-*enhancer* oder den Phosphoglycerat Kinase-Promotor und jeweils eine C-terminale SV40-NLS-Kodierung. Die Untersuchung von Plasmiden mit unterschiedlichen Promotoren sollte ineffiziente Transkription durch Verwendung des CMV-Promotors als möglichen Grund für die negativen Ergebnisse ausschließen. Die SV40-NLS sollte den effizienten Transport des translatierten Integraseenzym in den Kern vermitteln, wo die Integrase die Integration der Plasmid-DNA ins Genom vermittelt. Die Kotransfektionen wurden hier ebenfalls in einem Verhältnis von p $\Delta$ elCpGLuc $\Delta$ t $\Delta$ B und dem jeweiligen Integrasekonstrukt von 1:4 (m/m) durchgeführt. Auch hier wurden die Transfektionsmethoden Elektroporation (Abbildung 4.3) und Nucleofection (Abbildung 4.4) verwendet.

Abbildung 4.3

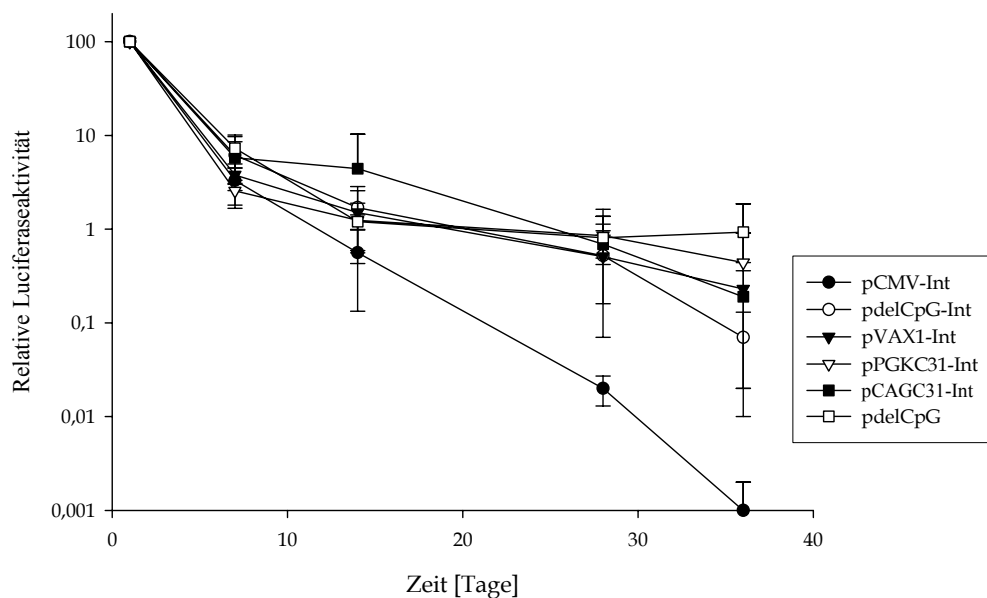


Abbildung 4.3 Transgenexpression nach Nucleofection unterschiedlicher Integrase Konstrukte.

Kotransfektionen von 1  $\mu$ g p $\Delta$ elCpGLuc $\Delta$ t $\Delta$ B und jeweils 4  $\mu$ g Integrase-Plasmid oder p $\Delta$ elCpG (Kontrolle) wurden mittels Nucleofection in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase Expression zu Tag 1 nach Transfektion der Integrase-Konstrukte war hier zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die p $\Delta$ elCpG-Kontrolle.

Abbildung 4.4

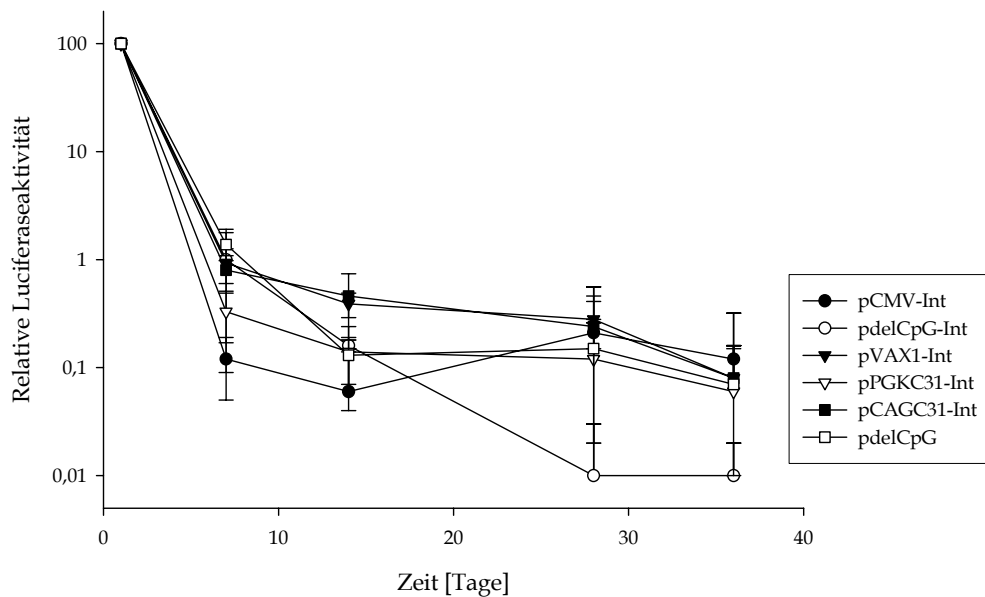


Abbildung 4.4 Transgenexpression nach Nucleofektion von unterschiedlicher Integrase-Konstrukte.

Kotransfektionen von 1  $\mu\text{g}$  pCpGLucattB und jeweils 4  $\mu\text{g}$  Integrase-Plasmid oder pdelCpG (Kontrolle) wurden mittels **Nucleofektion** in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase-Expression zu Tag 1 nach Transfektion der Integrase-Konstrukte war hier zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die pdelCpG-Kontrolle.

Auch mit den hier verwendeten Transgen - und Integrasekonstrukten konnte zu keinem Zeitpunkt erhöhte Luciferase-Expression durch die Integrase festgestellt werden. Weiterhin wurden analoge Versuche durchgeführt mit einem Plasmid-DNA Verhältnis von 1:1 (m/m) von pdelCpGLucattB und den verschiedenen Integrasekonstrukten pCMV-Int, pdelCpG-Int, pVAX1-Int, pPGK-Int und pCAG-Int. Auch hier konnte keine erhöhte Luciferase-Expression festgestellt werden.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Transfektion von mRNA an Stelle von Plasmid-DNA in hämatopoetische Monozyten höhere Transgenexpression zur Folge hatte (Martinet et al., 2003). Um das Potential von  $\phi\text{C31}$  Integrase-kodierender mRNA (mRNA-Int) zu testen, wurde in einem weiteren Experiment die Kotransfektion verschiedener Konzentrationen stabilisierter mRNA-Int mit pdelCpGLucattB durchgeführt. Hierzu wurden entweder 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  oder 2  $\mu\text{g}$  an

mRNA-Int und jeweils 1  $\mu\text{g}$  pdelCpGLucattB verwendet (Abbildung 4.5). Als Transfektionsmethode wurde Nucleofektion gewählt, da gezeigt werden konnte, dass dies eine sehr effiziente Methode für den Transfer sowohl von Plasmid-DNA, als auch von mRNA, in verschiedene hämatopoetische Zellen ist (Schakowski et al., 2004; von Levetzow et al., 2006; Landi et al., 2007).

Abbildung 4.5

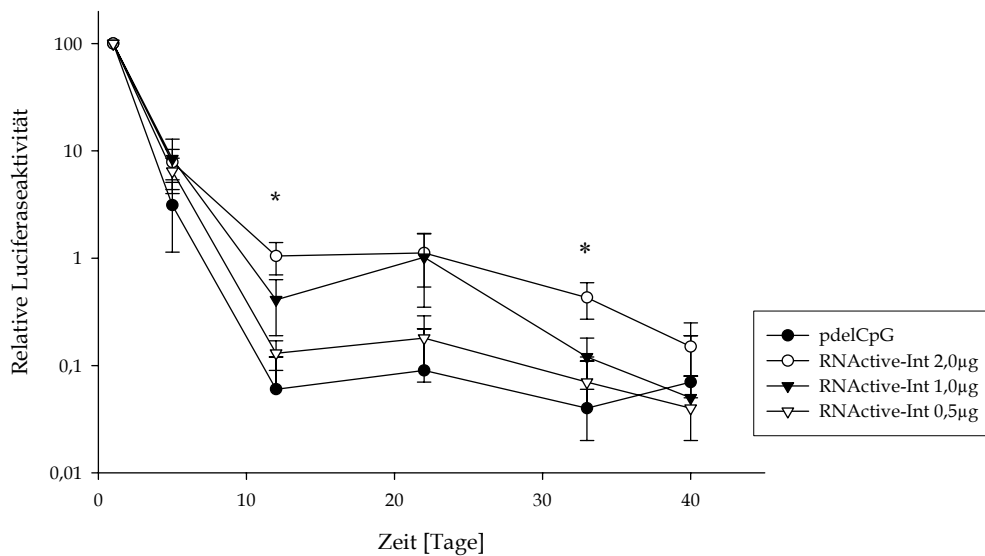


Abbildung 4.5 Transgenexpression nach Nucleofektion unterschiedlicher Mengen an Integrase mRNA.

Kotransfektionen von 1  $\mu\text{g}$  pCpGLucattB und jeweils unterschiedlichen Mengen an Integrase-mRNA oder pdelCpG (Kontrolle) wurden mittels Nucleofektion in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase-Expression zu Tag 1 nach Transfektion von 2  $\mu\text{g}$  Integrase mRNA war hier zu zwei Zeitpunkten signifikant höher als die pdelCpG-Kontrolle.

Insgesamt schien die Verwendung von mRNA-Int effizienter als Integrase Plasmid-DNA. Zu den zwei Zeitpunkten Tag 12 und Tag 33 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen 2 $\mu\text{g}$  mRNA-Int und der pdelCpG Negativkontrolle. Allerdings war dieser Unterschied nicht über die gesamte Zeit konsistent und konnte nur durch Kotransfektion von 2  $\mu\text{g}$  mRNA erreicht werden. Um hier spezifische Effekte der Jurkat-Zelllinie ausschließen zu können, wurde die Kotransfektion von pdelCpGLucattB mit verschiedenen Konzentrationen mRNA-Int oder pCMV-Int an einer weiteren hämatopoetischen T-Lymphozyten-

Zelllinie ED-7R (Ishikawa et al., 2006) durchgeführt (Abbildung 4.6). Hier konnte weder mittels Integrase Plasmid-DNA, noch mit mRNA-Int erhöhte Transgenexpression, verglichen mit der Kontrolle, festgestellt werden.

Abbildung 4.6

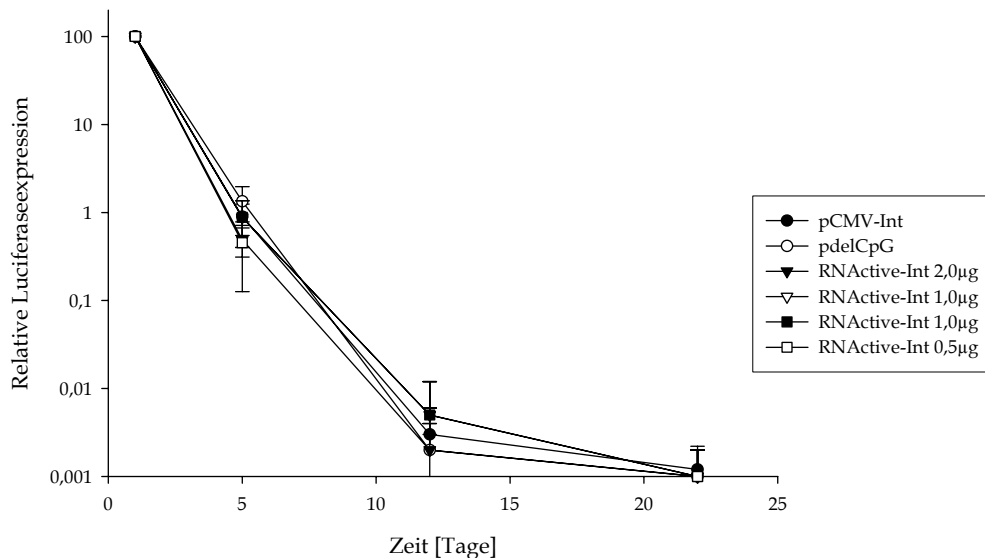


Abbildung 4.6 Transgenexpression nach Nucleofection unterschiedlicher Mengen an Integrase mRNA.

Kotransfektionen von 1 µg pCpGLucattB und jeweils 4 µg pCMV-Int, unterschiedlichen Mengen an Integrase mRNA oder pdelCpG (Kontrolle) wurden mittels Nucleofection in Jurkat-Zellen durchgeführt. Die relative Luciferase-Expression zu Tag 1 zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Verbesserung durch die Kotransfektion von mRNA-Int oder pCMV-Int verglichen zur Kontrolle-pdelCpG.

## 4.2 Expression der $\phi$ C31 Integrase in Jurkat-Zellen

Die Beobachtungen unter 4.1 wiesen entweder auf eine zu geringe Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase oder fehlende, beziehungsweise unzureichende Expression des Enzyms in hämatopoetischen T-Zelllinien, um stabile Transgenexpression zu vermitteln, hin. Um die Expression der  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen zu überprüfen, wurden Jurkat-Zellen entweder mit pCMV-Int oder dem kodonoptimierten Konstrukt pC31-Intopt transfiziert und nach 24 Stunden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zur Kontrolle wurden A549 Lungenzellen, in denen die Aktivität der Integrase bereits nachgewiesen wurde (Aneja et al., 2007), analog behandelt und analysiert. In beiden Zelltypen konnten nach Transfektion der Konstrukte deutliche  $\phi$ C31 Integrase spezifische Banden detektiert werden (Abbildung 4.7).

Abbildung 4.7

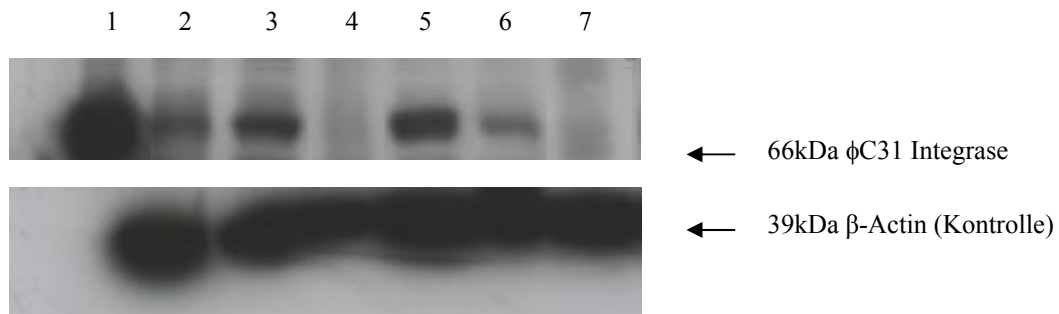


Abbildung 4.7 Detektion von  $\phi$ C31 Integrase Protein mittels Western-Blot-Analyse. Gesamtprotein wurde vor und 24 h nach Transfektion von entweder pCMV-Int oder pC31Intopt aus Jurkat- und A549-Zellen isoliert. Integrase-Expression konnte sowohl in A549 Zellen, die mit pCMV-Int (Spur 2) oder pC31-Intopt (Spur 3), als auch in Jurkat-Zellen, die mit pC31-Intopt (Spur 5) oder pCMV-Int (Spur 6) transfiziert wurden, detektiert werden. Untransfizierte A549 (Spur 4) und Jurkat-Zellen (Spur 7) zeigen keine Expression. Spur 1 repräsentiert die Integrase-Positivkontrolle.

Durch die kodonoptimierte Sequenz der Integrase-cDNA im Plasmid pC31-Intopt ergibt sich hier sowohl in Jurkat-, wie auch in A549-Zellen eine höhere Expression des  $\phi$ C31 Integrase-Proteins verglichen mit dem Vektor pCMV-Int. Mittels qRT-PCR wurde weiterhin die Expression der Integrase auf mRNA-Ebene in Jurkat

und A549-Zellen quantifiziert. Dazu wurden die Zellen jeweils mit pCMV-Int oder pC31-Intopt transfiziert, die gesamte RNA der Zellen isoliert und diese mittels Reverser Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Die Integrase-cDNA wurde anschließend mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) spezifisch amplifiziert und die Verhältnisse der vorhandenen Integrase in den unterschiedlichen Zelllinien abhängig vom verwendeten Integrase-Plasmid bestimmt (Abbildung 4.8).

Abbildung 4.8

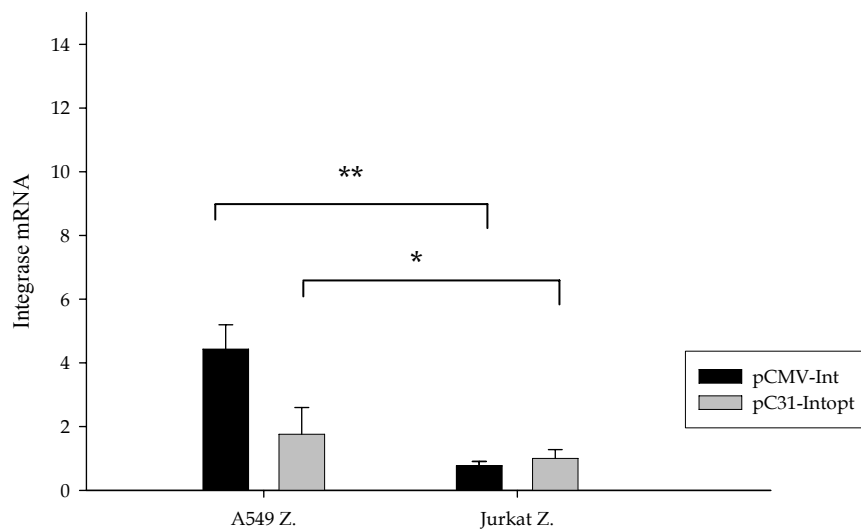


Abbildung 4.8 Quantifizierung der Integrase mRNA Expression.

Gesamt-RNA wurde 24 h und 72 h nach Transfektion von pCMV-Int oder pC31-Intopt aus A549 - und Jurkat-Zellen isoliert. Gesamt cDNA wurde durch reverse Transkription synthetisiert und Integrase cDNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Integrase-RNA-Menge war in A549 Zellen bei Transfektion von pCMV-Int 5,8-fach (\*\* $P < 0.01$ ), bei Transfektion von pC31-Intopt 1,7-fach (\* $P < 0.05$ ) höher als in Jurkat-Zellen.

Verglichen mit Jurkat-Zellen ergaben sich 24 Stunden nach Transfektion mit pCMV-Int 5,8-fach und im Falle des pC31-Intopt 1,7-fach höhere Integrase-RNA-Werte in A549-Zellen.



### 4.3 Plasmid-basierte Rekombination mittels $\phi$ C31 Integrase

In den unter 4.1 beschriebenen Versuchen wurde die Langzeit-Transgenexpression durch Integration von Plasmid-DNA mittels  $\phi$ C31 Integrase untersucht. Wie bereits unter 1.5 beschrieben, findet die Integration ins Genom an so genannten Pseudo *attP*-Sequenzen statt. Da bereits über 350 Pseudo *attB*-Sequenzen identifiziert wurden und diese offensichtlich gewebsspezifisch unterschiedlich häufig angesteuert werden, muss ein möglicher inhibitorischer Effekt durch die Position dieser Pseudo *attB*-Sequenzen im Genom von hämatopoetischen Zellen ausgeschlossen werden. Vorwiegende Integration in Bereichen des Heterochromatins könnte trotz effektiver Integration zum schnellen Abschalten (*Silencing*) der Transgenexpression führen. Daher wurde eine optimierte Versuchsanordnung entwickelt, in dem mögliche Effekte durch die Lage hämatopoetisch-spezifischer Pseudo *attB*-Sequenzen ausgeschaltet sind. Dazu wurden Kotransfektionen von pSVpax*attP*50-*attB*53 mit p*delCpG*-Int oder pCAG-Int und pEGFP*Luc* durchgeführt. Das 7,2 kb große pSVpax*attP*50-*attB*53 Konstrukt enthält eine Transkriptions-blockierende Sequenz von 1,1 kb zwischen dem P1-Promotor und dem LacZ-Reportergen, die die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase verhindert. Diese blockierende Sequenz ist von der *attB*- und der *attP*-Wildtypsequenz flankiert. Die funktionelle Integrase in diesem Versuchsaufbau vermittelt die intramolekulare Rekombination zwischen der *attB*- und der *attP*-Sequenz. Dabei kommt es zum Ausschneiden der blockierenden Sequenz und zur Rekombination derer zu einem entsprechenden 1,1 kb Plasmid. Des Weiteren entsteht ein 6,1 kb Plasmid, in dem sich der P1-Promotor im richtigen Raster vor dem LacZ-Gen befindet. Dies hat zur Folge, dass  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wird. Die Reaktion in dieser Versuchsanordnung ist schematisch in Abbildung 4.9 dargestellt.

Abbildung 4.9

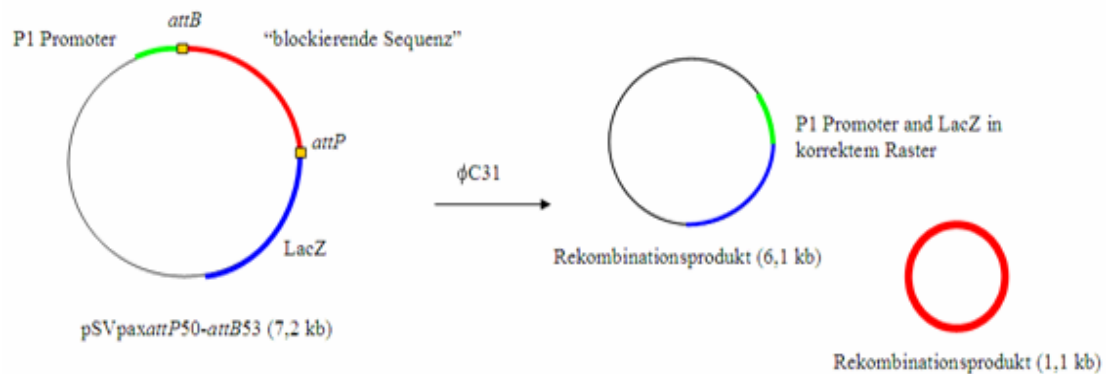


Abbildung 4.9 Schematische Abbildung der Rekombination von episomaler Plasmid-DNA mittels  $\phi C31$  Integrase.

Nach Transfektion von Integrase und *pSVpaxattP50-attB53* entstehen durch die Integrase-vermittelte Rekombination zwei Rekombinationsprodukte. Im 6,1 kb großem Rekombinationsprodukt befindet sich der P1-Promotor im korrektem Raster mit dem LacZ-Gen, so dass es zur Expression von  $\beta$ -Galaktosidase kommt.

Das *pEGFP<sub>Luc</sub>*-Plasmid dient als interne Transfektionskontrolle im Versuchsaufbau. Zur weiteren Kontrolle wurde jeweils parallel ein Versuchsansatz mit dem leeren *pUC21*-Konstrukt statt des jeweiligen Integrase Plasmids durchgeführt. Die durch Rekombination vermittelte  $\beta$ -Galaktosidase-Expression kann durch die Subtraktion des *pUC21*-Kontrollhintergrundes von der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des jeweiligen Integrase-Versuchs ermittelt werden. Mit diesem Versuchsaufbau konnte die relative Aktivität der  $\phi C31$  Integrase in Zellen unterschiedlicher Gewebe ermittelt werden. Für die folgenden Versuche wurde Nucleofection als effiziente Transfektionsmethode für alle untersuchten Zelltypen verwendet. Neben unterschiedlichen Zelllinien und primären Zellen des hämatopoetischen Systems wurden mit der beschriebenen Versuchsanordnung auch Lungen-, Leber-, sowie Cervixkarzinomzelllinien, als auch primäre mesenchymale Stammzellen untersucht. Für die T-Lymphozyten-Zelllinie ED-7R, primäre humane T-Lymphozyten und humane hämatopoetische CD34<sup>+</sup> Stammzellen konnte keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ermittelt werden. Im Falle von Jurkat-Zellen wurde geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität festgestellt. Dagegen konnte in allen nicht-hämatopoetischen Zellen deutliche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

gemessen werden. So zeigten humane A549-Alveolar-Typ-II-Zellen, BEAS-2B Bronchialepithelzellen, HepG2 Hepatozyten, HeLa Cervixkarzinomzellen und primäre mesenchymale Stammzellen (MCS) jeweils deutliche  $\beta$ -Galaktosidase Signale (Abbildung 4.10).

Abbildung 4.10

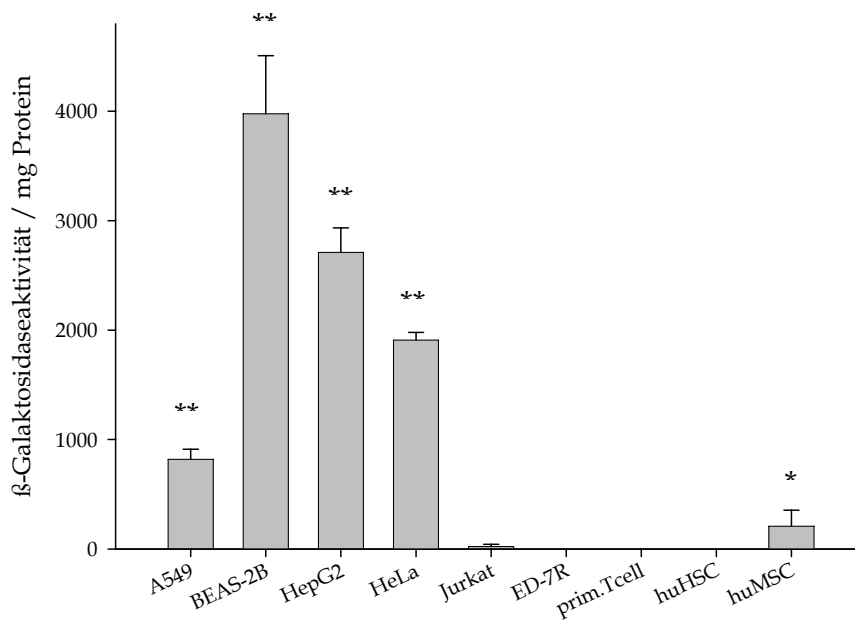


Abbildung 4.10 Durch Rekombination vermittelte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in unterschiedlichen Zelltypen.

Kotransfektionen von pSVpaxattP50-attB53, Integrase-Plasmid und pEGFP<sub>Luc</sub> wurden in unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt. Die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase ist als  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität/mg Protein dargestellt. Die Aktivität der Integrase in nicht-hämatopoetischen Zellen ist signifikant unterschiedlich zu der in Jurkat-Zellen (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).

Während in den Zellen des hämatopoetischen Systems keine oder minimale Integrase-vermittelte Rekombination stattfand zeigte sich in mesenchymalen Stammzellen und A549-Lungenzellen moderate Rekombination. Für die übrigen Zelllinien konnte sehr hohe Rekombination und damit  $\beta$ -Galaktosidase-Expression festgestellt werden. Dies bestätigt auf der einen Seite die Resultate für hämatopoetische Zellen aus 4.1 und zeigt auf der anderen Seite deutlich die zelltypabhängige Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase. Um mögliche Effekte der

Nucleofection als Transfektionsmethode auszuschließen, wurden die Transfektionen mit Metafectene Pro (Biontex Laboratories GmbH, Deutschland) und Lipofectamin 2000 (Invitrogen Inc., Grossbritannien) als Transfektionsreagenzien in A549-Zellen wiederholt. Auch hier wurde deutliche  $\beta$ -Galaktosidase-Expression beobachtet. Anhand der, als interne Kontrolle, zusätzlich ermittelten Luciferase-Expressionen konnten hier in Abhängigkeit der Transfektionsmethode unterschiedliche Transfektionseffizienzen festgestellt werden. In jedem Fall war jedoch eine vergleichbare  $\beta$ -Galaktosidase-Expression messbar. Dies zeigte, dass auch unterschiedliche Transfektionseffizienzen jeweils zu Integraseaktivität und entsprechend zu  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in diesem Versuchsaufbau führten.

Gründe für die fehlende  $\beta$ -Galaktosidase Expression in den verschiedenen hämatopoetischen Zellen könnten neben reduzierter Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase auch fehlende Sensitivität der  $\beta$ -Galaktosidase-Messung, oder eine mögliche gewebsspezifische Aktivität des P1-Promotors im Rekombinationsprodukt sein. Um diese Gründe ausschließen zu können, wurde eine PCR-basierte Versuchsanordnung entwickelt. Hierbei ist es möglich, unabhängig von der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression sehr sensitiv Integrase-vermittelte Rekombination festzustellen. Dafür wurde wiederum die Kotransfektion des pSVpaxattP50-attB53 Plasmids mit dem Integrase Plasmid p $\Delta$ elCpG-Int in verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Für die Kontrolle wurden analog Experimente mit dem leeren Vektor pUC21 anstelle des Integrase-Plasmids durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion wurde jeweils die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde als Matrize für eine anschließende PCR verwendet. Für die PCR wurde ein Primerpaar gewählt, das in der blockierenden Sequenz zwischen P1-Promotor und LacZ-Gen bindet. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie direkt nebeneinander binden und in verschiedene Richtungen amplifizieren. Durch die Verwendung einer üblichen *Taq*-Polymerase ist es möglich, selektiv ein 0,94 kb Fragment des aus Rekombination entstandene 1,1 kb Plasmids zu amplifizieren. Im Falle des 7,2 kb parenteralen Vektors ist die Amplifikation nicht

möglich, da eine übliche *Taq*- Polymerase maximal in der Lage ist, eine Sequenz von 5 kb zu amplifizieren. Im zweiten 6,1 kb Rekombinationsprodukt, auf dem das LacZ Gen lokalisiert ist, binden die Primer nicht, so dass auch hier unspezifische Amplifikation nicht möglich ist. Im Falle von Rekombination mittels  $\phi$ C31 Integrase kann also unabhängig von der P1-Promotor-Aktivität nach Trennung durch Gelelektrophorese ein 0,94 kb Fragment detektiert werden (Abbildung 4.11).

Abbildung 4.11

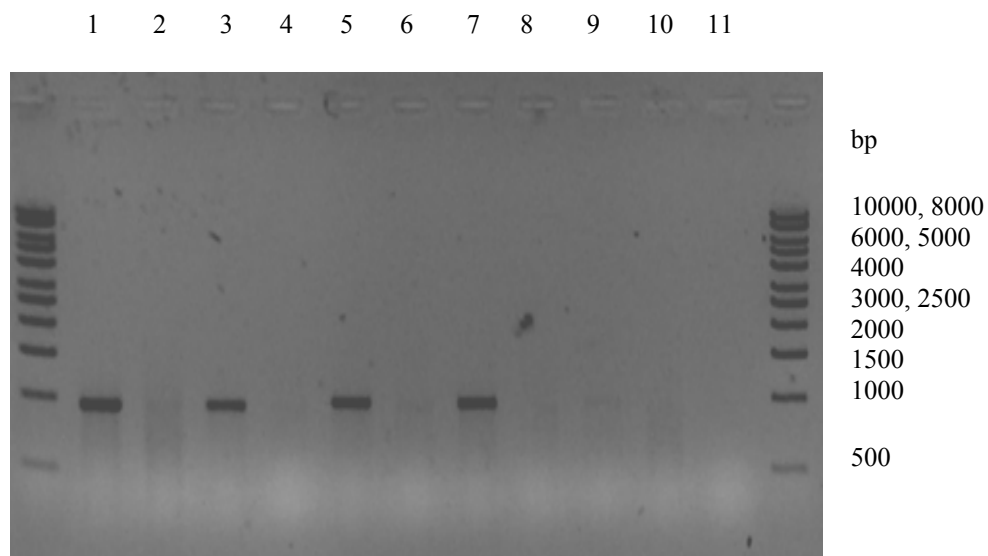


Abbildung 4.11 Detektion von Rekombinationsprodukten in unterschiedlichen Zelllinien mittels PCR.

Plasmid-DNA wurde 24 h nach Kotransfektion von pSVpaxattP50-attB53 und Integrase Plasmid oder pUC21 (Kontrolle) aus unterschiedlichen Zelltypen isoliert. Mittels PCR wurde ein 0,94 kb Fragment des durch Rekombination entstandenen 1,1 kb Rekombinationsprodukts amplifiziert und durch Gelelektrophorese detektiert. Sowohl in A549- (Spur 1), BEAS-2B- (Spur 3), HepG2- (Spur 5) und HeLa-Zellen (Spur 7) konnten deutliche Banden detektiert werden. In Jurkat-Zellen (Spur 9) dagegen ist nur eine sehr schwache Bande detektierbar. Spuren 2, 4, 6, 8, 10 zeigen die entsprechenden Kontrollen in A549-, BEAS-2B-, HepG2-, HeLa- und Jurkat-Zellen. Spur 11 repräsentiert die H<sub>2</sub>O-Kontrolle.

Deutliche Banden auf Höhe von 0,94 kb konnten für die Zelllinien A549, BEAS-2B, HepG2 und HeLa detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde unter den gleichen Bedingungen eine äußerst schwache Bande für Jurkat-Zellen beobachtet. Diese schwache Bande weist auf eine geringe Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase in

Jurkat-Zellen hin. Keinerlei Banden wurden im Falle der pUC21-Kontrollen detektiert.

### 4.4 Quantifizierung der $\phi$ C31 Integrase-vermittelten Rekombinationseffizienz in unterschiedlichen Zelllinien

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Zelllinien Jurkat T-Lymphozyten und A549 Typ II Alveolarzellen als Modellzellen gewählt, um die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase im Blutkompartiment und im Lungengewebe zu quantifizieren und zu vergleichen. Um möglichst optimale Bedingungen und damit möglichst hohe Aktivität der Integrase zu erzielen, wurde das kodonoptimierte Integrase-Plasmid pC31-Intopt verwendet (Raymond and Soriano, 2007). Hierbei handelt es sich um einen Vektor, der statt der ursprünglichen  $\phi$ C31 Integrase-DNA-Sequenz aus dem Phagengenom eine Sequenz enthält, die ebenfalls für die  $\phi$ C31 Integrase kodiert, allerdings aus Basentriplets besteht, die typischerweise in Säugerzellen vorkommen. Dadurch kann eine erhöhte Translation des Proteins in Säugerzellen erreicht werden. Das pC31-Intopt Plasmid enthält außerdem eine SV40-NLS-Kodierung C-terminal zur Integrase-cDNA. Zum Vergleich wurde neben pC31-Intopt zusätzlich das bereits in vielen Studien verwendete pCMV-Int Plasmid untersucht (Thyagarajan et al., 2001; Quenneville et al., 2004; Chalberg et al., 2006; Ishikawa et al., 2006). Als Negativkontrolle wurde pUC21, als Plasmid ohne Expressionskassette, verwendet. Um möglichst identische Versuchsbedingungen zu erreichen, muss ein Transfektionsreagenz gewählt werden, mit dem es möglich ist, sowohl die Jurkat-Suspensionzellen, als auch die adhärent wachsenden A549-Zellen ähnlich effizient zu transfizieren. Daher wurden die kationischen Lipide Lipofectamin 2000 (Invitrogen Inc., Grossbritannien), FuGene (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) Metafectene und Metafectene Pro (Biontex Laboratories GmbH, Deutschland) bezüglich ihrer Transfektionseffizienz in den beiden Zelllinien getestet. Als einziges Transfektionsreagenz, mit dem es möglich war, sowohl Jurkat - als auch A549-Zellen effizient zu transfizieren, erwies sich

Metafectene Pro. Daher wurde Metafectene Pro für die folgenden Untersuchungen als Transfektionsreagenz gewählt.

Für beide Zelllinien wurden Kotransfektionen, wie bereits unter 4.3 beschrieben, von pSVpaxattP50-attB53 mit jeweils pC31-Intopt, pCMV-Int oder pUC21 durchgeführt. Die durch Rekombination vermittelte  $\beta$ -Galaktosidase-Expression wurde jeweils nach 24 und 72 Stunden gemessen. Auch hier wurde durch Subtraktion des pUC21-Kontrollhintergrundes von der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität des jeweiligen Integrase Versuchs die Aktivität der Integrase in den verschiedenen Zellen ermittelt (Abbildung 4.12).

Abbildung 4.12

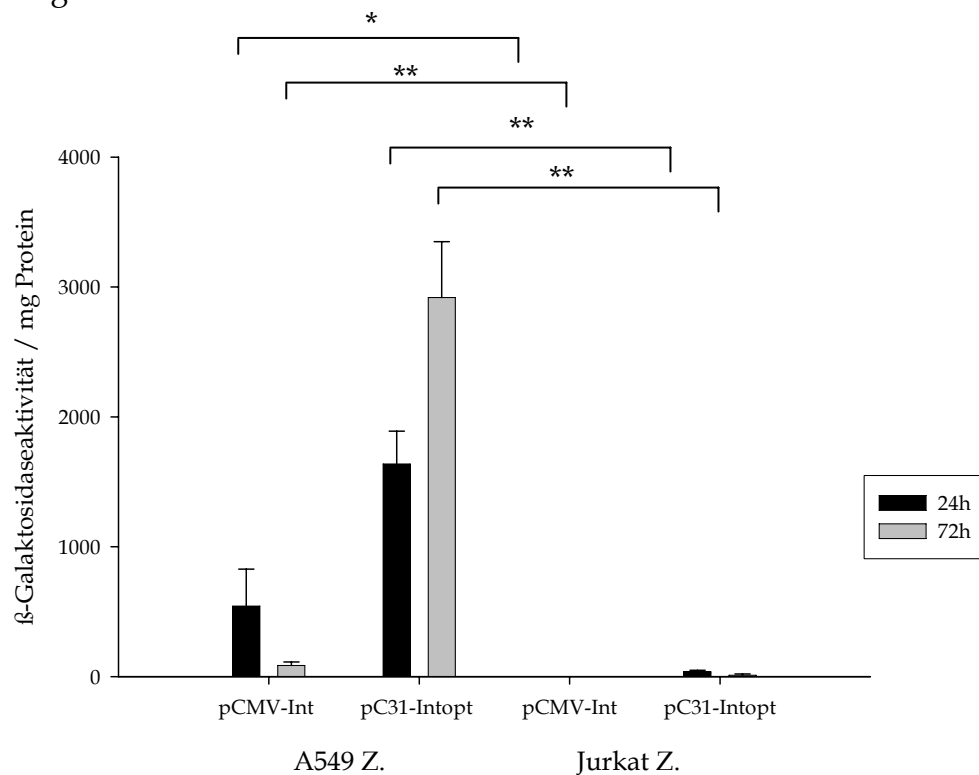


Abbildung 4.12 Bestimmung der Rekombinations-vermittelten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Kotransfektionen von pSVpaxattP50-attB53, pCMV-Int oder pC31-Intopt und pEGFPLuc wurden in A549 - und Jurkat-Zellen durchgeführt. Die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase ist als  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität/mg Protein 24 h and 72 h nach Transfektion dargestellt. Die Aktivität der Integrase in A549 Zellen ist für die untersuchten Plasmide zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als in Jurkat-Zellen (\*P<0.05; \*\*P<0.01).

Hierbei ergaben sich jeweils  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in A549-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden nach Transfektion mit pCMV-Int. Keine  $\beta$ -

Galaktosidase-Aktivität konnte für Jurkat-Zellen nach Transfektion mit pCMV-Int festgestellt werden. Dagegen zeigten Jurkat-Zellen nach Transfektion mit pC31-Intopt geringe  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden. Die entsprechenden Werte für A549-Zellen lagen allerdings auch hier deutlich höher. Für die Transfektionen mit pC31-Intopt ergeben sich entsprechend zum Zeitpunkt 24 Stunden eine 45-fache und nach 72 Stunden eine 265-fach höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in A549 verglichen mit Jurkat-Zellen. Vergleicht man die Effizienz der beiden Integrase Plasmide pC31-Intopt und pCMV-Int in A549, so ergab sich erwartungsgemäß eine 3-fach und eine 34-fach höhere  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität für pC31-Intopt 24 und 72 Stunden nach Transfektion.

Auch für diese Versuchsreihe wurden die Ergebnisse unabhängig von der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit der oben beschriebenen PCR-basierten Versuchsanordnung überprüft. Während für A549-Zellen starke Banden auf der Höhe von 0,94 kb effiziente Rekombination und damit die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase bestätigen, konnten im Falle von Jurkat-Zellen wiederum nur relativ schwache Banden detektiert werden (Abbildung 4.13).



Abbildung 4.13

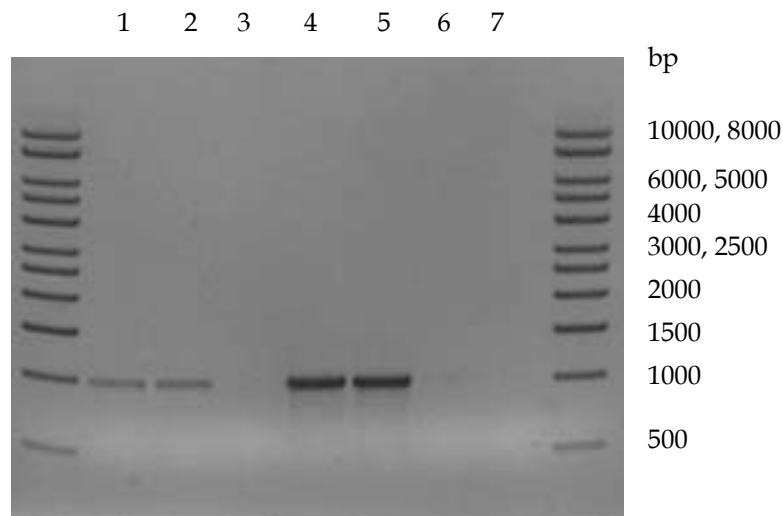


Abbildung 4.13 Detektion von Rekombinationsprodukten in Jurkat - und A549-Zellen mittels PCR.

Plasmid-DNA wurde 24 h nach Kotransfektionen von pSVpaxattP50-attB53, pCMV-Int oder pC31-Intopt und pUC21(Kontrolle) aus A549- und Jurkat-Zellen isoliert. Mittels PCR wurde ein 0,94 kb Fragment des durch die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase entstehenden 1,1 kb Rekombinationsprodukts amplifiziert und durch Gelelektrophorese detektiert. Starke Banden konnten für beide Integrase-Plasmide (Spuren 4 + 5) in A549-Zellen detektiert werden, wo gegen deutlich schwächere Banden für Jurkat-Zellen (Spuren 1 + 2) detektiert wurden. Spuren 3, 6 zeigen die entsprechenden Kontrollversuche. Spur 7 repräsentiert die H<sub>2</sub>O-Kontrolle.

Diese schwachen Banden bestätigen eine geringe Aktivität der Integrase in Jurkat-Zellen. Eine relative Quantifizierung der Rekombinationsprodukte wurde anschließend mittels qRT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden 24 Stunden nach Transfektion mit pCMV-Int 100-fach mehr Rekombinationsprodukte für A549 verglichen mit Jurkat-Zellen, ermittelt (Abbildung 4.14). Im Falle der Transfektionen mit pC31-Intopt ergab sich ein 29-fach höherer Wert für A549-Zellen. Zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion ergaben sich 3-fach und 120-fach mehr Rekombinationsprodukte für A549-Zellen. Insgesamt waren die Werte 72 Stunden nach Transfektion allerdings niedriger als nach 24 Stunden.

Abbildung 4.14

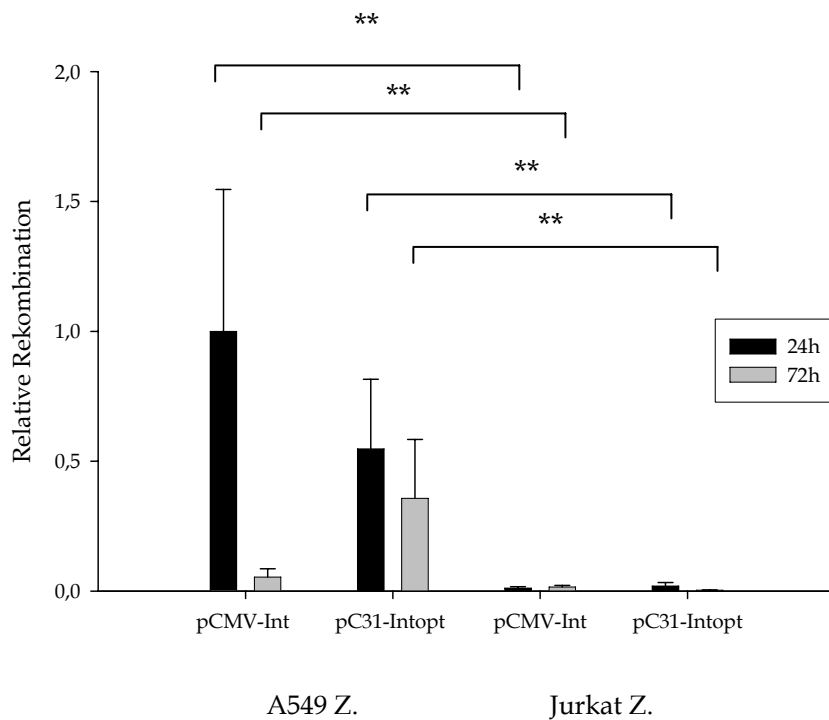


Abbildung 4.14 Quantifizierung von Rekombinationsprodukten mittels qRT-PCR in Jurkat - und A549-Zellen.

Plasmid-DNA wurde 24 h nach Kotransfektionen von pSVpaxattP50-attB53, pCMV-Int oder pC31-Intopt aus A549- und Jurkat-Zellen isoliert. Die entstehenden Rekombinationsprodukte wurden mittels qRT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Die relative Rekombinationsaktivität der  $\phi$ C31 Integrase wurde in A549 - und Jurkat-Zellen 24 h und 72 h nach Transfektion ermittelt. Die Werte für A549-Zellen sind für die untersuchten Plasmide zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als die von Jurkat-Zellen (\*\*P<0.01).

#### 4.5 Zelltypabhängige Gesamtaktivität der Integrase

Um die Gesamtaktivität der Integrase in den unterschiedlichen Zelltypen zu bestimmen, wurde die Integrase-vermittelte relative Rekombination in Zusammenhang mit der tatsächlich vorhanden Integrasemenge der Zellen gesetzt. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Menge an Rekombinationsprodukten und der ebenfalls mittels qRT-PCR bestimmten relativen mRNA-Integrase Expression (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1

Zelltyp	Zeitpunkt (h)	β-Galaktosidase Aktivität <sup>#</sup>		Menge an Rekombinationsprodukt <sup>§</sup>		relative Integrase mRNA Expression <sup>§</sup>	
		pCMV-Int	pC31-Intopt	pCMV-Int	pC31-Intopt	pCMV-Int	pC31-Intopt
Jurkat	24	<i>n.d.</i>	3	1	2	1	1
	72	<i>n.d.</i>	1	1	0.3	<i>n.d.</i>	0.2
A549	24	49	149	100	55	5,8	1,7
	72	8	265	5	36	1	2

<sup>#</sup>Die Werte representieren die β-Galactosidase-Aktivität, normalisiert auf die Werte von pC31-Intopt in Jurkat-Zellen 72 h nach Transfektion.

<sup>§</sup>Die Werte representieren die reative Menge an Rekombinationsprodukt, normalisiert auf die Werte von pCMV-Int in Jurkat-Zellen 24 h nach Transfektion.

<sup>§</sup>Die Werte representieren die relative Integrase-mRNA Expression, normalisiert auf die Werte von pCMV-Int in Jurkat-Zellen 24 h nach Transfektion.

*n.d.* = nicht detektiert

Dabei ergab sich in unabhängigen Experimenten mit entweder pCMV-Int oder pC31-Intopt jeweils eine 17-fach und 16-fach höhere Gesamtaktivität der Integrase in A549 - als in Jurkat-Zellen (Abbildung 4.15).

Abbildung 4.15

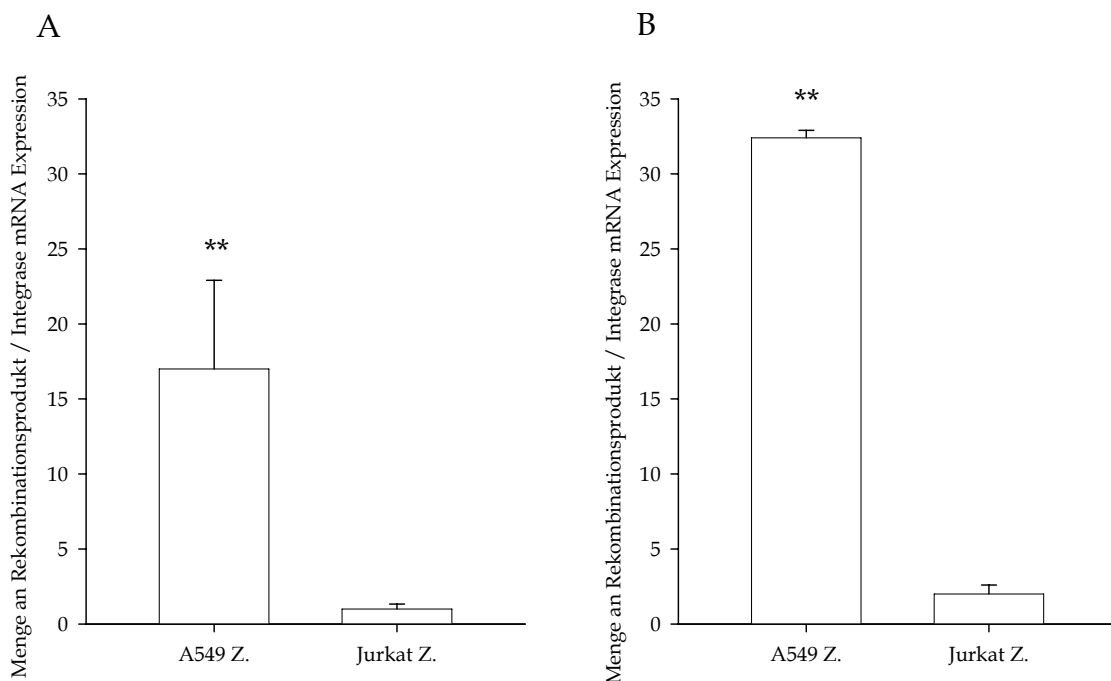


Abbildung 4.15 Gesamtaktivität der Integrase in A549- und Jurkat-Zellen.

Die zelltypabhängige Gesamtaktivität der  $\phi$ C31 Integrase wurde jeweils aus dem Verhältnis der Menge an Rekombinationsprodukten und der Integrase-mRNA Expression für Jurkat und A549-Zellen 24 h nach Transfektionen mit pCMV-Int (A) oder mit pC31-Intopt (B) berechnet. Hierbei ergab sich in den unabhängigen Experimenten entsprechend 17-fach und 16-fach höhere Gesamtaktivität der Integrase in A549 - als in Jurkat-Zellen (\*\*P<0.01).

### 4.6 Expression von zellulärem DAXX Protein

Protein-Protein-Interaktionen führen häufig zur Inhibition eines oder beider Proteine. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das intrazelluläre *Death-associated protein* (DAXX) mit der  $\phi$ C31 Integrase interagiert und deren Aktivität hemmt (Chen et al., 2006). Die beobachtete unterschiedliche Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen und Zellen anderer Gewebe könnte durch unterschiedliche Expression des DAXX-Proteins und entsprechend unterschiedlich starker Inhibition der Integrase verursacht werden. Aus diesem Grund wurde die DAXX-Expression in Jurkat- und A549-Zellen auf Protein-Ebene nachgewiesen. Mittels Western Blot konnte DAXX in transfizierten Jurkat- als auch in A549-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.16).

Abbildung 4.16

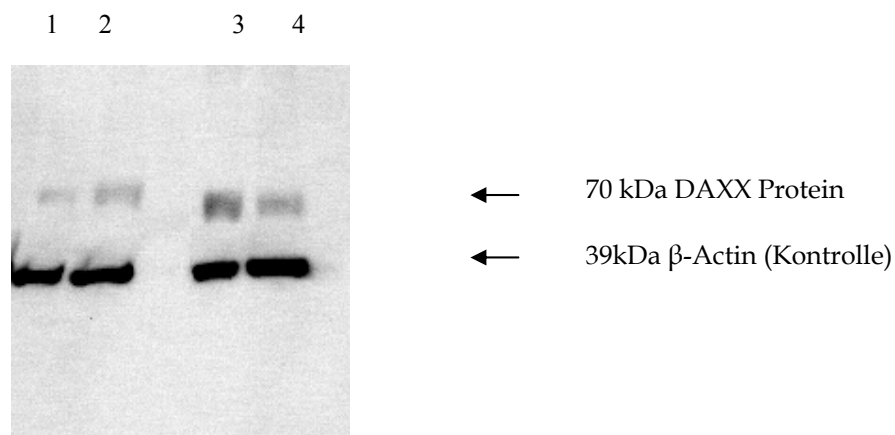


Abbildung 4.16 Detektion von DAXX mittels Western-Blot-Analyse.

Gesamtprotein wurde 24 h und 72 h nach Transfektion mit pCMV-Int aus Jurkat- und A549-Zellen isoliert. In A549-Zellen konnte 24 h (Spur 1) als auch 72 h (Spur 2) nach Transfektion DAXX Protein detektiert werden. DAXX spezifische Banden konnten ebenso in Jurkat-Zellen 24 h nach (Spur 3) und 72 h (Spur 4) nach Transfektion mit pCMV-Int detektiert werden.

Die DAXX-Protein-spezifischen Banden des Proteinlysats aus Jurkat-Zellen erschienen im Western Blot intensiver als in A549-Zellen. Eine gesteigerte DAXX Expression in Jurkat-Zellen könnte somit zu gesteigerter Inhibition und

verminderter Aktivität der Integrase führen. Da die Western-Blot-Analyse allenfalls eine Semiquantifizierung der Proteine zulässt, wurde im Folgenden DAXX in beiden Zelllinien mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene quantifiziert (Abbildung 4.17).

Abbildung 4.17

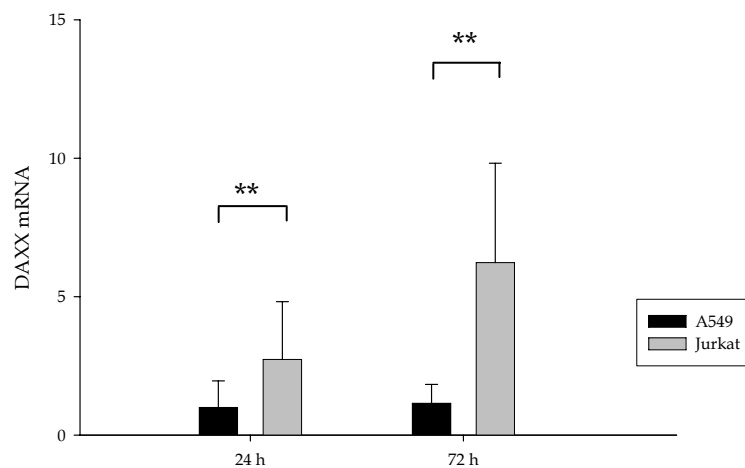


Abbildung 4.17 Quantifizierung der DAXX mRNA Expression. Gesamt-RNA wurde 24 h und 72 h nach Transfektion mit pCMV-Int aus A549 - und Jurkat-Zellen isoliert. Gesamt cDNA wurde durch reverse Transkription synthetisiert und DAXX-cDNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Die DAXX-mRNA-Menge war in Jurkat-Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant höher als in A549-Zellen (\*\*P<0.01).

Dazu wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden nach Transfektion untersucht. Hierbei ergaben sich entsprechend 2,7- und 5,4-fach signifikant höhere DAXX-Werte für Jurkat- im Vergleich zu A549-Zellen. Die Werte der transfizierten Zellen korrelieren mit den im Western Blot detektierten Intensitäten der DAXX-spezifischen Banden.

#### 4.7 Zusammenfassende Betrachtung der $\phi$ C31 Integrase-Aktivität

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die *Streptomyces*  $\phi$ C31 Integrase die spezifische Integration von transfizierter Plasmid-DNA ins Säuger genom vermitteln kann. Dabei kommt es zu Rekombination zwischen der auf dem

Plasmid liegenden *attB*-Sequenz und so genannten Pseudo *attP*-Sequenzen im Säuger genom. Während andere Rekombinasen, wie Cre oder FLP sowohl Integration als auch Exzision vermitteln, ist die  $\phi$ C31 Integrase-vermittelte Reaktion unidirektional und vermittelt ausschließlich Integration. Diese Eigenschaften machen die  $\phi$ C31 Integrase zu einem Werkzeug, um stabilen und sicheren nichtviralen Gentransfer und damit Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die  $\phi$ C31 Integrase prinzipiell in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben funktionell ist. So wurde die Aktivität der Integrase bereits in der Mausleber (Olivares et al., 2002), in Lungenzellen (Aneja et al., 2007) oder in humanen Myoblasten (Quenneville et al., 2004) gezeigt. Die Aktivität wurde in den untersuchten Zellen durch die Identifikation von spezifischen Integrationsstellen und durch Messung von Langzeit-Transgenexpression nachgewiesen. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass die Spezifität der Integration mittels  $\phi$ C31 Integrase abhängig vom Zelltyp ist (Ehrhardt et al., 2006). Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden, inwieweit auch die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase abhängig von Gewebe und Zelltyp ist. Die Untersuchungen unter 4.1 und 4.3 ergaben eine nicht messbare oder äußerst geringe Aktivität der Integrase in verschiedenen hämatopoetischen Zellen in unterschiedlichen Versuchsanordnungen. So konnte keine erhöhte Langzeit-Transgenexpression in den hämatopoetischen Zelllinien Jurkat und ED-7R nach Kotransfektion von pEGFP $LucattB$  und unterschiedlichen Integrase Plasmiden verglichen mit der Kontrolle, festgestellt werden. Hierbei hätte die spezifische Integration des *attB*-Sequenz-enthaltenden Plasmids ins Genom zu stabiler Transgenexpression führen sollen. Auch durch die Verwendung des p $\Delta$ elCpGL $LucattB$  Plasmids, in dem die *attB*-Sequenz in einem größeren intramolekularem Abstand zur Expressionskassette lokalisiert war, führte nicht zu erhöhter Langzeit-Transgenexpression. Unterschiedliche Verhältnisse an *attB*-enthaltendem-Plasmid und Integrase-Plasmid konnten hier ebenfalls keine erhöhte Luciferase-Expression vermitteln. Nur durch die Verwendung von Integrase-mRNA konnte teilweise erhöhte Langzeit-Expression erreicht werden.

Um ausschließen zu können, dass mangelnde Expression der  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen Ursache für die verminderte Integrase-Aktivität ist, wurde die Expression des Integrase-Proteins mittels Western-Blot-Analyse in Jurkat-Zellen und A549-Zellen, als Positiv-Kontrolle, untersucht. In beiden Zelllinien konnte deutliche Expression der Integrase nach Transfektion unterschiedlicher Integrase-Konstrukte detektiert werden.

Um weiterhin ausschließen zu können, dass die im hämatopoetischen System bevorzugten Pseudo *attP*-Sequenzen schlechter für den Integrationsprozess zugänglich sind und dadurch mangels Integration keinerlei erhöhte Langzeit-Transgenexpression festgestellt werden konnte, wurde eine optimierte, episomale Plasmid-basierte Versuchsanordnung etabliert. Weiterhin konnten durch diese Versuchsanordnung mögliche Detektionslimits durch *Gen-silencing* im Langzeitversuch als Grund für die negativen Ergebnisse ausgeschlossen werden. Bei dem episomalen Plasmid-basierten Versuchsaufbau wurde die Rekombination zwischen einer *attB*- und der Wildtyp-*attP*-Sequenz, die beide auf einem Plasmid lokalisiert waren, untersucht. Durch Rekombination sollte die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase vermittelt werden, die als Maß für die Aktivität der Integrase detektiert wurde. Deutliche  $\beta$ -Galaktosidase-Signale konnten in A549 Alveolar-TypII-, BEAS-2B-Bronchialepithel-, HepG2-Hepatozyten-, HeLa-epithelialen-Cervixkarzinom-Zelllinien, als auch in primären humanen mesenchymalen Stammzellen gemessen werden. Zwischen den verschiedenen Zelltypen zeigten sich deutliche Unterschiede in den  $\beta$ -Galaktosidase-Werten. Allerdings wurde in Jurkat-Zellen nur geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und in ED-7R-, primären T-Lymphozyten oder humanen hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Stammzellen keinerlei  $\beta$ -Galaktosidase-Expression festgestellt. Um auch hier mögliche Detektionslimits oder zellspezifische Promotoraktivitäten, die zu verminderten  $\beta$ -Galaktosidase-Werten führen könnten, auszuschließen, wurden die Rekombinationsprodukte in den verschiedenen Zelltypen direkt mittels PCR visualisiert. Deutliche Rekombinations-spezifische Banden konnten für alle nicht-hämatopoetische Zellen detektiert werden, während für Jurkat-T-Zellen nur eine äußerst schwache

Bande detektiert wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch eine reduzierte Aktivität der Integrase in hämatopoetischen Zellen keine Langzeit-Transgenexpression beobachtet werden konnte.

In früheren Untersuchungen wurde bereits die Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase in der Lunge sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt (Aneja et al., 2007). Um die Diskrepanz zwischen verschiedenen Zelltypen im Detail zu untersuchen, wurde weiterhin ein systematischer Vergleich der Aktivität der Integrase in hämatopoetischen- und Lungenzellen durchgeführt. Dafür wurden Jurkat- und A549-Zellen als Modelle für das hämatopoetische System und die Lunge gewählt. Zusätzlich zu dem Integrase-Plasmid pCMV-Int wurde das kodonoptimierte pC31-Intopt Plasmid, das C-terminal das SV40 NLS trägt, untersucht. Wie bereits in vorherigen Untersuchungen, konnte nach Transfektion des pCMV-Int keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Jurkat-Zellen festgestellt werden. Allerdings konnte durch Verwendung des optimierten pC31-Intopt-Vektors geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität detektiert werden, auch wenn diese 45-fach geringer war, als in A549-Zellen. Interessanterweise wurde in A549-Zellen 72 Stunden nach Transfektion des pC31-Intopt Vektors gesteigerte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität festgestellt werden, während die Aktivität im Falle des pCMV-Int Plasmids abnahm. Dies kann sowohl mit der verlängerten Expression durch die Kodonoptimierung als auch mit dem Effekt des NLS im pC31-Intopt-Plasmids erklärt werden. Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase resultiert nur aus Rekombinationsprodukten, die im Zellkern lokalisiert und transkribiert werden, gibt aber keine Auskunft über die gesamte intrazelluläre Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase. Da Rekombination allerdings im Zellkern als auch im Zytoplasma möglich ist, wurden die gesamten intrazellulären Rekombinationsprodukte 24 und 72 Stunden nach Transfektion aus den Zellen isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Die größten Mengen an rekombinierter Plasmid-DNA wurden in A549-Zellen 24 Stunden nach Transfektion des pCMV-Int (100%) und pC31-Intopt (54%) ermittelt, wohingegen in Jurkat-Zellen sehr geringe Mengen von entsprechend einem Prozent und zwei Prozent detektiert wurden. Die geringere Menge an Rekombinationsprodukt im Falle des pC31-Intopt in A549-Zellen kann



durch das NLS in diesem Vektor erklärt werden. Durch das NLS wird die Aufnahme des Integraseenzyms in den Zellkern vermittelt. Da allerdings der Großteil der zu rekombinierenden Plasmid-DNA durch die Zellkernmembranbarriere im Zytoplasma verbleibt (siehe 3.8;(MacLaughlin et al., 1998), kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Enzym und Plasmid-DNA, so dass insgesamt intrazellulär weniger Rekombination stattfindet. Im Falle der Messung von  $\beta$ -Galaktosidase wurde dies nicht offensichtlich, da hierbei ausschließlich rekombinierte Plasmid-DNA, die im Kern lokalisiert ist, nach Transkription zu  $\beta$ -Galaktosidase-Expression führt, Rekombinationsprodukte im Zytoplasma allerdings keinen Einfluss auf die Expression haben.

Um die Gesamtaktivität der Integrase in Jurkat- und A549-Zellen bestimmen zu können, wurde zunächst die Integrase-Expression auf mRNA-Ebene nach Transfektion mittels qRT-PCR ermittelt. Hierbei konnte eine 5,4-fach und 1,7-fach erhöhte Expression nach Transfektion des pCMV-Int und des pC31-Intopt Vektors in A549-Zellen festgestellt werden. Bei der Berechnung der Gesamtaktivität der  $\phi$ C31 Integrase in den unterschiedlichen Zelltypen durch Division der Menge an Integrase-mRNA und der Menge an Rekombinationsprodukten ergab sich für A549-Zellen, verglichen mit Jurkat-Zellen, im Falle des pCMV-Int eine 17-fach und im Falle des pC31-Intopt eine 16-fach höhere Aktivität. Dies bestätigte die reduzierte Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase im hämatopoetischen System in unabhängigen Experimenten.

Die reduzierte Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen könnte möglicherweise durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen und damit der Inhibition begründet werden. Tatsächlich konnte kürzlich die Interaktion zwischen dem intrazellulären *Death-associated protein* DAXX und der  $\phi$ C31 Integrase gezeigt werden (Chen et al., 2006). DAXX wurde als Protein identifiziert, das mit der *death domain* des Fas-Rezeptors assoziiert ist und einer Rolle bei der Fas induzierten Apoptose spielt (Yang et al., 1997). Außerdem konnten bereits multiple Protein-Protein-Interaktionen von DAXX, unter anderem mit Pax 3

(Hollenbach et al., 1999), PML (Ishov et al., 1999), DNA Methyltransferase I (Michaelson et al., 1999) aber auch mit der Avian Sarkoma Integrase (Greger et al., 2005) festgestellt werden. Bei der Interaktion zwischen DAXX und der  $\phi$ C31 Integrase ist die Bindungsstelle der Integrase gleichzeitig für die Aktivität essentiell, so dass die Interaktion mit DAXX die Inhibition der Integrase zur Folge hat. Obwohl DAXX grundsätzlich ein ubiquitär vorkommendes Protein ist (Kiriakidou et al., 1997), konnte bisher nicht gezeigt werden, inwieweit unterschiedlich starke Expression in verschiedenen Geweben der Fall ist. Daher wurde die Expression von DAXX zunächst mittels Western-Blot-Analyse in hämatopoetischen Jurkat-Zellen und A549 Lungenzellen untersucht. Hierbei wurden intensivere DAXX-spezifische Banden in transfizierten Jurkat-Zellen, verglichen mit A549-Zellen, festgestellt. Da eine höhere DAXX-Konzentration in hämatopoetischen Zellen Grund für die reduzierte Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase sein könnte, wurde weiterhin DAXX auf mRNA-Ebene mittel qRT-PCR in Jurkat- und A549-Zellen quantifiziert. Tatsächlich konnten hier signifikant höhere DAXX-mRNA-Expression in Jurkats detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass die erhöhten DAXX-Werte in Jurkat-Zellen zur gesteigerten Inhibition der  $\phi$ C31 Integrase führten, was zur deutlichen Reduktion der Aktivität der Integrase in diesen Zellen führte.

## 5. Stabiler Gentransfer mittels episomaler Plasmid-DNA

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass langanhaltende Transgenexpression durch Integration von Plasmid-DNA mittels  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen relativ ineffizient erfolgt. Eine weitere nichtvirale, sichere Alternative zur stabilen Integration von Plasmid-DNA ergibt sich durch die Transfektion episomal (= extrachromosomal) replizierender Plasmid-DNA. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche DNA-Sequenzen die Replikation von Plasmid-DNA als Episom vermitteln (McWhinney and Leffak, 1990; Razin et al., 1994; Piechaczek et al., 1999). Insbesondere zur *Scaffold Matrix Attachment Region* am 5'-Ende des humanen  $\beta$ -Interferongens (huINF  $\beta$ -S/MAR) gibt es umfassende Untersuchungen, die vorwiegend mit dem pEPI-1 Vektor unternommen wurden. Dieser Vektor wird nach einer initialen Selektion der transfizierten Zellen mit G418 über hunderte Zellgenerationen episomal repliziert. Bisher liegen allerdings keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss der Selektionsdauer oder der G418-Konzentration vor. In den folgenden Untersuchungen wurde daher systematisch die Dauer des G418-Selektionsdruck sowie die Konzentration von G418 bezüglich des Einflusses auf den Expressionsverlauf untersucht. Der pEPI-1 Vektor umfasst neben der huINF  $\beta$ -S/MAR des Reportergens EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors. Bisher gibt es keine Untersuchungen, inwieweit alternative Promotoren in Kombination mit der huINF  $\beta$ -S/MAR eine Verbesserung bezüglich der Notwendigkeit des Selektionsdrucks oder der Genexpression bewirken könnten. Die besondere Bedeutung von Promotoren und deren Einfluss auf die Transgenexpression konnte kürzlich in einer Arbeit von Riu et al. (Riu et al., 2007) gezeigt werden. Hierbei wurde in einem Vergleich zwischen Plasmid-DNA-Konstrukten, die jeweils den Rous Sarkoma Virus (RSV)-, den Elongation Factor 1 $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) oder den Ubiquitin C (UbC)-Promotor enthielten, und deren jeweilig entsprechenden Minicircles angestellt. Transgen-*silencing* wurde in den Plasmid-DNA Konstrukten mit dem RSV-Promotor und dem EF1- $\alpha$ -Promotor sieben Tage nach *in vivo* Transfektion der Leber im Mausmodell beobachtet. Dagegen konnte in allen Minicircle-Konstrukten eine stabile

Transgenexpression über mehrere Wochen festgestellt werden. Interessanterweise ergab sich für Plasmid-DNA, die den UbC-Promotor enthielt, ebenfalls stabile Transgenexpression, die vergleichbar mit dem entsprechenden UbC-Minircle war. Weitere Untersuchungen ergaben für UbC-Promotor-enthaltende Plasmid-DNA und für die entsprechende Minicircle-DNA die Assoziation der mit Histonmodifikationen des Euchromatins. Dagegen war die RSV- und EF1- $\alpha$  - Promotor enthaltende Plasmid-DNA mit Histonen des Heterochromatins assoziiert, was typischerweise zum *Silencing* der Expression führt. In den Untersuchungen zur Promotoraktivität von Riu et al. wurde die Expression in Hepatozyten mit einer relativ langsamen Teilungsrate *in vivo* untersucht. Dies gibt allerdings noch keine Auskunft, inwieweit Minicircle-DNA und UbC-Promotor enthaltende Plasmide auch nach mehreren Zellteilungen weiterhin vorhanden sind und Expression zeigen. Die Herstellung von Minicircle-DNA ist aufwendig und in großen Maßstab bisher kaum möglich. Daher ist die Entwicklung üblicher Plasmid-DNA, mit der stabile Transgenexpression in teilungsaktiven Zellen erreicht werden kann, von sehr großem Interesse, um effektive nichtvirale gentherapeutische Ansätze beispielsweise für hämatopoetische Stammzellen zu entwickeln. Im Folgenden wurde eine Kombination des UbC-Promotors mit der huINF  $\beta$ -S/MAR in einem Plasmid-DNA-Konstrukt bezüglich Transgenexpression und episomalem Status *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dies wurde mit dem Hintergrund durchgeführt, eine Histon-Assoziation im Euchromatin und damit stabile Transgenexpression durch den UbC-Promotor und die zusätzliche episomale Replikation des Plasmids durch die S/MAR zu erreichen. Neben dem UbC-Promotor wurde in diesem Zusammenhang weiterhin der Ubiquitin B-Promotor als eine mögliche effektive Alternative untersucht. Für die *in vitro* Untersuchungen wurde die hämatopoetische Jurkat T-Zelllinie verwendet. Um die jeweiligen Konstrukte *in vivo* zu untersuchen, wurde die Lunge als auch das Nasenepithel als Zielorgane gewählt. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch relativ einfache Applikation der Genvektoren und Messung der Transgenaktivität über mehrere Wochen die Effektivität der Konstrukte *in vivo* zu ermitteln. Gleichzeitig konnten dabei neue Ansätze für die stabile

gentherapeutische Behandlung von Lungenerkrankungen, wie beispielsweise Zystische Fibrose, entwickelt werden.

## 5.1 Evaluierung der optimalen Bedingungen für die Langzeit-Transgenexpression von pEPI1-Luc

Die bisherigen Untersuchungen zu episomal replizierenden Vektoren wurden größtenteils mit dem Prototyp pEPI-1 (pEPIeGFP) durchgeführt. Da die Detektion der EGFP-Expression bei niedriger Expression wegen der relativ geringen Sensitivität der Messmethoden problematisch ist, wurde im Folgenden der Vektor pEPI1-Luc verwendet. Die Messung der Luciferase-Aktivität ist deutlich sensitiver und auch bei geringer Expression gut messbar. Die Untersuchungen wurden an Jurkat-Zellen durchgeführt. Bei erfolgreicher Langzeitexpression kann Transgen-*silencing* ausgeschlossen werden. Wegen der schnellen Teilungsrate dieser Zellen kann im Falle von Langzeitexpression weiterhin die normalerweise stattfindende "Ausverdünnung" des Plasmids ausgeschlossen werden. Für den effizienten Gentransfer in Jurkat-Zellen wurde in den folgenden Untersuchungen Nucleofection als Transfektionsmethode verwendet.

### 5.1.1 Selektionsdauer nach Transfektion von pEPI1-Luc

Zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlich langer Selektionszeiten der transfizierten Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen mit  $5 \mu\text{g}$  pEPI1-Luc transfiziert. Nach 24 Stunden wurde G418 in einer Konzentration von  $500 \mu\text{g/ml}$  Medium zu den Zellen gegeben. Der G418-Selektionsdruck wurde entweder nach drei, sechs oder vierzehn Tagen von den Zellen genommen und die Zellen wurden mit G418-freiem Medium weiter kultiviert. In einem Kontrollexperiment wurde gänzlich auf die Selektion der Zellen mit G418 verzichtet. Unabhängig vom Selektionsdruck sank die Luciferaseexpression zunächst bis vierzehn Tage nach Transfektion auf unter ein Prozent der initialen Expression ab (Abbildung 5.1).

Abbildung 5.1

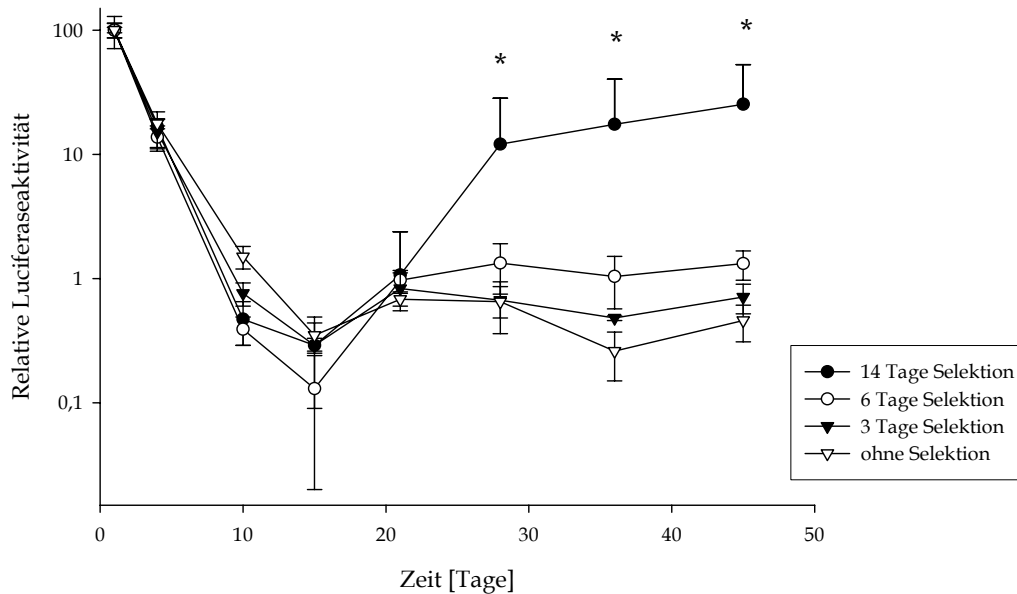


Abbildung 5.1 Langzeitexpression von pEPI1-Luc mit unterschiedlichen Selektionsdauern. Jurkat-Zellen wurden mit 5  $\mu$ g pEPI1-Luc mittels Nucleofektion transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen jeweils mit 500  $\mu$ g G418/ml Medium für die Dauer von entweder 14, 6 oder 3 Tagen selektiert. In der Kontrolle wurde kein Selektionsdruck angewendet. Ausschließlich ein Selektionsdruck von 14 Tagen vermittelte signifikant höhere Langzeitexpression verglichen zur Kontrolle ohne Selektion.

Nach Entfernen des Selektionsdruckes nach drei oder sechs Tagen blieb die relative Luciferaseexpression auf diesem Level und stieg im Laufe der Untersuchung nicht signifikant über die Expressionswerte der Kontrolle ohne Selektion von circa ein Prozent der initialen Werte hinaus. Wurden die Zellen dagegen für vierzehn Tage der Selektion mit G418 unterzogen, so stieg die Luciferaseexpression deutlich auf Werte von mehr als 25 Prozent der ursprünglichen Expression an. Der Anstieg korrelierte in diesem Fall exakt mit dem Wegfallen des Selektionsdrucks nach vierzehn Tagen. Weiterhin war nach dem initialen vierzehn-tägigen Selektionsdruck keinerlei weitere Selektion mehr nötig, um die Zellen auf dem hohen Expressionsniveau zu halten.

## 5.1.2 Konzentration von G418 nach Transfektion von pEPI1-Luc

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde der Einfluss der Konzentration von G418 zur Optimierung der Langzeitexpression des pEPI1-Luc-Vektors ermittelt.  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden dazu mit  $5 \mu\text{g}$  pEPI1-Luc transfiziert und für die ermittelte optimale Dauer von vierzehn Tagen entweder mit  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  oder  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  G418 kultiviert. Als Kontrolle wurden auch hier transfizierte Zellen ohne Selektionsdruck belassen. Die Messung der Luciferaseaktivität über mehr als 50 Tage ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen, die mit  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  und  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  G418 kultiviert wurden (Abbildung 5.2).

Abbildung 5.2

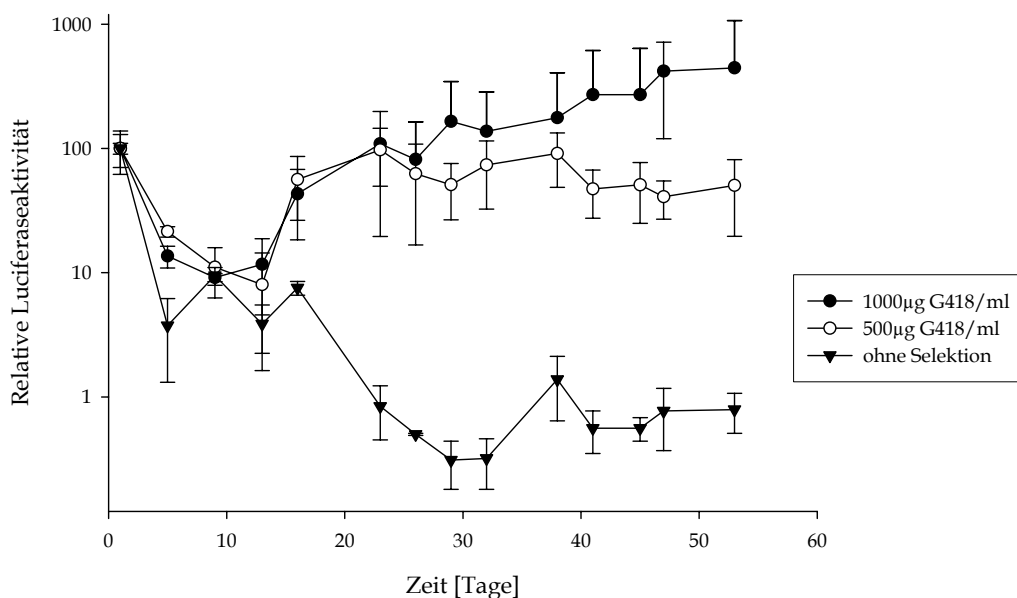


Abbildung 5.2 Langzeitexpression von pEPI1-Luc mit unterschiedlichen Konzentrationen an G418.

Jurkat-Zellen wurden mit  $5 \mu\text{g}$  pEPI1-Luc mittels Nucleofektion transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen jeweils mit  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  oder  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  G418 für die Dauer von 14 Tagen selektioniert. In der Kontrolle wurde kein Selektionsdruck angewendet. Zwischen  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  und  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  G418 ergab sich bezüglich Luciferaseaktivität kein signifikanter Unterschied.

### 5.1.3. Transgenexpression nach *in vivo* Applikation von pEPI1-Luc

Um zu untersuchen, inwieweit mit dem Vektor pEPI1-Luc langanhaltende Transgenexpression *in vivo* erreicht werden kann, wurden pEPI1-Luc im Mausmodell appliziert. Mittels systemischer Applikation über die Schwanzvene wurden die Lungen mit Komplexen aus Polyethylenimin und pEPI1-Luc transfiziert. Hierzu wurde lineares 22 kDa PEI und Plasmid-DNA in einem N/P Verhältnis von 10 in 5%-iger Glucose gemischt und zur Bildung der Komplexe 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µg komplexierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 400 µl in die Schwanzvene von acht Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen injiziert. 24 Stunden und acht Tage nach Injektion wurden die jeweils Tiere anästhesiert und eine Dosis von 3 mg Luciferin-Substrat intraperitoneal (i.p.) injiziert. 10 Minuten nach Injektion des Luciferins wurde die Biolumineszenz als Maß für die *in vivo* Luciferaseaktivität mittels IVIS 100 imaging system (Xenogen, USA) bestimmt (Abbildung 5.3). Während 24 Stunden nach Applikation von pEPI1-Luc deutliche Luciferaseaktivität gemessen wurde, konnte bereits zum Zeitpunkt Tag acht nach Transfektion keine Transgenexpression mehr detektiert werden.

Abbildung 5.3

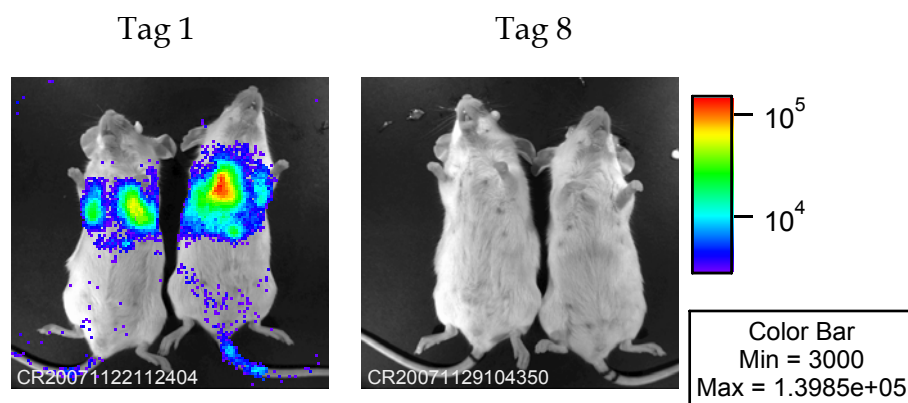


Abbildung 5.3 Detektion der *in vivo* Luciferaseaktivität in der Lunge  
Weibliche BALB/c-Mäuse wurden jeweils mit Komplexen aus l-PEI und pEPI1-Luc behandelt. Dafür wurden die Komplexe in einem Volumen von 400 µl 5%-iger Glucose in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. 24 h und acht Tage nach Injektion wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 imaging system bestimmt. Zum Zeitpunkt acht Tage nach Applikation konnte keine Luciferaseaktivität mehr detektiert werden.



## 5.2 Stabile Transgenexpression *in vitro* durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren

Um stabilen Gentransfer mit und insbesondere ohne die Verwendung von Selektionsdruck zu erreichen und zu vergleichen, wurden unterschiedliche Luciferase-enthaltende Plasmid-DNA Konstrukte kloniert und zunächst *in vitro* getestet. Für die Evaluierung des am besten geeigneten Konstrukts wurden Jurkat-Zellen mittels Nucleofection mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und die Reporterexpression über mehrere Wochen ermittelt. Die hierfür verwendeten Plasmide enthielten jeweils das Luciferase Reportergen unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren. Hierbei sollte der Einfluss der jeweiligen Promotoren auf die Dauer der Expression ermittelt werden. In einem weiteren Schritt wurde zur Verbesserung der stabilen Transgenexpression durch episomale Replikation der Plasmid-DNA jeweils der zusätzliche Einfluss der S/MAR untersucht. Hierzu wurden jeweils Konstrukte verwendet, in denen zwischen Transgen und polyA-Schwanz die huINF  $\beta$ -S/MAR kloniert wurde. Diese wurde mit den ursprünglichen Plasmiden ohne S/MAR-Element verglichen. Wie unter 5.1 gezeigt, vermittelte der CMV-Promotor in Kombination mit der huINF  $\beta$ -S/MAR nur unter mehrwöchiger Anwendung von Selektionsdruck mit G418 stabile Transgenexpression. Daher wurden im Folgenden das Potential des Ubiquitin B- und des Ubiquitin C-Promotors evaluiert, jeweils stabile Transgenexpression auch ohne Selektion zu vermitteln.

### 5.2.1 Stabile Transgenexpression durch Verwendung des Ubiquitin B-Promotors

Die in dieser Versuchsanordnung verwendeten Konstrukte pCUBIBLuc und pEPICUBIBLuc (schematische Darstellung unter 2.4.4) enthielten als Promotor-Elemente eine Kombination von CMV-*enhancer*, Ubiquitin B-Promotor und Ubiquitin-Intron in der angegebenen Reihenfolge mit einer Gesamtgröße von 1,4 kb. Die Verwendung von CMV-*enhancer* und Intron-Elementen führt zu einer

deutlich erhöhten Expression (Yew et al., 2002) und ist daher bei der Verwendung des relativ schwachen Ubiquitin B Promotors von Bedeutung.

Mittels Nucleofection wurden  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen jeweils mit  $5 \mu\text{g}$  pCUBIBLuc oder pEPICUBIBLuc transfiziert. Die Luciferase-Expression wurde über mehrere Wochen verfolgt, wobei sich für pEPICUBIBLuc verglichen mit pCUBIBLuc signifikant höhere Expressionslevel ergaben (Abbildung 5.4).

Abbildung 5.4

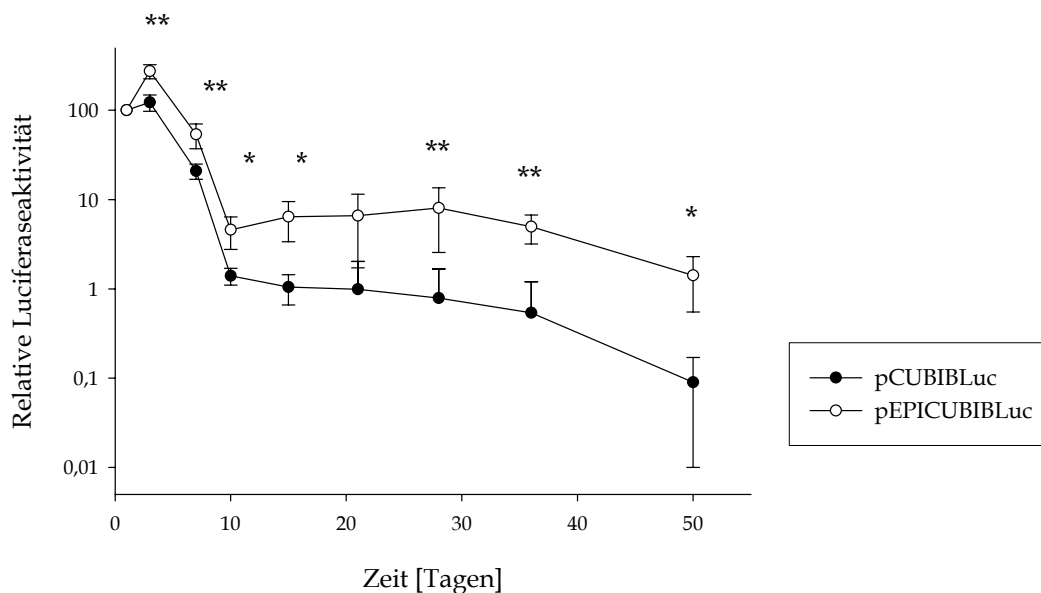


Abbildung 5.4 Langzeitexpression von pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc. Jurkat-Zellen wurden mit jeweils  $5 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mittels Nucleofection transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurden die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Hierbei ergaben sich signifikant höhere Luciferase-Expressionslevel für pEPICUBIBLuc verglichen mit pCUBIBLuc (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$ ).

Die Luciferase-Expression nach Transfektion von pCUBIBLuc sank innerhalb von 14 Tagen auf unter ein Prozent der initialen Expression, während durch die Verwendung des S/MAR enthaltenden pEPICUBIBLuc eine Expression von circa sieben Prozent über mehr als sieben Wochen ohne die Anwendung von Selektionsdruck erreicht werden konnte. Da als Transfektionsmethode Nucleofection, eine an die Zellen angelegte kurze, gepulste, hohe Spannung zur

Einschleusung der DNA in den Kern, verwendet wurde, kann auch teilweise Integration von DNA ins Genom der Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Durch die Isolierung von niedermolekularer Plasmid-DNA kann allerdings eine Detektion mittels PCR von ausschließlich episomaler Plasmid-DNA erreicht werden. Daher wurde an Tag 72 nach Transfektion aus jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen Plasmid-DNA isoliert und mittels PCR das Vorhandensein von episomalen Vektoren überprüft. Für die PCR wurden Luciferase-spezifische Primer verwendet, die im Falle von episomaler Plasmid-DNA zu einer Bande von 200 bp führt. Während für pCUBIBLuc keine Bande detektiert werden konnte, ergab sich eine deutliche spezifische Bande für pEPICUBIBLuc (Abbildung 5.5).

Abbildung 5.5

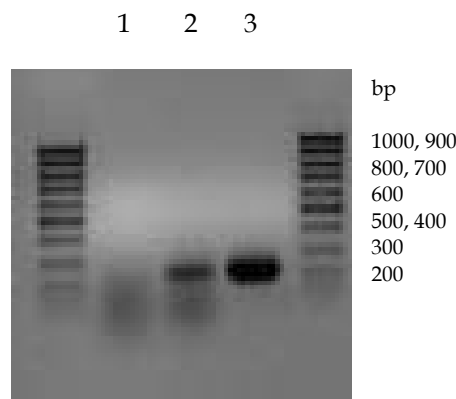


Abbildung 5.5 Detektion von episomaler Plasmid-DNA mittels PCR. Plasmid-DNA wurde 72 Tage nach Transfektion von Jurkat-Zellen mit pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc isoliert. Mittels PCR wurde anschließend vorhandene episomale Plasmid-DNA detektiert. Eine spezifische Bande von 200 bp ergab sich ausschließlich für pEPICUBIBLuc (Spur 2), während für pCUBIBLuc keine Bande detektiert werden konnte (Spur 1). Spur 3 zeigt die entsprechende Positivkontrolle.

Zum Zeitpunkt 72 Tage nach Transfektion war im Falle von pEPICUBIBLuc noch episomale Plasmid-DNA in den Zellen vorhanden, während für pCUBIBLuc keine episomale Plasmid-DNA nachweisbar war.

Um die Anwendbarkeit der Vektoren zum stabilen Gentransfer in Zellen mit geringen Teilungsraten und *in vivo* zu untersuchen, wurden die Plasmide

pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc im Mausmodell appliziert. Wie bereits unter 5.1.3 beschrieben wurden jeweils die Lungen mit Komplexen aus 22 kDa Polyethylenimin und Plasmid-DNA mittels systemischer Applikation über die Schwanzvene transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Biolumineszenz als Maß für die *in vivo* Luciferaseaktivität mittels IVIS 100 imaging system (Xenogen, USA) bestimmt (Abbildung 5.6).

Abbildung 5.6

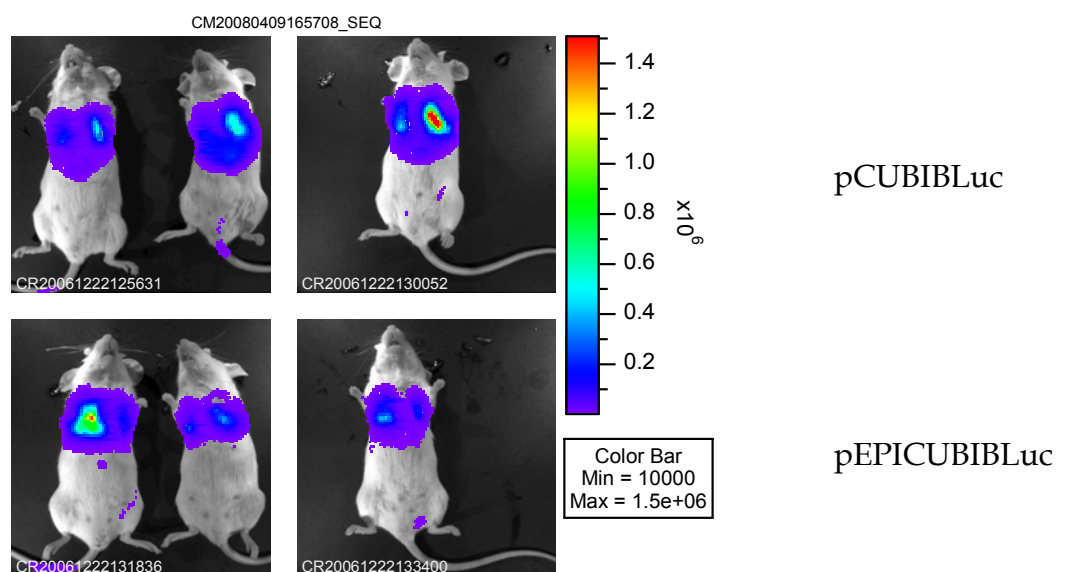


Abbildung 5.6 Detektion der *in vivo* Luciferaseaktivität in der Lunge

Weibliche BALB/c-Mäuse wurden jeweils mit Komplexen aus l-PEI und pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc behandelt. Dafür wurden die Komplexe in einem Volumen von 400  $\mu$ l 5%-iger Glucose in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. 24 h nach Injektion wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 imaging system bestimmt. Sowohl mit pEPICUBIBLuc als auch mit pCUBIBLuc konnte die Lunge der Mäuse effizient transfiziert werden.

Die Applikation von pEPICUBIBLuc als auch pCUBIBLuc führte zur effizienten Transfektion der Mauslungen. Interessanterweise konnte nach Injektion der Plasmid-DNA Partikel ebenfalls Luciferaseexpression in der Leber festgestellt werden. Die Transgenexpression in der Leber war zwar deutlich geringer, konnte aber durch eine veränderte Darstellung bei der Auswertung teilweise sichtbar gemacht werden (Abbildung 5.7).

Abbildung 5.7

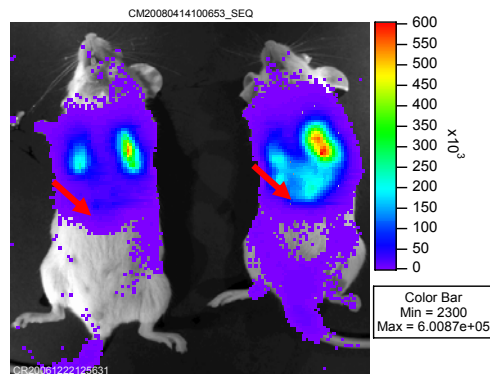


Abbildung 5.7 Detektion der *in vivo* Luciferaseaktivität in Leber und Lunge. Durch eine sensitivere Darstellung der Biolumineszenz konnte eine deutliche Luciferase-Expression in der Leber festgestellt werden. Die Expression in der Leber war zum Zeitpunkt 24 h nach Injektion der Komplexe deutlich geringer als die in der Lunge. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Transgenexpression in Lunge und Leber von Mäusen, die mit pCUBIBLuc behandelt wurden.

Nach Bestimmung der Luciferaseexpression wurden die Mäuse durch i.p. Injektion der entsprechenden Antagonisten die Narkose ausgeleitet. Durch dieses bildgebende *in vivo*-Verfahren, bei dem die Tiere zur Messung der Transgenexpression nicht getötet werden müssen, ist es möglich, die Entwicklung der Transgenexpression in den einzelnen Mäusen über lange Zeit zu verfolgen. Daher wurde die Transgenexpression der Mäuse durch regelmäßige Messung der Luciferaseaktivität in Lunge und Leber über sechs Monate verfolgt. Ausgehend von hohen absoluten Werten von circa  $6 \times 10^6$  Photonen/ Sekunde kam es hierbei zunächst innerhalb von 15 Tagen zu einem dramatischen Abfall der Luciferaseexpression in der Lunge auf weniger als 0,01 Prozent der initialen Expression (Abbildung 5.8). Im weiteren Verlauf stabilisierte sich die Transgenexpression in der Lunge auf ein relatives Expressionslevel von circa 0,1 Prozent bis 49 Tage nach Transfektion. Danach konnte nur noch zum Zeitpunkt 110 Tage nach Transfektion Transgenexpression in jeweils zwei von vier Mäusen der beiden Gruppen pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc detektiert werden.

Abbildung 5.8

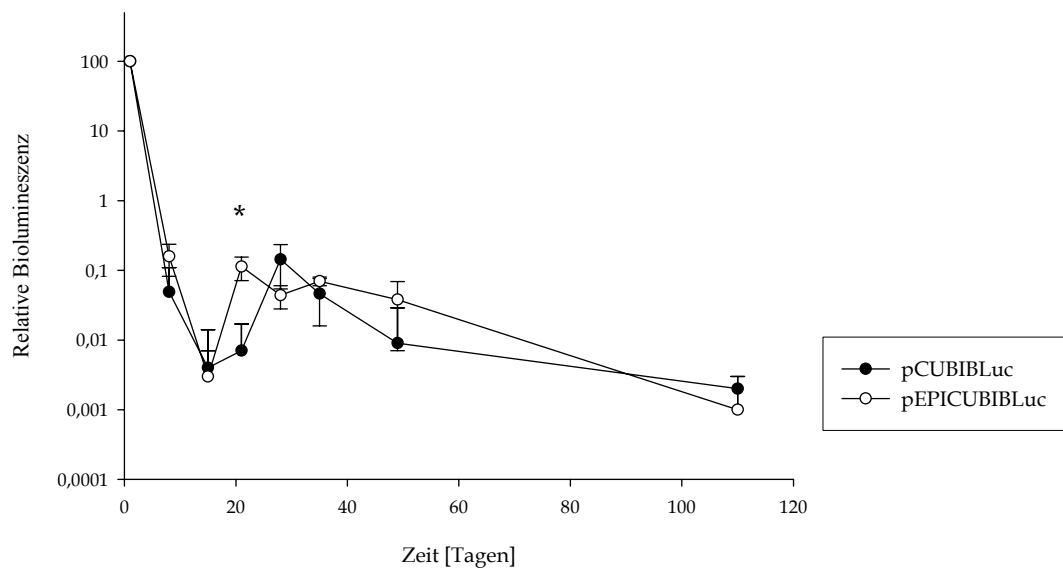


Abbildung 5.8 Verlauf der *in vivo* Luciferase-Expression in der **Lunge**.

Die Biolumineszenz in der Lunge der Mäuse als Mass für die Luciferaseexpression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität bis Tag 49 nach Transfektion mit einer signifikanten unterschiedlichen Expression zum Zeitpunkt Tag 21 (\*  $p \leq 0.05$ ). 110 Tage nach Transfektion konnte lediglich in jeweils 2 von 4 Mäusen eine sehr schwache Luciferaseaktivität festgestellt werden. Messungen nach Tag 110 dagegen ergaben keine messbare Luciferaseaktivität.

Die Messung der Luciferase-Expression in der Leber ergab einen ähnlichen Verlauf wie die Expression in der Lunge (Abbildung 5.9). Allerdings waren hier die initialen Expressionswerte niedriger als in der Lunge. Außerdem war der Abfall der Luciferaseaktivität entsprechend geringer. So blieben die Werte bis Tag 49 im Falle von pEPICUBIBLuc und bis Tag 35 im Falle von pCUBIBLuc stabil bei sechs bis vier Prozent der initialen Expression. Wie bereits in der Lunge beobachtet, konnten zum Zeitpunkt 110 Tage nach Transfektion in beiden Gruppen lediglich Luciferaseaktivität in zwei von vier Tieren detektiert werden. Nach Tag 110 konnte keinerlei *in vivo* Transgenexpression mehr beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt konnte hier allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Abbildung 5.9

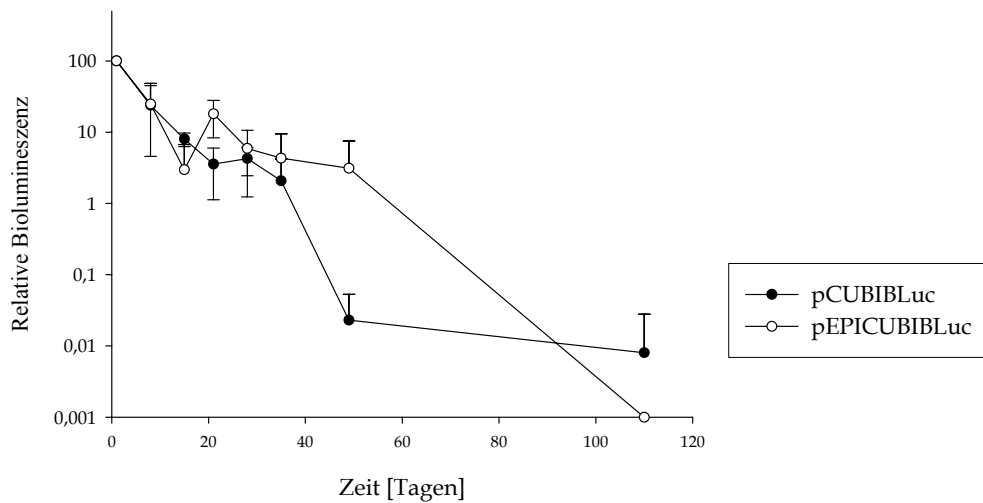


Abbildung 5.9 Verlauf der *in vivo* Luciferase-Expression in der **Leber**.

Die Biolumineszenz in der Leber der Mäuse als Maß für die Luciferase-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität bis Tag 49 nach Transfektion für pEPICUBIBLuc und bis Tag 35 nach Transfektion für pCUBIBLuc. 110 Tage nach Transfektion konnte lediglich in jeweils 2 von 4 Mäusen eine sehr schwache Luciferaseaktivität festgestellt werden. Messungen nach Tag 110 dagegen ergaben keine messbare Luciferaseaktivität mehr.

Da die Messungen der Luciferase-Expression *in vivo* deutlich weniger sensitiv ist als die Bestimmung der Luciferaseaktivität von isoliertem Gewebe *in vitro*, wurden die Mäuse sechs Monate nach Transfektion getötet und sowohl Lungen - als auch Lebergewebe isoliert und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die tiefgefrorenen Gewebe wurden vor Bestimmung der Luciferaseaktivität jeweils homogenisiert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität von circa 140 mg Lunge oder Leber mittels Luminometer Lumat LB9507 (EG&C Berthold AG, Deutschland) vermessen und auf das eingesetzte Gewicht normalisiert. Interessanterweise konnte Luciferaseaktivität in den Lungen aller 4 Mäuse, die mit pEPICUBIBLuc transfiziert wurden, detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nur in der Lunge einer Maus aus der pCUBIBLuc Gruppe noch Luciferase-Expression (Abbildung 5.10). Die *in vitro*-Detektion der Transgenexpression im Lebergewebe ergab Luciferaseaktivität in

allen untersuchten Mäusen (Abbildung 5.11). Die Expression ist hier im Mittel in der Gruppe pEPICUBIBLuc 10-fach höher als in der pCUBIBLuc-Gruppe. Dieser Unterschied ist allerdings durch die große Streuung der Werte nicht signifikant.

Abbildung 5.10

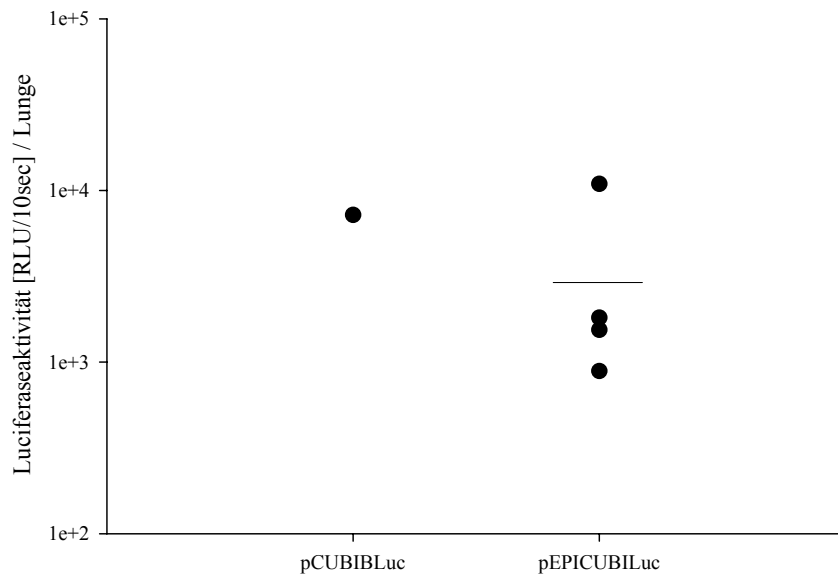


Abbildung 5.10 *In vitro* Bestimmung der Luciferaseexpression der **Lunge** 6 Monate nach Transfektion.

Die Luciferaseaktivität in isoliertem Lungengewebe wurde 6 Monate nach Applikation von entweder pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität für alle 4 Mäuse aus der pEPICUBIBLuc-Gruppe. Dagegen konnte Luciferaseexpression nur noch in der Lunge einer Maus, die mit pCUBIBLuc transfiziert wurde, nachgewiesen werden.



Abbildung 5.11

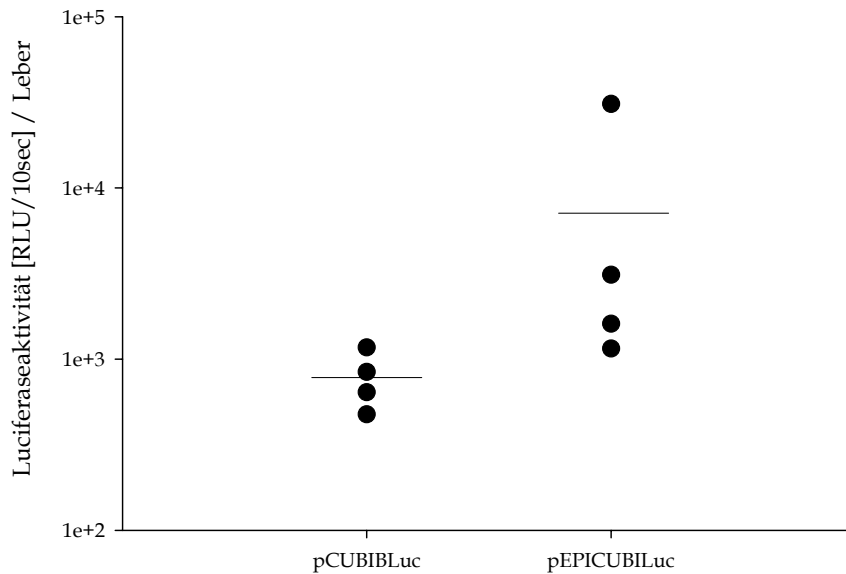


Abbildung 5.11 *In vitro* Bestimmung der Luciferaseexpression der **Leber** 6 Monate nach Transfektion.

Die Luciferaseaktivität in der isolierten Leber wurde 6 Monate nach Applikation von entweder pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität für jeweils alle 4 Mäuse aus beiden Gruppen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob die applizierte Plasmid-DNA ins Genom integriert wurde oder sechs Monate nach Transfektion noch als episomale Plasmid-DNA vorlag, wurde aus dem Lungen- und Lebergewebe der Mäuse Gesamt-DNA isoliert. Diese konnte sowohl genomische als auch Plasmid-DNA enthalten. Die jeweils enthaltene genomische DNA wurde durch einen spezifischen, enzymatischen Verdau von linearer DNA mittels „Plasmid-Safe ATP-abhängigen DNase“ degradiert. Verbleibende Plasmid-DNA wurde mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt, konzentriert und jeweils gleiche Volumen an Plasmid-DNA als Matrize zur Amplifikation mittels PCR verwendet. Durch die Verwendung Luciferase-spezifischer Primer ist es so möglich, sehr kleine Mengen vorhandener Plasmid-DNA zu detektieren. Sowohl in den Mäusen, die mit pEPICUBIBLuc, als auch in denjenigen, die mit pCUBIBLuc behandelt wurden, konnte so Plasmid-DNA im Lungengewebe nachgewiesen werden (Abbildung 5.12).

Abbildung 5.12

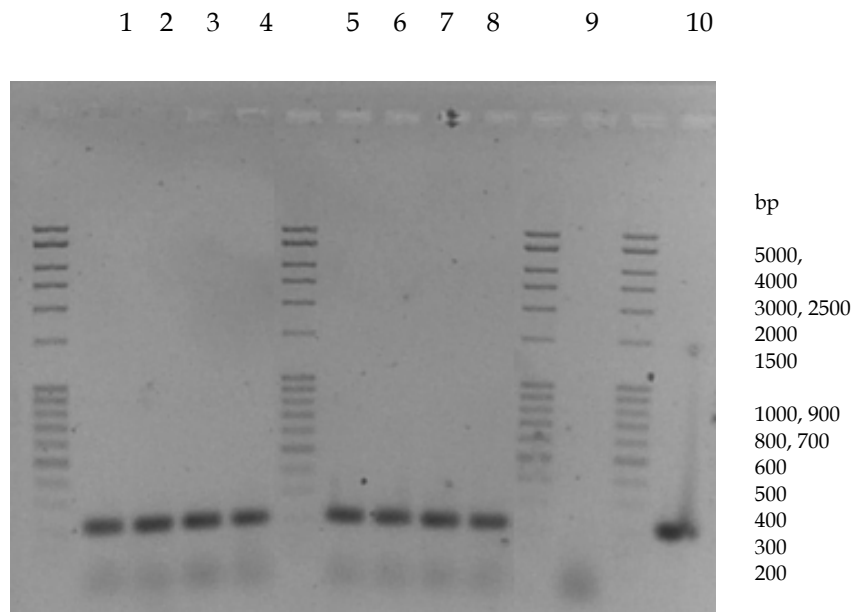


Abbildung 5.12 Detektion episomaler Plasmid-DNA in der Mauslunge mittels PCR. Gesamt-DNA wurde 6 Monate nach Transfektion mit pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc aus Lungengewebe isoliert. Mittels selektivem Verdau von linearer, genomischer DNA wurde episomal vorhandene Plasmid-DNA isoliert und anschließend aufgereinigt. Die Detektion episomaler Plasmid-DNA erfolgte durch Amplifikation mittels PCR. Spezifische Banden von 200 bp ergaben sich für alle Mäuse aus beiden Gruppen, pCUBIBLuc (Spur 1-4) und pEPICUBIBLuc (Spur 5-8). Spuren 9 und 10 repräsentieren jeweils Negativ- und Positivkontrolle.

Um zu untersuchen, inwieweit unterschiedliche Mengen an pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc in der Lunge der Mäuse vorhanden waren, wurde die Plasmid-DNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Dabei konnte 1,8-fach mehr pCUBIBLuc Plasmid-DNA detektiert werden als pEPICUBIBLuc Plasmid-DNA. Hierbei sind allerdings die unterschiedlichen Größen der beiden Konstrukte (pCUBIBLuc: 5,0 kb; pEPICUBIBLuc: 7,2 kb) und die jeweils gleiche applizierte Plasmid-DNA Dosis von 50µg noch nicht berücksichtigt, durch die sich unterschiedlich applizierte molare Mengen an Plasmid-DNA ergeben. Unter Berücksichtigung dieser Umstände ergibt sich ein Verhältnis zwischen pEPICUBIBLuc zu pCUBIBLuc von 1: 1,25 an detektierter Plasmid-DNA nach sechs Monaten.

Die Untersuchung des Lebergewebes ergab vorhandene episomale Plasmid-DNA in zwei Mäusen aus der Gruppe pEPICUBIBLuc (Abbildung 5.13). In zwei weiteren Mäusen, die mit pEPICUBIBLuc behandelt wurden, konnten nur sehr schwache Banden detektiert werden. Dies weist auf eine äußerst geringe Menge an Plasmid-DNA in der Leber hin. Dagegen konnte in der Gruppe pCUBIBLuc keinerlei verbleibende Plasmid-DNA detektiert werden.

Abbildung 5.13

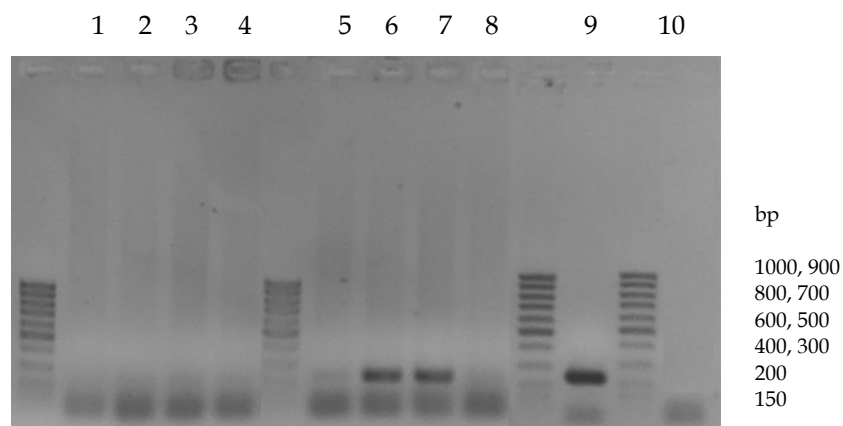


Abbildung 5.13 Detektion episomaler Plasmid-DNA in der Mausleber mittels PCR. Gesamt-DNA wurde 6 Monate nach Transfektion mit pEPICUBIBLuc oder pCUBIBLuc aus den Mauslebern isoliert. Mittels selektivem Verdau linearer, genomischer DNA wurde episomal vorhandene Plasmid-DNA isoliert und anschließend aufgereinigt. Die Detektion episomaler Plasmid-DNA erfolgte durch Amplifikation mittels PCR. Spezifische Banden von 200 bp konnte in 2 Mäusen aus der Gruppe pEPICUBIBLuc (Spur 6+7) eindeutig detektiert werden. In zwei weiteren mit pEPICUBIBLuc behandelten Mäusen konnten nur sehr schwache spezifische Banden festgestellt werden (Spur 5+8). In keiner der mit pCUBIBLuc behandelten Mäuse war episomale Plasmid-DNA in der Leber detektierbar (Spur 1-4). Spuren 9 und 10 repräsentieren jeweils die Positiv- und Negativkontrolle.

## 5.2.2 Stabile Transgenexpression durch Verwendung des Ubiquitin C-Promotors

Die in den folgenden Untersuchungen verwendeten Konstrukte pEPIUbCLuc und pUbCLuc sind schematisch unter 2.4.4 dargestellt. Beide enthalten das Luciferasegen unter der Kontrolle des Ubiquitin C-Promotors ohne weitere transkriptionsverstärkende Elemente. Weiterhin besitzen beide Plasmide die Gene

für den Resistenzmarker Neomycin, sodass hier die Selektion transfizierter Säugerzellen mit G418 *in vitro* möglich ist.

In einer ersten Untersuchung wurden äquimolare Mengen an pEPIUbCLuc oder pUbCLuc mittels Nucleofection in jeweils  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen transfiziert. Dafür wurden jeweils 5,0  $\mu\text{g}$  pEPIUbCLuc und entsprechend 3,8  $\mu\text{g}$  pUbCLuc verwendet. 24 Stunden nach Transfektion wurde zur Selektion von transfizierten Zellen G418 in einer Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dem Medium zugegeben. Der Selektionsdruck wurde über 14 Tage aufrechterhalten und die Zellen wurden anschließend in G418-freiem Medium weiterkultiviert. Die Luciferaseexpression wurde über einen Zeitraum von 60 Tagen verfolgt (Abbildung 5.14).

Abbildung 5.14

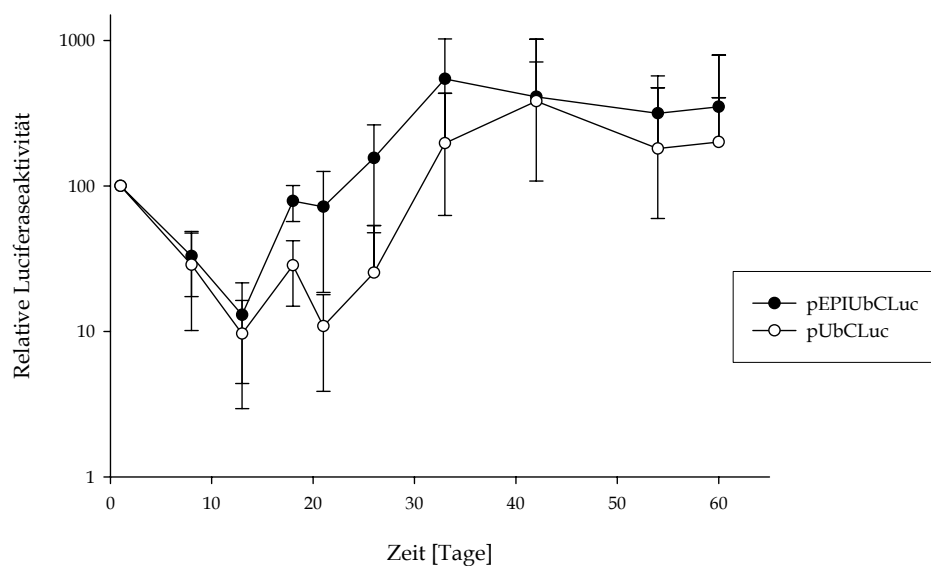


Abbildung 5.14 Langzeitexpression von pEPIUbCLuc und pUbCLuc mit Anwendung von initialem Selektionsdruck.

Die Transfektion von jeweils äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (entspr. 5 $\mu\text{g}$  pEPIUbCLuc) wurde mittels Nucleofection an  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurden die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Luciferase-Expression der beiden Konstrukte. Die Expression stieg nach Absetzen des Selektionsdruckes in beiden Gruppen deutlich über die initialen Expressionslevel.

Wie bereits nach Transfektion von pEPI1-Luc mit anschließender Selektion beobachtet, sank auch bei den Vektoren pEPIUbCLuc und pUbCLuc die Luciferase-Expression zunächst während der Dauer des Selektionsdruckes von 14 Tagen ab. Danach kam es allerdings zu einem sehr starken Anstieg der Transgenexpression. Die Luciferaseaktivität des pEPIUbCLuc stieg auf den 5,5-fachen Wert verglichen mit der initialen Expression an Tag 1 nach Transfektion an, während die Expression von pUbCLuc auf den 4-fachen Wert anstieg. Dieser Unterschied war allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant. Insgesamt konnten beide Konstrukte durch die Anwendung initialen Selektionsdrucks stabile Transgenexpression auf sehr hohem Niveau vermitteln.

Um das Potential der beiden Plasmide zu testen, auch ohne Selektionsdruck stabile Transgenexpression zu vermitteln, wurden analoge Experimente ohne die Zugabe von G418 durchgeführt. Hierbei wurde die Luciferaseaktivität ebenfalls über einen Zeitraum mehr als 60 Tagen untersucht (Abbildung 5.15).

Abbildung 5.15

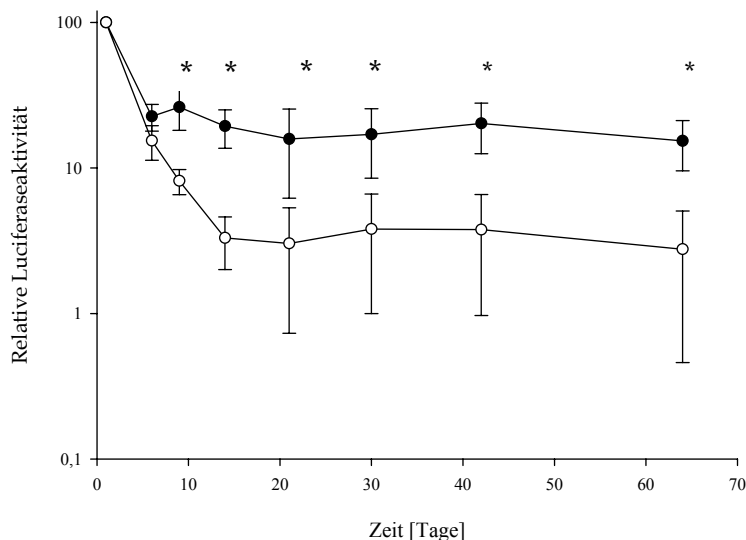


Abbildung 5.15 Langzeitexpression von pEPIUbCLuc und pUbCLuc ohne Selektionsdruck. Die Transfektion von jeweils äquimolaren Mengen an Plasmid-DNA (entspr. 5  $\mu\text{g}$  pEPIUbCLuc) wurde mittels Nucleofektion an  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion wurden die Luciferaseaktivität der Zellen bestimmt. Hierbei ergaben sich signifikant höhere Luciferase-Expression für pEPIUbCLuc verglichen mit pUbCLuc.

Für beide Konstrukte konnte auch ohne die Anwendung initialen Selektionsdrucks stabile Transgenexpression beobachtet werden. Allerdings konnte durch Transfektion des S/MAR-haltigen Konstrukts pEPIUbCLuc relative Luciferaseaktivität von circa 20 Prozent erreicht werden, während die durch pUbCLuc vermittelte Expression lediglich auf einem Level von circa drei Prozent verblieb. Dieser Unterschied war ab Tag neun nach Transfektion zu jedem Zeitpunkt signifikant. Insgesamt konnten beide Konstrukte langanhaltende Transgenexpression über mehr als 60 Tage vermitteln.

Um auch hier den Status der applizierten Plasmid-DNA zu untersuchen, wurde zu den Zeitpunkten 8, 28 und 45 Tagen nach Transfektion niedermolekulare Plasmid-DNA aus jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen isoliert und in 20  $\mu$ l eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA als Matrize zur Detektion von episomaler Vektoren durch die Verwendung von Luciferase-spezifischen Primern mittels PCR verwendet. Episomale Plasmid-DNA beider Vektoren konnte zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesen werden (Abbildung 5.16). Allerdings erscheinen zu allen drei Zeitpunkten die Banden für pEPIUbCLuc intensiver als für pUbCLuc.

Abbildung 5.16

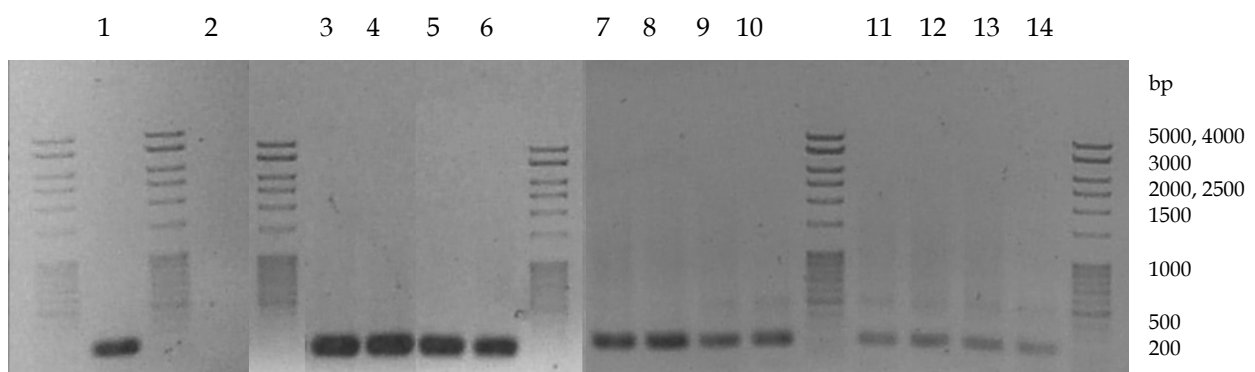


Abbildung 5.16 Detektion von episomaler Plasmid-DNA mittels PCR. Plasmid-DNA wurde 8, 28 und 45 Tage (Spur 3-6; 7-10; 11-14) nach Transfektion mit pEPIUbCLuc oder pUbCLuc aus Jurkat-Zellen isoliert. Mittels PCR wurde anschließend vorhandene episomale Plasmid-DNA detektiert. Spezifische Banden von 200 bp ergaben sich jeweils für pEPIUbCLuc (Spur 3+4; 7+8; 11+12) und pUbCLuc (Spur 5+6; 9+10; 13+14). Spur 1+2 zeigen die entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen.

Anschließend wurden die relativen Mengen an episomaler Plasmid-DNA zu den Zeitpunkten Tag 8 und Tag 45 in den unterschiedlichen Gruppen mittels qRT-PCR quantifiziert. Acht Tage nach Transfektion konnte 2-fach mehr an pEPIUbCLuc, verglichen mit pUbCLuc, detektiert werden (Abbildung 5.17). Nach 45 Tagen konnte ein 2,5-facher Unterschied zwischen den Vektoren beobachtet werden (Abbildung 5.17).

Abbildung 5.17

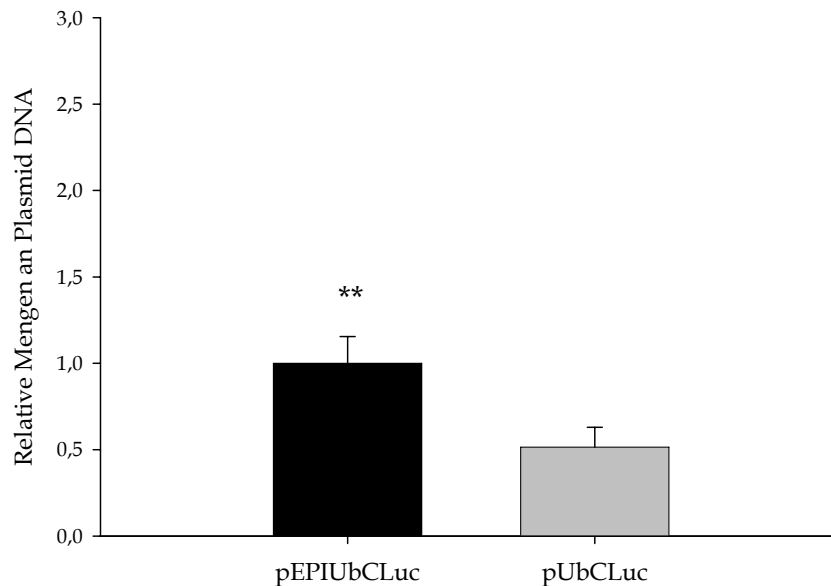


Abbildung 5.16 Quantifizierung episomaler Plasmid-DNA mittels qRT-PCR. Plasmid-DNA wurde 8 Tage nach Transfektion mit pEPIUbCLuc oder pUbCLuc aus Jurkat-Zellen isoliert. Mittels qRT-PCR wurde anschließend vorhandene episomale Plasmid-DNA quantifiziert. Hierbei ergaben sich 2-fach höhere Mengen an pEPIUbCLuc verglichen mit pUbCLuc (\*\*  $p \leq 0.01$ ).

Abbildung 5.18

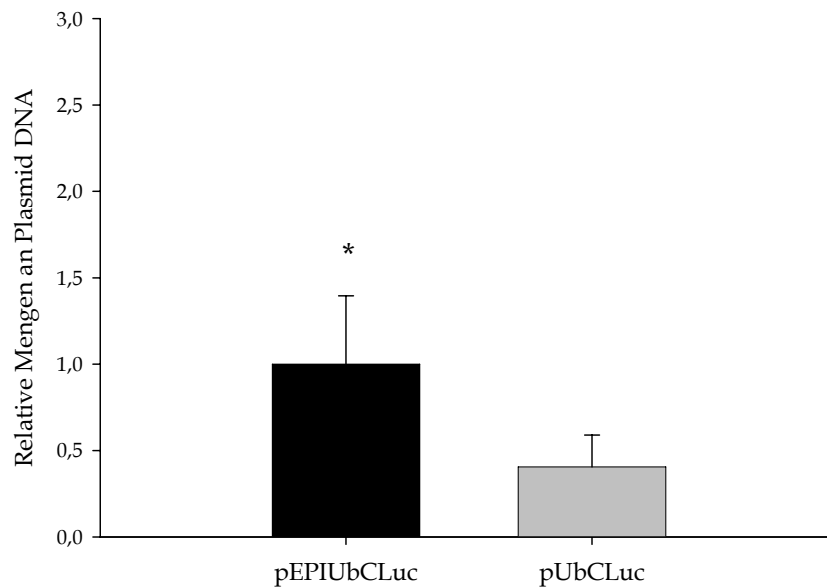


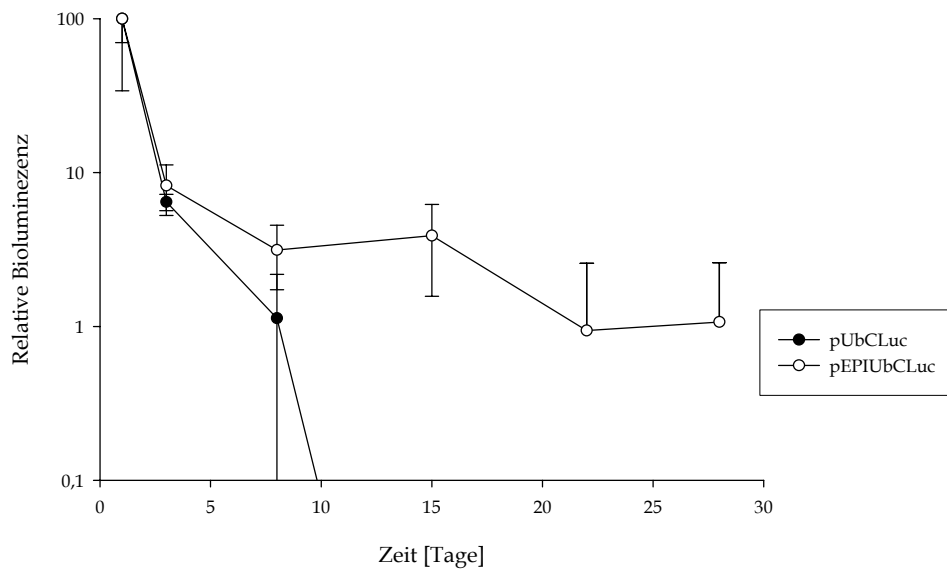
Abbildung 5.18 Quantifizierung episomaler Plasmid-DNA mittels qRT-PCR. Plasmid-DNA wurde 45 Tage nach Transfektion mit pEPIUbCLuc oder pUbCLuc aus Jurkat-Zellen isoliert. Mittels qRT-PCR wurde anschließend vorhandene episomale Plasmid-DNA quantifiziert. Hierbei ergaben 2,5-fach mehr pEPIUbCLuc verglichen mit pUbCLuc (\*  $p \leq 0.05$ ).

Bei Einsatz von 5  $\mu\text{g}$  pEPIUbCLuc mit einer Größe von 8,3 kb und entsprechend 3,8  $\mu\text{g}$  pUbCLuc mit einer Größe von 6,3 kb wurden jeweils  $5,5 \times 10^{11}$  Plasmid Moleküle zur Transfektion von  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Mit Hilfe einer Standardkurve, die mittels qRT-PCR erstellt wurde, konnte die absolute Masse und damit die Mengen an Plasmid-Molekülen nach 8 und 45 Tagen ermittelt werden. Hierbei ergaben sich unter Berücksichtigung des Volumens der eingesetzten Matrice von 3  $\mu\text{l}$  aus 20  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen für den Zeitpunkt acht Tage nach Transfektion 164 ng und entsprechend  $1,8 \times 10^{11}$  Moleküle pEPIUbCLuc, sowie 84 ng und  $9,1 \times 10^{10}$  Moleküle pUbCLuc. 45 Tage nach Transfektion konnten lediglich 5,9 pg pEPIUbCLuc und entsprechend  $6,6 \times 10^5$  Moleküle sowie 2,4 pg pUbCLuc und entsprechend  $2,67 \times 10^5$  Molekülen detektiert werden. Dies entspricht bei  $2 \times 10^6$  Zellen, aus denen die Plasmid-DNA isoliert wurde, zum Zeitpunkt Tag 45 im Mittel nur noch einem Plasmid-Molekül pEPIUbCLuc in jeder dritten und einem Molekül pUbCLuc in jeder zehnten Zelle.



Die Möglichkeit, durch die Verwendung des Ubiquitin C-Promotors Langzeitexpression *in vivo* zu vermitteln, wurde im Folgenden im Mausmodell untersucht. Dazu wurden die Lungen von acht Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen durch Injektion von l-PEI/pDNA-Komplexen in die Schwanzvene transfiziert. Wie bereits für pEPI1-Luc beschrieben (5.1.3), wurden Komplexe aus linearem PEI und pEPIUbCLuc oder pUbCLuc hergestellt und injiziert. Die Luciferase-Expression wurde über eine Dauer von 50 Tagen verfolgt (Abbildung 5.19). In der Gruppe pUbCLuc konnte nur bis Tag 8 Luciferaseaktivität beobachtet werden. Zu den Zeitpunkten Tag 22 und Tag 28 nach Transfektion konnte Biolumineszenz lediglich in einer einzigen Maus, die pEPIUbCLuc erhalten hatte, detektiert werden. 50 Tage nach Injektion der Komplexe wurde keinerlei Luciferaseaktivität mehr detektiert.

Abbildung 5.19

Abbildung 5.19 Verlauf der *in vivo* Luciferase-Expression in der Lunge.

Die Biolumineszenz in der Lunge der Mäuse als Maß für die Luciferase-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von PEI/pDNA-Komplexen aus pEPIUbCLuc oder pUbCLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität bis Tag 8 nach Transfektion für beide Konstrukte. Am Tag 15 nach Transfektion wurde nur noch Biolumineszenz in den Mäusen detektiert, die mit pEPIUbCLuc transfiziert wurden. Zu den Zeitpunkten Tag 22 und 28 nach Injektion konnte Biolumineszenz nur in einer Maus der Gruppe pEPIUbCLuc gemessen werden.

Für PEI als Transfektionsreagenz sind unterschiedliche toxische Effekte, wie Membrandestabilisierung und induzierte Apoptose *in vivo* und *in vitro* bekannt (Kotin et al., 1990; Moghimi et al., 2005). Um einen Einfluss von l-PEI auf die Luciferaseexpression *in vivo* auszuschließen und das Potential der unkomplexierten nackten Plasmid-DNA, pEPIUbCLuc und pUbCLuc, zu untersuchen, wurde nasale Perfusion als eine weitere Methode zur Transfektion im Mausmodell angewendet. Hierzu wurde das Nasenepithel von acht Wochen alten BALB/c-Mäusen mit 50 µg pEPIUbCLuc oder der äquimolaren Menge an pUbCLuc (38 µg) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die initiale *in vivo*-Luciferaseaktivität in der Nasenschleimhaut mittels IVIS 100 imaging system (Xenogen, USA) bestimmt (Abbildung 5.20).

Abbildung 5.20

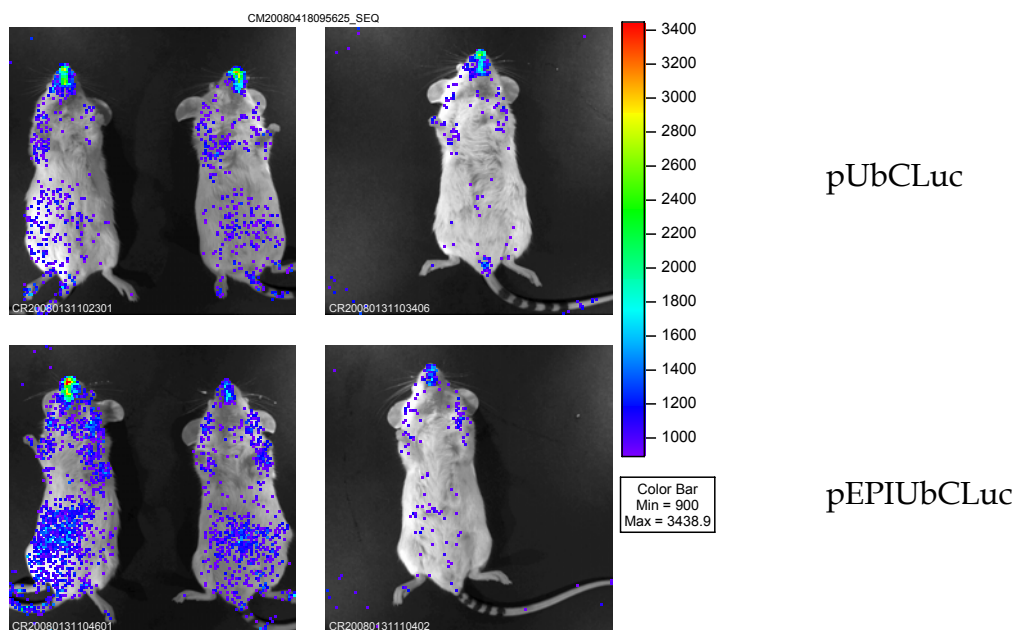


Abbildung 5.20 Detektion der *in vivo*-Luciferaseaktivität der Nasenschleimhaut  
 Das Nasenepithel von weibliche BALB/cMäuse wurde jeweils mit pEPIUbCLuc oder pUbCLuc perfundiert. Dafür wurde die nackte Plasmid-DNA mit einer Geschwindigkeit von 7,4 µl/min in einem Volumen von 100 µl *Aqua ad injectabilia* appliziert. 24 h nach Perfusion wurde das Substrat Luciferin i.p. injiziert und die Biolumineszenz mittels IVIS 100 imaging system bestimmt. Sowohl mit der nackten Plasmid-DNA pEPIUbCLuc als auch mit pUbCLuc konnte die Nasenschleimhaut der Mäuse effizient transfiziert werden.

Die *in vivo* Luciferaseexpression wurde über einen Zeitraum von 78 Tagen beobachtet (Abbildung 5.21). Während die Transgenexpression von pEPIUbCLuc zunächst auf über 200 Prozent der initialen Expression anstieg, sank die von pUbCLuc innerhalb von acht Tagen auf unter 50 Prozent. Allerdings sank die Luciferaseaktivität von pEPIUbCLuc bis zum Zeitpunkt Tag 50 auf die Werte von pUbCLuc. Beide Konstrukte vermittelten Luciferaseaktivität über den gesamten Zeitraum der Messungen von 78 Tagen.

Abbildung 5.21

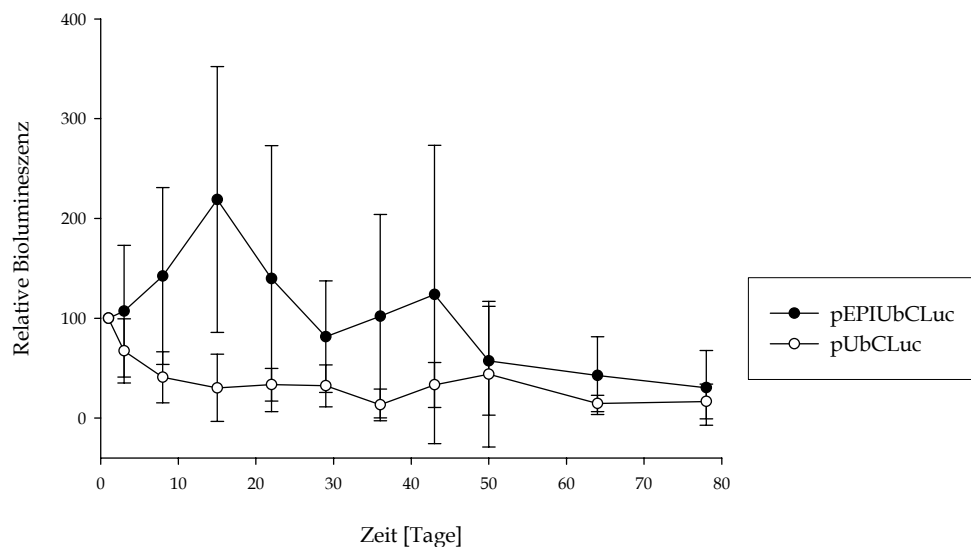


Abbildung 5.21 Verlauf der *in vivo*-Luciferase-Expression des Nasenepithels.

Die Luciferase-Expression im Nasenepithel der Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach nasaler Perfusion von pEPIUbCLuc oder pUbCLuc bestimmt. Hierbei ergab sich eine messbare Luciferaseaktivität über den gesamten Zeitraum der Messung von 78 Tagen. Für den Vektor pEPIUbCLuc konnte eine maximale Luciferaseaktivität von 220% der initialen Expression zum Zeitpunkt Tag 15 nach Transfektion detektiert werden.

### 5.3 Zusammenfassende Betrachtung von episomaler Plasmid-DNA zum stabilen Gentransfer

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nichtviraler, stabiler Gentransfer mittels episomaler Plasmid-DNA in hämatopoetische Zellen ohne Selektionsdruck *in vitro* aber teilweise auch in der Lunge *in vivo* möglich ist. Konstrukte mit unterschiedlichen Promotoren und transkriptionsverstärkenden Elementen in Kombination mit der huINF  $\beta$ -*Scaffold Matrix Attachment Region* wurden auf deren Potenzial getestet, Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die Plasmid-DNA nach Transfektion als noch nicht-integriertes Episom vorliegt.

Zur Untersuchung episomal replizierender nichtviraler Vektoren wurde bisher zumeist der Prototyp pEPI-1 verwendet. Um mit diesem Plasmid, das den CMV-Promotor, das Reportergen EGFP und die huINF  $\beta$ -S/MAR umfasst, stabile Transgenexpression zu erreichen, wurde bisher eine initiale Selektion von zwei bis drei Wochen angewandt. Die bisherigen Studien zu diesem Vektor konnten episomale Replikation, allerdings nur stabile EGFP-Expression von circa einem Prozent der Zellen zeigen. Um eine sensitivere Detektion der Transgenexpression zu ermöglichen wurde in diesen Untersuchungen statt pEPI-1 der entsprechende Luciferase-kodierende Vektor pEPI1-Luc verwendet. In einer ersten Versuchsanordnung wurde die Transgenexpression nach verkürzter Selektionsdauer getestet. Hierzu wurden Jurkat-Zellen mit pEPI1-Luc transfiziert und für drei, sechs oder vierzehn Tage unter Selektionsdruck kultiviert. Die bisherigen Studien konnten dahingehend bestätigt werden, als dass nur durch eine Selektionsdauer von 14 Tagen eine relative Luciferase-Expression von mehr als zehn Prozent erreicht werden konnte. Wurde dagegen nur drei oder sechs Tage Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt, so blieb die relative Transgenexpression auf dem gleichen Level wie ohne Selektion. Insgesamt konnte allerdings die Transgenexpression durch Detektion der Luciferaseaktivität, verglichen mit EGFP, sehr genau und sensitiv verfolgt werden. In einem weiteren

Experiment wurde der Einfluss der G418-Konzentration auf die Transgenexpression untersucht. Durch eine G418-Konzentration von 1000 µg/ml Medium kann zwar eine höhere relative Transgenexpression erreicht werden, allerdings ergeben sich dadurch auch deutlich inhomogenere Werte. Durch die resultierende hohe Standardabweichung lässt sich daher bei der Verwendung von G418 in den Konzentrationen 1000 µg/ml und 500µg/ml kein signifikanter Unterschied feststellen. Während durch Anwendung von Selektionsdruck nach *in vitro*-Transfektion des pEPI1-Luc Vektors Langzeit-Transgenexpression erreicht werden konnte, war bereits acht Tage nach *in vivo* Applikation des Vektors zur Transfektion der Lunge keine Luciferaseaktivität mehr detektiertbar.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, selbstreplizierende Vektoren durch die Kombination geeigneter Promotoren mit der huINF β-S/MAR zu erhalten, die keinerlei initiale Selektion mehr benötigen, wurden verschiedene Konstrukte kloniert und deren Fähigkeit, stabile Transgenexpression zu vermitteln, getestet.

Zunächst wurde der Einfluss der huINF β-S/MAR in Kombination mit dem Promotorelementen CMV-*enhancer*, Ubiquitin B-Promotor, sowie dem Ubiquitin B-Intron *in vitro* durch Transfektionen der Vektoren pCUBIBLuc und pEPICUBIBLuc bezüglich der vermittelten Langzeit-Transgenexpression untersucht. Durch die Transfektion von pEPICUBIBLuc konnte eine signifikant höhere relative Luciferaseaktivität über einen Zeitraum von 50 Tagen erreicht werden. Dieser Unterschied könnte sowohl durch *Silencing*, als auch durch fehlende episodale Replikation des pCUBIBLuc Plasmids, verglichen mit pEPICUBIBLuc, begründet sein. Daher wurde im Weiteren der Status der beiden Konstrukte 72 Tage nach Transfektion untersucht. Während episodales pEPICUBIBLuc vorhanden war, konnte keinerlei verbliebene extrachromosomale pCUBIBLuc Plasmid-DNA mehr detektiert werden. Die huINF β-S/MAR vermittelte hier in Kombination mit dem CMV-*enhancer*, Ubiquitin B-Promotor sowie dem Ubiquitin B-Intron die episodale Replikation des Plasmids, ohne dass Selektion nötig ist.

Nach Transfektion der Lunge *in vivo* durch Injektion von PEI/pDNA Komplexen kann bei Verwendung von CMV-Promotor-enthaltenden Plasmiden in der Regel eine Transgenexpression über maximal eine Woche detektiert werden (Aneja et al., 2007). Während durch den CMV-Promotor-enthaltenden Vektor pEPI1-Luc *in vivo* keine verlängerte Transgenexpression vermittelt werden konnte (siehe 5.1.3; Conese et al., 2004), konnten nach intravenöser Applikation von pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc über einen Zeitraum von 49 Tagen Transgenexpression beobachtet werden. Auch sechs Monate nach Injektion von pEPICUBIBLuc konnte in den isolierten Lungen aller Mäuse noch Luciferaseaktivität detektiert werden, während für pCUBIBLuc nur noch Luciferaseexpression in einer Maus beobachtet werden konnte. Bei der Quantifizierung der in der Lunge vorhandenen episomalen Plasmid-DNA ergab sich hier allerdings kein Unterschied zwischen pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc. Beide Konstrukte konnten klar als episomale Vektoren in den Mauslungen sechs Monate nach Transfektion nachgewiesen werden. Dies korreliert mit neusten Untersuchungen zur Zellteilungsrate von Lungenepithelzellen, die mit bis zu 18 Monaten angegeben wurde (Rawlins and Hogan, 2008). Der Verbleib der Plasmid-DNA Konstrukte im Lungengewebe über sechs Monate war daher zu erwarten. Da bereits gezeigt werden konnte, dass *Silencing* durch die Assoziation der huINF  $\beta$ -S/MAR mit der Expressionskassette im episomalen pEPI1 Vektor *in vitro* reduziert ist, ist anzunehmen, dass auch *Silencing in vivo* durch die huINF  $\beta$ -S/MAR teilweise verhindert wird. Dies erklärt die unterschiedlichen Expressionsmuster von pEPICUBIBLuc und pCUBIBLuc trotz Vorhandensein beider Vektoren nach sechs Monaten *in vivo*.

Durch die Injektion von PEI/pDNA-Komplexen in die Schwanzvene von Mäusen wird nicht nur Lungen-, sondern mit geringerer Effektivität auch Lebergewebe transfiziert. Interessanterweise konnte bei der Bestimmung der Luciferaseaktivität im Lebergewebe bei allen Mäusen Luciferaseaktivität, unabhängig vom verwendeten Plasmid, beobachtet werden. Episomale Plasmid-DNA wurde allerdings nur in zwei der mit pEPICUBIBLuc transfizierten Mäusen detektiert. Dies deutet darauf hin, dass Plasmid-DNA auch integriert wurde und hier die Transgenexpression vermittelte. Da durch Transfektion von pEPICUBIBLuc in der

Leber höhere Expressionslevel erreicht wurden als mit pCUBIBLuc, könnte auch bei integrierter Plasmid-DNA ein inhibitorischer Effekt der huINF  $\beta$ -S/MAR auf das *Silencing* angenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei nach systemischer Applikation von I-PEI/pDNA-Komplexen sowohl Nekrosen als auch Zelltod im Lebergewebe auftraten, während das Lungengewebe weitgehend unbeschädigt blieb (Chollet et al., 2002). Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der vorhandenen episomalen Plasmid DNA in Lunge und Leber erklären.

Für Plasmide, deren Transgenexpression durch den Ubiquitin C-Promotor gesteuert wird, konnte nach *in vivo*-Transfektion stabile Expression und die Assoziation des Vektors mit Histonen des Euchromatins festgestellt werden (Riu et al., 2007). Daher wurden die Vektoren pEPIUbCLuc und pUbCLuc kloniert und bezüglich ihres Expressionsmusters sowie episomaler Replikation *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

Durch die Anwendung initialen Selektionsdrucks konnte sowohl für pEPIUbCLuc, als auch für pUbCLuc stabiler Gentransfer und Transgenexpression über einen Zeitraum von über 60 Tagen erreicht werden. Wie bereits bei Transfektion von pEPI1-Luc beobachtet, sank die Luciferase-Expression zunächst während der Dauer der Selektion ab, stieg anschließend allerdings auf ein vergleichsweise deutlich höheres Niveau von bis zu 5,5-fach der initialen Expression an. Im Gegensatz zur pEPI1-Luc vermittelte pEPIUbCLuc auch ohne Selektionsdruck stabile Transgenexpression, wenn auch auf niedrigerem Level als mit Selektion. Hier wurde eine relative Luciferaseaktivität von circa 20 Prozent der initialen Werte gemessen. Dabei ergab sich allerdings auch ein signifikanter Unterschied zum Vektor pUbCLuc, der eine relative Luciferaseexpression von bis lediglich fünf Prozent vermittelte. Um zu prüfen, inwieweit die Transgenexpression von episomaler Plasmid-DNA stammen könnte, wurde der Status der DNA zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Hierbei ergab sich grundsätzlich für beide Plasmide eine stetig abnehmende Menge an Plasmid-DNA. Während allerdings acht Tage nach Transfektion für pEPIUbCLuc noch

circa 1/3 und für pUbCLuc immerhin noch 1/6 der initial transfizierten Menge an Plasmid Molekülen festgestellt werden konnte, konnte ein dramatischer Verlust beider Konstrukte zum Zeitpunkt Tag 45 nach Transfektion festgestellt werden. So verblieb lediglich 0,00012 Prozent pEPIUbCLuc und 0,000049 Prozent pUbCLuc als episomale Plasmid-DNA in den Zellen. Die in der Literatur beschriebene episomale Replikation durch die huINF  $\beta$ -S/MAR kann für den unterschiedlich starken Verlust an Plasmid-DNA im Verlauf nach Transfektion als Erklärung herangezogen werden. Allerdings konnte 45 Tage nach Transfektion im Mittel lediglich in jeder dritten Zelle ein Molekül pEPIUbCLuc detektiert werden. Diese geringe Menge war allerdings ausreichend, um stabile relative Transgenexpression von 20 Prozent ohne Selektion über einen Zeitraum von mehr als 60 Tagen zu vermitteln. Dies erhält besondere Bedeutung im Vergleich mit dem Vektor pEPI1. Dieser ist nach Selektion im Mittel in einer Menge von fünf Molekülen pro Zelle vorhanden (Jenke et al., 2004) und vermittelte stabile relative Transgenexpression von bis zu 25 Prozent (5.1.1). Offensichtlich kommt es im Falle des pEPIUbCLuc durch den Ubiquitin C-Promotor im Vergleich zu pEPI1-Luc deutlich weniger zu *Gen-silencing*.

Bei der Anwendung der Vektoren pEPIUbCLuc und pUbCLuc *in vivo* ergab sich nach Applikation von PEI/pDNA-Komplexen eine verlängerte Transgenexpression durch pEPIUbCLuc in der Lunge. Allerdings konnte auch für dieses Plasmid nach Tag 28 keine Luciferaseaktivität *in vivo* mehr festgestellt werden.

Um hier den Einfluss von Polyethylenimin als Transfektionsreagenz auf die Transgenexpression auszuschließen, wurde nackte Plasmid-DNA im Mausmodell zur Transfektion des Nasenepithels mittels Perfusion verwendet. Interessanterweise kam es hier zu einem deutlich veränderten Expressionsverlauf für pEPIUbCLuc. Während die durch pUbCLuc vermittelte relative Luciferase-Expression innerhalb von 15 Tagen auf ein stabiles Niveau von circa 20 Prozent absank, stieg die Transgenexpression im Falle von pEPIUbCLuc zunächst auf einen maximalen Wert von 220 Prozent nach 15 Tagen. Im weiteren Verlauf sank diese dann bis Tag 50 nach Transfektion auf das gleiche Niveau wie die durch pUbCLuc vermittelte Luciferaseaktivität. Es ergab sich durch die Applikation



nackter pEPIUbCLuc Plasmid-DNA also ein veränderter Verlauf der Transgenexpression verglichen mit der Transfektion mittels PEI.

Während der in der Literatur als episomal-replizierend beschriebene Vektor pEPI1 in den Untersuchungen weder *in vitro* ohne Selektionsdruck noch *in vivo* Langzeit-Transexpression vermittelt, konnte gezeigt werden, dass dies durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und Transkriptions-verstärkender Elemente möglich ist. Hierbei zeigte sich, dass wiederum die Einführung der huINF  $\beta$ -S/MAR am 3'-Ende des Transgens im Plasmid die Expression verstärken und teilweise auch zu verlängern vermag. Insbesondere unter Kontrolle einer Kombination aus CMV *enhancer*, Ubiquitin B-Promotor und Ubiquitin B-Intron konnte für den S/MAR enthaltenden Vektor pEPICUBIBLuc hohe Transgenexpression über einen Zeitraum von mehreren Wochen ohne Anwendung von Selektionsdruck beobachtet werden. Auch *in vivo* konnte nach sechs Monaten erhöhte Transgenexpression, verglichen mit dem S/MAR-freien Vektor pCUBIBLuc, gezeigt werden, obwohl in der Menge der vorhanden episomalen Plasmid-DNA kein Unterschied festgestellt wurde. Die huINF  $\beta$ -S/MAR verringert hier also das *Silencing* des Transgens.

### 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation bestand in der Optimierung des nichtviralen Gentransfers insbesondere in hämatopoetische Zellen. Hierbei sollte zunächst eine möglichst hohe Transfektionseffizienz und damit hohe Transgenexpression erzielt werden. In weiteren Teilen der Arbeit sollten die Möglichkeiten untersucht werden, stabile Transgenexpression entweder durch persistente, extra-chromosomale Plasmid-DNA oder durch Integration von Plasmid-DNA ins Genom hämatopoetischer Zielzellen zu erreichen. Dies hatte den Hintergrund, dass nichtvirale Gentherapie, verglichen mit viralem Gentransfer, für viele Anwendung bisher zu ineffizient und lediglich transient ist. Dagegen ist die höhere Sicherheit ein großer Vorteil von nichtviralem Gentransfer. Dies erlangte kürzlich besondere Bedeutung, als nach erfolgreicher Behandlung von 17 X-SCID Patienten mittels replikationsdefizienter, retroviraler Gentransfervektoren fünf dieser Patienten Virus-assoziierte Leukämien entwickelten.

Die systematische Untersuchung eines Plasmid-DNA-Dimers im Vergleich mit dessen Monomer ergab deutliche Unterschiede bezüglich intrazellulärer Verteilung und Transgenexpression nach Transfektion. Die verwendeten Konstrukte, pEGFP-N1 Monomer und das entsprechende Dimer, wurden vor den Transfektionsexperimenten bezüglich ihres hydrodynamischen Durchmessers charakterisiert. Hierbei ergab sich eine annähernd zweifach größerer Durchmesser des Dimers. Für die weiteren Untersuchungen wurde Elektroporation als effektive Methode zur Transfektion von Jurkat-T-Lymphozyten verwendet. Zunächst konnte mittels Southern-Blot-Analyse gezeigt werden, dass nach Transfektion und Transkription die ursprüngliche monomere und dimere Form der Plasmide in der Zelle erhalten blieb und die weiteren Ergebnisse aus den unterschiedlichen intramolekularen Anordnungen der Konstrukte resultierten. Bei Transfektion äquimolarer Mengen an Genkopien ergab sich, bezüglich der Anzahl transfizierter Zellen, eine höhere Effizienz des Monomers. Bezüglich der Höhe der Transgenexpression der transfizierten Zellen zeigte sich jedoch kein Unterschied. Interessanterweise konnte nach Transfektion äquimolarer Mengen an Plasmid-

DNA-Molekülen höhere Transgenexpression in den Zellen beobachtet werden, die mit dem Dimer transfiziert wurden. Die Anzahl der transfizierten Zellen unterschieden sich in diesem Falle jedoch nicht. Da nur im Zellkern lokalisierte Plasmid-DNA transkribiert wird, und entsprechend zu Transgenexpression führen kann, wurde im Weiteren die intrazelluläre Lokalisation der Konkatemere nach Transfektion sowohl äquimolarer Mengen an Genkopien als auch Plasmid-DNA-Molekülen untersucht. Dies ergab eine größenabhängige Verteilung der Plasmid-DNA in Zytoplasma und Zellkern. Das kleinere Monomer wurde in größerer Menge als das Dimer ins Zytoplasma und in den Zellkern geschleust. Im Zusammenhang mit den relativen Mengen der jeweiligen Konstrukte im Zellkern und der zuvor bestimmten Transgenexpression ließ sich die relative Transkriptionseffizienz der beiden Konstrukte berechnen. Interessanterweise vermittelte das dimere Plasmid-DNA-Molekül mit 3,5-fach höherer Effektivität Transgenexpression als das entsprechende Monomer. Dieser Wert war unabhängig davon, ob gleiche Mengen an Genkopien oder Plasmid-DNA Moleküle zur Transfektion verwendet wurden. Aus den Untersuchungen lässt sich ein möglichst kleines Konkatermer als idealer nichtviraler Vektor ableiten, um möglichst hohe Transfektionsraten und hohe Transgenexpression pro Zelle zu erzielen.

Durch die spezifische Integration von Plasmid-DNA ins Genom von Zielzellen mittels *Streptomyces* Bakteriophage  $\phi$ C31 Integrase ist es möglich grundsätzlich *in vitro*, als auch *in vivo* stabile Transgenexpression zu erreichen (Thyagarajan et al., 2001). Dazu werden in der Regel das zu integrierende Plasmid-DNA-Konstrukt sowie ein für die  $\phi$ C31 Integrase kodierendes Plasmid kotransfiziert. Die exprimierte Integrase vermittelt die Rekombination zwischen der *attB*-Sequenz auf dem zu integrierenden Plasmid und spezifischen Pseudo *attP*-Sequenzen im Genom. Dieser Integrationsvorgang ist spezifisch, unidirektional und daher stabil. Um die Möglichkeit zu untersuchen, mittels  $\phi$ C31 Integrase stabilen Gentransfer in hämatopoetischen Zellen zu erreichen, wurden verschiedene Vektoren zur Integration mit unterschiedlichen Integrase-kodierenden Plasmiden kotransfiziert. Diese führten allerdings, verglichen mit Kontrollexperimenten, nicht zu erhöhter

oder verlängerter Transgenexpression. Ausschließlich mit relativ hohen Mengen an Integrase-kodierender mRNA konnte erhöhte Langzeit-Transgenexpression erzielt werden. Dies steht in Kontrast zu bisherigen Untersuchungen in Zellen anderer Gewebe. Um eine eventuell gestörte Expression nach Transfektion von Integrase-kodierender Plasmid-DNA in hämatopoetischen Zellen als Grund für die fehlende Langzeit-Transgenexpression ausschließen zu können, wurde mittels Western-Blot-Analyse das  $\phi$ C31 Integrase Protein in Jurkat-T-Zellen nachgewiesen. Um die Aktivität der Integrase in hämatopoetischen Zellen genauer zu untersuchen, wurde ein optimierter Versuchsaufbau entwickelt. Hierbei wurde die Integrase-vermittelte Rekombination episomaler Plasmid-DNA zwischen den Wildtyp-*attB*- und *attP*-Sequenzen in hämatopoetischen Zellen und Zellen anderer Gewebe untersucht. Dabei ergab sich sowohl bezüglich Integrase-vermittelter  $\beta$ -Galaktosidase-Expression als auch bei der Quantifizierung der Rekombinationsprodukte eine deutlich reduzierte Aktivität der Integrase in T-Zelllinien, primären T-Lymphozyten und humanen hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Stammzellen. Um die zellspezifischen Unterschiede in der Aktivität der Integrase im Detail zu untersuchen, wurde ein direkter Vergleich von Jurkat-T-Zellen und A549-Alveolar-TypII-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Integrase-vermittelte Transgenexpression, sowie Rekombination in Zusammenhang mit der tatsächlich vorhanden Menge an Integrase-Protein in den jeweiligen Zellen untersucht. Hierbei wurden nach Transfektion unterschiedlicher Integrase-Konstrukte jeweils circa 16-fach höhere Integraseaktivität in Lungenzellen beobachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Interaktion der  $\phi$ C31 Integrase mit zellulärem DAXX-Protein zur Inhibierung der Integraseaktivität führt. Um einen Zusammenhang der reduzierten relativen Aktivität der  $\phi$ C31 Integrase in hämatopoetischen Zellen mit DAXX zu untersuchen, wurde zelluläres DAXX in Jurkat -, sowie in A549-Zellen auf Protein-Ebene detektiert. Hierbei ergab sich in der Western-Blot-Analyse deutlich erhöhte DAXX-Protein-Expression in Jurkat-Zellen. Um dies zu verifizieren, wurde weiterhin die DAXX-mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Die DAXX-Expression in Jurkat-Zellen war auf mRNA-Ebene bis zu 5,4-fach gegenüber der in A549-Zellen gesteigert. Die

Untersuchungen ergaben insgesamt eine deutlich verringerte Aktivität der Integrase in hämatopoetischen Zellen, verglichen mit anderen Geweben. Dies könnte auf eine höhere Expression von DAXX-Protein in hämatopoetischen Zellen zurückgeführt werden.

Eine Alternative zur stabilen Integration von Plasmid-DNA ins Genom stellt die stabile Transfektion extrachromosomaler Plasmid-DNA dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung einer *Scaffold Matrix Attachment Region* zwischen Transgen und polyA-Schwanz im Plasmid episodale Replikation in hämatopoetischen Zellen vermittelt werden kann (Papapetrou et al., 2006). In den Untersuchungen musste allerdings nach Transfektion des Vektors pEPI1 ein mehrwöchiger Selektionsdruck mit G418 angewendet werden, um episodale Replikation und Langzeit-Expression zu erreichen. Um die Möglichkeit zu untersuchen, mit einer reduzierten Selektionsdauer stabile Transgenexpression auf hohem Level zu erreichen, wurden Jurkat-Zellen mit pEPI1-Luc transfiziert und unterschiedlich lange unter Selektionsdruck kultiviert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität ergab einen Zeitraum von 14 Tagen Selektion, der nötig war, um stabile Transgenexpression zu erzielen. Sowohl mit einer G418-Konzentration von 500 µg/ml als auch von 1000 µg/ml konnte Langzeit-Transgenexpression erreicht werden. Um den Einfluss des Promotors in Kombination mit der huINF β-S/MAR zu untersuchen, und die Möglichkeit zu testen, durch den Austausch des Promotors stabile Transgenexpression ohne Selektionsdruck zu erreichen, wurden Konstrukte mit dem Ubiquitin B- oder dem Ubiquitin C-Promotor in Kombination mit der huINF β-S/MAR bezüglich Transgenexpression *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Sowohl unter Kontrolle des Ubiquitin B- als auch des Ubiquitin C Promotors konnte in Kombination mit der S/MAR *in vitro* eine erhöhte und verlängerte Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen ohne die Anwendung von Selektionsdruck beobachtet werden. Die Untersuchungen des Status der transfizierten Plasmid-DNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion ergab jeweils das Vorhandensein extrachromosomaler S/MAR-enthaltenden Vektoren. Dies weist auf eine gewisse S/MAR-vermittelte episodale Replikation dieser Plasmide hin. *In vivo* konnte ebenfalls eine erhöhte Transgenexpression in

Lunge und Leber der S/MAR-Konstrukte über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet werden. Hier gab es allerdings bezüglich der Menge an episomaler Plasmid-DNA durch die geringe Zellteilungsrate im Lungengewebe keinen Vorteil durch die Einbringung der huINF  $\beta$ -S/MAR. Der *in vivo* Effekt der huINF  $\beta$ -S/MAR liegt hier vor allem einer Verringerung des Gen-*silencing*.

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen zur Optimierung des nichtviralen Gentransfers in hämatopoetische Zellen hohe und lananhaltende Transgenexpression ohne Selektionsdruck erzielt werden. Durch die Verwendung von Plasmid-Konkatemeren konnte die Transgenexpression, bezogen auf ein Molekül, deutlich gesteigert werden. Stabile Transgenexpression durch die spezifische Integration von Plasmid-DNA mittels  $\phi$ C31 Integrase konnte in hämatopoetischen Zellen durch die Interaktion der Integrase mit dem zellulären Protein DAXX nicht erreicht werden. Dagegen konnte dies nach Transfektion von Plasmid-DNA mit geeigneten Promotoren und der huINF  $\beta$ -S/MAR durch den extrachromosomalen Verbleib der DNA und verlängerte Transgenexpression in der Zelle erreicht werden.

Eine Fortführung der Untersuchungen könnte zur Etablierung nichtviraler Gentherapie zur Behandlung genetischer Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, wie beispielsweise X-SCID, aber auch Erkrankungen der Lunge, wie Zystische Fibrose, beitragen.

## 7. Summary

The overall aim of this thesis was the optimization of nonviral gene transfer particularly into hematopoietic cells. In the first part high transfection efficiencies and transgene expressions were achieved by the use of plasmid DNA (pDNA) concatemers. In further parts of the study it was investigated to which extent stable transgene expression could be achieved either with persistent extrachromosomal pDNA or with integrated pDNA into the genome of hematopoietic cells. This was done against the background of relatively low transfection efficiency and transient transgene expression upon nonviral gene transfer compared to viral transduction. On the other hand, a superior safety profile of nonviral gene transfer systems seems to be essentially important, as recently 5 out of 17 X-SCID (X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease) patients, which have successfully been treated with replication-deficient  $\psi$ -coding retroviruses, developed virus-associated T-cell leukaemia.

The investigation of a pDNA dimer and compared to its monomer resulted in significant differences regarding intracellular localization and transgene expression after transfection. The hydrodynamic diameter of the constructs pEGFP-N1 monomer and pEGFP-N1 dimer were determined by PCS. The diameter of the dimeric pDNA concatamer free in solution was approximately two-fold higher than that of the monomeric pDNA. In further experiments electroporation was used as an efficient method to transfect Jurkat T cells. Southern blot analysis confirmed that the transfected constructs remain in their original statuses as monomer and dimer after treatment with electroporation and intracellular uptake. When equimolar ratios of gene copies were transfected a higher number of transfected cells was found for the monomer than for the dimer. In contrast no difference was found in the EGFP expression per transfected cell. Interestingly higher EGFP expression was found in dimer-transfected cells, when equimolar ratios of plasmid molecules were transfected. In contrast, no difference was found regarding the number of transfected cells. Further, the intracellular localization of the different constructs was investigated after transfection of

equimolar ratios of either gene copies or pDNA molecules. This resulted in size-dependent localization of the pDNA in the cytoplasm and the nucleus. The smaller monomer was shuttled more efficiently into the cytoplasm and the nucleus compared to the dimer. From the relative amounts of pDNA present in the nucleus and the resulting transgene expression the relative transcription efficiency was calculated. Interestingly a dimeric pEGFP-N1 molecule mediated transgene expression with a 3.5-fold higher efficiency compared to its monomer. This was independent of whether equimolar gene copies or equimolar plasmid molecules were transfected. Therefore, the ideal plasmid vector for efficient nonviral gene delivery would be a concatemer as small as possible.

The bacteriophage *Streptomyces*  $\phi$ C31 integrase is a promising tool to achieve safe and stable nonviral gene transfer, for the reason that it mediates site specific integration of pDNA into mammalian host genomes. After co-transfection of an *attB* donor plasmid together with an integrase-coding plasmid, recombination between the *attB* site on the donor plasmid and pseudo *attP* sites in the genome is mediated by the functional integrase enzyme. The recombination reaction of the  $\phi$ C31 is specific and unidirectional resulting in stable genomic integration. To investigate the potential of the integrase to mediate stable gene transfer into hematopoietic cells, a variety of donor plasmids and integrase constructs were co-transfected. However this did not lead to enhanced long-term expression compared to control experiments. Only transfection of high amounts of integrase mRNA led to enhanced long-term expression. These data in hematopoietic cells are contrary to former findings in other tissues. To exclude a lack of integrase expression in hematopoietic cells, the integrase protein was detected in Jurkat T cells after transfection of the integrase plasmid by western blot analysis. An optimized assay was developed to further investigate the integrase activity in hematopoietic cells. Therefore, integrase-mediated recombination of episomal pDNA between wild-type *attB* and *attP* sites was determined in hematopoietic cells and cells of other tissues. Significantly reduced activity of the integrase in T cell lines, primary T lymphocytes, and human CD34<sup>+</sup> progenitor cells was observed by determination of integrase-mediated  $\beta$ -galactosidase activity and



quantification of recombination products. To investigate this effect in further detail, additional experiments in A549 lung and Jurkat T cell lines were performed. Integrase-mediated transgene expression and recombination was determined in context with intranuclear integrase mRNA expression. In independent experiments with different integrase construct, the  $\phi$ C31 integrase efficacy was approximately 16-fold higher in A549 lung cells than in hematopoietic Jurkat cells. It has previously been published that the cellular protein DAXX interacts with the  $\phi$ C31 integrase and inhibits its recombination efficiency. To investigate DAXX protein as a possible inhibitor of the integrase in hematopoietic cells, western blot analysis was performed. This resulted in detection of higher DAXX protein levels in Jurkat than in A549 cells. Differences were further confirmed by quantification of DAXX mRNA expression. DAXX mRNA levels were up to 5.4-fold higher in Jurkat than in A549 cells. In conclusion, significantly reduced activity of the integrase was found in hematopoietic cells compared to cells of other tissues. Higher levels of DAXX in hematopoietic cells might be one reason for this discrepancy.

An alternative to integrating systems is the stable transfection of extrachromosomal pDNA. It has recently been published that episomal replication of pDNA can be achieved in hematopoietic cells by cloning a *Scaffold Matrix Attachment Region* (S/MAR) between transgene and polyA tail in the pDNA. However, an initial selection with G418 for 2-3 weeks after transfection is necessary to mediate episomal replication and long-term transgene expression. To investigate if stable transgene expression can also be achieved with a reduced duration of selection pressure, Jurkat cells were transfected with pEPI1-Luc and cultivated under G418-selection between 0 and 14 days. Stable transgene expression could only be observed after 14 days of G418-selection. Concentrations of 500  $\mu$ g/ml and 1000 $\mu$ g/ml were sufficient to obtain long-term transgene expression. To test the influence of the promoter in combination with the huINF  $\beta$ -S/MAR on the necessity of initial selection pressure, Ubiquitin C and Ubiquitin B promoter comprising constructs were transfected *in vitro* and *in vivo*. Both constructs mediated enhanced long-term transgene expression without

application of G418-selection compared to the S/MAR-free plasmids. At different time points post transfection extrachromosomal S/MAR-comprising pDNA could be detected. This suggests episomal replication due to the S/MAR in these experiments. Further, enhanced long-term expression of S/MAR comprising vectors for up to six months was found in lung and liver tissue *in vivo*. However, due to the relatively slow cell turn-over in the lung no differences in the amount of extrachromosomal pDNA between S/MAR comprising and S/MAR-free vectors were observed *in vivo*. The *in vivo* effect of the S/MAR sequence rather seems to be a reduction of gene silencing.

In conclusion, high and stable transgene expression could be achieved in hematopoietic cells without application of selection pressure. Using a dimeric pDNA concatemer led to higher transgene expression per pDNA molecule compared to its monomer.  $\phi$ C31 integrase mediated long-term transgene expression could not be achieved in hematopoietic cells presumably due to the interaction of the integrase with cellular DAXX protein. In contrast transfection of pDNA comprising Ubiquitin C or Ubiquitin B promoters and S/MAR led to enhanced transgene expression due to improved extrachromosomal persistence of these vectors.

Continuation of this study might contribute to the establishment of nonviral gene therapy protocols for genetic diseases of the hematopoietic system or lung diseases, like X-SCID or Cystic Fibrosis.

## 7. Referenzen

- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R.M., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G.: RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) D523-7.
- Alexander, B.L., Ali, R.R., Alton, E.W., Bainbridge, J.W., Braun, S., Cheng, S.H., Flotte, T.R., Gaspar, H.B., Grez, M., Griesenbach, U., Kaplitt, M.G., Ott, M.G., Seger, R., Simons, M., Thrasher, A.J., Thrasher, A.Z. and Yla-Herttuala, S.: Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther* 14 (2007) 1439-47.
- Amati, B. and Gasser, S.M.: *Drosophila* scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol Cell Biol* 10 (1990) 5442-54.
- Andre, F. and Mir, L.M.: DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 11 Suppl 1 (2004) S33-42.
- Andrews, J.L., Kadan, M.J., Gorziglia, M.I., Kaleko, M. and Connelly, S.: Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. *Mol Ther* 3 (2001) 329-36.
- Aneja, M.K., Imker, R. and Rudolph, C.: Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration and long-term gene expression in the lung after nonviral gene delivery. *J Gene Med* 9 (2007) 967-75.
- Arbuthnot, P., Longshaw, V., Naidoo, T. and Weinberg, M.S.: Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat* 14 (2007) 447-59.
- Barron, L.G., Meyer, K.B. and Szoka, F.C., Jr.: Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther* 9 (1998) 315-23.
- Bateman, J.R., Lee, A.M. and Wu, C.T.: Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics* 173 (2006) 769-77.
- Bedbrook, J.R. and Ausubel, F.M.: Recombination between bacterial plasmids leading to the formation of plasmid multimers. *Cell* 9 (1976) 707-16.

- Belteki, G., Gertsenstein, M., Ow, D.W. and Nagy, A.: Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. *Nat Biotechnol* 21 (2003) 321-4.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (2001) 363-6.
- Berrios, V.M., Dooner, G.J., Nowakowski, G., Frimberger, A., Valinski, H., Quesenberry, P.J. and Becker, P.S.: The molecular basis for the cytokine-induced defect in homing and engraftment of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 29 (2001) 1326-35.
- Bielinska, A.U., Chen, C., Johnson, J. and Baker, J.R., Jr.: DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection. *Bioconjug Chem* 10 (1999) 843-50.
- Bigger, B.W., Tolmachov, O., Collombet, J.M., Fragkos, M., Palaszewski, I. and Coutelle, C.: An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 276 (2001) 23018-27.
- Bird, A.P.: CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 (1986) 209-13.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J.J., Rosenberg, S.A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C.A., Ramsey, W.J., Muul, L., Morgan, R.A. and Anderson, W.F.: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270 (1995) 475-80.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T.: Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 255 (1992) 195-7.
- Bode, J. and Maass, K.: Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27 (1988) 4706-11.

- Bode, J., Pucher, H.J. and Maass, K.: Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell. *Eur J Biochem* 158 (1986) 393-401.
- Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V. and Klehr-Wirth, D.: Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* 162A (1995) 389-454.
- Bostanci, A.: Gene therapy. Blood test flags agent in death of Penn subject. *Science* 295 (2002) 604-5.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P.: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 7297-301.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- Bronte, V.: Genetic vaccination for the active immunotherapy of cancer. *Curr Gene Ther* 1 (2001) 53-100.
- Burger, C., Gorbatyuk, O.S., Velardo, M.J., Peden, C.S., Williams, P., Zolotukhin, S., Reier, P.J., Mandel, R.J. and Muzyczka, N.: Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10 (2004) 302-17.
- Capecchi, M.R.: High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22 (1980) 479-88.
- Capodici, J., Kariko, K. and Weissman, D.: Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 169 (2002) 5196-201.
- Carroll, M.W. and Moss, B.: Poxviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8 (1997) 573-7.
- Cavazzana-Calvo, M. and Fischer, A.: Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* 117 (2007) 1456-65.

- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. and Fischer, A.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 (2000) 669-72.
- Chalberg, T.W., Genise, H.L., Vollrath, D. and Calos, M.P.: phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (2005) 2140-6.
- Chalberg, T.W., Portlock, J.L., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., Kirby, P.J., Hillman, R.T., Hoelters, J. and Calos, M.P.: Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J Mol Biol* 357 (2006) 28-48.
- Charrier, S., Dupre, L., Scaramuzza, S., Jeanson-Leh, L., Blundell, M.P., Danos, O., Cattaneo, F., Aiuti, A., Eckenberg, R., Thrasher, A.J., Roncarolo, M.G. and Galy, A.: Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 14 (2007) 415-28.
- Check, E.: A tragic setback. *Nature* 420 (2002) 116-8.
- Chen, J.Z., Ji, C.N., Xu, G.L., Pang, R.Y., Yao, J.H., Zhu, H.Z., Xue, J.L. and Jia, W.: DAXX interacts with phage PhiC31 integrase and inhibits recombination. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 6298-304.
- Chen, Z.Y., He, C.Y. and Kay, M.A.: Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 16 (2005) 126-31.
- Chen, Z.Y., Yant, S.R., He, C.Y., Meuse, L., Shen, S. and Kay, M.A.: Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol Ther* 3 (2001) 403-10.
- Chollet, P., Favrot, M.C., Hurbin, A. and Coll, J.L.: Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 4 (2002) 84-91.
- Choosakoonkriang, S., Lobo, B.A., Koe, G.S., Koe, J.G. and Middaugh, C.R.: Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci* 92 (2003) 1710-22.

- Coggan, J.S., Kovacs, I. and Thompson, S.H.: The aminoglycoside G418 suppresses muscarinic receptor-activated calcium release in stably transfected murine N1E-115 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 170 (1994) 247-50.
- Cole, A.: Child in gene therapy programme develops leukaemia. *Bmj* 336 (2008) 13.
- Conese, M., Auriche, C. and Ascenzioni, F.: Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther* 11 (2004) 1735-41.
- Darquet, A.M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D. and Crouzet, J.: A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther* 4 (1997) 1341-9.
- Darquet, A.M., Rangara, R., Kreiss, P., Schwartz, B., Naimi, S., Delaere, P., Crouzet, J. and Scherman, D.: Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther* 6 (1999) 209-18.
- Dasgupta, S., Tripathi, P.K., Bhattacharya-Chatterjee, M., O'Malley, B., Jr. and Chatterjee, S.K.: Recombinant vaccinia virus expressing IL-2 generates effective anti-tumor responses in an orthotopic murine model of head and neck carcinoma. *Mol Ther* 8 (2003) 238-48.
- Dass, C.R.: Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 82 (2004) 579-91.
- De Smedt, S.C., Demeester, J. and Hennink, W.E.: Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res* 17 (2000) 113-26.
- Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawley, R.G. and Dick, J.E.: Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 95 (2000) 102-10.
- Dunbar, C.E., Takatoku, M. and Donahue, R.E.: The impact of ex vivo cytokine stimulation on engraftment of primitive hematopoietic cells in a non-human primate model. *Ann N Y Acad Sci* 938 (2001) 236-44; discussion 244-5.

- Ehrhardt, A., Engler, J.A., Xu, H., Cherry, A.M. and Kay, M.A.: Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration. *Hum Gene Ther* 17 (2006) 1077-94.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.: Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20 (2001) 6877-88.
- Elfinger, M., Maucksch, C. and Rudolph, C.: Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials* 28 (2007) 3448-55.
- Esfand, R. and Tomalia, D.A.: Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* 6 (2001) 427-436.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7413-7.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (1998) 806-11.
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H.P. and Kissel, T.: A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16 (1999) 1273-9.
- Freimark, B.D., Blezinger, H.P., Florack, V.J., Nordstrom, J.L., Long, S.D., Deshpande, D.S., Nochumson, S. and Petrak, K.L.: Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid: cationic lipid complexes. *J Immunol* 160 (1998) 4580-6.
- Gaspar, H.B., Parsley, K.L., Howe, S., King, D., Gilmour, K.C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M.A., Christensen, H.O., Al Ghonaium, A., White, H.N., Smith, J.L., Levinsky, R.J., Ali, R.R., Kinnon, C. and Thrasher, A.J.: Gene therapy of X-linked severe combined



- immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364 (2004) 2181-7.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K.: Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46 (1986) 521-30.
- Glorioso, J.C., DeLuca, N.A. and Fink, D.J.: Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 49 (1995) 675-710.
- Glover, D.J., Lipps, H.J. and Jans, D.A.: Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 6 (2005) 299-310.
- Godbey, W.T., Wu, K.K. and Mikos, A.G.: Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 45 (1999) 268-75.
- Goetze, S., Gluch, A., Benham, C. and Bode, J.: Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains. *Biochemistry* 42 (2003) 154-66.
- Golic, K.G. and Lindquist, S.: The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59 (1989) 499-509.
- Golzio, M., Mazzolini, L., Moller, P., Rols, M.P. and Teissie, J.: Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther* 12 (2005) 246-51.
- Golzio, M., Rols, M.P. and Teissie, J.: In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods* 33 (2004) 126-35.
- Golzio, M., Teissie, J. and Rols, M.P.: Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 1292-7.
- Greger, J.G., Katz, R.A., Ishov, A.M., Maul, G.G. and Skalka, A.M.: The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J Virol* 79 (2005) 4610-8.

- Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G. and Lun, K.: New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33 (2004) 151-63.
- Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B. and Calos, M.P.: A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5995-6000.
- Guo, Z.S., Wang, L.H., Eisensmith, R.C. and Woo, S.L.: Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 3 (1996) 802-10.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M. and Fischer, A.: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348 (2003) 255-6.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (2000) 293-6.
- Hannon, G.J.: RNA interference. *Nature* 418 (2002) 244-51.
- Harrington, J.J., Van Bokkelen, G., Mays, R.W., Gustashaw, K. and Willard, H.F.: Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* 15 (1997) 345-55.
- Harris, J.D. and Lemoine, N.R.: Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet* 12 (1996) 400-5.
- Herweijer, H., Zhang, G., Subbotin, V.M., Budker, V., Williams, P. and Wolff, J.A.: Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med* 3 (2001) 280-91.
- Hibbitt, O.C., Harbottle, R.P., Waddington, S.N., Bursill, C.A., Coutelle, C., Channon, K.M. and Wade-Martins, R.: Delivery and long-term expression of a 135 kb LDLR genomic DNA locus in vivo by hydrodynamic tail vein injection. *J Gene Med* 9 (2007) 488-97.

- Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26 (1967) 365-9.
- Hollenbach, A.D., Sublett, J.E., McPherson, C.J. and Grosveld, G.: The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *Embo J* 18 (1999) 3702-11.
- Hollis, R.P., Nightingale, S.J., Wang, X., Pepper, K.A., Yu, X.J., Barsky, L., Crooks, G.M. and Kohn, D.B.: Stable gene transfer to human CD34(+) hematopoietic cells using the Sleeping Beauty transposon. *Exp Hematol* 34 (2006) 1333-43.
- Huser, D. and Heilbronn, R.: Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency. *J Gen Virol* 84 (2003) 133-7.
- Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Kugoh, H., Oshimura, M., Calos, M.P. and Sugamura, K.: Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J Gene Med* 8 (2006) 646-53.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd and Maul, G.G.: PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147 (1999) 221-34.
- Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H. and Izsvak, Z.: Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91 (1997) 501-10.
- Izsvak, Z. and Ivics, Z.: Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol Ther* 9 (2004) 147-56.
- Jahrsdorfer, B. and Weiner, G.J.: CpG oligodeoxynucleotides for immune stimulation in cancer immunotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 4 (2003) 686-90.
- James, M.B. and Giorgio, T.D.: Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol Ther* 1 (2000) 339-46.

- Jenke, A.C., Stehle, I.M., Herrmann, F., Eisenberger, T., Baiker, A., Bode, J., Fackelmayer, F.O. and Lipps, H.J.: Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 11322-7.
- Jenke, B.H., Fetzer, C.P., Stehle, I.M., Jonsson, F., Fackelmayer, F.O., Conradt, H., Bode, J. and Lipps, H.J.: An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep* 3 (2002) 349-54.
- Kaiser, J.: Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 299 (2003) 495.
- Kasahara, N., Dozy, A.M. and Kan, Y.W.: Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266 (1994) 1373-6.
- Kay, M.A. and Woo, S.L.: Gene therapy for metabolic disorders. *Trends Genet* 10 (1994) 253-7.
- Keller, E.T., Burkholder, J.K., Shi, F., Pugh, T.D., McCabe, D., Malter, J.S., MacEwen, E.G., Yang, N.S. and Ershler, W.B.: In vivo particle-mediated cytokine gene transfer into canine oral mucosa and epidermis. *Cancer Gene Ther* 3 (1996) 186-91.
- Khorsandi, S.E., Bachellier, P., Weber, J.C., Greget, M., Jaeck, D., Zacharoulis, D., Rountas, C., Helmy, S., Helmy, A., Al-Waracky, M., Salama, H., Jiao, L., Nicholls, J., Davies, A.J., Levicar, N., Jensen, S. and Habib, N.: Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther* 15 (2008) 225-30.
- Kim, D.H. and Rossi, J.J.: Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8 (2007) 173-84.
- Kim, J.M., Kim, J.S., Park, D.H., Kang, H.S., Yoon, J., Baek, K. and Yoon, Y.: Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol* 107 (2004) 95-105.
- Kiriakidou, M., Driscoll, D.A., Lopez-Guisa, J.M. and Strauss, J.F., 3rd: Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region. *DNA Cell Biol* 16 (1997) 1289-98.

- Klehr, D., Schlake, T., Maass, K. and Bode, J.: Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* 31 (1992) 3222-9.
- Kneuer, C., Ehrhardt, C., Bakowsky, H., Kumar, M.N., Oberle, V., Lehr, C.M., Hoekstra, D. and Bakowsky, U.: The influence of physicochemical parameters on the efficacy of non-viral DNA transfection complexes: a comparative study. *J Nanosci Nanotechnol* 6 (2006) 2776-82.
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K.M. and Artursson, P.: Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* 8 (2001) 1108-21.
- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. and Berns, K.I.: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2211-5.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374 (1995) 546-9.
- Kung, M., Stadelmann, B., Brodbeck, U. and Butikofer, P.: Addition of G418 and other aminoglycoside antibiotics to mammalian cells results in the release of GPI-anchored proteins. *FEBS Lett* 409 (1997) 333-8.
- Lakkaraju, A., Dubinsky, J.M., Low, W.C. and Rahman, Y.E.: Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem* 276 (2001) 32000-7.
- Landi, A., Babiuk, L.A. and van Drunen Littel-van den Hurk, S.: High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. *J Leukoc Biol* 82 (2007) 849-60.
- Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjanen, K., Urtti, A. and Syrjanen, S.: Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res* 11 (1994) 1127-31.

- Latchman, D.S.: Gene therapy with herpes simplex virus vectors: progress and prospects for clinical neuroscience. *Neuroscientist* 7 (2001) 528-37.
- Leahy, P., Carmichael, G.G. and Rossomando, E.F.: Transcription from plasmid expression vectors is increased up to 14-fold when plasmids are transfected as concatemers. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 449-50.
- Lechardeur, D., Verkman, A.S. and Lukacs, G.L.: Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 755-67.
- Lee, R.J. and Huang, L.: Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14 (1997) 173-206.
- Lewis, P., Hensel, M. and Emerman, M.: Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11 (1992) 3053-8.
- Lilley, C.E., Branston, R.H. and Coffin, R.S.: Herpes simplex virus vectors for the nervous system. *Curr Gene Ther* 1 (2001) 339-58.
- Lipps, H.J., Jenke, A.C., Nehlsen, K., Scinteie, M.F., Stehle, I.M. and Bode, J.: Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene* 304 (2003) 23-33.
- Liu, J., Jeppesen, I., Nielsen, K. and Jensen, T.G.: Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts. *Gene Ther* 13 (2006) 1188-90.
- Loc, P.V. and Stratling, W.H.: The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *Embo J* 7 (1988) 655-64.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A. and van Driel, R.: Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 6297-305.
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mouro, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A. and Mehtali, M.: In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 72 (1998) 2022-32.
- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., Hinchcliffe, M. and Rolland, A.P.: Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as

- condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release* 56 (1998) 259-72.
- Marconi, P., Krisky, D., Oligino, T., Poliani, P.L., Ramakrishnan, R., Goins, W.F., Fink, D.J. and Glorioso, J.C.: Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 11319-20.
- Markert, J.M., Parker, J.N., Buchsbaum, D.J., Grizzle, W.E., Gillespie, G.Y. and Whitley, R.J.: Oncolytic HSV-1 for the treatment of brain tumours. *Herpes* 13 (2006) 66-71.
- Marozin, S., Prank, U. and Sodeik, B.: Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol* 85 (2004) 775-86.
- Marshall, E.: Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286 (1999) 2244-5.
- Martinet, W., Schrijvers, D.M. and Kockx, M.M.: Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett* 25 (2003) 1025-9.
- Mazda, O.: Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr Gene Ther* 2 (2002) 379-92.
- Mazda, O., Satoh, E., Yasutomi, K. and Imanishi, J.: Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors. *J Immunol Methods* 204 (1997) 143-51.
- McMahon, J.M., Wells, K.E., Bamfo, J.E., Cartwright, M.A. and Wells, D.J.: Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle. *Gene Ther* 5 (1998) 1283-90.
- McManus, M.T., Petersen, C.P., Haines, B.B., Chen, J. and Sharp, P.A.: Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *Rna* 8 (2002) 842-50.
- McWhinney, C. and Leffak, M.: Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human c-myc gene. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 1233-42.

- Menon, A.G., Kuppen, P.J., van der Burg, S.H., Offringa, R., Bonnet, M.C., Harinck, B.I., Tollenaar, R.A., Redeker, A., Putter, H., Moingeon, P., Morreau, H., Melief, C.J. and van de Velde, C.J.: Safety of intravenous administration of a canarypox virus encoding the human wild-type p53 gene in colorectal cancer patients. *Cancer Gene Ther* 10 (2003) 509-17.
- Merdan, T., Kopecek, J. and Kissel, T.: Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002a) 715-58.
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J. and Kissel, T.: Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res* 19 (2002b) 140-6.
- Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. and Leder, P.: Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 13 (1999) 1918-23.
- Miller, D.G., Rutledge, E.A. and Russell, D.W.: Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* 30 (2002) 147-8.
- Miyagishi, M. and Taira, K.: U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20 (2002) 497-500.
- Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G. and Szewczyk, A.: A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 11 (2005) 990-5.
- Monaco, A.P. and Larin, Z.: YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol* 12 (1994) 280-6.
- Moreadith, R.W. and Radford, N.B.: Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J Mol Med* 75 (1997) 208-16.
- Müller, R. and R Schuhmann: Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart., 1996.
- Muzyczka, N., Berns, K.I.: Paroviridae: The viruses and their replication. Williams & Wilkins, 2001.



- Nam, C.H. and Rabbitts, T.H.: The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther* 13 (2006) 15-25.
- Namciu, S.J., Blochlinger, K.B. and Fournier, R.E.: Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 2382-91.
- Nienhuis, A.W., Dunbar, C.E. and Sorrentino, B.P.: Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 13 (2006) 1031-49.
- Nita, I., Ghivizzani, S.C., Galea-Lauri, J., Bandara, G., Georgescu, H.I., Robbins, P.D. and Evans, C.H.: Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 39 (1996) 820-8.
- O'Gorman, S., Fox, D.T. and Wahl, G.M.: Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251 (1991) 1351-5.
- O'Neal, W.K., Zhou, H., Morral, N., Aguilar-Cordova, E., Pestaner, J., Langston, C., Mull, B., Wang, Y., Beaudet, A.L. and Lee, B.: Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum Gene Ther* 9 (1998) 1587-98.
- Ogris, M. and Wagner, E.: *Gene Transfer: Delivery And Expression of DNA And RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P., Chalberg, T.W., Meuse, L., Kay, M.A. and Calos, M.P.: Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol* 20 (2002) 1124-8.
- Orschell-Traycoff, C.M., Hiatt, K., Dagher, R.N., Rice, S., Yoder, M.C. and Srour, E.F.: Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood* 96 (2000) 1380-7.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D.R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M.P. and Khavari, P.A.: Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med* 8 (2002) 1166-70.
- Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A.,

- Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A.J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R. and Grez, M.: Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12 (2006) 401-9.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S.: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16 (2002) 948-58.
- Pai, S.I., Lin, Y.Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C.F. and Wu, T.C.: Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 13 (2006) 464-77.
- Paoletti, E.: Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 11349-53.
- Paoletti, E., Lipinskas, B.R., Samsonoff, C., Mercer, S. and Panicali, D.: Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 193-7.
- Papapetrou, E.P., Ziros, P.G., Micheva, I.D., Zoumbos, N.C. and Athanassiadou, A.: Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 13 (2006) 40-51.
- Pastore, L., Morral, N., Zhou, H., Garcia, R., Parks, R.J., Kochanek, S., Graham, F.L., Lee, B. and Beaudet, A.L.: Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 10 (1999) 1773-81.
- Patil, S.D., Rhodes, D.G. and Burgess, D.J.: Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *Aaps J* 6 (2004) e29.
- Patil, S.D., Rhodes, D.G. and Burgess, D.J.: DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *Aaps J* 7 (2005) E61-77.
- Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. and Engelke, D.R.: Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20 (2002) 505-8.

- Persons, D.A.: Update on gene therapy for hemoglobin disorders. *Curr Opin Mol Ther* 5 (2003) 508-16.
- Phez, E., Faurie, C., Golzio, M., Teissie, J. and Rols, M.P.: New insights in the visualization of membrane permeabilization and DNA/membrane interaction of cells submitted to electric pulses. *Biochim Biophys Acta* 1724 (2005) 248-54.
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H.J.: A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 426-8.
- Pike-Overzet, K., de Ridder, D., Weerkamp, F., Baert, M.R., Verstegen, M.M., Brugman, M.H., Howe, S.J., Reinders, M.J., Thrasher, A.J., Wagemaker, G., van Dongen, J.J. and Staal, F.J.: Gene therapy: is IL2RG oncogenic in T-cell development? *Nature* 443 (2006) E5; discussion E6-7.
- Pouton, C.W., Lucas, P., Thomas, B.J., Uduehi, A.N., Milroy, D.A. and Moss, S.H.: Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release* 53 (1998) 289-99.
- Pringle, I.A., McLachlan, G., Collie, D.D., Sumner-Jones, S.G., Lawton, A.E., Tennant, P., Baker, A., Gordon, C., Blundell, R., Varathalingam, A., Davies, L.A., Schmid, R.A., Cheng, S.H., Porteous, D.J., Gill, D.R. and Hyde, S.C.: Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung. *J Gene Med* 9 (2007) 369-80.
- Qian, H., Yu, J., Li, Y., Wang, H., Song, C., Zhang, X., Liang, X., Fu, M. and Lin, C.: RNA interference of metastasis-associated gene 1 inhibits metastasis of B16F10 melanoma cells in a C57BL/6 mouse model. *Biol Cell* 99 (2007) 573-81.
- Quenneville, S.P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., Beaulieu, J., Caron, N.J., Skuk, D., Mills, P., Olivares, E.C., Calos, M.P. and Tremblay, J.P.: Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther* 10 (2004) 679-87.

- Rainov, N.G. and Ren, H.: Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy-- what have we learned? *J Neurooncol* 65 (2003) 227-36.
- Rakhmievich, A.L., Turner, J., Ford, M.J., McCabe, D., Sun, W.H., Sondel, P.M., Grota, K. and Yang, N.S.: Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 6291-6.
- Räty, J., Pikkarainen, J., Wirth, T. and Ylä-Herttuala, S.: Gene Therapy: The First Approved Gene-Based Medicines, Molecular Mechanisms and Clinical Indications. *Curr Mol Pharm* 1 (2008) 13-23.
- Rawlins, E.L. and Hogan, B.L.: Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2008).
- Raymond, C.S. and Soriano, P.: High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS ONE* 2 (2007) e162.
- Razin, S.V., De Moura Gallo, C.V. and Scherrer, K.: Characterization of the chromatin structure in the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Mol Gen Genet* 242 (1994) 649-52.
- Remaut, K., Sanders, N.N., Fayazpour, F., Demeester, J. and De Smedt, S.C.: Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. *J Control Release* 115 (2006) 335-43.
- Ritter, T., Lehmann, M. and Volk, H.D.: Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs* 16 (2002) 3-10.
- Riu, E., Chen, Z.Y., Xu, H., He, C.Y. and Kay, M.A.: Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol Ther* 15 (2007) 1348-55.
- Sato, T., Ishii, T. and Okahata, Y.: In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22 (2001) 2075-80.
- Sauer, B.: Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14 (1998) 381-92.

- Sauer, B. and Henderson, N.: Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5166-70.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J. and Knippers, R.: An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J* 23 (2004) 191-201.
- Schakowski, F., Buttgereit, P., Mazur, M., Marten, A., Schottker, B., Gorschluter, M. and Schmidt-Wolf, I.G.: Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genet Vaccines Ther* 2 (2004) 1.
- Scherer, L., Rossi, J.J. and Weinberg, M.S.: Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther* 14 (2007) 1057-64.
- Scherr, M. and Eder, M.: Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 2 (2002) 45-55.
- Schnierle, B.S., Stitz, J., Bosch, V., Nocken, F., Merget-Millitzer, H., Engelstadter, M., Kurth, R., Groner, B. and Cichutek, K.: Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 8640-5.
- Senior, J.H., Trimble, K.R. and Maskiewicz, R.: Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1070 (1991) 173-9.
- Shin, J.Y., Suh, D., Kim, J.M., Choi, H.G., Kim, J.A., Ko, J.J., Lee, Y.B., Kim, J.S. and Oh, Y.K.: Low molecular weight polyethylenimine for efficient transfection of human hematopoietic and umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Biochim Biophys Acta* 1725 (2005) 377-84.
- Smith, A.E.: Viral vectors in gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 49 (1995) 807-38.
- Stehle, I.M., Scinteie, M.F., Baiker, A., Jenke, A.C. and Lipps, H.J.: Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Res* 11 (2003) 413-21.

- Stoll, S.M. and Calos, M.P.: Extrachromosomal plasmid vectors for gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 4 (2002) 299-305.
- Sudo, K., Ogata, M., Sato, Y., Iguchi-Arigo, S.M. and Arigo, H.: Cloned origin of DNA replication in c-myc gene can function and be transmitted in transgenic mice in an episomal state. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 5425-32.
- Surabhi, R.M. and Gaynor, R.B.: RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 76 (2002) 12963-73.
- Surovoy, A., Flechsler, I., Gaunitz, F., Papke, M. and Jung, G.: Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol* 451 (1998) 457-60.
- Szilvassy, S.J., Meyerrose, T.E. and Grimes, B.: Effects of cell cycle activation on the short-term engraftment properties of ex vivo expanded murine hematopoietic cells. *Blood* 95 (2000) 2829-37.
- Szilvassy, S.J., Meyerrose, T.E., Ragland, P.L. and Grimes, B.: Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin. *Exp Hematol* 29 (2001) 1494-502.
- Takeuchi, T., Nomura, T., Tsujita, M., Suzuki, M., Fuse, T., Mori, H. and Mishina, M.: Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 293 (2002) 953-7.
- Tan, J., Yang, N.S., Turner, J.G., Niu, G.L., Maassab, H.F., Sun, J., Herlocher, M.L., Chang, A.E. and Yu, H.: Interleukin-12 cDNA skin transfection potentiates human papillomavirus E6 DNA vaccine-induced antitumor immune response. *Cancer Gene Ther* 6 (1999) 331-9.
- Tang, M.X., Redemann, C.T. and Szoka, F.C., Jr.: In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* 7 (1996) 703-14.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. and Kay, M.A.: Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4 (2003) 346-58.

- Thomas, M. and Klibanov, A.M.: Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 14640-5.
- Thorpe, H.M. and Smith, M.C.: In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 5505-10.
- Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S. and Calos, M.P.: Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 3926-34.
- Tsimbouri, P., Drotar, M.E., Coy, J.L. and Wilson, J.B.: bcl-xL and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene* 21 (2002) 5182-7.
- von Levetzow, G., Spanholtz, J., Beckmann, J., Fischer, J., Kogler, G., Wernet, P., Punzel, M. and Giebel, B.: Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 15 (2006) 278-85.
- Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K. and Flaschel, E.: Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application. *J Biotechnol* 105 (2003) 205-13.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. and Birnstiel, M.L.: Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 7934-8.
- Wagner, E.K. and Bloom, D.C.: Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev* 10 (1997) 419-43.
- Wattiaux, R., Jadot, M., Warnier-Pirotte, M.T. and Wattiaux-De Coninck, S.: Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett* 417 (1997) 199-202.
- Weintraub, H., Cheng, P.F. and Conrad, K.: Expression of transfected DNA depends on DNA topology. *Cell* 46 (1986) 115-22.

- Wells, D.J.: Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 11 (2004) 1363-9.
- Williams, D.A.: Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? *Blood* 81 (1993) 3169-72.
- Williams, D.A. and Smith, F.O.: Progress in the use of gene transfer methods to treat genetic blood diseases. *Hum Gene Ther* 11 (2000) 2059-66.
- Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Johnston, R.B., Jr., Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R.H., Foster, C.B., Chanock, S.J. and Dickler, H.: Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79 (2000) 155-69.
- Wolfert, M.A., Dash, P.R., Nazarova, O., Oupicky, D., Seymour, L.W., Smart, S., Strohm, J. and Ulbrich, K.: Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem* 10 (1999) 993-1004.
- Wolff, J.A. and Budker, V.: The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 54 (2005) 3-20.
- Wolff, J.A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A. and Chong, W.: Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 11 (1991) 474-85.
- Woods, N.B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C. and Verma, I.M.: Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 440 (2006) 1123.
- Wu, H., Dmitriev, I., Kashentseva, E., Seki, T., Wang, M. and Curiel, D.T.: Construction and characterization of adenovirus serotype 5 packaged by serotype 3 hexon. *J Virol* 76 (2002) 12775-82.
- Xie, T.D. and Tsong, T.Y.: Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. V. Effects of DNA topology on surface binding, cell uptake, expression, and integration into host chromosomes of DNA in the mammalian cell. *Biophys J* 65 (1993) 1684-9.
- Xu, Y. and Szoka, F.C., Jr.: Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35 (1996) 5616-23.



- Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. and Hayakawa, T.: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272 (2001) 149-56.
- Yang, J.P. and Huang, L.: Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 4 (1997) 950-60.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. and Baltimore, D.: Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89 (1997) 1067-76.
- Yates, J.L. and Guan, N.: Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* 65 (1991) 483-8.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B.: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313 (1985) 812-5.
- Ye, G.N., Daniell, H. and Sanford, J.C.: Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* 15 (1990) 809-19.
- Yew, N.S., Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.H., Tousignant, J.D., Scheule, R.K. and Cheng, S.H.: CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 5 (2002) 731-8.
- Yoshino, H., Hashizume, K. and Kobayashi, E.: Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 13 (2006) 1696-702.
- Yu, J.Y., DeRuiter, S.L. and Turner, D.L.: RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 6047-52.
- Yuan, J., Wang, X., Zhang, Y., Hu, X., Fei, J. and Li, N.: Mammalian Pol III promoter H1 can transcribe shRNA inducing RNAi in chicken cells. *Mol Biol Rep* 33 (2006) 33-41.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P.: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 (2000) 25-33.

- Zhang, G., Budker, V. and Wolff, J.A.: High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10 (1999) 1735-7.
- Zhou, X. and Huang, L.: DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1189 (1994) 195-203.
- Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y. and Debs, R.: Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261 (1993) 209-11.
- Zhu, X., Venkataprasad, N., Ivanyi, J. and Vordermeier, H.M.: Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 92 (1997) 6-9.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AB	Antibiotika
ADA	Adenosindeaminase Defizienz
A/T	Adenosin / Thymin
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
br-PEI	branched (verzweigtes) Polyethylenimin
CAG	Chicken Beta-Actin
ccc	covalently closed circular
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CpG (CG)	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DC-chol.	3,[N-(N1,N-Dimethylethylendiamin)- carbamoyl]cholesterol
DIG	Digoxigenin
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCS	Di-Octadecylamidoglycylspermin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSPA	2,3-Dioleyloxy-N-[2-(Spermincarbox-amido)ethyl]-N,N- Dimehtyl-1-propanaminium
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropan
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleyloxy)-propyl-N,N,N- Trimethylammoniumchlorid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EBNA	EBV Nukleäre Antigen 1

EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1 $\alpha$	Elongation Factor 1 $\alpha$
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein
FP	Forward Primer
FSC	Forward Angle Light Scatter
$\gamma_c$	Common Gamma C Chain
HAC	Human Artificial Chromosome
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSV	Herpes-Simplex-Virus
huINF	humanes Interferon beta
huMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IE2	immediate early region 2
i.p.	intraperitoneal
ITR	Inverted Terminal Repeat
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LMO-2	LIM domain only 2
l-PEI	lineares Polyethylenimin
LTA	Latency-associated Transcript
LTR	Long Terminal Repeat
MEM	Minimal Essential Medium
$\mu$ F	Microfarad
$\mu$ g	Microgramm

miRNA	micro RNA
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLV	Molony-Maus-Leukämie-Virus
mM	Millimolar
MNZ	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
n	Replikate
Neo <sup>R</sup>	Neomycin-Geneticin-Resistenzkassette
NLS	Nuclear Localization Signal
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
pDNA	Plasmid-DNA
PEI	Polyethylenimin
PGK	Phosphoglycerat Kinase
pH	potentia Hydrogenii
PLL	Poly-L-Lysin
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	RNA Inducing Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RP	Reverse Primer
RSV	Rous Sarkoma Virus
SAF-A	Scaffold Attachment Factor-A
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase

SCF	Stem Cell Factor
siRNA	small interfering RNA
S/MAR	Scaffold Matrix Attachment Region
SSC	Side Angle Light Scatter
SSR	Site Specific Recombinase
SV40	Simian Virus 40
TPO	Thrombopoietin
TR	Terminal Repeat
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-CGD	X-chromosomale chronischen Granulomatose
X-SCID	X-chromosomale schwere kombinierte Immundefizienz
YAC	Yeast Artificial Chromosome

## Publikationen

### Journal Artikel

2008 **Maucksch C**, Hennen E, Bohla A, Hoffmann F, Aneja MK, Elfinger M, Rosenecker J and Rudolph C

Tissue specific activity of Streptomyces bacteriophage  $\phi$ C31 integrase.  
Nucleic Acids Research, eingereicht

**Maucksch C**, Hoffmann F, Schleaf M, Aneja MK, Elfinger M, Hartl D and Rudolph C

Transgene expression of transfected supercoiled Plasmid-DNA concatemers in mammalian cells.  
Journal of Gene Medicine, eingereicht

Elfinger M, Uezguen S, Golas MM, Sander B, **Maucksch C**; Stark H, Rudolph C.

Surface adsorbed insulin improves gene delivery of PEI-pDNA nanoparticles to alveolar-like epithelial cells.  
Journal of Controlled Release, eingereicht

2007 Dames P, Laner A, **Maucksch C**, Aneja MK, Rudolph C

Targeting of the glucocorticoid hormone receptor with Plasmid-DNA comprising glucocorticoid response elements improves nonviral gene transfer efficiency in the lungs of mice.

J Gene Med. 2007 Sep;9(9):820-9.

Elfinger M, **Maucksch C**, Rudolph C

Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells.

Biomaterials. 2007 Aug;28(23):3448-55.

2006 Weiss SI, Sieverling N, Niclasen M, **Maucksch C**, Thunemann AF,

Mohwald H, Reinhardt D, Rosenecker J, Rudolph C.

Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethyleneglycol (PEG)-graft-copolymers as novel synthetic gene carriers.

Biomaterials. 2006 Apr;27(10):2302-12.

#### Buchkapitel

2008 **Maucksch C**, Aneja MK and Rudolph C

„Phage integrases for mediating genomic integration and DNA recombination“ in “Genetic Recombination Research Progress“

Nova Science Publishers, Inc., USA, ISBN 978-1-60456-482-2

#### Tagungsbeiträge

2008 Bohla A, Elfinger M, **Maucksch C**, Rudolph C

Expression of Recombinant PhiC31 Integrase-TAT Fusion Protein and Delivery to Mammalian Cells

Molecular Therapy Abstracts ASGT 11th Annual Meeting

May 28- June 1, 2008

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

Different Activity of the  $\phi$ C31 Integrase in Lung- and Blood Cells

Molecular Therapy Abstracts ASGT 11th Annual Meeting

May 28- June 1, 2008



Elfinger M, Uezguen S, Sieverling N, Aneja MK, **Maucksch C**, Rudolph C  
Targeting of the  $\beta$ 2-Adrenoceptor Increases Nonviral Gene Delivery to  
Pulmonary Epithelial Cells *In Vitro* and Lungs *In Vivo*  
Molecular Therapy Abstracts ASGT 11th Annual Meeting  
May 28- June 1, 2008

2007 **Maucksch C**, Hoffmann F, Schleaf M, Aneja MK, Elfinger M, Hartl D and  
Rudolph C  
Analysis of the Transfection Behaviour of Supercoiled Plasmid-DNA  
Concatemers *in Vitro*  
Molecular Therapy Abstracts ASGT 10th Annual Meeting  
May 30- June 3, 2007

2006 Aneja MK, **Maucksch C**, Rudolph C  
PhiC31 integrase mediated long-term gene expression in lung cells in vitro  
and in vivo  
Abstract Book ESGT 14th Annual Meeting 2006

Üzgün S, Akademir Ö, **Maucksch C**, Lutz F, Rudolph C  
Novel poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)-graft-  
polyethylenglycol (pDMAEMA-g-PEG) copolymers as nonviral gene  
transfer agents  
Abstract Book ESGT 14th Annual Meeting 2006

Dames P, Laner A, **Maucksch C**, Imker R, Rudolph C  
Targeting of the glucocorticoid hormone receptor for nonviral gene delivery  
Abstract Book ESGT 14th Annual Meeting 2006

2005 Weiss SI, Sieverling M, Niclasen M, **Maucksch C**, Thünemann AF,  
Rosenecker J, Rudolph C  
Mannuronic acid-functionalized PEI-PEG-graft-copolymers as novel  
synthetic gene carriers  
Abstract Book ESGT 13th Annual Meeting 2005

**Maucksch C**, Hoffmann F, Schleef M, Aneja MK, Rosenecker J, Rudolph C  
In vitro transfection efficiency of concatemeric Plasmid-DNA using  
nonviral transfection methods  
Abstract Book ESGT 13th Annual Meeting 2005